



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

“Preparação e caracterização de sistemas híbridos para biocélulas  
enzimáticas operando com etilenoglicol/O<sub>2</sub>”

Jesimiel Glaycon Rodrigues Antônio

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade  
de São Paulo, como parte das exigências para a  
obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

Ribeirão Preto - SP

2021



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

“Preparação e caracterização de sistemas híbridos para biocélulas  
enzimáticas operando com etilenoglicol/O<sub>2</sub>”

*Preparation and characterization of hybrid systems for enzymatic biocells  
operating with ethylene glycol/O<sub>2</sub>*

**Versão Corrigida**

(Versão original encontra-se na unidade que aloja o Programa de Pós-graduação)

Jesimiel Glaycon Rodrigues Antônio

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade  
de São Paulo, como parte das exigências para a  
obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

Orientadora: Professora Dra. Adalgisa Rodrigues de Andrade

Coorientador: Dr. Jefferson Honorio Franco

Ribeirão Preto - SP

2021

## FICHA CATALOGRÁFICA

Antônio, J. G. R.

Preparação e caracterização de sistemas híbridos para biocélulas enzimáticas operando com etilenoglicol/O<sub>2</sub>.

Ribeirão Preto, 2021.

96 p.: il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Química.

Orientadora: Andrade, Adalgisa Rodrigues de.

Coorientador: Franco, Jefferson Honorio.

1. Biocélula a combustível enzimática. 2. Biocélula híbrida. 3. Etilenoglicol. 4. Oxalato Oxidase. 5. TEMPO-NH<sub>2</sub>. 6. Nanocatalisadores. 7.MWCNTs.

Dedico este trabalho ao destino, que me guiou até aqui  
e espero que me acompanhe nos novos caminhos.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente eu gostaria de agradecer a CAPES pela bolsa concedida, sem ela não seria possível a realização deste trabalho.

Em seguida a minha orientadora Professora Dra. Adalgisa Rodrigues de Andrade por ter me dado a oportunidade de aprendizado e trabalho no grupo LEEA desde 2018. Ao meu querido coorientador Dr. Jefferson Honorio Franco pela paciência e grande auxílio no percurso.

A todos os membros do grupo LEEA, mas especialmente para os membros que convivi por mais tempo: Doutora Erica, Mércia, Gisele, Guilherme, Fabiano, Doutora Thamires, Beatriz, Alexandre e todos os outros.

Aos membros de laboratórios parceiros que foram essenciais para este projeto: Professor Dr. Thiago dos Santos Almeida da UFTM, Dra. Paula Zaghetto de Almeida e Professora Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli do departamento de biologia da FFCLRP-USP.

Aos meus amigos dos outros laboratórios pela companhia, a todos os professores pelos ensinamentos, aos técnicos, por me ajudarem até em momentos que eu não esperava, aos guardinhas por sempre me desejarem boa sorte na pesquisa e a Rose pelo bom humor com os alunos diariamente nos corredores.

Ao Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP) que foi a minha segunda casa desde 2015, levarei muitas boas memórias.

E por último e não menos importante aos meus pais, sem eles eu não estaria realizando o meu sonho de aprender pelo menos um pouco de ciência.

Muito obrigado!

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

## RESUMO

Antônio Rodrigues, Jesimiel Glaycon. **Preparação e caracterização de sistemas híbridos para biocélulas enzimáticas operando com etilenoglicol/O<sub>2</sub>**. 2021. 96 p.

Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Este trabalho descreve a investigação de sistemas híbridos para o desenvolvimento de uma biocélula a combustível etilenoglicol/O<sub>2</sub> visando a oxidação completa do combustível. Os catalisadores de nanopartículas de Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> depositadas sobre nanotubos de carbono de parede múltiplas (MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>) e 4-amino-TEMPO (TEMPO-NH<sub>2</sub>) demonstraram atividade eletrocatalítica para a oxidação do etilenoglicol (EG) com um pico de oxidação bem definido. A enzima oxalato oxidase (OxOx) obtida pela *Ceriporiopsis subvermispora* foi empregada como catalisador na quebra da ligação C-C do substrato. As voltametrias cíclicas do sistema híbrido MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx, na presença de EG apresentaram uma corrente 1,6 maior em relação a densidade de corrente observada para o MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>; já TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx foi em média 1,23 maior quando comparada com o TEMPO-NH<sub>2</sub>. Análises voltamétricas, cronoamperométricas e de eletrólises demonstraram que a OxOx não oxida diretamente o EG. Foram realizados estudos cronoamperométricos do EG e dos subprodutos de oxidação (glicolaldeído (GAlD), ácido fórmico (AF), ácido glicólico (AG), ácido glioxílico (AGO) e ácido oxálico (AO)) no sistema MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx e MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> em um potencial fixo de 0,9 V vs Ag/AgCl. O sistema híbrido apresentou corrente superior para todos os substratos analisados. O sistema TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx e TEMPO-NH<sub>2</sub> após injeções sucessivas de EG em um potencial fixo de 0,75 V vs Ag/AgCl, mostraram um aumento médio de 14% na presença da enzima OxOx. A eletrólise de longo prazo em um potencial de 0,5 V vs Ag/AgCl para o MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx gerou uma densidade de corrente 65% maior em comparação com o sistema contendo apenas MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>; e as eletrolises em 0,75 V vs Ag/AgCl do TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx gerou uma densidade de corrente 58%

maior em comparação com o sistema contendo apenas TEMPO-NH<sub>2</sub>. Os resultados obtidos pela técnica de CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) para o MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx e TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx mostraram a formação de CO<sub>2</sub>, confirmando a coleta de todos os 10 elétrons do EG. Eletrólises com os subprodutos de oxidação do EG e ensaios com a OxOx, possibilitaram ser proposto um provável mecanismo de oxidação para ambos os sistemas híbridos. MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx atingiu  $930 \pm 85 \mu\text{A cm}^{-2}$ ,  $332 \pm 28 \mu\text{W cm}^{-2}$  e VCA (tensão de circuito aberto) de  $0,643 \pm 0,020 \text{ V}$ , todos superiores ao sistema simples em 38,3% para a densidade de e potência, 28% para a densidade de corrente, e 18% para o VCA.

**Palavras chaves:** Biocélula a combustível enzimática. Biocélula híbrida. Etilenoglicol. Oxalato oxidase. TEMPO-NH<sub>2</sub>. Nanocatalisadores. MWCNTs.

## ABSTRACT

Antônio Rodrigues, Jesimiel Glaycon. **Preparation and characterization of hybrid systems for enzymatic biocells operating with ethylene glycol/O<sub>2</sub>. 2021. 96 p.** Dissertation (Masters in Chemistry) – Department of Chemistry, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters at Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

This work describes the investigation of hybrid systems for the development of an ethylene glycol/O<sub>2</sub> biofuel cell aiming at the complete oxidation of the fuel. The catalysts of Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> nanoparticles deposited on multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>) and 4-amino-TEMPO (TEMPO-NH<sub>2</sub>) catalysts showed electrocatalytic activity for the oxidation of ethylene glycol (EG) with a well-defined oxidation peak. The oxalate oxidase (OxOx) enzyme obtained by *Ceriporiopsis subvermispora* was employed to break the C-C bond of the substrate. Cyclic voltammetric curves of the hybrid system in the presence of ethylene glycol of the MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx system showed a current 1.6 higher than the current density observed in the absence of the enzyme MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>, whereas the current of TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx was on average 1.23 higher when compared to TEMPO-NH<sub>2</sub>. Cyclic voltammetric, chronoamperometric, and electrolysis reveals that OxOx does not oxidize directly the EG. Chronoamperometric assays of EG and its oxidation byproducts (GAlD, FA, AG, AGO, and AO) for MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx and MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> at a fixed potential of 0.9 V vs Ag / AgCl, showed that the hybrid system presented a higher current for all analyzed substrates. And the chronoamperometric curves for TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx and TEMPO-NH<sub>2</sub>, after successive injections of EG at a fixed potential of 0.75 V vs Ag / AgCl, showed that in the system in the presence of OxOx there is an average increase of 14% in current density relative to the system in its absence. Long-term electrolysis at a potential of 0.5 V vs Ag/AgCl for MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx generated a 65% higher current density compared to the system containing only MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>; the 0.75 V vs Ag/AgCl electrolysis of TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx generated a 58% higher current density compared to the system containing only TEMPO-NH<sub>2</sub>. The results obtained by the HPLC (High performance liquid chromatograph) technique for MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx and TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx showed the formation of CO<sub>2</sub>, confirming the collection of all 10



EG electrons. Electrolysis with EG oxidation by-products and assays with OxOx, made it possible to propose a probable oxidation mechanism for both hybrid systems. MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx reached  $930 \pm 85 \mu\text{A cm}^{-2}$ ,  $332 \pm 28 \mu\text{W cm}^{-2}$  and OCV (open circuit voltage) of  $0.643 \pm 0.020 \text{ V}$ , 38.3% superior to the simple system for power density, 28% for current density, and 18% for the OCV.

Keywords: Enzymatic biofuel cell. Hybrid biofuel cell. Ethylene glycol. Oxalate oxidase. TEMPO-NH<sub>2</sub>. Nanocatalysts. MWCNTs.

## LISTA DE FIGURA

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1:</b> Fonte da oferta interna de energia elétrica no Brasil em 2019.....  | 2  |
| <b>Figura 2:</b> Esquema representativo do funcionamento de uma célula a combustível $H_2/O_2$ .....   | 3  |
| <b>Figura 3:</b> Pesquisa bibliográfica conduzida utilizando o termo “biofuel cell”.....   | 4  |
| <b>Figura 4:</b> Representação de uma biocélula.....   | 6  |
| <b>Figura 5:</b> Reação catalisada pela OxOx.....  | 12 |
| <b>Figura 6:</b> Proposta de mecanismo da oxidação de oxalato pela OxOx.....   | 13 |
| <b>Figura 7:</b> Mecanismo de ação do TEMPO.....   | 15 |
| <b>Figura 8:</b> Nanotubos de carbono.....   | 17 |
| <b>Figura 9:</b> Pesquisa bibliográfica conduzida no Science direct utilizando o termo “biofuel cell” (vermelho), “biofuel cell/CNT” (verde) e “biofuel cell/MWCNT” (azul)....   | 18 |
| <b>Figura 10:</b> Placa de cultivo da da <i>Pichia pastori</i> KM71H utilizando como meio o YPD.....   | 23 |
| <b>Figura 11:</b> Eletrocatalisadores metálicos obtidos.....   | 27 |
| <b>Figura 12:</b> Eletrodos utilizados nos ensaios eletroquímicos. ....  | 28 |
| <b>Figura 13:</b> Célula eletroquímica utilizada nas análises de voltametria cíclica e cronoamperometria.....  | 29 |
| <b>Figura 14:</b> Esquema representativo da célula eletroquímica para os testes de potência.....   | 30 |
| <b>Figura 15:</b> Célula eletroquímica de três compartimentos utilizada nos experimentos de eletrolise.....  | 31 |
| <b>Figura 16:</b> Esquema da aferição da atividade enzimática da OxOx.....   | 34 |
| <b>Figura 17:</b> Absorbância em 650 nm em relação ao tempo, nos ensaios de atividade enzimática da OxOx em tampão ácido acético 40 mM pH 4.0.....   | 35 |
| <b>Figura 18:</b> Curva de quantificação de proteína (0-5 $\mu$ g) realizada pelo método de Bradford.....  | 36 |
| <b>Figure 19:</b> Padrões de DRX dos catalisadores.....  | 37 |
| <b>Figura 20:</b> Curvas voltamétricas na presença (linha sólida) e ausência (linhas tracejadas) de EG (100 mmol L <sup>-1</sup> ) em MWCNTs-Pt (linha preta) e MWCNTs-Pt <sub>65</sub> Sn <sub>35</sub> (linha vermelha)..... | 39 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 21:</b> TCA do etilenoglicol para ânodo de MWCNTs-Pt (linha preta), MWCNTs-Pt <sub>65</sub> Sn <sub>35</sub> (linha vermelha) e o experimento de controle (eletrodo de carbono vítreo na ausência de nanopartículas - linha tracejada cinza).....  | 40 |
| <b>Figura 22:</b> Corrente ao final do ciclo (120 s) da TCA do EG para ânodo de MWCNTs-Pt (círculo preto), MWCNTs-Pt <sub>65</sub> Sn <sub>35</sub> (quadrado vermelho) e o experimento de controle (eletrodo de carbono vítreo na ausência de nanopartículas - triangulo cinza).....  | 41 |
| <b>Figura 23:</b> Voltametrias cíclicas do sistema híbrido metálico (MWCNTs-Pt <sub>65</sub> Sn <sub>35</sub> + OxOx).....   | 42 |
| <b>Figura 24:</b> Curvas voltamétricas do ensaio enzimático (0,03 U mL <sup>-1</sup> OxOx) em eletrodo de carbono vítreo com diferentes concentrações de EG.....   | 43 |
| <b>Figura 25:</b> Ensaios cronoamperométricos realizados na presença de MWCNTs-Pt <sub>65</sub> Sn <sub>35</sub> + OxOx (linha azul), MWCNTs-Pt <sub>65</sub> Sn <sub>35</sub> (linha vermelha) e experimento controle (eletrodo de carbono vítreo no eletrólito - linha tracejada cinza).....   | 44 |
| <b>Figura 26:</b> Curvas cronoamperométricas da oxidação do etilenoglicol (100 mmol L <sup>-1</sup> ) na presença de MWCNTs-Pt <sub>65</sub> Sn <sub>35</sub> + OxOx (linha azul), MWCNTs-Pt <sub>65</sub> Sn <sub>35</sub> (linha vermelha), enzima pura (eletrodo de papel de carbono na presença de OxOx - linha verde) e experimento controle (MWCNTs-Pt <sub>65</sub> Sn <sub>35</sub> + OxOx na presença de ES - linha cinza tracejada)..... | 45 |
| <b>Figura 27:</b> Cromatogramas dos produtos formados para a análise de 12h das eletrólises de EG (100 mmol L <sup>-1</sup> ) na presença de MWCNTs-Pt <sub>65</sub> Sn <sub>35</sub> (A= 0h e B= 12h) e MWCNTs-Pt <sub>65</sub> Sn <sub>35</sub> + OxOx (C=0h e D= 12h).....  | 47 |
| <b>Figura 28:</b> Distribuição dos produtos da oxidação do EG (100 mmol L <sup>-1</sup> ) após 12h de eletrólise em MWCNTs-Pt <sub>65</sub> Sn <sub>35</sub> + OxOx (azul) e MWCNTs-Pt <sub>65</sub> Sn <sub>35</sub> (vermelho).....  | 48 |
| <b>Figura 29:</b> Oxidação do ácido fórmico.....   | 51 |
| <b>Figura 30:</b> Oxidação do ácido glioxílico.....  | 51 |
| <b>Figura 31:</b> Oxidação do ácido glicólico.....   | 52 |
| <b>Figura 32:</b> Cromatogramas obtidos para a reação do OxOx com os subprodutos da oxidação do etilenoglicol.....   | 52 |
| <b>Figura 33:</b> Proposta do mecanismo de oxidação do EG MWCNTs-Pt <sub>65</sub> Sn <sub>35</sub> + OxOx.....   | 54 |
| <b>Figura 34:</b> Curvas de densidade de potência da célula de biocombustível de ETG/O <sub>2</sub> .<br>.....   | 55 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 35:</b> Voltametrias cíclicas do sistema híbrido orgânico (TEMPO-NH <sub>2</sub> +OxOx).....  | 57 |
| <b>Figura 36:</b> Titulação cronoamperométrica do etilenoglicol para TEMPO-NH <sub>2</sub> (linha vermelho-circulo), TEMPO-NH <sub>2</sub> + OxOx (linha azul-triângulo) e eletrólito de suporte (linha cinza-quadrado).....  | 58 |
| <b>Figura 37:</b> Curvas cronoamperométricas da oxidação do etilenoglicol (100 mmol L <sup>-1</sup> ) na presença de TEMPO-NH <sub>2</sub> +OxOx (linha azul), TEMPO-NH <sub>2</sub> (linha vermelha), enzima pura (eletrodo de papel de carbono na presença de OxOx - linha verde tracejada) e experimento controle (TEMPO-NH <sub>2</sub> +OxOx na presença de ES - linha cinza tracejada)..... | 60 |
| <b>Figura 38:</b> Cromatogramas dos produtos formados para a análise de 12h das eletrolise de EG (100 mmol L <sup>-1</sup> ) na presença de TEMPO-NH <sub>2</sub> (A= 0h e B= 12h) e TEMPO-NH <sub>2</sub> +OxOx (C=0h e D= 12h).....   | 61 |
| <b>Figura 39:</b> Distribuição dos produtos da oxidação do EG (100 mmol L <sup>-1</sup> ) após 12h de eletrólise em TEMPO-NH <sub>2</sub> +OxOx (azul) e TEMPO-NH <sub>2</sub> (vermelho).....  | 62 |
| <b>Figura 40:</b> Curvas cronoamperométricas da oxidação do glicolaldeído (linha roxa), ácido glicólico (linha laranja), ácido glioxílico (linha verde) e ácido fórmico (rosa) na presença de TEMPO-NH <sub>2</sub> .....   | 65 |
| <b>Figura 41:</b> Cromatogramas dos produtos formados para a análise de 12h da eletroxidação de (A) glicolaldeído, (B) ácido glicólico e (C) ácido glioxílico (D) ácido fórmico na presença de TEMPO-NH <sub>2</sub> .....  | 65 |
| <b>Figura 42:</b> Proposta do mecanismo de oxidação do EG TEMPO-NH <sub>2</sub> +OxOx.....  | 67 |
| <b>Figura A1:</b> Curvas voltamétricas em diferenças concentrações de EG com eletrodos modificados por MWCNTs-Pt.....   | 90 |
| <b>Figura A2:</b> Curvas voltamétricas em diferenças concentrações de EG com eletrodos modificados por MWCNTs-Pt <sub>65</sub> Sn <sub>35</sub> .....   | 90 |
| <b>Figura A3:</b> Curvas voltamétricas do sistema MWCNTs-Pt <sub>65</sub> Sn <sub>35</sub> (linha vermelha), MWCNTs-Pt <sub>65</sub> Sn <sub>35</sub> (linha azul) e ES (linha pontilhada cinza) com os subprodutos (20 mmol L <sup>-1</sup> ) de oxidação do EG.....   | 91 |
| <b>Figura A4:</b> Cromatograma (detector RID) de 0h de EG (100 mmol L <sup>-1</sup> ) antes da eletrólise com MWCNTs-Pt <sub>65</sub> Sn <sub>35</sub> .....  | 92 |
| <b>Figura A5:</b> Ensaios cronoamperométricos realizados na presença de TEMPO-NH <sub>2</sub> +OxOx (linha azul) e TEMPO-NH <sub>2</sub> (linha vermelha).....  | 93 |

**Figura A6** - Curvas voltamétricas do sistema TEMPO-NH<sub>2</sub> (linha vermelha), TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx (linha azul) e ES (linha pontilhada cinza) com os subprodutos 20 mmol L<sup>-1</sup> de oxidação do EG.....94

## LISTA DE TABELA

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1:</b> Cascata híbridas em biocélulas a combustível.....   | 11 |
| <b>Tabela 2:</b> Propriedades físicas dos MWCNTs e SWCNTs.....   | 17 |
| <b>Tabela 3:</b> Protocolo da quantificação proteica pelo método de Bradford.....  | 25 |
| <b>Tabela 4:</b> Atividade enzimática da OxOx.....   | 36 |
| <b>Tabela 5:</b> Atividade enzimática da enzima OxOx para diferentes substratos.....   | 36 |
| <b>Tabela 6:</b> Distribuição dos produtos (mmol L <sup>-1</sup> ) da oxidação do EG (100 mmol L <sup>-1</sup> ) após 24h, 48h e 72h de eletrólise.....  | 49 |
| <b>Tabela 7:</b> Eletrólises (12h – 0,5 V vs Ag/AgCl) e ensaios enzimáticos (24h - 0,03 U mL <sup>-1</sup> OxOx) para os subprodutos (100 mmol L <sup>-1</sup> ) da oxidação do EG em pH 5,5.....                        | 53 |
| <b>Tabela 8:</b> PCA (V) e densidade de potência (μW cm <sup>-2</sup> ) para sistemas híbridos.....  | 56 |
| <b>Tabela 9:</b> Distribuição dos produtos (mmol L <sup>-1</sup> ) da oxidação do EG (100 mmol L <sup>-1</sup> ) após 24h, 48h e 72h.....  | 63 |
| <b>Tabela 10:</b> Produtos (mmol L <sup>-1</sup> ) e carga (Coulombs) após 72h de eletrólises para os sistemas MWCNTs-Pt <sub>65</sub> Sn <sub>35</sub> +OxOx (inorgânico) e TEMPO-NH <sub>2</sub> +OxOx (orgânico)..... | 64 |
| <b>Tabela 11:</b> Eletrólises (12h – 0,75 V vs Ag/AgCl) TEMPO-NH <sub>2</sub> para os subprodutos (100 mmol L <sup>-1</sup> ) da oxidação do EG em pH 5,5.....   | 66 |

## LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

ABTS - (2,2'-Azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) sal diamônio)

ADH - álcool desidrogenase

AF - Ácido fórmico

AG - ácido glicólico

AGO - ácido glioxílico

AldH - aldeído desidrogenase (AldH)

AO - ácido oxálico (AO)

ATP - adenosina trifosfato

BSA - albumina de soro bovino

CNT – nanotubos de carbono

EDX - Espectroscopia de raios X por dispersão em energia

EBFC – *Enzymatic biofuel cell*

EG - etilenoglicol

ES - eletrólito de suporte

FoDH - formato desidrogenase

GA – Glutaraldeído

GAld – Glicolaldeído

HRP - peroxidase de rabano

MFC - *microbial fuel cell*

MMB - *minimal medium buffer*

MMT - meio mínimo tamponado (MMT)

MWCNTs - nanotubos de carbono de paredes multiplas

NT - nanotubo

ONU - Organização das nações unidas

PCA - potencial de circuito aberto

PVM - verde de metileno polimerizado

SDS-PAGE - *sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis*

SWCNTs - nanotubos de carbono de paredes simples

TBAB - Brometo de tetra-n-butilamônio

TCA - titulação cronoamperométrica

TEMPO - 2,2,6,6-tetrametilpiridina 1-oxilradical

VCA - tensão de circuito aberto

DRX - Difração de raios X

YNB - *yeast nitrogen base*

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1. Introdução</b> .....   | 1  |
| 1.1. Demanda energética e fontes alternativas.....   | 1  |
| 1.2. Biocélulas a combustível.....   | 3  |
| 1.2.1. Biocélulas a combustível enzimáticas.....   | 5  |
| 1.2.2. Cascata enzimáticas em biocélulas a combustíveis.....                                   | 7  |
| 1.2.3. Sistemas híbridos em biocélulas a combustível.....                                      | 8  |
| 1.3. Enzima Oxalato Oxidase: OxOx.....   | 11 |
| 1.4. Catalisador TEMPO e seus derivados.....   | 14 |
| 1.5. Nanotubos de carbono, derivados e eletrocatalisadores.....                                | 16 |
| 1.6. EG e biocélulas a combustíveis.....   | 19 |
| <b>2. Objetivos</b> .....  | 21 |
| <b>3. Metodologia</b>  |    |
| 3.1. Materiais.....  | 22 |
| 3.2. Métodos   |    |
| 3.2.1. Expressão e obtenção da enzima OxOx.....  | 22 |
| 3.2.2. Atividade enzimática.....   | 25 |
| 3.2.3. Síntese das nanopartículas Pt:Sn.....   | 26 |
| 3.2.4. Caracterização do catalisador.....  | 27 |
| 3.2.5. Preparo do sistema inorgânico.....  | 27 |
| 3.2.6. Preparo do sistema orgânico.....  | 28 |
| 3.2.7. Voltametrias cíclicas.....  | 29 |
| 3.2.8. Teste de potência.....  | 30 |
| 3.2.9. Titulação cronoamperométrica (TCA).....   | 31 |
| 3.2.10. Eletrólise.....  | 31 |
| 3.2.11. Análises por HPLC-UV/RID.....  | 32 |
| <b>4. Resultados e discussão</b>   |    |
| 4.1. Atividade da OxOx.....  | 34 |
| 4.2. Caracterização física das nanopartículas metálicas.....                                   | 37 |
| 4.3. Oxidação do EG no sistema híbrido metálico MWCNTs-Pt <sub>65</sub> Sn <sub>35</sub> ..... | 38 |
| 4.4. Oxidação do EG no sistema híbrido orgânico TEMPO-NH <sub>2</sub> .....                    | 57 |
| <b>5. Conclusões</b> .....   | 69 |
| <b>6. Referências</b> .....  | 71 |



|                         |           |
|-------------------------|-----------|
| <b>7. Apêndice.....</b> | <b>90</b> |
|-------------------------|-----------|

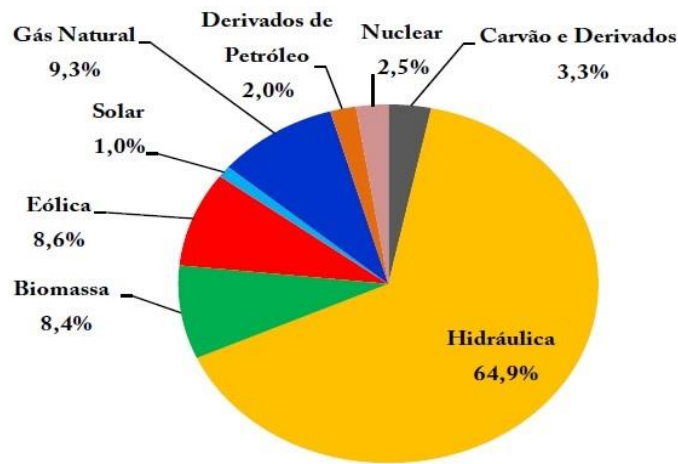
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. DEMANDA ENERGÉTICA E FONTES ALTERNATIVAS

Os impactos dos seres humanos na Terra são evidentes pelas mudanças climáticas ocorridas ao longo do tempo [1]. Estima-se que a temperatura deva ultrapassar a marca de 1,5 °C acima dos níveis pré-industriais em meados de 2030 [2]. A necessidade de mudanças é necessária para que possamos garantir um ambiente habitável para as futuras gerações. Sendo assim, é de urgência a implementação de novas legislações e produção de energia mais sustentável [3].

Em 2015 a ONU (Organização das nações unidas) estabeleceu 17 objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS) para 2030. Dentre eles o objetivo de número 7 que é “Garantir o acesso à energia acessível, confiável, sustentável e moderna para todos” [4]. A energia para todos ainda é algo distante, pois se continuarmos com o mesmo ritmo de investimento em estrutura, até 2030 teremos ainda 620 milhões de pessoas sem acesso à energia elétrica [4]. E a energia elétrica sustentável é um outro desafio à parte, pois o consumo energético humano é majoritariamente baseado em combustíveis fósseis, o qual corresponde a cerca de 80% da matriz energética mundial [5]. Esta alta contribuição está atrelada ao custo, densidade energética, atual disponibilidade, cadeia de produção, armazenamento e transporte já estruturado. As reservas finitas e a produção de gases do efeito estufa são algumas das grandes desvantagens do uso de combustíveis fósseis nos dias de hoje, o que gera a necessidade do desenvolvimento e aprimoramento de formas sustentáveis de obtenção de energia. Fontes alternativas como a energia solar [6], eólica [7], hidráulica [8], biomassa [9] e células a combustível [10] são promissoras para atender à esta demanda. O Brasil tem se destacado pela produção de energia hidráulica, eólica, solar e da biomassa, que juntas são fonte de 82,9% da energia elétrica utilizada em nosso território, como segue o gráfico do balanço energético nacional de 2019 (Figura 1) [11].

**Figura 1** - Fonte da oferta interna de energia elétrica no Brasil em 2019.

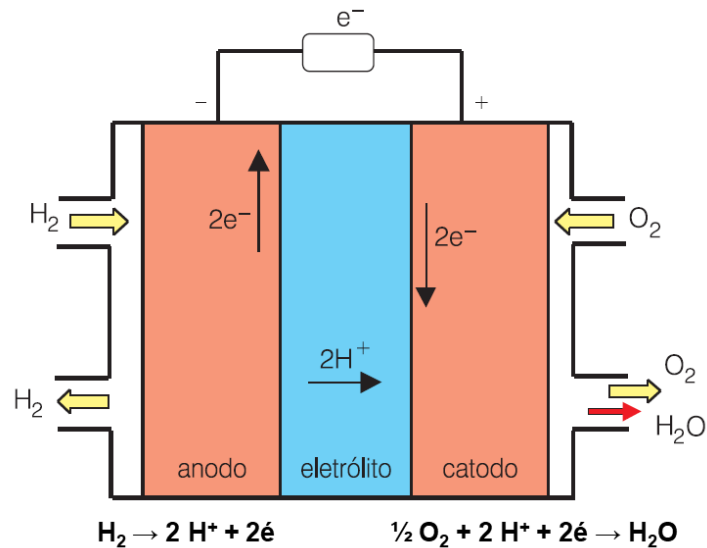


**Fonte:** adaptado de Balanço energético 2020 [11].

Dentre estas fontes alternativas, uma que ainda não tem o seu potencial completamente explorado, são as células a combustível. As células a combustível são dispositivos capazes de converter a energia química em eletricidade através das reações eletroquímicas de oxidação de um combustível.

Os combustíveis geralmente usados são o hidrogênio [12] e álcoois de cadeia curta como metanol [13], etanol [14] e glicerol [15]. Entretanto, açúcares como glicose [16] podem ser utilizados, já que o fator limitante é a molécula ser capaz de sofrer oxidação no sistema. Esses combustíveis são oxidados no compartimento anódico e o elétron gerado é transferido através de um circuito externo até o lado catódico, onde reage com um oxidante, geralmente oxigênio, tendo como resultado trabalho elétrico. Ambas as reações ocorrem simultaneamente. A Figura 2 apresenta um esquema representativo do funcionamento de uma célula a combustível alimentada com hidrogênio.

**Figura 2:** Esquema representativo do funcionamento de uma célula a combustível  $H_2/O_2$ .



**Fonte:** adaptado de *Villullas et al.* [17].

As células a combustíveis tradicionais (utilizam catalisadores metálicos) são classificadas de acordo com o eletrólito [10] e também pela temperatura de operação [18]. No geral, apresentam ótima eficiência energética e geram altas taxas de potência. Entretanto, alguns fatores limitam sua aplicação, um deles é a melhor disponibilidade do uso do hidrogênio, que é o combustível que gera os melhores resultados, mas sua produção e distribuição precisam se tornar comercialmente atrativa e livres do combustível fóssil [19]. Também há o alto custo dos catalisadores metálicos (baseados em Pt e Ru principalmente), o envenenamento do catalisador, a passivação dos eletrodos e a incapacidade de oxidar produtos mais complexos, principalmente na clivagem da ligação carbono-carbono de seus substratos, que impede a oxidação completa do combustível [20].

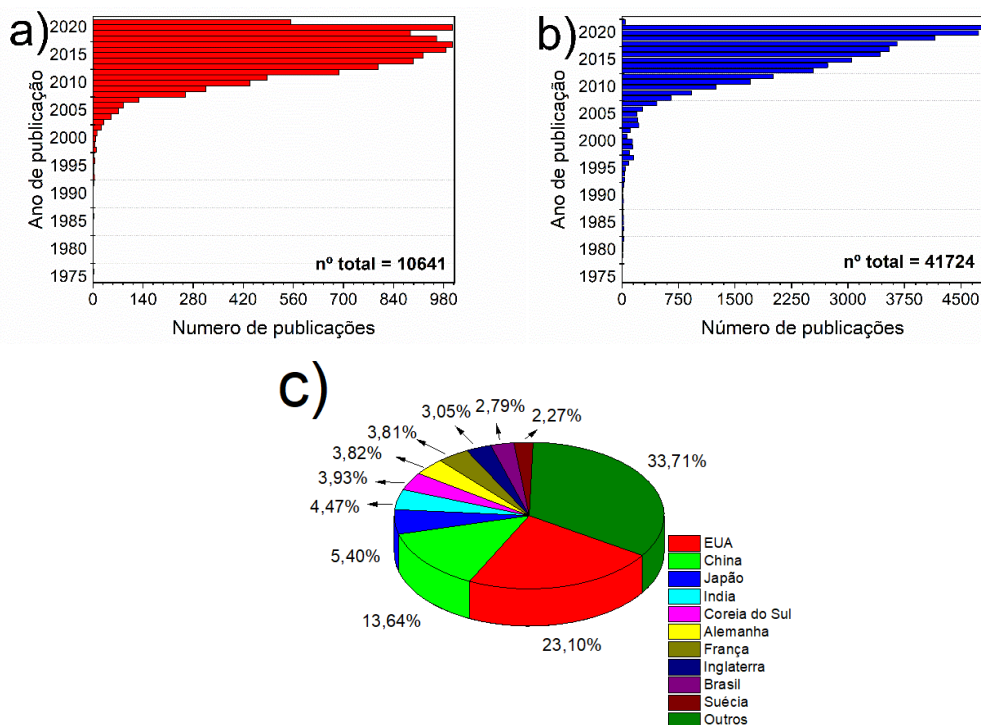
## 1.2. BIOCÉLULAS A COMBUSTÍVEL

Além das células a combustíveis baseadas em catalisadores metálicos existem as biocélulas, que utilizam como catalisadores enzimas, micro-organismos e organelas na conversão de energia química para elétrica [21] em substituição aos catalisadores metálicos. Ou seja, a conversão da energia química para elétrica envolve algum tipo de caminho biológico [22].

Da primeira célula a combustível desenvolvida por Humphrey Davy em 1802, uma célula simples que gerava descargas mensuráveis [23], mais de um século se passou até que Potter em 1911 demonstrasse a produção de energia alimentando uma cultura de *Saccharomyces cerevisiae* e outras bactérias com açúcar de cana e glicose [24]. Décadas mais tardes, com a Guerra Fria e a corrida espacial, nas décadas de 50 e 60, a NASA (do inglês *National Aeronautics and Space Administration*) buscava maneiras de tratar resíduos gerados pelas espaçonaves e seres humanos, e ao mesmo tempo, gerar energia [22]. Em 1964, *Yahiro et al.* reportaram o funcionamento das primeiras biocélulas a combustível enzimática, em que a produção de energia era gerada pelo uso da glicose oxidase (GOx) e a D-aminoácido oxidase para catalisar oxidação da glicose e D-alanina respectivamente [25].

Apesar destes avanços, as pesquisas com biocélulas não tiveram um crescimento expressivo, apenas no final dos anos 90 que o interesse foi novamente despertado pelos pesquisadores. A Figura 3 mostra um crescimento significativo das publicações científicas sobre biocélulas após os anos 2000.

**Figura 3:** Pesquisa bibliográfica conduzida utilizando o termo “biofuel cell”. a) Número de publicações na base de dados do Web of Science. b) Número de publicações na base de dados do Science direct. c) Países de origem das publicações. Pesquisa realizada em agosto de 2021.



Fonte: autoria própria.

O aumento nas publicações pode ser explicado pelas melhorias tecnológicas na área de nanomateriais, imobilização de biomoléculas, engenharia molecular [26] e a urgência de se encontrar fontes alternativas de geração de energia. Entretanto, não podemos ter a ideia errônea de que as biocélulas serão a fonte de energia do futuro, que irão substituir os combustíveis fósseis nos carros e suprirão a demanda energética de uma casa. Os estudos dos grupos de pesquisa ao redor do globo têm se direcionado para aplicações de dispositivos que demandam baixa potência [27], sensores autoalimentáveis [28], dispositivos implantáveis [29] ou vestíveis [30] como lentes de contato (com possíveis aplicações militares futuras) [30,31], relógios [32] e marca passo [33].

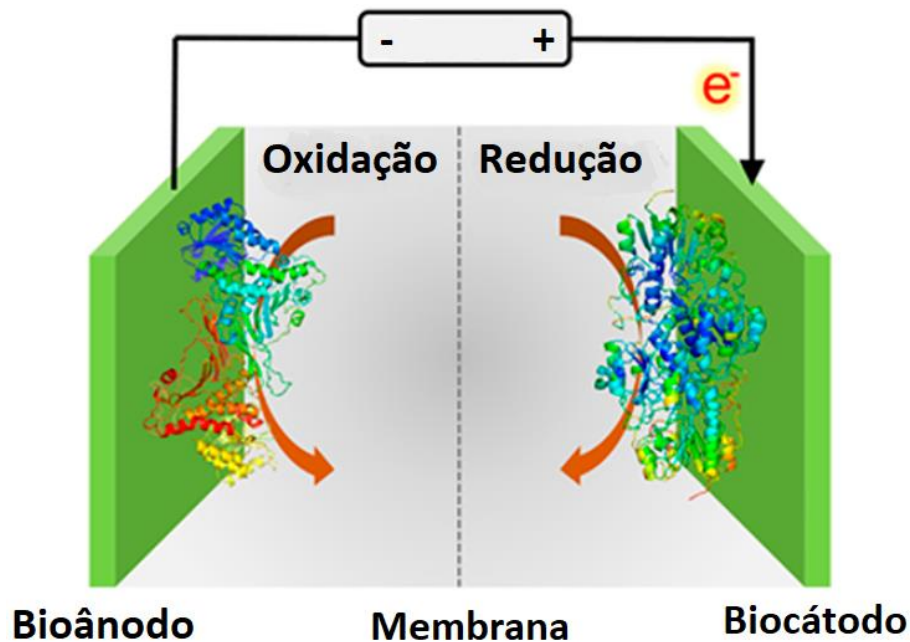
Além das possíveis aplicações práticas das biocélulas, as pesquisas são impulsionadas pelas vantagens delas frente as células a combustíveis tradicionais. Os catalisadores utilizados são renováveis (enzimas ou micro-organismos), ou seja, podem ser facilmente produzidos, não sendo necessário depender de reservas finitas. Além disso, outras vantagens incluem; operar em temperaturas e pHs alternativos, não sendo necessário pHs extremos e altas temperaturas como na maioria das células a combustíveis tradicionais; e a vasta variedade de microrganismos e enzimas, permitem a diversificação de aplicações.

### **1.2.2. Biocélulas a combustível enzimáticas**

Os dois principais tipos de biocélulas são as que empregam enzimas e as que utilizam microrganismos. As biocélulas microbiológicas ou microbiana (MFC, do inglês *microbial fuel cell*) utilizam bactérias como catalisadores na oxidação de compostos orgânicos [34] ou inorgânicos [35] para a geração de energia.

As biocélulas enzimáticas (EBFC, do inglês *enzymatic biofuel cell*) utilizam enzimas para catalisar reações redox com o objetivo de gerar energia. Devido a vasta variedade de enzimas disponíveis as aplicações se estendem desde a redução de oxigênio [36], até a oxidação de álcoois [37–39], sulfitos [40], ácidos orgânicos [41], açúcares [42,43] e o hidrogênio [44,45]. A Figura 4 apresenta um esquema representativo do funcionamento de uma EBFC, nela o combustível é oxidado no compartimento anódico, em seguida os elétrons gerados são transferidos através de um circuito externo até o lado catódico onde reage com um oxidante.

**Figura 4** - Representação de uma biocélula.



**Fonte:** adaptado de XIAO *et al.* [46].

As enzimas apresentam a vantagem da sua alta especificidade, que diminui a necessidade de purificação do combustível, a possibilidade de não utilizar membranas separadoras [45,47], além de ser um catalisador renovável, possível de ser cultivado em laboratório sem a necessidade de depender de reservas metálicas finitas. Além disso, o seu tamanho nanométrico possibilita uma maior eficiência volumétrica frente aos microrganismos das MFC [47]. Também há a possibilidade de aplicações *in vivo* [27,48], entretanto é necessário aprimoramento da biocompatibilidade dos componentes.

Resumidamente, as EBFC proporcionam meios de se obter energia limpa e renovável em pressão ambiente, pHs e temperaturas alternativas de trabalho, e assim, tem atraído o interesse de diversos grupos de pesquisa devido ao seu alto potencial tecnológico [27,46,49]. Entretanto, a energia produzida pelas EBFC é menor que as das células a combustíveis metálicas [46], além de não possuir a capacidade de ser operada durante anos como as MFC [50]. Sendo assim, existem tópicos a serem aprimorados e estudados.

### 1.2.2. Cascata enzimáticas em biocélulas a combustíveis

Um dos tópicos mais importantes no desenvolvimento de uma EBFC é a densidade de corrente e de potência, os valores obtidos precisam ser maiores para tornar viável uma aplicação comercial. Uma das maneiras que este aumento pode ser obtido é através da utilização total da energia disponível no combustível, isto é, obter todos os elétrons possíveis da reação química. Uma célula a combustível de etanol 20% (m/m) oxidando o etanol até ácido acético ( $n = 4$ ) apresenta uma densidade de potência de  $363 \text{ W h L}^{-1}$  muito inferior ao valor teórico máximo de  $5442 \text{ W h L}^{-1}$  caso os 12 elétrons fossem transferidos [51]. Portanto, tendo em vista a alta seletividade da maioria das enzimas, normalmente deve-se empregar mais de um catalisador biológico para se atingir a oxidação completa do combustível.

A primeira EBFC aplicando uma cascata enzimática para a completa oxidação de um álcool foi realizada por *Palmore et al.* [52] onde aplicaram um conjunto de enzimas contendo álcool desidrogenase (ADH), aldeído desidrogenase (AldH) e a formato desidrogenase (FoDH) em solução, e com sucesso oxidaram completamente o metanol. Vários trabalhos posteriores foram realizados, muitos deles utilizando as rotas metabólicas de compostos para propor a cascata enzimática [46,49].

*Xu et al.* prepararam uma biocélula utilizando 6 enzimas: glicose desidrogenase, gluconato 2-desidrogenase, aldolase, ADH, AldH e oxalato oxidase, as quais foram empregadas para realizar a oxidação completa da glicose e obter os 24 elétrons possíveis [53]. Obteve-se um valor de  $6,74 \pm 1,43 \mu\text{W cm}^{-2}$  e  $31,5 \pm 6,5 \mu\text{A cm}^{-2}$ , um aumento de 46,8 e 33,9 vezes na densidade de potência e corrente respectivamente em relação ao sistema com 2 enzimas. Em 2017, *Wu et al.* utilizaram *nanodots* de carbono como matriz de imobilização da lacase no biocátodo e uma cascata enzimática no bioanodo contendo ADH, AldH e FoDH, com objetivo de oxidar por completo o metanol [37]. O bioanodo também foi revestido com azul de metileno polimerizado para atuar como eletrocatalisador na oxidação de NADH para  $\text{NAD}^+$  e diminuir o sobrepotencial de oxidação. Esta EBFC atingiu um potencial de circuito aberto (PCA) de  $0,71 \pm 0,02 \text{ V}$  e uma densidade de potência de  $68,7 \pm 0,4 \mu\text{W cm}^{-2}$ .

Já *Sokic-Lazic et al.*, em 2011, aplicaram um conjunto de 8 enzimas (piruvato desidrogenase, citrato sintase, aconitase, isocitrato desidrogenase,  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, succinil CoA sintetase, fumarase e malato desidrogenase) para realizar a oxidação completa do lactato [54]. Relataram um valor de densidade de



corrente de  $3,32 \pm 0,11 \text{ mA cm}^{-2}$  e de potência de  $827 \pm 21 \text{ } \mu\text{W cm}^{-2}$ , valores 21 e 18 vezes superior ao do eletrodo com apenas uma única enzima. Em 2008, o mesmo grupo já havia replicado o ciclo do ácido cítrico para obter a oxidação completa do etanol pela imobilização de 10 enzimas sobre um eletrodo, os valores de densidade de potência e corrente foram 9 e 10 vezes superiores ao do eletrodo com apenas uma enzima [38]. Entretanto, este aumento foi inferior ao esperado, o qual foi atribuído à inibição de enzimas da cascata pelos produtos intermediários formados durante a oxidação progressiva do etanol.

As cascatas enzimáticas geram um aumento na energia obtida, pois possibilita uma oxidação maior do combustível, aumentando os valores de densidade de corrente e potência. Porém, não é fácil encontrar biocatalisadores compatíveis para todas as etapas, a estabilidade é determinada pela enzima mais instável, enzimas podem diferir nos pHs ótimos de atuação; a expansão no número dos componentes torna o processo mais complexo e mais caro, e o aumento da densidade energética pode ser menor que o teórico esperado [46]. Estudos realizados por *Neto et al.* revelaram que o aumento da quantidade de enzima imobilizada na superfície do eletrodo leva a uma diminuição na estabilidade do sistema [39]. Neste estudo, os autores utilizaram o LPEI (polímero linear de etileno imina) como matriz de imobilização e o EGDGE (etilenoglicol diglicidil éter) como um agente crosslinking, sobre o qual foi imobilizado e estudado enzimas para que obtivesse a oxidação completa do etanol. A partir de 3 enzimas os autores relataram a perda da atividade catalítica, a qual pode ser atribuída ao impedimento estérico, ao aumento da quantidade de material sobre o eletrodo e a pouca robustez do filme. Todos esses obstáculos dificultam a chegada dos substratos aos sítios catalíticos da enzima e causam a instabilidade do material com os incrementos de enzima.

### **1.2.3. Sistemas híbridos em biocélulas a combustível**

A utilização de sistemas híbridos, que combinam as vantagens de uma oxidação enzimática com um outro catalisador, orgânico ou inorgânico, pode contornar os problemas de estabilidade na imobilização de um número grande de enzimas. Todavia, deve-se destacar que uma EBFC híbrida é diferente de uma EBFC que utiliza mediadores eletrônicos não biológicos como organometálicos e corantes. Em uma EBFC híbrida temos enzima(s) e catalisador(es) não biológico(s) trabalhando

em conjunto na oxidação/redução ou gerando um combustível que seja oxidado/reduzido pelo outro catalisador (cascata). Entretanto, há sistemas que o catalisador abiótico apenas melhora características como a área do eletrodo e a condutividade, não atuando em cascata com a enzima.

Devido ao desafio de adequar as condições ótimas de atividade de dois catalisadores, a maioria dos trabalhos de biocélulas híbridas não atuam em cascata. Além disso, boa partes desses trabalhos são aplicados a glicose [42,55–60], particularmente pela possibilidade de sua aplicação *in vivo*, permitindo um maior avanço nas pesquisas com este combustível. *Kwon et al.* aplicaram fibras de algodão modificadas com ouro em conjunto com a GOx, as fibras metálicas aumentaram a condutividade entre a enzima e o eletrodo [60]. Foi obtido um valor de 3,7 mW cm<sup>-2</sup> sem a necessidade de mediadores redox, sendo este o maior valor de densidade de potência reportado para um biocélula glicose/O<sub>2</sub> até o momento. Outro trabalho interessante foi o de *Dector et al.*, no qual foi utilizado como bioanodo híbrido a combinação da GOx com carbono Vulcan, MWCNT e glutaraldeído (GA), e como catodo um eletrodo de Pt/C [57]. A biocélula microfluídica operada com 5 mmol L<sup>-1</sup> de glicose no sangue humano apresentou tensão de circuito aberto (VCA) de 0,52 V e densidade de potência de 0,20 mW cm<sup>-2</sup> (em 0,38 V) e 1,1 mA cm<sup>-2</sup> de densidade de corrente.

Para outros combustíveis, os trabalhos não são tão abundantes, mas existem vários exemplos de destaque. Para a oxidação de hidrogênio, *Gentil et al.* incorporaram o aminoácido arginina no complexo de níquel bis-difosfina ([Ni<sup>II</sup>(P<sup>Cy</sup>2N<sup>Arg</sup><sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>7+</sup>), imobilizando-o sobre nanotubos de carbono modificados por grupos de ácido naftóicos [61]. Este sistema se mostrou ativo para a oxidação de H<sub>2</sub> no pH entre 0,3-9. A combinação do sistema híbrido com um biocatodo de bilirrubina oxidase de *Myrothecium verrucaria* (MvBOD) atingiu uma potência aproximada de 2 mW cm<sup>-2</sup> em tampão fosfato pH 5 a 25°C e um VCA de 1,0 V. Notavelmente, este é o maior valor de potência reportado até o momento para uma biocélula de hidrogênio.

Já os trabalhos de EBFC empregando cascata enzimática híbrida são escassos na literatura, apesar do seu potencial de gerar valores altos de potência e corrente. A maioria dos trabalhos focam no etanol e glicerol [62–68], que são duas moléculas com alta densidade energética onde, em baixas temperaturas, os catalisadores metálicos falham em quebrar a ligação C-C [62,69]. O glicerol é um subproduto da produção do biodiesel, e apresenta a possibilidade de gerar produtos de oxidação com alto valor

agregado [70]. Já o etanol é um álcool de alta densidade energética, que possui uma cadeia de produção e distribuição bem segmentada no Brasil [71].

Um trabalho muito importante para o desenvolvimento de biocélulas híbridas que operam com álcoois foi o de *Hickey et al.* que aplicaram o catalisador orgânico TEMPO-NH<sub>2</sub> em conjunto com a enzima OxOx para oxidar completamente o glicerol [66]. A formação de CO<sub>2</sub> foi comprovada pelas análises de RMN<sup>13</sup>C. Um passo importante deste trabalho, foi juntar dois catalisadores distintos em condições que ambos fossem ativos; uma enzima promiscua (OxOx) [72], que reage com alguns compostos carboxílicos além do seu substrato específico (oxalato) [73–76] junto com um catalisador orgânico que oxida álcoois para aldeídos e ácidos carboxílicos, mas não cliva a ligação C-C. A aplicação em conjunto desses catalisadores, permitiu, com sucesso, a elaboração de uma cascata híbrida que possibilitou a oxidação completa do glicerol.

Em seguida, foi reportado sistemas com metodologia semelhante, destaca-se os trabalhos reportados por *Franco et al.* que, com sucesso, conseguiram oxidar completamente o lactato [77] e o etanol [68] em sistemas aplicando o híbrido TEMPO-NH<sub>2</sub> em conjunto com a oxalato descarboxilase (OxDc). Em outro trabalho foi utilizado o pireno-TEMPO, imobilizado junto com nanotubos de carbono de parede múltiplas funcionalizados com grupos carboxílicos (MWCNTs-COOH), em conjunto com a OxDc para a oxidação completa do etanol [67]. Além disso, este sistema é extremamente estável, pois após 10h de eletrólise a 0,8 V vs ECS em tampão citrato-fosfato, pH 5,2 a densidade de potência caiu apenas 13% em comparação ao eletrodo antes do experimento.

Para oxidar completamente o combustível em cascatas híbridas não é necessário a utilização de várias enzimas, nem condições extremas de pH e temperatura das células a combustíveis com catalisadores metálicos. Isto evita os problemas de estabilidade enfrentados pelas cascatas enzimáticas, e as condições de operações dos catalisadores metálicos, possibilitando a oxidação completa em um sistema com menos componentes e em condições brandas. A Tabela 1 contém um resumo de trabalhos da literatura que aplicaram cascatas híbridas no desenvolvimento de biocélulas.

**Tabela 1:** Sistemas com cascata híbrida em biocélulas a combustível.

| <b>Sistema</b>   | <b>Combustível</b> | <b>VCA<br/>(V)</b> | <b>Potência<br/>(<math>\mu\text{A cm}^{-2}</math>)</b> | <b><math>I_{\text{max}}</math><br/>(<math>\mu\text{A cm}^{-2}</math>)</b> | <b>Ref.</b> |
|--|--------------------|--------------------|--|---|-------------|
| <b>GA/AuNPs/CNFs</b>                                       | Glicose            | *                  | 91,4   | 304   | [56]        |
| <b>TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx</b>                           | Glicerol           | *                  | *  | 875   | [66]        |
| <b>TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxDc</b>                           | Glicerol           | *                  | *  | *   | [63]        |
| <b>MWCNT/TEMPO-<br/>LPEI/OxDc</b>                          | Glicerol           | *                  | *  | 1300  | [64]        |
| <b>MG/MWCNTs/TEMPO-<br/>LPEI/ADH+AldDH+NAD<sup>+</sup></b> | Etanol             | 0.649              | 378,2  | 1087  | [62]        |
| <b>MWCNT-COOH/TEMPO-<br/>LPEI/OxOx</b>                     | Etanol             | 0.492              | 302,5  | 821,1   | [65]        |
| <b>MWCNT-COOH/Pireno-<br/>TEMPO/OxDc</b>                   | Etanol             | 0.598              | 388  | 690   | [67]        |
| <b>TEMPO-NH<sub>2</sub>/OxDc</b>                           | Etanol             | 0.468              | 78   | 353   | [68]        |
| <b>TEMPO-NH<sub>2</sub>/OxDc</b>                           | Lactato            | *                  | *  | 23000   | [77]        |

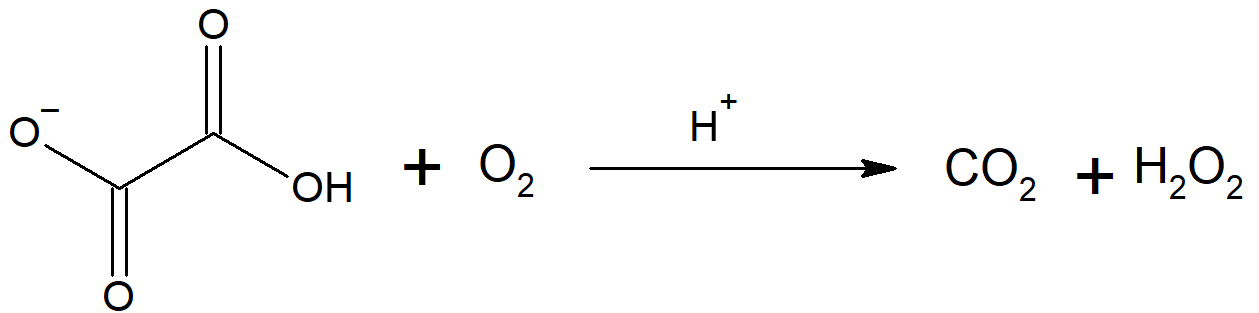
\*valor não relatado

Resumidamente, a construção das biocélulas híbridas busca agregar a características da enzima com algum outro componente, que possa aumentar a condutividade, estabilidade e a área do eletrodo, mas principalmente aumentar a quantidade de energia obtida. É uma área em expansão de grande potencial, que pode ajudar a enfrentar os desafios no desenvolvimento de biocélulas e até mesmo das células a combustíveis tradicionais.

### 1.3 ENZIMA OXALATO OXIDASE: OxOx

Descoberta por *Houget et al.* [78] em 1927, a OxOx de classificação enzimática EC 1.2.3.4, catalisa a reação de oxidação do oxalato para CO<sub>2</sub> reduzindo oxigênio para peróxido de hidrogênio [79] (Figura 5).

**Figura 5:** Reação catalisada pela OxOx.



**Fonte:** *Moussatche et al.* [73].

Enzimas que degradam oxalato possuem diversas aplicações, entre elas: na indústria de papel e biorremediação de resíduos industriais [80,81], na produção de plantas transgênicas [82], em ensaios clínicos de determinação de oxalato na urina [83] e sangue [84]. A OxOx já foi detectada no trigo [78,85], milho, aveia, arroz e centeio [86], sorgo [74], beterraba [87], morango [88], cevada [89,90], bactérias [91], fungos [75] e em tecidos de plantas [92]. Nas plantas, uma das suas funções é no mecanismo de defesa contra fitopatógenos que liberam oxalato, no qual o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado pode servir como um fungicida ou como molécula sinalizadora para o sistema de defesa [86,93]. As mais exploradas e melhores caracterizadas na literaturas são as OxOx da farinha de trigo e cevada [79,85,93,94].

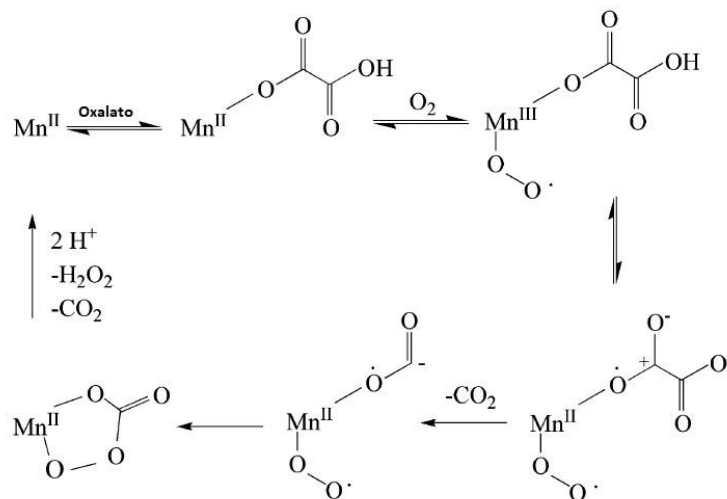
A OxOx de *Ceriporiopsis subvermispora* foi primeiramente identificada por *Aguilar et al.* [75]. Neste fungo, basidiomiceto ligninolítico, é proposto que a OxOx é transportada para o espaço periplasmático, no qual ela oxida o ácido oxálico liberado durante o crescimento do fungo, com o objetivo de prover traços de peróxido hidrogênio para as peroxidases de manganês [75,95,96]. Estas peroxidases são importantes para o desenvolvimento do fungo, pois catalisam a oxidação de Mn<sup>2+</sup> para Mn<sup>3+</sup>, os quais podem oxidar resíduos fenólicos presentes na lignina [75].

O ponto isoelétrico da OxOx de *Ceriporiopsis subvermispora* é de 4,2, tendo pH de 3,5 e 45 °C como condições ideais de atividade [75]. Este pH ótimo é o mesmo encontrado para OxOx extraída da cevada [76] e próximo ao de pH 5,0 e 40 °C reportado para a enzima extraída das folhas de sorgo [74]. Sua massa molecular descrita na literatura é 65,5 kDa para a subunidade e de 400 kDa para a estrutura proteica como um todo da enzima nativa [75]. Mas também já foi reportado o valor de 66 kDa para a proteína purificada [73].

Apesar de não termos uma descrição estrutural detalhada da OxOx [73], foi determinado por dados sequenciais e modelagem que ela é considerada a primeira enzima identificada que contem manganês e catalisa a oxidação de oxalato [73,97,98]. Além disso, ela apresenta um código sequência 49% semelhante a OxDc microbiana [97]. Análoga a OxOx, a OxDc catalisa a quebra a ligação C-C do oxalato, entretanto formando  $\text{CO}_2$  e formato, em uma reação que não há uma oxidação ou redução resultante [99]. Elas podem apresentar parte da atividade semelhante uma das outras, ou seja, a OxOx pode se comportar em partes como a OxDc e vice-versa [73,97,100].

O mecanismo da OxOx não foi elucidado, porém investigações com técnicas de espectroscopia UV-vis, estudos de *spin trapping* e estudos estruturais de OxOx de cevada, propuseram um provável mecanismo [79,93,99,101]. Nestes estudos, o oxalato se liga diretamente ao  $\text{Mn(II)}$ , seguido da oxidação para  $\text{Mn(III)}$  e a formação de uma espécie radicalar intermediária, em seguida ocorre uma transferência reversível de elétrons acoplada aos prótons que facilita a descarboxilação para produzir um radical formil ligado ao manganês, como apresentado na Figura 6.

**Figura 6:** Proposta de mecanismo da oxidação de oxalato pela OxOx



**Fonte:** Adaptado de *Moussatche et al.* [73].

A OxOx é considerada uma enzima promiscua [72], isto se deve a sua característica de reagir com outros substratos além do seu principal. Já foi relatado na literatura a capacidade da OxOx em reagir com ácidos carboxílicos simples como ácido oxálico, ácido glioxílico, ácido maleico [91] e ácido mesoxálico [51]. No entanto, ela não é capaz de reagir e oxidar álcoois como etanol [65] e glicerol [66].

Para atingir a completa oxidação de álcoois um outro catalisador deve ser utilizado em conjunto. Esta estratégia foi utilizada por *Franco et al.* que desenvolveram um bioanodo híbrido com o catalisador orgânico TEMPO modificado com o polietilenoimina linear (TEMPO-LPEI) em conjunto com a OxOx e MWCNTs-COOH, no qual foi possível oxidar o etanol a CO<sub>2</sub> e coletar 12 elétrons por molécula [65]. O sistema MWCNT-COOH/TEMPO-LPEI/OxOx demonstrou o efeito sinérgico dos componentes, gerando, nos experimentos de eletrólise, uma corrente 3 e 2,5 vezes maior que os sistemas MWCNT-COOH/LPEI/OxOx e MWCNT-COOH/TEMPO-LPEI/BSA respectivamente. A aplicação da OxOx é necessária para que a ligação C-C seja clivada, sem ela o sistema apenas com o catalisador TEMPO-LPEI não conseguiria oxidar por completo o etanol, impossibilitando a coleta dos 12 elétrons. Outros trabalhos utilizando a propriedade de clivar ligações C-C da OxOx e a da OxDc, foram descritos na literatura para o glicerol [63,64,66], etanol [62,67,68] e lactato [77], no quais foi possível oxidar por completo estas moléculas ao trabalhar em conjunto com catalisadores orgânicos.

A enzima OxOx, devido a sua propriedade de reagir com ácidos carboxílicos simples, possui grande potencial de ser aplicada em sistemas híbridos de biocélulas a combustíveis. Entretanto, é necessário a escolha de catalisadores que possam trabalhar na mesma faixa de pH que a enzima, e se esses catalisadores formem subprodutos ácidos a partir do combustível, para posterior atuação da OxOx.

#### **1.4. CATALISADOR TEMPO E SEUS DERIVADOS**

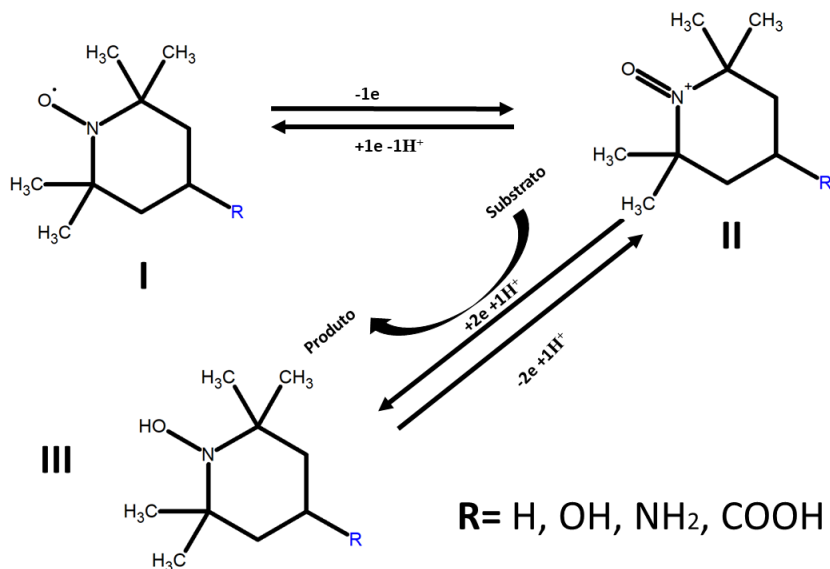
Muitas das enzimas utilizadas nos estudos de desenvolvimento de biocélulas são limitadas pela sua estabilidade, elevada especificidade do substrato e diferentes condições operacionais (pH, temperatura e eletrólitos). Por outro lado, catalisadores orgânicos, tais como *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) não possuem esta especificidade, tendo como função a oxidação de uma ampla gama de grupos funcionais contendo oxigênio, nitrogênio e enxofre [66], tais como álcoois e aldeídos [102] e na oxidação de aminas para aldeídos, cetonas ou nitrilas [103] à temperatura ambiente.

TEMPO e seus derivados são amplamente usados em sínteses por serem econômicos, seguros [104] e capazes de realizar oxidações específicas ajustando-se as condições reacionais [105]. A sua utilização como catalisador de reações de

oxidação é vantajosa, pois os métodos tradicionais utilizam reagentes tóxicos ou que geram resíduos tóxicos, como os métodos baseados em crômio, dióxido de manganês, dimetil sulfóxido, óxido de prata e periodanos [106–109]. Além desta função clássica, eles possuem aplicações no desenvolvimento de baterias [110] e células solares [111].

O mecanismo na oxidação de um substrato se baseia na formação do cátion oxoamônio a partir do radical nitroxil (I), que pode ocorrer com a adição de um oxidante ao meio reacional ou eletroquimicamente [112]. Este íon tem a atividade oxidante para álcoois primários, e quando ele age o oxoamônio (II) reduz para a forma hidroxilamina (III), a qual pode ir para uma segunda oxidação e regenerar o cátion oxiamonium. Esta segunda oxidação pode ocorrer quando a hidroxilamina é oxidada pelo radical oxiamonium presente na solução, pela ação de um outro oxidante ou eletroquimicamente [112–115]. A Figura 7 esquematiza o mecanismo de ação do TEMPO.

**Figura 7** - Mecanismo de ação do TEMPO. I- radical nitroxil. II- cátion oxoamônio. III- hidroxilamina



**Fonte:** Adaptado de *Bragd et al.* [116].

A modificação do TEMPO permite ajustar as propriedades para a aplicação desejada. Um desses derivados o TEMPO-NH<sub>2</sub>, apresenta uma propriedade interessante de ser ativo em condições ácidas, como estudado por *Hickey et al.* [66]. Esta característica permite usar o TEMPO-NH<sub>2</sub> em conjunto das enzimas OxOx ou OxDc que atuam em pH ácidos. Desta forma é possível propor sistemas híbridos que compensem as limitações



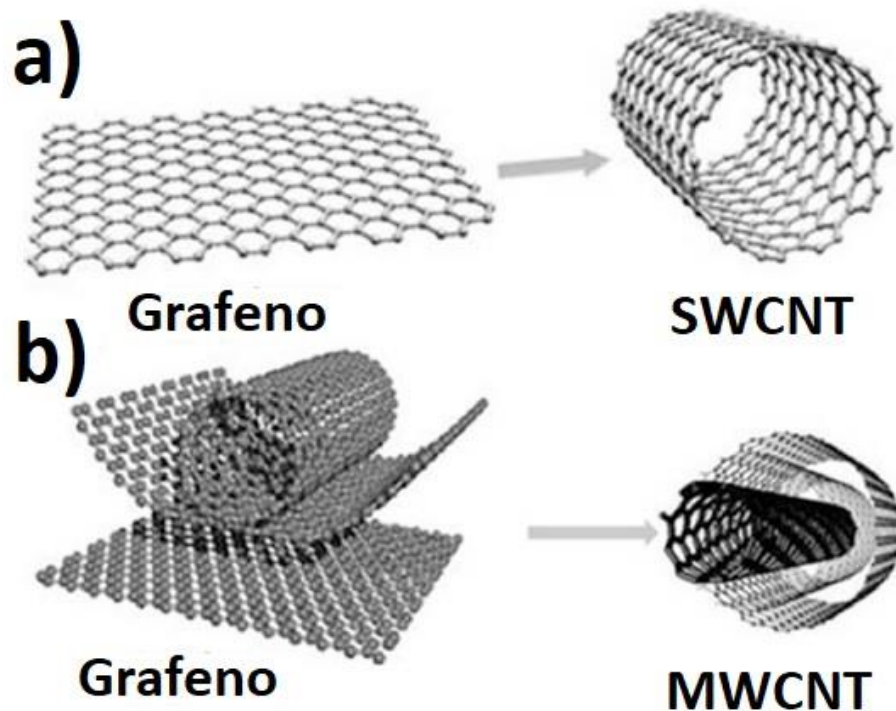
individuais, combinando as vantagens de enzimas capazes de quebrar eficientemente as ligações C-C aliada aos catalisadores orgânicos. Tem-se como exemplos os trabalhos desenvolvidos por *Franco et al.* [68,77] e *Hickey et al.* [66] que aplicaram o TEMPO-NH<sub>2</sub> em conjunto com a OxOx para obter a oxidação completa do etanol, lactato e glicerol.

## 1.5 NANOTUBOS DE CARBONO, DERIVADOS E ELETROCATALISADORES

O carbono é um dos elementos mais importantes do planeta e compõem tantos compostos que têm um ramo da química dedicado apenas para eles, a Química Orgânica. Este elemento pode se ligar entre si formando alótropos, os quais apresentam propriedades distintas [117], sendo eles o diamante, grafite, grafeno e fulerenos, dentro deste último temos os nanotubos de carbono.

Os nanotubos de carbono tiveram sua descoberta atribuída a Lijima em 1991 [118]. Podendo ser divididos em dois tipos: os de paredes simples (SWCNT, do inglês *single wall carbon nanotubes*) e os de paredes múltiplas (MWCNTs, do inglês *multiwalled carbon nanotube*) [119] (Figura 8). Podemos considerar o SWCNTs como uma folha de grafite enrolada formando um cilindro, e os MWCNTs um conjunto destas folhas enroladas organizadas de forma concêntricas interagindo por forças de van der Waals [120]. Os nanotubos podem ter diferentes diâmetros, quiralidade e tamanho [121]. A folha de grafeno é composta por átomos de carbono ligados entre si em ligações covalentes com configuração sp<sup>2</sup> formando um arranjo hexagonal. O diâmetro do SWCNT varia de aproximadamente 0,4 nm até valores superiores 3 nm e para os MWCNTs este valor varia de aproximadamente 1,4 até 100 nm [122].

**Figura 8** - Nanotubos de carbono. a) SWCNTs. b) MWCNTs.



**Fonte:** adaptado de *Vidu et al.* [123].

MWCNTs exibem grande área de superfície específica [124], alta resistência mecânica, podendo ser condutor ou semicondutor [120], alta condutividade térmica [125], excelente biocompatibilidade e propriedades anti-incrustantes [126,127]. A Tabela 2 resume algumas das propriedades físicas dos nanotubos.

**Tabela 2:** Propriedades físicas dos MWCNTs e SWCNTs.

| Propriedade   | SWCNTs          | MWCNTs          |
|---|-----------------|-----------------|
| Densidade ( $\text{g cm}^{-3}$ )                                  | 0.8             | 1.8             |
| Condutividade elétrica ( $\text{S cm}^{-1}$ )                     | $10^2$ - $10^6$ | $10^3$ - $10^5$ |
| Mobilidade elétrica ( $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) | $\sim 10^5$     | $10^5$ - $10^6$ |
| Condutividade térmica ( $\text{W mK}^{-1}$ )                      | 6000            | 2000            |
| Estabilidade termica no ar ( $^{\circ}\text{C}$ )                 | >600            | >600            |

**Fonte:** adaptado de *Ma et al.* [128].

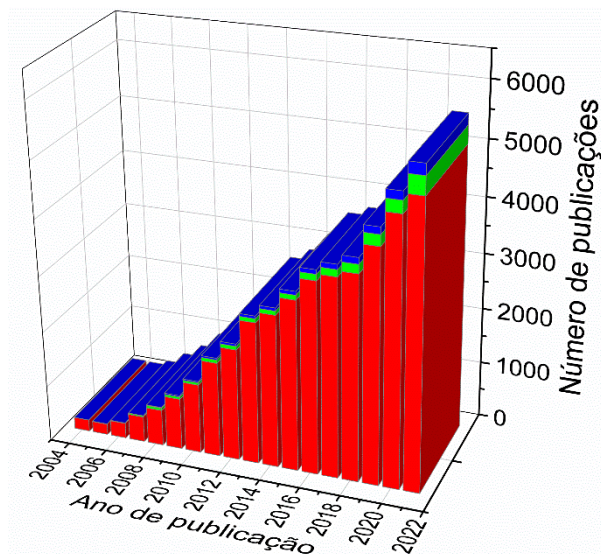
Os MWCNTs possuem aplicações em diversas áreas, na eletroquímica se destacam a sua utilização em sensores [129,130], capacitores [131,132], baterias

[133,134], células a combustíveis [135,136], biocélulas a combustíveis microbianas [137,138], biocélulas a combustíveis enzimáticas [26,42] e no preparo de catalisadores em geral [139,140].

No campo da bioeletroquímica, MWCNTs provaram ter boa capacidade de se comunicar eletricamente com muitas enzimas [26,141]. Nas biocélulas a combustível melhoraram o desempenho tanto do bioanodo como do biocátodo, aumentam a área superficial e a condutividade. Além disso, eles facilitam a transferência eletrônica, pois o seu pequeno diâmetro permite maior aproximação com os sítios ativos das enzimas [121].

O aumento do número de publicações envolvendo CNTs em biocélulas nos anos de 2004 à 2009 foi um dos tópicos discutidos por *Cosnier et al.* [26]. A Figura 9 mostra este crescimento atualizado até o ano de 2021 através de uma pesquisa no banco de dados do Science Direct.

**Figura 9** - Pesquisa bibliográfica conduzida no Science Direct utilizando o termo “biofuel cell” (vermelho), “biofuel cell/CNT” (verde) e “biofuel cell/MWCNT” (azul). Pesquisa realizada em agosto de 2021.



**Fonte:** autoria própria.

Nanocatalisadores baseados em Pt são popularmente aplicados na eletroxidação de álcoois, principalmente em razão da sua atividade catalítica em baixas temperaturas [142]. Entretanto, apresentam a desvantagem do alto custo, reservas finitas e perda de atividade pelo envenenamento por espécie que adsorvem sobre a Pt [70]. Sendo assim, o desenvolvimento de catalisadores agregando a Pt

com um ou mais metais, se tornou uma alternativa para diminuir o custo e enfrentar a perda de atividade [142].

O catalisador bimetálico PtSn é uma dessas possíveis combinações que podem ser aplicadas na oxidação de álcoois [143–145]. Para a oxidação do etilenoglicol as nanopartículas de PtSn já foram preparadas por diferentes metodologias e razões molares, sendo depositadas sobre Carbon Vulcan XC72R [145–150]. Em 2017 Krzysztof Miecznikowski utilizou MWCNTs modificado com óxido de tungstênio ( $\text{WO}_3$ ) como suporte para nanopartículas de PtSn [151]. Em eletrólito  $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$  foi possível atingir uma densidade de corrente  $79,8 \text{ mA cm}^{-2}$  e  $20,5 \text{ mW cm}^{-2}$  de potência. Além disso, foi identificado por Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier a formação de  $\text{CO}_2$ .

A utilização de MWCNTs como suporte de nanocatalisadores é bastante interessante e já é explorada nos estudos de células a combustível tradicionais [152–154]. A união destes nanocatalisadores com biomoléculas, pode permitir o desenvolvimento mais aprimorado de EBFC, devido a um possível efeito sinérgico destes componentes. *Neto et al.* observaram uma melhora significativa ao aplicarem MWCNTs-Au no desenvolvimento de biocélulas a combustível de etanol [155] e glicose [42]. A construção C/MWCNTs-Au/ADH atingiu valor de  $0,61 \pm 0,05 \text{ V}$  e  $155 \pm 11 \text{ mW cm}^{-2}$ , já a construção C/MWCNTs-Au/GOx/polipirrol-ferroceno/ os valores de  $647 \pm 18 \text{ mV}$  e  $190 \pm 11 \text{ mW cm}^{-2}$ .

## 1.6 ETILENO GLICOL E BIOCÉLULAS A COMBUSTÍVEIS

O EG é um combustível com uma alta densidade energética ( $5,3 \text{ kWh kg}^{-1}$ ) [156], apresenta ponto de ebulição alto ( $197 \text{ }^\circ\text{C}$ ) quando comparado com metanol ( $64,7 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e etanol ( $78,2 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Ele é utilizado em fluidos anticongelantes, óleo de freios, tintas, plásticos e como solvente [157]. Ele é tóxico para os seres humanos, sendo metabolizado no fígado, gerando metabólitos que podem afetar órgãos e o sistema nervoso central [158–160]. O EG é um combustível amplamente estudado nas células a combustíveis tradicionais [153,154], porém, apenas um único trabalho empregando esse combustível nos estudos de biocélula enzimática foi reportado até o momento. *Falase et al.* imobilizaram ADH em um filme eletropolimerizado de verde de metileno (PVM), juntamente com MWCNTs e PtRu nanoestruturado [161]. A densidade de

corrente para oxidação de EG na presença de nanopartículas de rutênio (PVM-PtRu-ADH) foi 1,2 vezes maior em comparação com o sistema PVM-ADH. Uma possibilidade de aplicação futura seria o preparo de um sensor auto alimentável que fosse movido pelo EG e detectasse a presença dele. Portanto, a investigação de EG em EBFC é de extremo interesse e promissora, já que os trabalhos nesta área são escassos.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é o desenvolvimento de sistemas híbridos para aplicação em biocélulas a combustível visando a obtenção da oxidação completa da molécula de EG através de uma cascata catalítica. Foram investigados dois sistemas: C/MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>/OxOx,EG//C/Pt,O<sub>2</sub> e C/TEMPO-NH<sub>2</sub>,OxOx,EG//C/Pt,O<sub>2</sub>. Como objetivo específico, destaca-se:

- Preparar e caracterizar os sistemas híbridos (MWCNTs-metal+OxOx) e (TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx) na presença e ausência de enzima;
- Analisar a oxidação do EG nos dois sistemas acima na presença e ausência da enzima OxOx, objetivando verificar a atividade catalítica e os subprodutos de oxidação formados;
- Analisar a oxidação dos subprodutos identificados na oxidação do EG nos dois sistemas híbridos e propor um provável mecanismo catalítico.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. MATERIAIS

Enzimas de restrição XbaI e XhoI, vetor pPICZαA da Invitrogen. Extrato de levedura, peptona, ágar, zeocina, glicose, sulfato de amônio, base de nitrogênio para leveduras com sulfato de amônio, biotina, HRP (peroxidase de rabano), indicador de oxidação ABTS (2,2'-Azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) sal diamônio, acetato de sódio, ácido fosfórico, BSA (Albumina de soro bovino, do inglês bovine serum albumin) glicerol, Nafion® 5%, brometo de tetra-n-butilamônio (TBAB), propilenoglicol, SnCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>.6H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaOH 50-52%, TEMPO-NH<sub>2</sub> (4-Amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil), glicolaldeído, ácido glicólico, ácido glioxílico e ácido oxálico e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> da Sigma-Aldrich. Glicerol, ácido acético e etanol 95% da Labsynth. Oxalato de sódio, etanol HPLC, citrato de sódio, HAuCl<sub>4</sub>, Isopropanol HPLC, éter diglicidílico de etilenoglicol (EGDE), HCl e ácido cítrico da Merck. Coomassie Blue G250 da BioRad. Nitrogênio gasoso comercial 4.0 99,99% da Air Liquide.

MWCNTs (OD ≤ 8 nm, ID = 2-5 nm, OL = 10 - 30 mm) foram adquiridos da Cheap Tubes. As soluções tampão de ácido cítrico-fosfato 150 mM (pH = 5,5) e acetato 50 mM de pH 4,0 foram preparadas dissolvendo as quantidades apropriadas de sais em água ultrapura. Todas as soluções foram preparadas com água de alta pureza de um sistema Millipore Milli-Q.

#### 3.2. MÉTODOS

##### 3.2.1. Expressão e obtenção da enzima OxOx

A OxOx (E.C. 1.2.3.4) foi obtida previamente pelo nosso grupo de pesquisa [65], através da expressão do seu gene clonado no vetor pPICZαA como descrito por *Moussatche et al.* [73]. No qual a sequência codificadora para a OxOx da *Ceriporiopsis subvermispota* foi amplificada por PCR (reação em cadeia da polimerase, do inglês *polymerase chain reaction*). O produto da PCR foi digerido com as enzimas de restrição XbaI e XhoI e clonado no vetor pPICZαA (Invitrogen). Em

seguida, o vetor foi introduzido na *Pichia pastoris* KM71H pela técnica de eletroporação como descrito no manual da Invitrogen [162].

Realizou-se primeiro o cultivo da *Pichia pastoris* KM71H em placas de Petri (Figura 10) utilizando o meio de cultivo YPD (abreviado do inglês, *Yeast extract – Peptone – Dextrose*). O YPD foi preparado em uma solução contendo 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% ágar e  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de zeocina, sendo em seguida levada à autoclave junto com as ponteiras, micropipetas e tubos a serem utilizados posteriormente. Separadamente, autoclavou-se uma solução de glicose 20% para ser adicionada ao meio até atingir uma concentração de 2%. Realizou-se o repique da *Pichia pastoris* KM71H para as placas após o meio já ter se solidificado, armazenando-as por 24h em uma estufa a  $28^\circ\text{C}$ . A seleção das mutantes que receberam o vetor é feita pela resistência à zeocina presente no meio.

**Figura 10** - Placa de cultivo da *Pichia pastoris* KM71H utilizando como meio o YPD.



**Fonte:** autoria própria.

O segundo cultivo foi realizado em meio mínimo tamponado (MMT) o qual é composto por  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  de sulfato de amônio pH 6, 1,34% base de nitrogênio para leveduras com sulfato de amônio,  $4 \cdot 10^{-5}$  % de biotina e 1% de glicerol. Foi preparado 200 mL desta solução em um *erlenmeyer*, transferiu-se parte da colônia cultivada nas placas de Petri selecionadas pela zeocina e manteve-se durante 24h em uma Incubadora Shaker a  $29^\circ\text{C}$  e 200 rpm. O glicerol neste meio tem função de ser alimento das células para o seu crescimento.

Em seguida, as células cultivadas foram precipitadas por centrifugação e transferidas para um meio de mesma composição, no qual foi adicionado 0,5% de



metanol. Manteve-se o *erlenmeyer* contendo o meio em uma Incubadora Shaker a 29°C e 200 rpm e repetiu-se esta adição de 0,5% de metanol por mais dois dias a cada 24h. A adição de metanol tem a função de induzir a secreção da OxOx expressada pela *Pichia pastori* KM71H ao meio extra celular. Após os três dias de indução, a solução foi centrifugada em tubos tipo Falcon para a obtenção do sobrenadante, no qual a enzima está presente.

A enzima obtida foi concentrada utilizando o equipamento Labscale™ TFF System da Millipore em um processo de ultrafiltração utilizando como membrana um cartucho Biomax 5 50 cm<sup>2</sup>, o qual reteve em seu filtro proteínas com tamanho superiores a 5 kDa. Este experimento foi realizado em uma câmara fria, sendo o equipamento resfriado por cerca de 1h antes de começar a filtração, para diminuir a possibilidade de desnaturação das proteínas.

### 3.2.2. Atividade enzimática

Os ensaios de atividade enzimática foram realizados de forma semelhante ao descrito por Requena e Bornemann [163]. A formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela OxOx foi analisada através do acoplamento da reação com a enzima HRP, mediada pelo indicador de oxidação ABTS. Em um volume final de 1 mL foi preparada uma solução com 50 μmol L<sup>-1</sup> de ABTS, 25 U de HRP, 5 mmol L<sup>-1</sup> de oxalato de sódio e 10 μL da solução enzimática, em tampão acetato pH 4,0. Monitorou-se a absorbância em 650 nm, banda de absorção característica da oxidação do ABTS, a qual possui um coeficiente de absorvidade molar de 10.000 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Para estes experimentos, utilizou-se o espectrofotômetro modelo Cary 60 UV-Vis da Agilent Technologies e uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico.

Calculou-se a velocidade determinando-se o coeficiente angular da curva nos primeiros minutos da reação, quando o gráfico de absorbância versus o tempo apresentava um comportamento linear. Aplicou-se a formula descrita na Equação 1 para o cálculo da atividade em U mL<sup>-1</sup>.

$$Atividade\ enzimática = \frac{\alpha \cdot 10^6 \cdot V_{cubeta}}{\epsilon \cdot V_{enzima}} \quad (1)$$

$\alpha$  = coeficiente angular da curva de absorbância versus o tempo (Abs min<sup>-1</sup>);

$V_{cubeta}$  = volume final da solução na cubeta (mL);

$V_{enzima}$  = volume de enzima adicionado no ensaio (mL);

$\epsilon$  = coeficiente de absorvidade molar  $10.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Realizou-se de forma semelhante os ensaios aplicando como substrato os produtos de oxidação do EG: glicaldeído, ácido glicólico, ácido glioxílico e ácido oxálico.

A quantidade de proteína foi determinada por uma curva de Bradford [164]. Este ensaio consiste na formação do complexo da proteína analisada com a Coomassie Blue G250, gerando um aumento de absorvância em 595 nm que pode ser aferido e correlacionado com a concentração.

A curva analítica e a análise da amostra foram realizadas em uma microplaca de 96 poços. Para o preparo do reagente Coomassie Blue G250, 100 mg foi dissolvido em 50 mL de etanol 95% e 100 mL de ácido fosfórico 85% (m/v), sendo em seguida diluído para 1 L. Esta solução deve ser filtrada em papel Whatman sempre que for utilizada. Além disso, preparou-se uma solução de BSA  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ . A Tabela 3 contém o protocolo e preparo das soluções, as análises forma realizadas em triplicata.

**Tabela 3:** Protocolo da quantificação proteica pelo método de Bradford.

| Poço           | H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{L}$ ) | BSA 0,2 mg<br>mL <sup>-1</sup> ( $\mu\text{L}$ ) | BSA ( $\mu\text{g}$ ) | Reagente de<br>Bradford |
|----------------|------------------------------------|--|-----------------------|-------------------------|
| 1              | 30                                 | 0  | ---                   | 170                     |
| 2              | 27                                 | 3  | 0,6                   | 170                     |
| 3              | 25                                 | 5  | 1                     | 170                     |
| 4              | 20                                 | 10   | 2                     | 170                     |
| 5              | 15                                 | 15   | 3                     | 170                     |
| 6              | 10                                 | 20   | 4                     | 170                     |
| 7              | 0                                  | 30   | 5                     | 170                     |
| <b>Tampão</b>  | 30*                                | 0  | ---                   | 170                     |
| <b>Amostra</b> | 30*                                | 0  | ---                   | 170                     |

\*Foi adicionado 30  $\mu\text{L}$  do tampão e da amostra ao invés de H<sub>2</sub>O

Após a análise das atividades enzimáticas das oito colônias selecionadas, a que apresentou maior atividade foi repicada em uma solução de glicerol e armazenada em  $-80^\circ\text{C}$ . A pureza desta enzima obtida foi verificada por SDS-PAGE. No qual 200  $\mu\text{L}$  da solução enzimática foi adicionada em um tubo *Eppendorf*<sup>®</sup> contendo 600  $\mu\text{L}$  de acetona. Manteve-se em banho de gelo por 15 min e realizou-se a precipitação

centrifugando por 20 min a 14000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e deixou o precipitado secar. Adicionou-se após seco 30  $\mu$ L da solução tampão tris 0,25 mmol L<sup>-1</sup> pH 5,75 suplementada com glicerol 10% (m/v), SDS 8% (m/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 20% (m/v) e azul de bromofenol (2 mg/L). Foi esquentado os *Eppendorf*<sup>®</sup> a 100 °C por 5 minutos. Com o gel feito anteriormente, analisou-se o tampão, o marcador e as amostras, em uma corrida de 90 min, aplicando-se 180 V. A análise foi realizada com uma solução tampão tris 20 mmol pH 8,3, suplementada com 192 mmol glicina e 0,1% SDS. A investigação das bandas foi feita por coloração de prata e Coomassie Blue G250.

### 3.2.3. Síntese das nanopartículas Pt:Sn

MWCNTs-Pt<sub>75</sub>Sn<sub>25</sub> (razão molar Pt:Sn) foi preparada anteriormente em nosso grupo de pesquisa como descrito na literatura [165,166]. Resumidamente, 30 mL de propilenoglicol (atuando como agente redutor), 1,14 mL de SnCl<sub>2</sub> (0,025 mol L<sup>-1</sup>), 1,11 mL de H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,077 M) e 46,6 mg de acetato de sódio (atuando como agente estabilizador) foram adicionados em um béquer de 250 mL, mantidos sob agitação intensa por 5 minutos em banho ultrassônico até se obter uma suspensão homogênea. A razão metal:C foi mantida em 40% (m/m) adicionando MWCNTs (cerca de 30 mg), previamente funcionalizado. Para a funcionalização, 1,0 g de MWCNTs foi refluxado com 65% (m/m) HNO<sub>3</sub> por 5 horas. Manteve-se a solução sob agitação em ultrassom por 30 min, até a obtenção de uma suspensão homogênea. Após, a mistura foi levada a um microondas comum (Panasonic NN-ST568WRU, 2450 Hz, 800 W) na potência máxima por 2 min. A suspensão foi filtrada usando uma membrana de PTFE de 0,2  $\mu$ m e lavada com etanol e acetona. O produto sólido foi seco em estufa a 120 °C por 2 h, sob atmosfera de N<sub>2</sub> (fluxo de gás 0,5 L min<sup>-1</sup>).

Já para o catalisador MWCNTs-Pt o mesmo procedimento descrito foi realizado, neste caso misturando 30 mL de propilenoglicol, 1,32 mL de H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,077 M e 41,8 mg de acetato de sódio. A Figura 11 mostra os catalisadores obtidos armazenados em tubos

**Figura 11** - Eletrocatalisadores metálicos obtidos. Da esquerda para a direita MWCNTs-Pt<sub>75</sub>Sn<sub>25</sub>, e MWCNTs-Pt.



Fonte: autoria própria.

### 3.2.4. Caracterização do catalisador

A composição dos catalisadores foi analisada anteriormente em nosso laboratório [167] por espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDX) em um microscópio Leica da Zeiss LEO modelo SEM acoplado a um Oxford 7060 modulo de análise. Os padrões de difração foram obtidos em um difratometro de raio-X (D5005 Siemens) operando com radiação de Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ ) gerada em 40 kV e 40 mA. Os seguintes parâmetros foram mantidos constantes durante as análises: faixa  $2\theta = 20^\circ\text{--}90^\circ$ , step =  $0.03^\circ \text{ s}^{-1}$ , e tempo total de análise = 1,97 h. As medidas do tamanho do cristalito (D), o grau de formação de liga do material binário e o tratamento do DRX foram feitos como descrito por *Palma et al* [143].

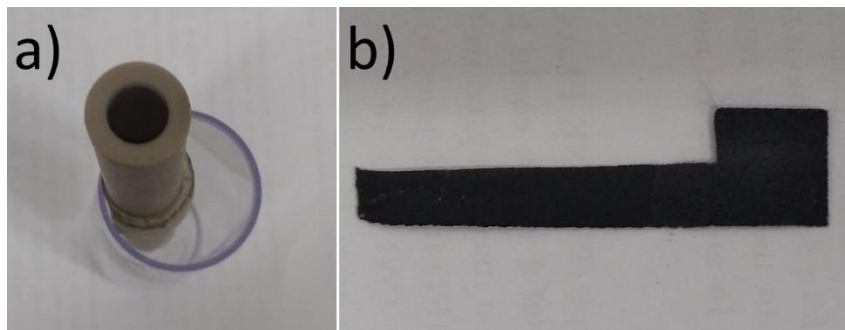
### 3.2.5. Preparo do sistema inorgânico

Para os catalisadores metálicos, preparou-se uma tinta catalítica, através da dispersão das nanopartículas metálicas (PtSn e Pt) depositadas em MWCNTs. Adicionou-se 2 mg dos catalisadores em um tubo Eppendorf<sup>®</sup> de 2 mL com 95  $\mu\text{L}$  de isopropanol (Sigma-Aldrich) e 5  $\mu\text{L}$  de Nafion<sup>®</sup> 5% (Sigma-Aldrich) não modificado. Este tubo foi submetido por irradiação de ultrassom por 30 min ou até completa formação de uma tinta homogênea, sendo adicionado gelo no banho regularmente para evitar o aquecimento.

Um disco de carbono vítreo com diâmetro de 7 mm foi polido antes dos experimentos eletroquímicos com alumina 1  $\mu\text{m}$ , 0,3  $\mu\text{m}$  e 0,05  $\mu\text{m}$ . Adicionou-se 20  $\mu\text{L}$  das soluções de catalisadores metálicos sobre o eletrodo previamente limpo

(Figura 12-a), o eletrodo foi mantido no dessecador por 2h, antes das medidas eletroquímicas.

**Figura 12** - Eletrodos utilizados nos ensaios eletroquímicos. a) Eletrodo carbono vítreo 7 mm de diâmetro. b) Papel de carbono área 1 cm<sup>2</sup>.



**Fonte:** autoria própria.

Para os procedimentos de eletrólise, o suporte utilizado foi o papel de carbono Toray<sup>®</sup> (fibra de carbono, TGP-H-060 Fuel Cell Earth, Stoneham, MA) com área de 1 cm<sup>2</sup> (Figura 12-b). 50 µL da tinta catalítica metálica foi adicionado sobre a superfície do papel de carbono. Semelhante ao suporte de carbono vítreo, estes eletrodos foram mantidos no dessecador por pelo menos 2h. Para os ensaios de sistema híbrido a solução foi suplementada com 0,03 U mL<sup>-1</sup> de OxOx.

### 3.2.6. Preparo do sistema orgânico

Para os ensaios eletroquímicos do sistema orgânico, foi utilizado um sistema homogêneo, com todos os catalisadores em solução. A concentração do TEMPO-NH<sub>2</sub> foi de 5 mmol L<sup>-1</sup>, semelhante a reportada anteriormente [63,66,68,77], e 0,03 U mL<sup>-1</sup> de OxOx. Aplicou-se como eletrodo de trabalho o carbono vítreo de 7 mm (Figura 12-a) para os ensaios de voltametria e cronoamperometria, ou um suporte de papel de carbono de 1 cm<sup>2</sup> (Figura 12-b) para as eletrólises. Estes eletrodos não sofreram modificações. Todos os experimentos eletroquímicos foram realizados em tampão citrato-fosfato 150 mmol L<sup>-1</sup> pH 5,5.

### 3.2.7. Voltametrias cíclicas

A caracterização voltamétrica dos diferentes tipos de eletrodos e sistemas foi realizada em uma cela eletroquímica de compartimento único (Figura 13). Utilizou-se o eletrodo de Ag/AgCl, KCl (sat) como referência, um fio de platina platinizada em espiral (10 cm) como eletrodo auxiliar e o eletrodo de trabalho conforme descrito anteriormente.

**Figura 13** - Célula eletroquímica utilizada nas análises de voltametria cíclica e cronoamperometria.



**Fonte:** autoria própria.

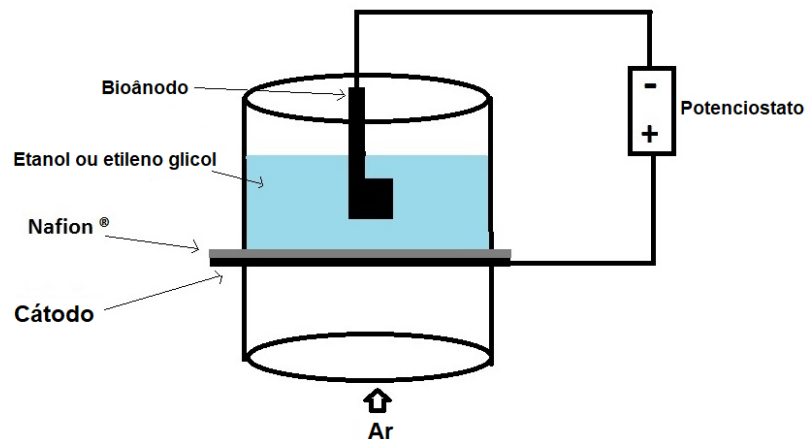
Nos ensaios preliminares com os eletrocatalisadores metálicos, varreu-se o potencial de -0,4 até 0,8 V vs Ag/AgCl, KCl (sat) a uma velocidade de varredura de 30  $\text{mV s}^{-1}$  em um potenciostato da AutoLab Methrom PGSTAT 204, variando-se a concentração de EG de 0-200  $\text{mmol L}^{-1}$ . Em ensaios subsequentes, a janela de varredura foi modificada para 0-1,0 V e 0-1,2 V vs Ag/AgCl, KCl (sat), com velocidade de 10  $\text{mV s}^{-1}$ . Analisou-se o comportamento voltamétrico do EG para os diferentes sistemas propostos, também para os prováveis produtos de oxidação formados (glicolaldeído, ácido glicólico, ácido glioxílico e ácido oxálico).

### 3.2.8. Teste de potência

Os testes eletroquímicos de semi biocélula a combustível foram realizados em uma célula eletroquímica de dois compartimentos (Figura 14) separada por uma membrana de Nafion<sup>®</sup>, similar a descrita por Moehlenbrock e Minteer [47]. Uma membrana de difusão gasosa contendo 20% de platina, prensado à quente na membrana trocadora de prótons (Nafion<sup>®</sup> 212) (130 °C, pressão de 12,5 kgf cm<sup>-2</sup> por 120 s). A célula, quando não estava em uso, era mantida em ácido sulfúrico concentrado em seu compartimento anódico para preservar a hidratação da membrana de Nafion<sup>®</sup>.

Antes das análises, o compartimento anódico da célula foi lavado com água ultrapura com subsequente adição de solução tampão citrato-fosfato 150 mmol L<sup>-1</sup> pH 5,5 e mantido em repouso de 1h. Após esse procedimento, a solução era descartada.

**Figura 14** - Esquema representativo da célula eletroquímica para os testes de potência.



**Fonte:** Adaptado de Moehlenbrock e Minteer [47].

O compartimento catódico foi mantido em contato direto com o ar e o anódico foi preenchido com 10 mL de tampão citrato-fosfato 150 mmol L<sup>-1</sup> (pH = 5,5), a concentração de 0,03 U mL<sup>-1</sup> de OxOx e 100 mmol L<sup>-1</sup> EG para o experimento na presença do combustível. Aferiu-se a VCA por cerca de 30 min ou até a estabilização da voltagem da célula. Em seguida, realizou-se uma varredura do VCA até 0 V a uma velocidade de 1 mV s<sup>-1</sup> e foi calculado a densidade de potência.

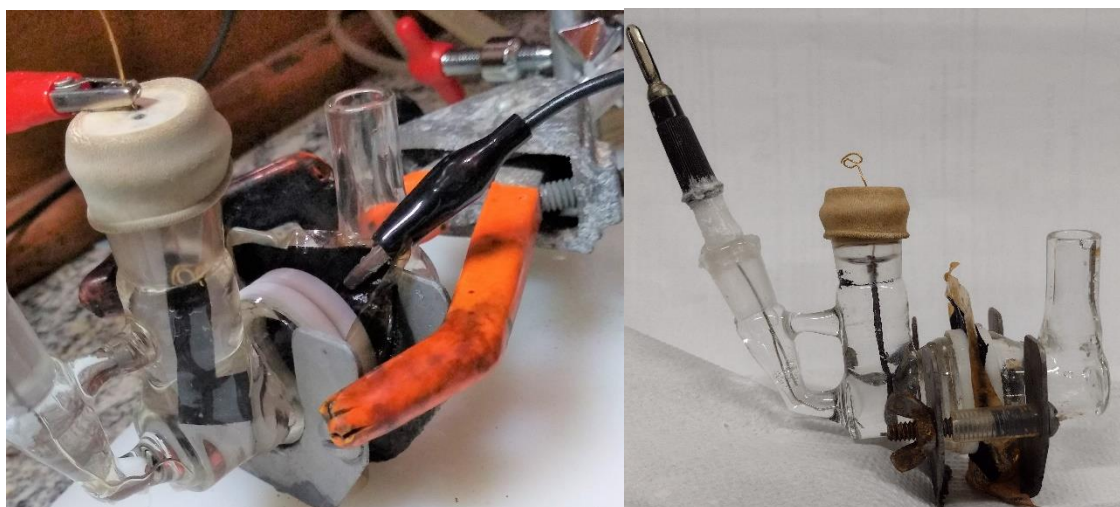
### 3.2.9. Titulação cronoamperométrica (TCA)

As curvas de TCA para o EG, ácido glicólico, ácido glioxílico e ácido oxálico, foram realizadas em uma célula de compartimento único (Figura 14) conforme descrita no item 3.2.7. Os potenciais investigados era função das condições experimentais e foram mantidos fixos em 0,5; 0,75 ou 0,9 V vs Ag/AgCl, KCl (sat). Inicialmente, realizou-se a cronoamperometria apenas na presença de eletrólito de suporte (ES) por 3 min. Logo após, foram realizadas adições sucessivas dos substratos variando a concentração de 0-200 mmol L<sup>-1</sup>, o intervalo entre as injeções foi de 120s.

### 3.2.10. Eletrólise

As eletrolises foram realizadas em uma célula com dois compartimentos separados por uma membrana Nafion<sup>®</sup> prensada a um cátodo de difusão gasosa contendo 20% de platina (A6ELAT/BASF) (Figura 15). Manteve-se o compartimento catódico em contato direto com o ar. Para preservar a hidratação da membrana de Nafion<sup>®</sup>, quando não estava em uso, o compartimento anódico foi mantido em ácido sulfúrico concentrado.

**Figura 15** - Célula eletroquímica de três compartimentos utilizada nos experimentos de eletrolise.



**Fonte:** autoria própria.

Ao iniciar os procedimentos, o compartimento anódico da célula foi lavado com água ultrapura, com subsequente adição de solução tampão citrato-fosfato 150 mmol L<sup>-1</sup> pH 5,5 e repouso de 1h. Após esse procedimento, a mesma foi descartada e uma



solução contendo tampão citrato-fosfato na presença de 100 mmol L<sup>-1</sup> de EG foi adicionada.

Aplicou-se um potencial de 0,5 (MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> e MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx) ou 0,75 V (TEMPO-NH<sub>2</sub> e TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx) vs Ag/AgCl, KCl (sat) durante 72h, coletando-se no tempo inicial e a cada 1h (até 12 horas) alíquotas de 50 µL, as quais foram analisadas por um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV/RID) Foram coletadas alíquotas nos tempos de 0-12-24-48 e 72h. Nestas, imediatamente, foi adicionado o mesmo volume de uma solução de NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup>, preparada a partir da diluição de uma solução padrão da Sigma Aldrich de 50% (m/m); em seguida, a mistura foi filtrada com um filtro PTFE 0,45 µm. Este procedimento tem o objetivo de converter o CO<sub>2</sub> presente para Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e permitir a detecção pelo detector de índice de refração (RID).

Para obter mais informações sobre o mecanismo de oxidação do EG foi realizada a eletrólise de alguns subprodutos: ácido glicólico, ácido glioxílico, ácido fórmico, ácido oxálico e glicolaldeído. Os ensaios foram realizados a potencial fixo, empregando MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> (0,500 V vs Ag/AgCl, KCl (sat)) na presença e ausência de OxOx (0,03 U mL<sup>-1</sup>) e TEMPO-NH<sub>2</sub> (0,750 V vs Ag/AgCl, KCl (sat)) por 12h. Foram coletadas amostras para análise por CLAE-UV/RID no final da eletrólise. Além disso, um ensaio puramente enzimático empregando 100 mmol L<sup>-1</sup> desses produtos na presença de 0,03 U mL<sup>-1</sup> de OxOx em um tempo total de reação de 24h; de forma semelhante, foram coletadas amostras para análise por CLAE-UV/RID após este período. O volume total da solução contendo o eletrólito suporte foi de 5 mL e o sistema foi mantido fechado.

### 3.2.11. Análises por CLAE-UV/RID

As análises das amostras das eletrólises e ensaios enzimáticos descritos no tópico anterior, foram realizadas em um cromatógrafo (Shimadzu, modelo LC-10AT) equipado com duas bombas e um injetor automático (volume de injeção de 20 µL) acoplado a um sistema duplo de detecção on-line com ultravioleta (UV) e refração (RID-10). A coluna utilizada foi uma Aminex<sup>®</sup> HPX-87H (300x7,8 mm) e a fase móvel empregada foi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,33 mM em uma vazão constante de 0,6 mL min<sup>-1</sup>. Os detectores foram o de UV (210 nm) e detector de índice de refração (RID). Os produtos formados foram identificados pela comparação com o tempo de retenção obtido pelas

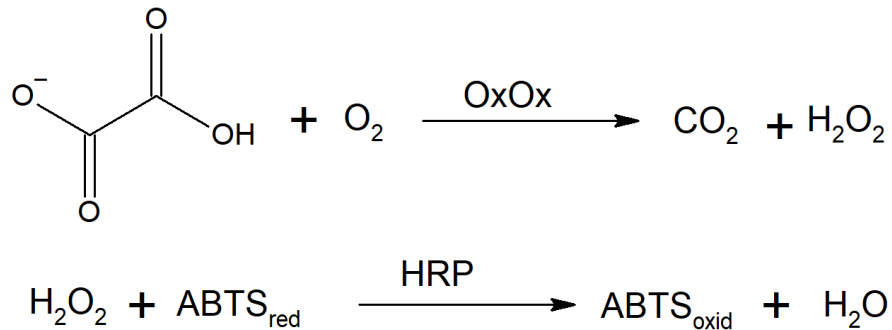
análises de padrões das possíveis substâncias formadas. Já a quantificações foram feitas pela elaboração de curvas padrões, na qual foi injetado em triplicata o EG (1-100 mmol L<sup>-1</sup>), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,25-30 mmol L<sup>-1</sup>), ácido oxálico (0,4-20 mmol L<sup>-1</sup>), ácido glicólico, ácido fórmico, ácido glioxílico e glicolaldeído de (1-30 mmol L<sup>-1</sup>). Para o cálculo foi aplicado a área dos picos identificados na curva padrão do produto correspondente.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. ATIVIDADE DA OxOx

A OxOx (E.C. 1.2.3.4) obtida ficou armazenada no freezer (-80°C), sendo assim, é de extrema importância verificar a atividade enzimática antes do seu uso. A atividade enzimática é dada por unidade (U), foi proposta em 1964, definida como a quantidade de enzima que catalisa a conversão de 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto nas condições experimentais aplicadas [168]. A catálise da OxOx na oxidação do ácido oxálico produz peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) [73], o qual oxida o ABTS na presença da HRP [163], como segue na Figura 16.

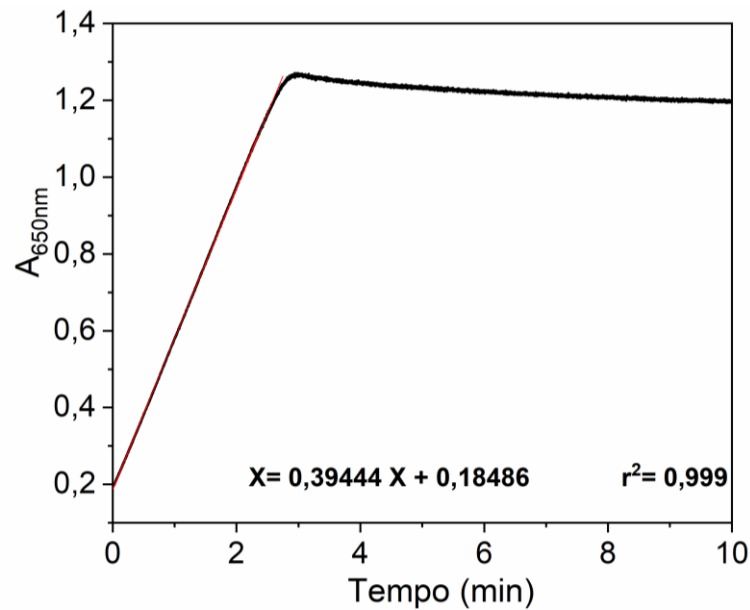
**Figura 16** - Esquema da aferição da atividade enzimática da OxOx.



**Fonte:** autoria própria.

Monitorando-se a absorvância em 650 nm, é possível obter-se a curva da Figura 17, que correlaciona a absorvância neste comprimento de onda com o tempo.

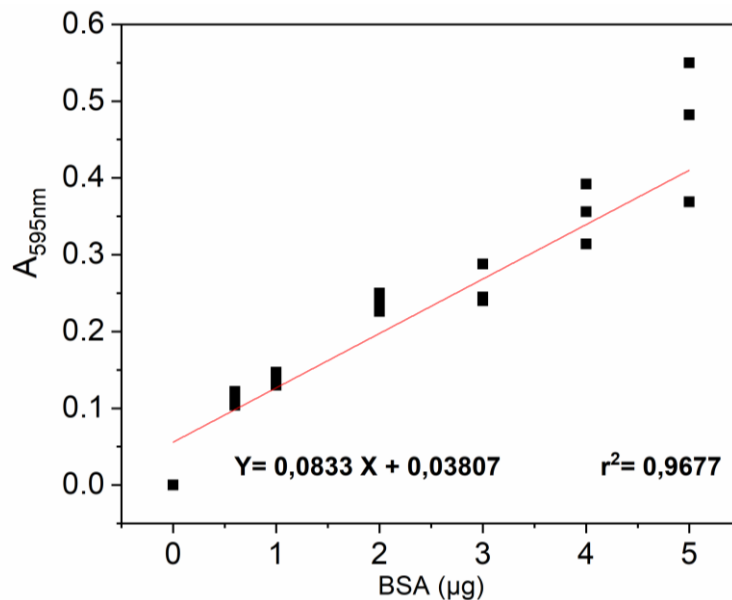
**Figura 17** - Absorbância em 650 nm em relação ao tempo, nos ensaios de atividade enzimática da OxOx em tampão ácido acético 40 mM pH 4,0.



**Fonte:** autoria própria.

Para o cálculo da atividade, calculou-se o coeficiente angular da parte linear da curva apresentada na Figura 17 e aplicou-se a Equação 1. A necessidade de se calcular o coeficiente linear nesta faixa é para garantir que estamos utilizando dados da enzima em suas condições de estado estacionário, ou seja, quando a concentração do produto é muito inferior ao substrato. Os dados das replicatas estão contidos na Tabela 4.

Para o cálculo da atividade específica ( $U\ mg^{-1}$ ), que correlaciona a atividade com a quantidade de proteína, foi realizado o método de quantificação proteica pela curva de Bradford [164]. Este ensaio se baseia na formação do complexo da proteína analisada com a *Coomassie Blue G250*, gerando um aumento de absorbância em 595 nm que pode ser aferido e correlacionado com a concentração. A Figura 18 contém a curva de Bradford obtida.

**Figura 18** - Curva de quantificação de proteína (0-5 µg) realizada pelo método de Bradford.

Fonte: autoria própria.

**Tabela 4:** Atividade enzimática da OxOx.

| <b>Coeficiente angular</b> | <b>U mL<sup>-1</sup></b> | <b>U mg<sup>-1</sup></b> |
|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>0,40938</b>             | 4,0938                   | 511,725                  |
| <b>0,39444</b>             | 3,9444                   | 493,050                  |
| <b>0,39478</b>             | 3,9478                   | 493,475                  |
| <b>Média</b>               | 3,9953                   | 499,417                  |

Os resultados da Tabela 4, demonstram que a enzima está ativa e que o seu preparo e armazenamento permitiram a manutenção da atividade. Além disso o valor médio de  $3,995 \pm 0,070$  U mL<sup>-1</sup> e  $499,4 \pm 8,7$  U mg<sup>-1</sup> são superiores ao relatado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa [65] e por outros trabalhos da literatura [73,169]. Também foi aplicado o mesmo ensaio para os possíveis subprodutos de oxidação do EG, os valores médios são mostrados na Tabela 5.

**Tabela 5:** Atividade enzimática da enzima OxOx para diferentes substratos.

| <b>Substrato</b>      | <b>U mL<sup>-1</sup></b> | <b>U mg<sup>-1</sup></b> |
|-----------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Glicolaldeído</b>  | 0                        | 0                        |
| <b>Ac. Glicólico</b>  | 0                        | 0                        |
| <b>Ac. Glioxílico</b> | 0                        | 0                        |
| <b>Ac. Oxálico</b>    | 3,948                    | 439,5                    |

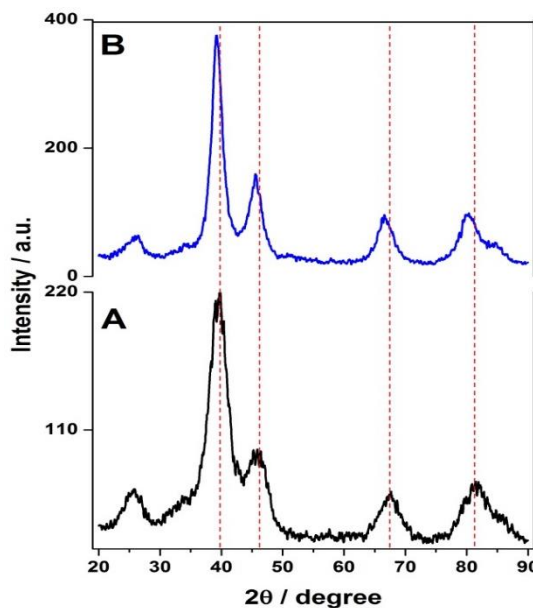
A OxOx é considerada uma enzima promiscua [72], ou seja, ela pode catalisar reações além das do seu substrato característico. Na literatura já foi relatado a capacidade da OxOx de oxidar ácidos carboxílicos simples como ácido oxálico, ácido glioxílico, ácido maleico [91] e ácido mesoxálico [51]. Analisando os resultados da Tabela 5, esperava-se atividade catalítica na oxidação do ácido glioxílico pela OxOx. Entretanto, a atividade relativa em comparação ao substrato específico é de 3,7% [91]. O aumento do tempo de monitoramento poderia permitir a determinação da atividade da OxOx na oxidação do ácido glioxílico.

Para explicar a oxidação do ácido oxálico deve se atentar que no pH do ensaio (4,0), no qual o ácido oxálico está majoritariamente em sua forma desprotonada. Gerando assim uma atividade semelhante ao substrato original oxalato.

## 4.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Através das análises de EDX determinou-se a composição das MWCNTs-PtSn que apresentaram uma razão molar de Pt:Sn de Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>. A Figura 19 apresenta os padrões de difrações de raio-X para MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>.

**Figure 19** - Padrões de DRX dos catalisadores (A) MWCNTs-Pt e (B) MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>.



Fonte: Antonio et al. [167].

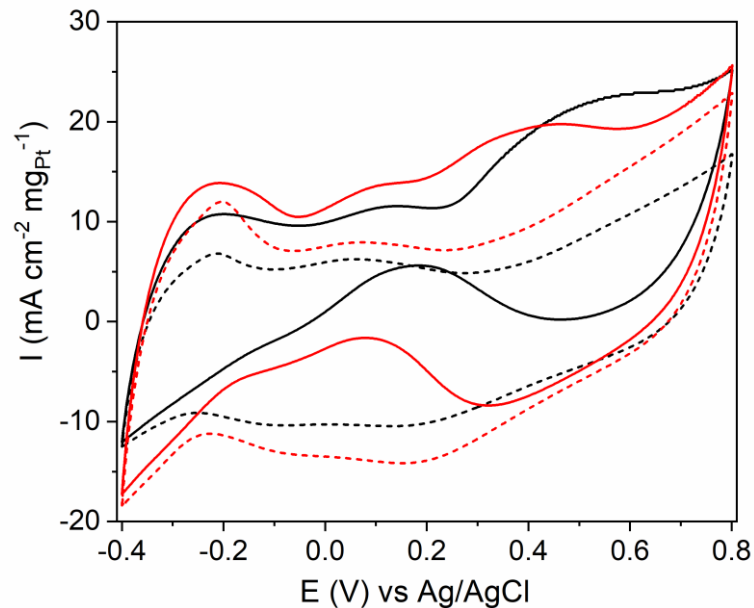
Analisando a Figura 19, pode ser atribuído o pico em  $2\theta = 25^\circ$  ao plano cristalográfico do suporte de carbono (002). Já os picos detectados para ambas as composições foram característicos da estrutura cristalina da platina cúbica de face centrada (CFC) (grupo espacial Fm-3m) e referem-se aos planos de reflexão (111), (200), (220), (311) e (222) indicados pelas linhas tracejadas vermelhas. Através do plano (220) foi obtido o tamanho médio do cristalito das nanopartículas sintetizadas de 3,4 nm.

Comparando-se o DRX do catalisador MWCNTs-Pt (linha preta) com os picos de difração  $2\theta$  de MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> (linha azul) há a indicação que os átomos de Sn foram incorporados na estrutura de Pt (JCPDS # 00-004-0802), levando a uma modificação no parâmetro de rede de célula unitária ( $a = 3,96800 \text{ \AA}$ ) em comparação com Pt puro ( $a = 3,91455 \text{ \AA}$ ). Outra indicação da incorporação de Sn na estrutura do catalisador é obtida calculando o grau de liga usando a lei de Vegard [143]. Para as MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> observa-se a formação de 7,9% de liga PtSn, esta mudança pode melhorar a atividade eletroquímica do catalisador na oxidação de pequenas moléculas [170–172].

### **4.3. OXIDAÇÃO DO EG NO SISTEMA HÍBRIDO METÁLICO – MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>**

A primeira caracterização eletroquímica realizada foi a voltametria cíclica, na qual buscou-se avaliar a presença de picos de oxidação e a modificação do voltamograma com a presença EG. A Figura 20 mostra os voltamogramas dos eletrodos preparados com as nanopartículas de Pt e Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> depositadas sobre MWCNTs.

**Figura 20** - Curvas voltamétricas na presença (linha sólida) e ausência (linhas tracejadas) de EG (100 mmol L<sup>-1</sup>) em MWCNTs-Pt (linha preta) e MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> (linha vermelha). ES= tampão fosfato-citrato 150 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,5,  $\nu = 30$  mVs<sup>-1</sup>.



**Fonte:** autoria própria.

Analisando a Figura 20 é possível verificar que na ausência de EG há um pequeno pico de adsorção/dessorção de H<sub>2</sub> para ambos os catalisadores. Comparando-se com voltamogramas obtidos em meios ácidos, o pico de H<sub>2</sub> é menor em pHs neutros [165]. Além disso, na presença de Sn observa-se, um ligeiro alargamento da região da dupla camada elétrica (-0,2-0,2 V vs Ag/AgCl) nos voltamogramas do ES. Na presença de EG um pico de oxidação bem definido é observado na região de 0,4 V vs Ag/AgCl para MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>.

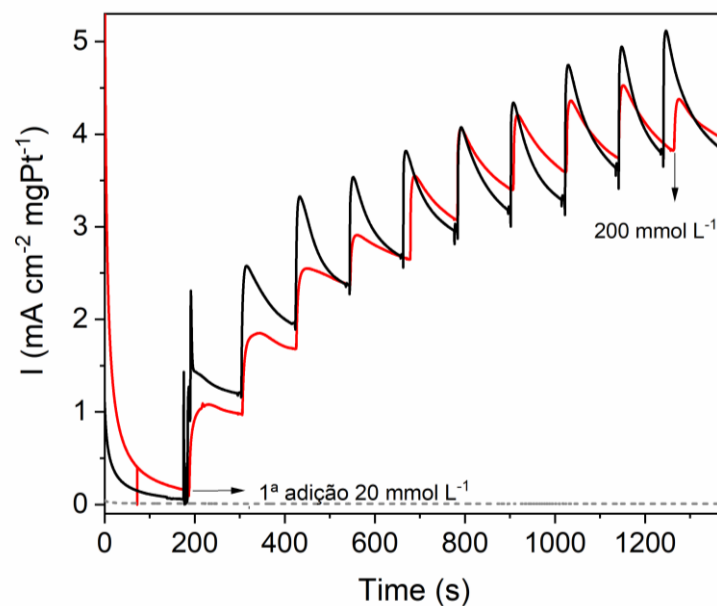
A introdução de Sn deslocou o potencial inicial de oxidação do EG em 50 mV para valores menos positivos. Isto era esperado, já que o Sn é conhecido por seu bom desempenho como cocatalisador de nanopartículas de Pt durante a oxidação de álcoois [173]. O Sn modifica a estrutura eletrônica de MWCNTs-Pt, conseqüentemente, altera a força de adsorção dos produtos formados nos sítios ativos de Pt e dessa forma, promove a oxidação do EG em potenciais menos positivos [173]. Resultados semelhantes são observados em catalisadores bimetálicos, devido ao efeito bifuncional, o qual foi descrito por *Watanable et al.* [174]. Neste efeito, a adição de metais menos nobres que a platina, mas com capacidade de adsorção de



espécies oxigenadas pela ativação da água, melhoram a eficiência catalítica da oxidação de álcoois, devido a transferência destas espécies oxigenadas adsorvidas para uma molécula orgânica adsorvida no sítio de platina vizinho. Conseqüentemente, a oxidação do combustível ocorre em sobrepotencial menos positivo que a Pt pura.

A Figura 21 mostra as curvas de TCA obtidas para os catalisadores MWCNTs-Pt e MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>.

**Figura 21** - TCA do EG para ânodo de MWCNTs-Pt (linha preta), MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> (linha vermelha) e o experimento de controle (eletrodo de carbono vítreo na ausência de nanopartículas - linha tracejada cinza). E= 0,5 V vs Ag/AgCl, ES= tampão fosfato-citrato 150 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,5, adições sucessivas de 20 mmol L<sup>-1</sup> EG em intervalos de 120s.

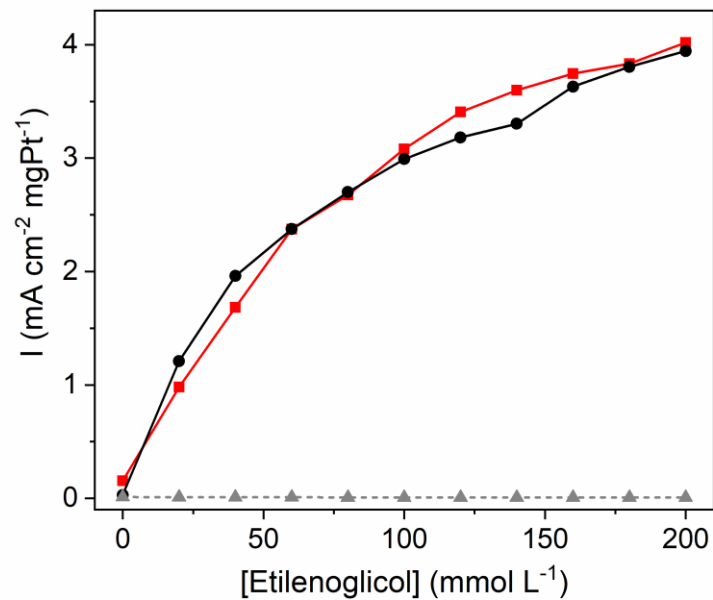


**Fonte:** autoria própria.

De forma semelhante à voltametria cíclica, a TCA apresentou aumentos sucessivos de corrente com a adição de substrato no meio como pode ser observado na Figura 21. A Figura 22 correlaciona a corrente da TCA com a concentração de EG no meio, embora MWCNTs-Pt e MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> forneçam a mesma magnitude de corrente, o pico de oxidação desloca para valores menos negativos (Figura 20). O eletrodo MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> apresenta um decréscimo da corrente ligeiramente menor, indicando menor envenenamento em comparação ao MWCNTs-Pt. Em concentrações intermediárias de EG, a corrente diminuiu mais abruptamente para MWCNTs-Pt do que para MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>. Este resultado indicou que os sítios ativos se tornam mais fortemente bloqueados na ausência de Sn à medida que a

oxidação prossegue. Sendo assim, o catalisador MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> foi escolhido para ser utilizado na parte seguinte deste trabalho.

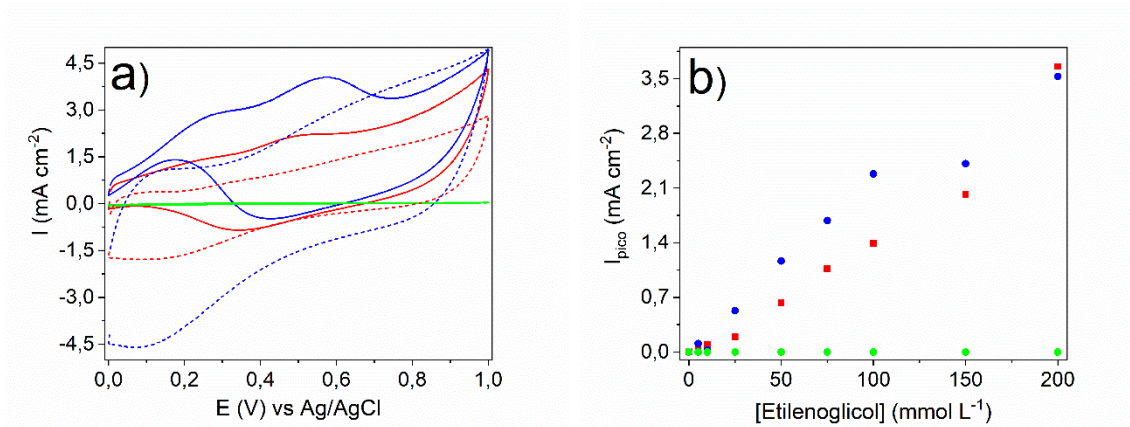
**Figura 22** - Corrente ao final do ciclo (120 s) da TCA do EG para ânodo de MWCNTs-Pt (círculo preto), MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> (quadrado vermelho) e o experimento de controle (eletrodo de carbono vítreo na ausência de nanopartículas - triângulo cinza).  $E_{ap}$  = 0,5 V vs Ag/AgCl, ES= tampão fosfato-citrato 150 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,5, adições sucessivas de 20 mmol L<sup>-1</sup> EG.



**Fonte:** autoria própria.

Com as MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> apresentando atividade eletrocatalítica para a oxidação do EG, é necessário avaliar se o sistema híbrido tem o mesmo comportamento. A Figura 23 apresenta as curvas voltamétricas para o eletrodo MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> na presença e ausência da OxOx.

**Figura 23** - Voltametrias cíclicas do sistema híbrido metálico (MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> + OxOx). (a) Curvas voltamétricas; a linha sólida refere-se à presença de EG; as linhas tracejadas referem-se à ausência de EG; ES= tampão fosfato-citrato 150 mmol L<sup>-1</sup>,  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ ,  $[\text{EG}] = 100 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $[\text{OxOx}] = 0,03 \text{ U mL}^{-1}$ . (b) corrente de pico do EG na presença de MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx (azul / círculo), MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> (vermelho / quadrado) ou OxOx pura (eletrodo de carbono vítreo na presença de 0,03 U mL<sup>-1</sup> OxOx - verde / círculo);  $E_{\text{pico}} = 0,5 \text{ V vs Ag/AgCl}$ .



**Fonte:** autoria própria.

Na ausência do EG, a adição da OxOx aumenta a corrente capacitiva, indicando que ocorrem modificações na dupla camada com a adição do biomaterial na solução. O pico de oxidação do EG deslocou 40 mV para valores mais positivos na presença da OxOx em comparação ao sistema apenas com as MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>.

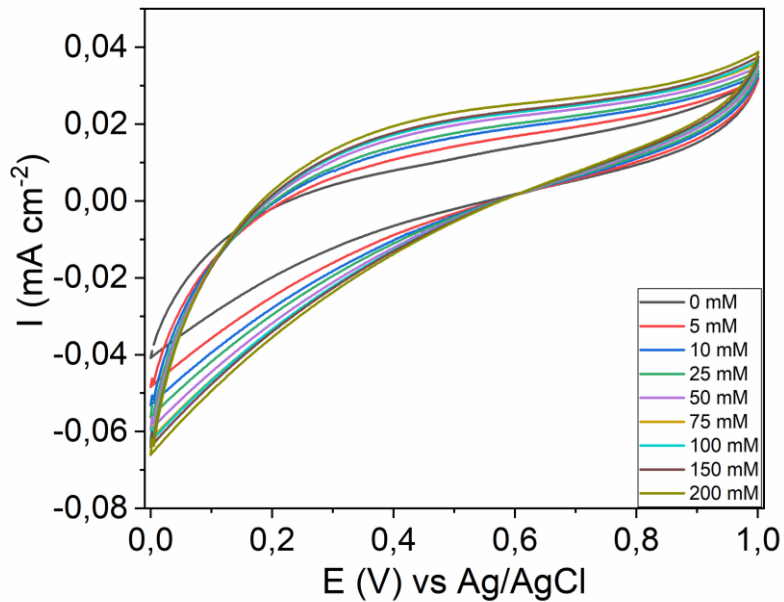
Analisando a Figura 23-b observa-se uma correlação direta entre a corrente de pico oxidação e a concentração de EG para ambos os sistemas até 100 mmol L<sup>-1</sup>. Na qual em média, as densidades de corrente obtidas na presença de OxOx foram 1,6 vezes maiores do que as densidades de corrente observadas para MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>. Em concentrações mais altas, a densidade de corrente permaneceu semelhante para ambos os sistemas.

A atividade catalítica gerada pelo sistema híbrido MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx assemelhou-se aos resultados relatados por *Falase et al.* [161], que relataram um aumento de cerca de 1,2 na densidade de corrente de oxidação de EG na presença de PtRu-ADH, indicando o efeito benéfico do sistema híbrido.

A Figura 23-b contém os ensaios apenas na presença da OxOx (eletrodo de carbono vítreo na presença de OxOx- verde / círculo). Nele é possível verificar que a enzima não oxida o EG diretamente, confirmando resultados anteriores descritos na literatura para o glicerol [66] e etanol [65], provando que para a quebra da ligação C-

C na catalise enzimática é necessário a oxidação anterior do álcool. A Figura 24 contém os voltamogramas da OxOx em diferentes concentrações de EG.

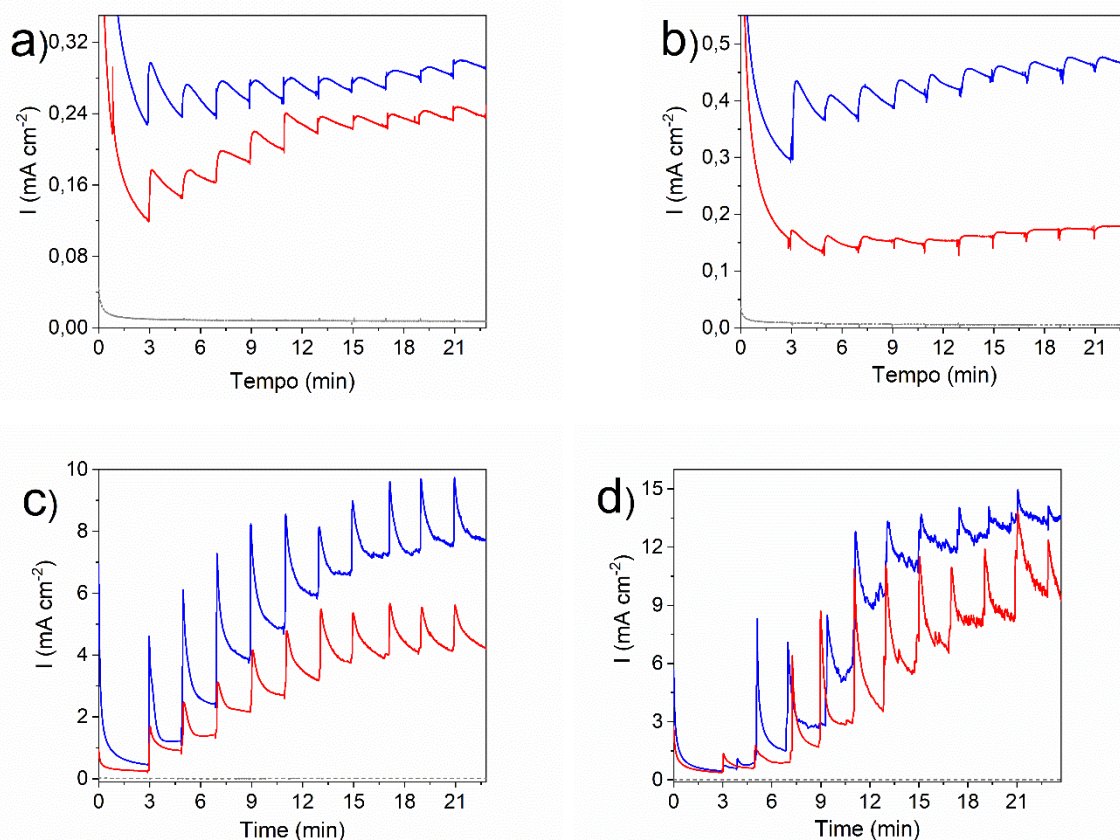
**Figura 24** - Curvas voltamétricas do ensaio enzimático ( $0,03 \text{ U mL}^{-1}$  OxOx) em eletrodo de carbono vítreo com diferentes concentrações de EG. ES= tampão fosfato-citrato  $150 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ .



**Fonte:** autoria própria.

Para elucidar como a OxOx atua nas etapas do ciclo catabólico de oxidação do sistema híbrido, foram realizadas curvas cronoamperométricas para os sistemas MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> e MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx com adições sucessivas de EG e seus produtos de oxidação (ácido oxálico, ácido glicólico e ácido glioxílico) em um potencial fixo de  $0,9 \text{ V vs Ag/AgCl}$  (Figura 25).

**Figura 25** - Ensaio cronamperométricos realizados na presença de MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx (linha azul), MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> (linha vermelha) e experimento controle (eletrodo de carbono vítreo no eletrólito - linha tracejada cinza). Adições sucessivas de 20 mmol L<sup>-1</sup> de (a) etilenoglicol, (b) ácido glicólico, (c) ácido glioxílico e (d) ácido oxálico em um potencial de oxidação fixo (0,900 V vs Ag/AgCl). EG. ES= tampão fosfato-citrato 150 mmol L<sup>-1</sup>, [OxOx] = 0.03 U mL<sup>-1</sup>.



**Fonte:** autoria própria.

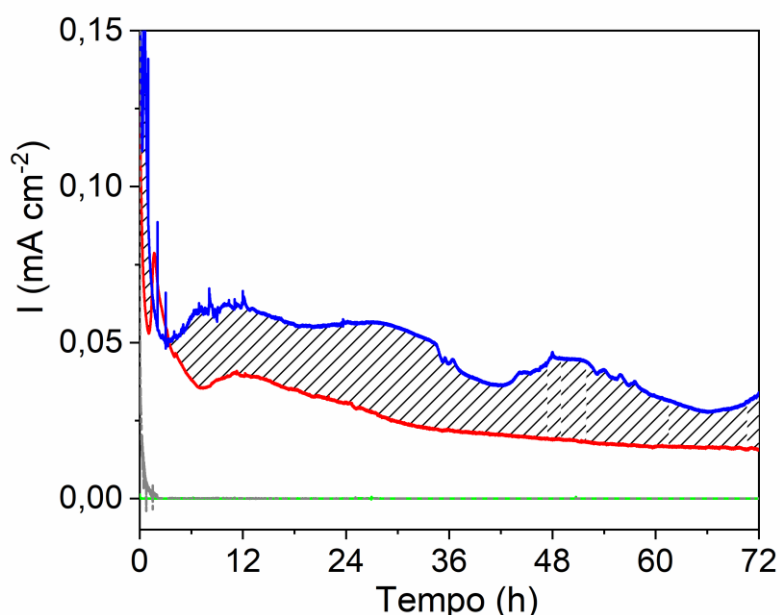
Quando os experimentos foram realizados na presença de MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx, houve aumento da corrente para todos os compostos analisados, incluindo o EG (Figura 25-a) em comparação ao sistema contendo apenas MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>. Esse resultado pode ser explicado pela ação da OxOx nos produtos de oxidação formados. A atividade da OxOx em relação aos glioxílico e oxálico já foi descrita como resultante da capacidade da OxOx de catalisar a oxidação desses compostos [72,79,91]. Assim, o aumento da corrente para EG na presença de MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx pode ser atribuído a uma reação em cadeia com os produtos gerados no eletrodo MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> (ácidos glicólico, glioxílico e oxálico).

Comparando-se com o relatado anteriormente por *Franco et al.* para uma biocélula de etanol [65], onde tanto o catalisador orgânico (TEMPO-LPEI) com a

enzima foram imobilizadas sobre o eletrodo; no sistema em estudo a OxOx está em solução, e o produto gerado pela MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> deve se difundir da interfase do eletrodo para reagir com a enzima. A necessidade do transporte do substrato até a enzima, explica a baixa atividade catalítica apresentadas na Figura 23. O mesmo comportamento ocorreu nas voltametrias cíclicas com os subprodutos de oxidação, como mostra a Figura A5 do apêndice B.

Com o objetivo de quantificar e identificar os produtos formados na eletroxidação do EG, eletrólises de 72h, a um potencial constante de 0,5 V vs Ag/AgCl, para os diferentes sistemas foram realizadas. A Figura 26 contém as curvas cronoamperométricas após 72 horas tanto para o sistema MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>, quanto para o sistema MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx.

**Figura 26** - Curvas cronoamperométricas da oxidação do EG (100 mmol L<sup>-1</sup>) na presença de MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx (linha azul), MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> (linha vermelha), enzima pura (eletrodo de papel de carbono na presença de OxOx - linha verde) e experimento controle (MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx na presença de ES - linha cinza tracejada). ES= tampão fosfato-citrato 150 mmol L<sup>-1</sup>. [EG] = 100 mmol L<sup>-1</sup>, E<sub>ap</sub> = 0,5 V vs Ag/AgCl, [OxOx] = 0,03 U mL<sup>-1</sup>.



**Fonte:** autoria própria.

Como esperado, a densidade de corrente da oxidação do EG pelo sistema MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx (linha azul) foi maior em comparação ao sistema MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> (linha vermelha). Já para os experimentos apenas na presença da OxOx, não

houve evidência de oxidação direta do EG, como já observado nas voltametrias cíclicas (Figura 24). A Figura 26 também destaca o aumento da densidade de carga com MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx, a qual foi de 65%. Ou seja, o sistema híbrido é mais ativo na oxidação do EG, indicando que a OxOx pode oxidar os produtos formados pelo MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> coletando mais elétrons por molécula de combustível de partida.

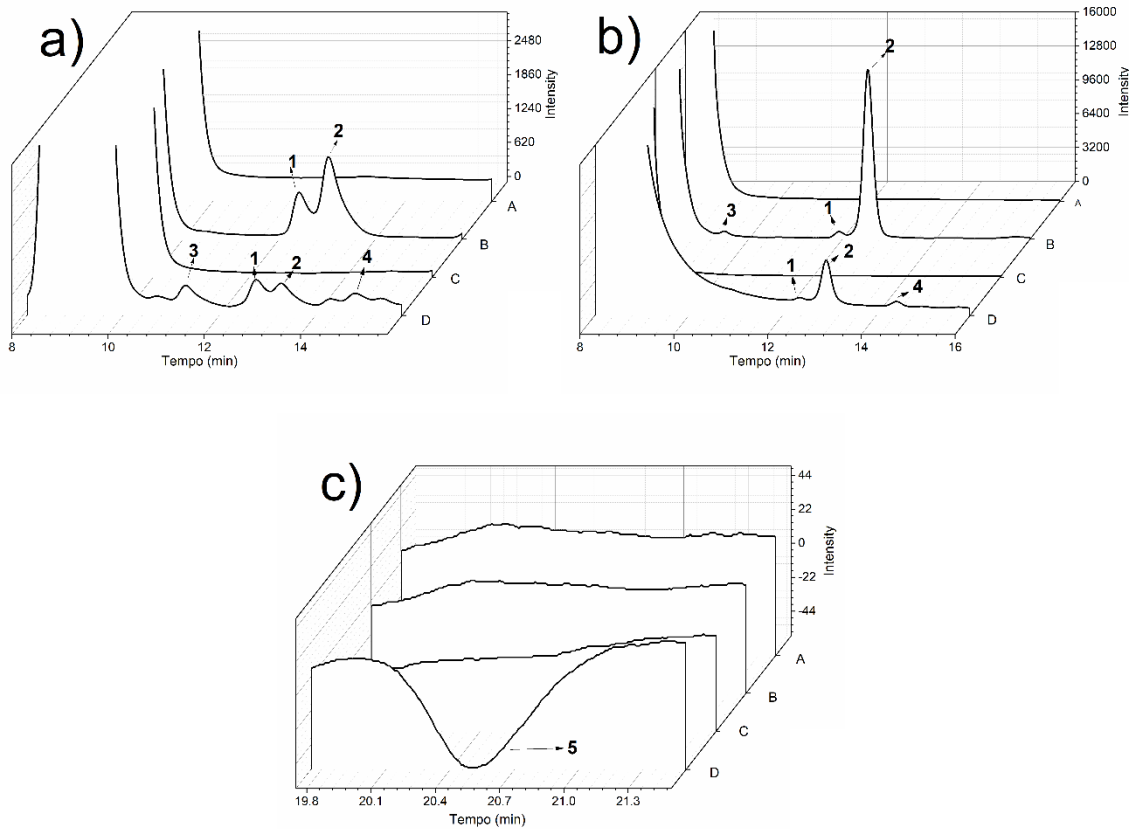
Além disso, para verificar se o ES, que contém ácido cítrico, poderia ser oxidado durante os experimentos, foi realizado uma eletrolise de controle na ausência de EG (linha cinza tracejada). De forma semelhante ao reportado anteriormente [65], a corrente encontrada foi muito baixa e não foi observado produtos de oxidação nas análises de CLAE-UV/RID, mostrando que o ES é inerte e não sofre nenhum tipo de oxidação pela enzima ou eletrodo.

Amostras foram cuidadosamente coletadas do meio reacional como descrita no tópico 3.2.10. e analisadas por CLAE-UV/RID. A Figura 27 contém os cromatogramas para o sistema MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> e MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx, por RID (Figura 27-a), por UV-vis (Figura 27-b) e pelas análises na presença de CO<sub>2</sub> (Figura 27-c), no tempo de 0 e 12h.

Através da comparação com os tempos de eluição dos padrões analíticos injetados nas mesmas condições de análise, foi possível identificar e quantificar os intermediários formados. A Figura 28 mostra a distribuição dos produtos identificados na amostra de 12h para o sistema MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> e MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx.



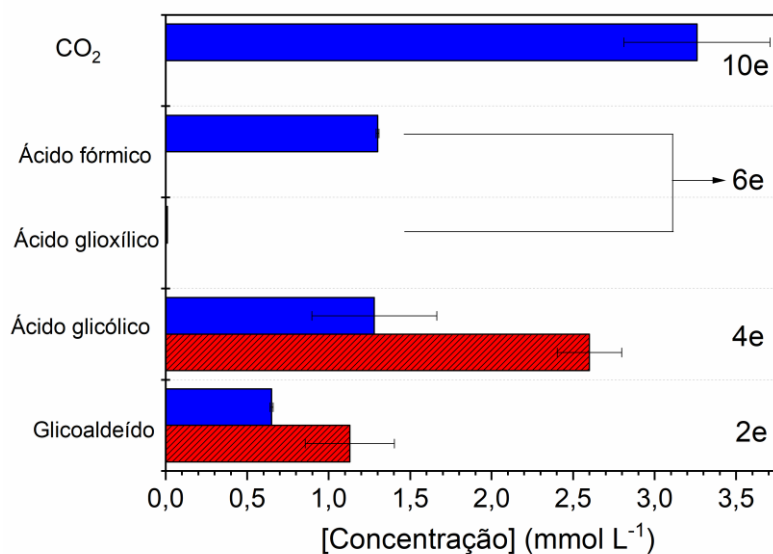
**Figura 27** - Cromatogramas dos produtos formados para a análise de 12h das eletrólises de EG ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) na presença de MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> (A= 0h e B= 12h) e MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx (C=0h e D= 12h). (a) Detector RID, (b) UV (210 nm) e as (c) análises da presença de CO<sub>2</sub>. Coluna Aminex<sup>®</sup> HPX-87H (300x7,8 mm), fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,33 mM e temperatura 45°C. Eap= 0,5 V vs Ag/AgCl; ES= tampão fosfato-citrato  $150 \text{ mmol L}^{-1}$ . 1- glicaldeído, 2- ácido glicólico, 3- ácido glicólico, 4- ácido fórmico e 5- dióxido de carbono.



**Fonte:** autoria própria.



**Figura 28:** Distribuição dos produtos da oxidação do EG ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) após 12h de eletrólise em MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> + OxOx (azul) e MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> (vermelho). ES= tampão fosfato-citrato  $150 \text{ mmol L}^{-1}$ , [OxOx] =  $0,03 \text{ U mL}^{-1}$ ,  $E_{ap} = 0,5 \text{ V}$  versus Ag/AgCl.



**Fonte:** autoria própria.

Para o sistema MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> foram identificados dois produtos da eletroxidação do EG: glicolaldeído ( $1,13 \pm 0,27 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e ácido glicólico ( $2,60 \pm 0,20 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Não houve evidência da quebra da ligação C-C ou de outros ácidos formados neste tempo de análise. Em contrapartida, o sistema híbrido MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx apresentou, após 12 horas de eletrólise, cinco produtos de eletroxidação do EG. Os produtos majoritários foram CO<sub>2</sub> ( $3,26 \pm 0,45 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e ácido fórmico ( $1,3 \pm 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ), demonstrando que a OxOx foi capaz de clivar a ligação C-C dos subprodutos gerados pela eletroxidação do EG, e assim, auxiliar na completa oxidação do combustível ao ser combinada com o sistema MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>. Glicolaldeído ( $0,65 \pm 0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ ), ácido glicólico ( $1,28 \pm 0,38 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e traços de ácido glioxílico ( $10 \pm 4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) também foram outros subprodutos identificados no sistema híbrido. Não foi identificado a presença de ácido oxálico nas análises, pois o seu pico característico coeluiu com o pico do ácido cítrico do tampão impedindo a correta atribuição deste subproduto. O pico do etilenoglicol é detectado pelo RID em cerca de 16,479 min, a Figura A4 contém um cromatograma de uma análise de 0h de uma replicata do sistema MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> indicando o pico

do combustível. No período de 12h o pico característico do EG teve uma queda média de 9,76% para o sistema MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> e de 8,89% para o Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx.

A obtenção de CO<sub>2</sub> pode ser explicado pela ação em conjunto do catalisador metálico e do catalisador biológico, os quais quando combinados possibilitam a coleta de todos os 10 elétrons do EG. Para entender a estabilidade do sistema e verificar as modificações nos produtos detectados, a eletrólise foi prolongada até 72h. A Tabela 6 contém a distribuição dos produtos para os tempos de 24, 48 e 72h.

**Tabela 6:** Distribuição dos produtos (mmol L<sup>-1</sup>) da oxidação do EG (100 mmol L<sup>-1</sup>) após 24h, 48h e 72h de eletrólise. ES= tampão fosfato-citrato 150 mmol L<sup>-1</sup>, [OxOx]= 0,03 U mL<sup>-1</sup>, E<sub>ap</sub>= 0,5 V versus Ag/AgCl.

| mmol L <sup>-1</sup>  | 24        |           | 48       |         | 72       |         |
|-----------------------|-----------|-----------|----------|---------|----------|---------|
|                       | Metálico* | Híbrido** | Metálico | Híbrido | Metálico | Híbrido |
| <b>Glic aldeído</b>   | 1,42 ±    | 0,76 ±    | 1,72 ±   | 0,92 ±  | 1,85 ±   | 1,03 ±  |
|                       | 0,49      | 0,08      | 0,53     | 0,19    | 0,43     | 0,27    |
| <b>Ac. glicólico</b>  | 4,56 ±    | 1,96 ±    | 8,9 ±    | 3,05 ±  | 14,14 ±  | 4,11 ±  |
|                       | 0,18      | 0,45      | 0,67     | 0,31    | 0,51     | 0,49    |
| <b>Ac. glioxílico</b> | 0         | 0,010 ±   | 0,010 ±  | 0,010 ± | 0,013 ±  | 0,02 ±  |
|                       |           | 0,003     | 0,005    | 0,002   | 0,008    | 0,001   |
| <b>Ac. fórmico</b>    | 0         | 1,61 ±    | 0        | 1,23 ±  | 0        | 0       |
|                       |           | 0,01      |          | 0,02    |          |         |
| <b>CO<sub>2</sub></b> | 0         | 7,17 ±    | 0        | 7,13 ±  | 0        | 4,72 ±  |
|                       |           | 2,93      |          | 4,93    |          | 2,83    |

\*Metálico: MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>

\*\*Híbrido: MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx

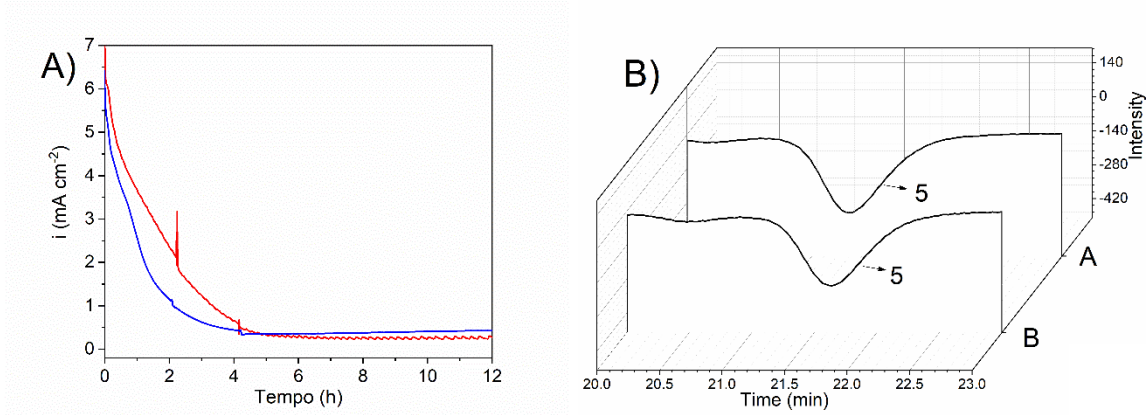
Com o aumento do tempo de eletrólise não ocorreu mudanças extremas nos produtos detectados, entretanto foi possível verificar traços de ácido glioxílico, produto não detectável nos experimentos com MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> após 12h. A observação de traços de ácido glioxílico leva-se à conclusão de que este deve ser oxidado rapidamente após ser formado. Além disso, o ácido fórmico formado é consumido, indicando que o aumento do tempo de reação da eletrólise permitiu que ele se difundisse até o eletrodo de MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> e fosse oxidado a CO<sub>2</sub> como já descrito anteriormente por Luo *et al.* [175] e Stevanović *et al.* [176]. Após 72h o pico característico do EG teve uma queda média de 33,9% para o sistema MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> e de 20,5% para o Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx.

Na maioria das vezes, os trabalhos de oxidação do EG em catalisadores metálicos baseados em platina foram realizados em condições extremas, em meios muito ácidos ou muito básicos [153,154]. Estudos baseados em técnicas de espectroscopia eletroquímica forneceram evidências de clivagem da ligação carbono-carbono no EG [177]. No entanto, os principais produtos foram os ácidos carboxílicos (ácidos oxálico, glioxílico e glicólico), resultantes da oxidação parcial do EG pelos catalisadores à base de Pt [177,178]. Até o momento, apenas um único trabalho de EBFC utilizou EG como combustível [161]. A oxidação completa na presença da OxOx só foi reportado para etanol e glicerol, no entanto, os autores empregaram o uso do catalisador orgânico TEMPO-NH<sub>2</sub> [65,66]. A utilização de catalisadores baseados em platinas em conjunto com enzimas relatado neste trabalho expande a possibilidade de aplicação desta tecnologia para outros combustíveis.

Devido à baixa corrente gerada por sistemas bio-eletroquímicos, comparar os resultados obtidos com técnicas eletroquímicas e experimentos analíticos é difícil. Entretanto alguns autores tiveram sucesso em oxidar completamente o etanol [62,65,67], lactato [77] e glicerol [64,66] em sistemas híbridos. No entanto, esta é a primeira vez que esse tipo de estudo é relatado para o EG.

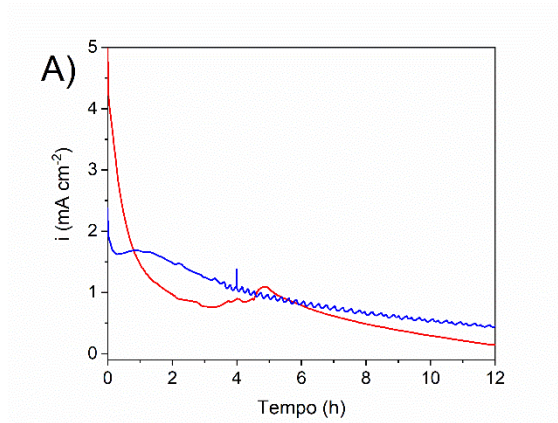
Para elucidar a rota catalítica de oxidação do EG pelo MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx e entender o papel de cada catalisador, foi realizado eletrólises e ensaios enzimáticos na presença dos subprodutos como descrito no tópico 3.2.10. As Figuras 29-32 contêm as curvas cronoamperométricas das eletrólises e respectivos cromatogramas das análises por CLAE-UV/RID.

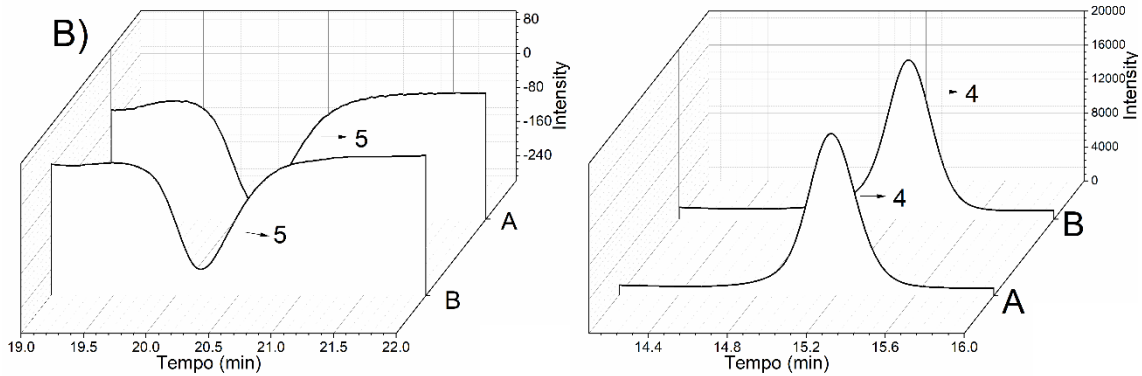
**Figura 29** - Oxidação do ácido fórmico. A) - Corrente versus o tempo durante a eletrolise do ácido fórmico no MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx (linha azul), MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> (linha vermelha); B) - Cromatogramas obtidos após 12h de eletrólise ( $E_{ap}$ = 0,5 V vs Ag/AgCl) do ácido fórmico em: A- MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> e B- MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx. O pico 5 corresponde ao dióxido de carbono.



Fonte: autoria própria.

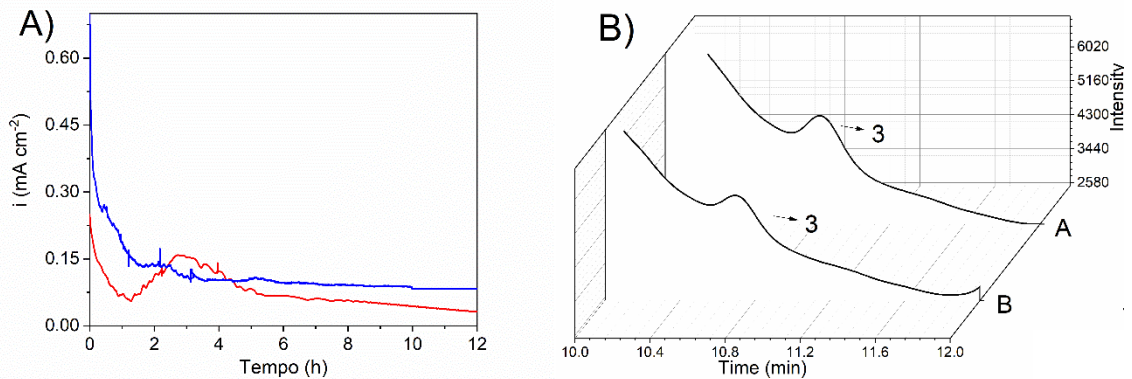
**Figura 30:** Oxidação do ácido glicólico. A) - Corrente versus o tempo durante a eletrolise do ácido glicólico no MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx (linha azul), MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> (linha vermelha); B) - Cromatogramas obtidos após 12h de eletrólise ( $E_{ap}$ = 0,5 V vs Ag/AgCl) do ácido glicólico em: A- MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> e B- MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx. Os picos 4 e 5 correspondem ao ácido fórmico e dióxido de carbono, respectivamente.





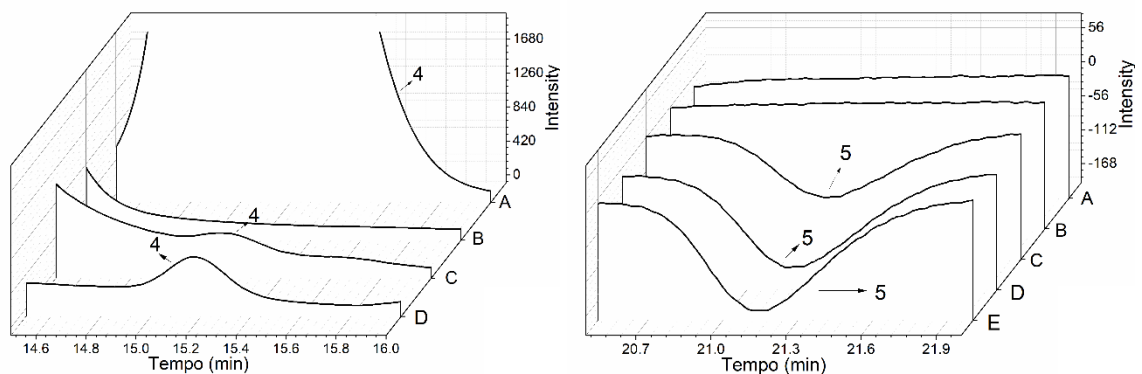
Fonte: autoria própria.

**Figura 31** - Oxidação do ácido glicólico. A) - Corrente versus o tempo durante a eletrolise do ácido glicólico no MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx (linha azul), MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> (linha vermelha); B) - Cromatogramas obtidos após 12h de eletrólise ( $E_{ap} = 0,5$  V vs Ag/AgCl) do ácido glicólico em: A- MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> e B- MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx. O pico 3 corresponde ao ácido glioxílico.



Fonte: autoria própria.

**Figura 32** - Cromatogramas obtidos para a reação do OxOx com os subprodutos da oxidação do EG: A- ácido fórmico; B- glicolaldeído; C- ácido glicólico; D- ácido glioxílico; E- ácido oxálico. Os picos 4 e 5 correspondem ao ácido fórmico e dióxido de carbono, respectivamente.



Fonte: autoria própria.

De forma semelhante às eletrólises de longa duração com o EG, os picos observados foram comparados com os de soluções padrões e os resultados são mostrados na Tabela 7.

**Tabela 7:** Eletrólises (12h – 0,5 V vs Ag/AgCl) e ensaios enzimáticos (24h - 0,03 U mL<sup>-1</sup> OxOx) para os subprodutos (100 mmol L<sup>-1</sup>) da oxidação do EG em pH 5,5.

| <b>Substrato</b> | <b>Produto</b>  | <b>Enzima<br/>(mmol L<sup>-1</sup>)</b> | <b>MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub><br/>(mmol L<sup>-1</sup>)</b> | <b>MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+<br/>OxOx (mmol L<sup>-1</sup>)</b> |
|------------------|-----------------|---|--|--|
| <b>GAld</b>      | AGO             | 0                                       | 0,009  | -  |
|                  | AG              | 0                                       | 34,2   | -  |
|                  | CO <sub>2</sub> | 0                                       | 0  | -  |
| <b>AG</b>        | AGO             | 0                                       | 13,2   | 9  |
|                  | AF              | 0,14                                    | 0  | 0  |
|                  | CO <sub>2</sub> | 3,92                                    | 0  | 0  |
| <b>AGO</b>       | AF              | 0,21                                    | 2,92   | 4,28   |
|                  | CO <sub>2</sub> | 6,64                                    | 10,96  | 12,12  |
| <b>AF</b>        | CO <sub>2</sub> | 0                                       | 15,47  | 13,72  |
| <b>AO</b>        | CO <sub>2</sub> | 8,42                                    | 10,82  | -  |

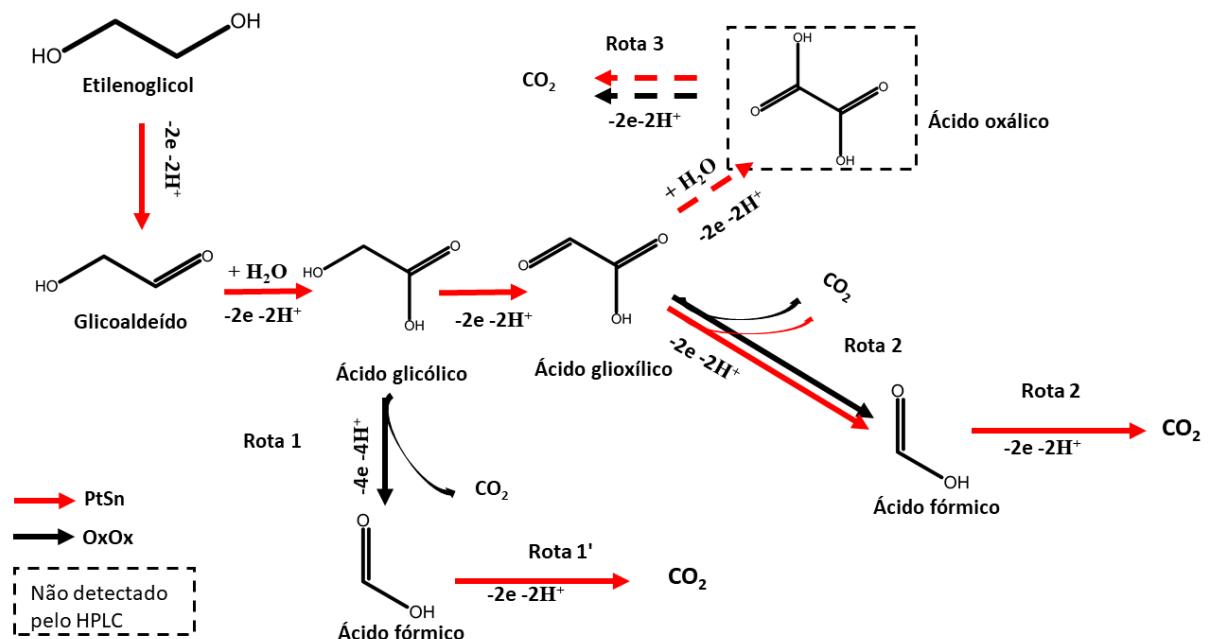
\*Ácido fórmico (AF), Glicaldeído (GAld), ácido glicólico (AG), ácido glioxílico (AGO), ácido oxálico (AO)

Nos ensaios apenas com a OxOx, o único produto identificado na presença de AO foi o CO<sub>2</sub>, dado a alta especificidade desta enzima para oxalato [72,73,91]. A enzima também reagiu com AG e AGO, quebrando a ligação C-C destes ácidos e gerando CO<sub>2</sub> e AF. Entretanto, a OxOx não reagiu com o AF ou GAld. Já foi descrito na literatura que a OxOx é capaz de reagir com outros ácidos, além do seu substrato característico, como o AGO [66], ácido maleico [91] e mesoxálico [51].

Resultado diferente dos ensaios descritos no tópico 4.1, no qual não foi possível determinar a atividade da OxOx para o ácido glicólico e ácido glioxílico. Nestes experimentos de 24h conseguiu-se verificar a capacidade da OxOx de catalisar a clivagem da ligação C-C do AG e AGO para ácido fórmico e CO<sub>2</sub>. O aumento do tempo de reação é uma das justificativa deste resultado, além do indicio de que a quebra da ligação C-C do AG e AGO não deve formar peróxido de hidrogênio no meio, por isso não observa-se a oxidação do ABTS.

As eletrólises realizadas com o sistema MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> na presença de GAlD gerou 34,2 mmol L<sup>-1</sup> de AG e traços de AGO. Já a eletrólise do AG produziu 13,2 mmol L<sup>-1</sup> de AGO; enquanto o AGO foi eletro-oxidado para CO<sub>2</sub> (10,96 mmol L<sup>-1</sup>) e AF (2,92 mmol L<sup>-1</sup>). E por último, o AO gerou 10,82 mmol L<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> após 12 horas de eletrólise. A partir destas informações é possível propor um mecanismo de oxidação do EG no sistema MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx, como mostra a Figura 33.

**Figura 33** - Proposta do mecanismo de oxidação do EG MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx. A linha vermelha representa a oxidação mediada apenas por Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>, e a linha preta representa a oxidação bioenzimática mediada por OxOx.



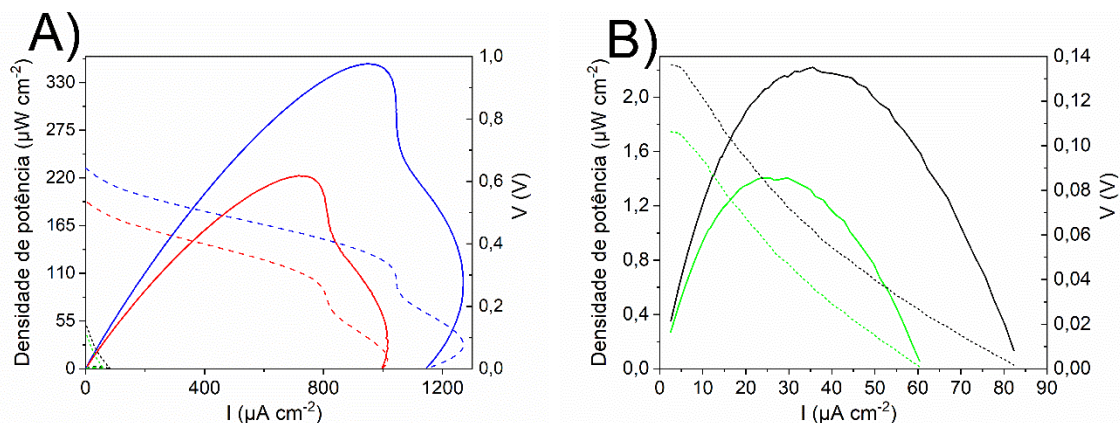
**Fonte:** autoria própria.

Analisando os resultados da Tabela 7, podemos afirmar que em pH 5,5 e com o potencial aplicado de 0,5 V vs Ag/AgCl, o eletrodo MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> oxida o EG para GAlD, AG e AGO. Assim que o AG é formado, este é rapidamente oxidado pela enzima OxOx para AF e CO<sub>2</sub>, como indicam as rotas 1 (Figura 33). Já no caso AGO este é oxidado, indistintamente, tanto pela enzima OxOx como por via eletroquímica no eletrodo (rota 2). A alta quantidade formada de CO<sub>2</sub> na presença de MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx foi devido à reação concomitante de OxOx com GOA e GA, que clivou as ligações C-C, formando AF (6 elétrons) e CO<sub>2</sub> (10 elétrons). Já a oxidação do AF para CO<sub>2</sub> ocorre, exclusivamente, por uma rota eletroquímica pelo MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>. A reatividade do AGO com ambos os catalisadores explica a sua baixa detecção após

a eletrólise de longa duração (Figura 28 e Tabela 6), comprovando que o AGO é rapidamente oxidado para AF e  $\text{CO}_2$ .

Realizou-se experimentos de densidade de potência na presença e ausência de EG para os sistemas MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> e MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx como apresenta a Figura 34.

**Figura 34** - Curvas de densidade de potência da célula de biocombustível de EG/O<sub>2</sub>. A) empregando o sistema híbrido (MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx) (linha azul) e o sistema metálico (MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>) (linha vermelha) (100 mmol L<sup>-1</sup> EG). B) curvas na ausência de EG (verde - MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>; preto - MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx). ES= tampão fosfato-citrato 150 mmol L<sup>-1</sup>,  $v = 1 \text{ mV s}^{-1}$ , [OxOx]= 0,03 U mL<sup>-1</sup>.



**Fonte:** autoria própria.

A biocélula híbrida C/MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>, OxOx,EG//C/Pt,O<sub>2</sub> apresentou uma densidade de corrente máxima de  $930 \pm 85 \mu\text{A cm}^{-2}$ , densidade de potência máxima de  $332 \pm 28 \mu\text{W cm}^{-2}$  e VCA de  $0,643 \pm 0,020 \text{ V}$ . Já a célula a combustível C/MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>,EG//C/Pt,O<sub>2</sub> apresenta valores bem menores, sendo o VCA  $0,544 \pm 0,013 \text{ V}$ , densidade de corrente máxima de  $726 \pm 10 \mu\text{A cm}^{-2}$  e densidade de potência  $240 \pm 17 \mu\text{W cm}^{-2}$ . Ou seja, nas curvas de polarização os valores obtidos pelo sistema híbrido foram superiores ao sistema metálico. A densidade de corrente 28%, de potência foram 38,3% superiores em média, e o VCA foi 18% maior. Esses resultados confirmaram o desempenho significativamente aprimorado do MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx na coleta de elétrons do EG. A Tabela 8 resume alguns dados de densidade de potência para sistemas híbridos com álcoois de cadeia curta.



**Tabela 8:** VCA (V) e densidade de potência ( $\mu\text{W cm}^{-2}$ ) para sistemas híbridos.

| <b>Sistemas híbridos</b>  | <b>Combustível<br/>(mmol L<sup>-1</sup>)</b> | <b>VCA<br/>(V)</b> | <b>Potência<br/>(<math>\mu\text{W cm}^{-2}</math>)</b> | <b>Ref.</b>              |
|---|--|--------------------|--|--------------------------|
| <b>MWCNTs- Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx</b>                    | <b>EG</b>                                    | <b>0,643</b>       | <b>332</b>   | <b>Este<br/>trabalho</b> |
| <b>MG/MWCNTs/TEMPO-<br/>LPEI/ADH+AldDH+NAD<sup>+</sup></b>            | EtOH   | 0,649              | 378,2  | [62]                     |
| <b>TEMPO-NH<sub>2</sub>/OxDc</b>                                      | EtOH   | 0,468              | 78,0   | [68]                     |
| <b>MWCNT-COOH/TEMPO-<br/>LPEI/OxOx</b>                                | EtOH   | 0,492              | 302,5  | [65]                     |
| <b>ADH/TiO<sub>2</sub>NTs-TCPP</b>                                    | EtOH   | 1,13               | 270  | [179]                    |
| <b>MWCNTs-COOH-Au/ADH</b>   | EtOH   | 0,61               | 155  | [155]                    |
| <b>MWCNT-NH<sub>2</sub>-Au<br/>nanoparticles/ADH</b>                  | EtOH   | *                  | 226  | [180]                    |
| <b>poly-(MG-PYR) + MWCNTs<br/>+Nafion + ADH/AldDH/NAD<sup>+</sup></b> | EtOH   | 0,503              | 275  | [181]                    |
| <b>MG+Nafion+ADH /AldDH/NAD<sup>+</sup></b>                           | EtOH   | 0,510              | 390  | [182]                    |
| <b>MWCNT-COOH/Pireno-<br/>TEMPO/OxDc</b>                              | EtOH   | 0,598              | 388  | [67]                     |

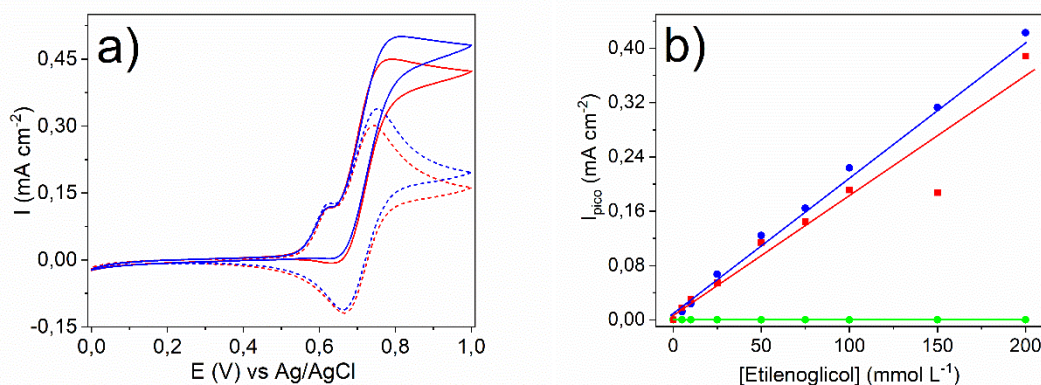
\*Valor não informado

Para analisar esses dados, deve-se levar em consideração as diferenças nos parâmetros experimentais. Diferentes combustíveis, eletrólitos, células eletroquímicas, concentrações de substratos e outros parâmetros que são diferentes entre os trabalhos foram utilizados. Entretanto, os valores obtidos para a biocélula híbrida com ânodo de MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx estão na mesma ordem de magnitude dos maiores valores reportados na literatura. A densidade de potência gerada por um sistema híbrido empregando um catalisador inorgânico (MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>) em vez de um catalisador orgânico, como TEMPO [65,66], se mostrou inovadora e promissora. O ganho energético obtido com MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx revelou o excelente comportamento do MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> associado à via enzimática, proporcionando melhor densidade de corrente e densidade de potência. O sistema híbrido MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx desenvolvido abre oportunidades para melhorar o desenvolvimento de biocélulas a combustível a partir de diferentes tipos de catalisadores e combustíveis.

#### 4.4. OXIDAÇÃO DO EG NO SISTEMA HÍBRIDO ORGÂNICO-TEMPO-NH<sub>2</sub>

Foram realizados estudos usando como catalisador inicial para oxidação do EG TEMPO-NH<sub>2</sub> em solução. De forma semelhante ao estudo realizado para o sistema metálico discutido no tópico 4.3, a primeira caracterização eletroquímica realizada foi a voltametria cíclica, na qual buscou-se avaliar a presença de picos de oxidação e a modificação do voltamograma com os incrementos de EG no meio. A Figura 35 contém os voltamogramas dos sistemas TEMPO-NH<sub>2</sub> e TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx, também a relação da corrente de pico com a concentração de EG no meio.

**Figura 35** - Voltametrias cíclicas do sistema híbrido orgânico (TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx). (a) Curvas voltamétricas; a linha sólida refere-se à presença de EG; as linhas tracejadas referem-se à ausência de EG; ES= tampão fosfato-citrato 150 mmol L<sup>-1</sup>,  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , [EG] = 100 mmol L<sup>-1</sup>, [OxOx] = 0,03 U mL<sup>-1</sup>. (b) corrente de pico de EG na presença de TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx (azul/círculo), TEMPO-NH<sub>2</sub> (vermelho/quadrado) ou OxOx pura (eletrodo de carbono vítreo na presença de 0,03 U mL<sup>-1</sup> OxOx – verde/círculo);  $E_{\text{pico}}=0,75 \text{ V vs Ag/AgCl}$



**Fonte:** autoria própria.

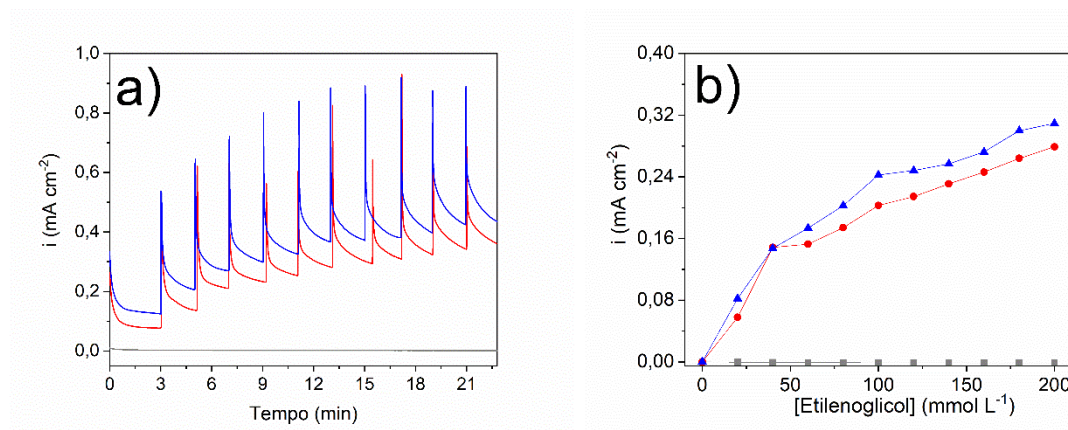
Antes da adição do EG o voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo na presença de TEMPO-NH<sub>2</sub> apresenta dois picos, similar ao observado anteriormente na literatura [63]. Estes são atribuídos aos picos de oxidação do radical nitroxil como descrito por *Hickey et al.* [115]. O primeiro pico, menos intenso e em 0,6 V, se refere a formação da espécie hidroxilamina a partir do radical nitroxil; já o segundo pico, em 0,75 V, de maior intensidade, é referente à formação do cátion

oxiamonium, que oxida as moléculas de álcoois primários pelo mecanismo descrito na Figura 7.

O TEMPO-NH<sub>2</sub> apresentou atividade eletrocatalítica para a oxidação do EG. Este resultado era esperado, pois o catalisador TEMPO é muito reativo com álcoois primários [183] e já demonstrou eletrooxidar o etanol [68], glicerol [63] e lactato [77]. Na presença de 100 mmol L<sup>-1</sup> de EG, a adição da enzima OxOx gerou um ganho de corrente de cerca de 1,17 vezes no sistema híbrido em comparação ao sistema na sua ausência. Explorando-se uma faixa de concentração de 0-200 mmol L<sup>-1</sup> foi possível verificar que a corrente de pico do TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx começa a superar a do TEMPO-NH<sub>2</sub> em concentrações superiores a 50 mmol L<sup>-1</sup> e que este aumento é, em média, 1,23 vezes. Este ganho de corrente é muito próximo ao de 1,2 vezes relatado por *Falase et al.* para a oxidação de EG na presença de PtRu-ADH [161]. No entanto, este incremento é inferior ao de 1,6 do sistema metálico investigado no item 4.3. Além disso, há um evidente comportamento linear da corrente nesta faixa de concentração, que abre a possibilidade de aplicação deste sistema como um sensor para etileno glicol.

Também foi realizado experimentos de adições sucessivas de EG em um potencial fixo de 0,75 V vs Ag/AgCl como pode ser visto na Figura 36.

**Figura 36** - TCA do EG em eletrodo de carbono vítreo na presença de TEMPO-NH<sub>2</sub> (linha vermelho-círculo), TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx (linha azul-triângulo) e ES (linha cinza-quadrado). E= 0,75 V vs Ag/AgCl, ES= tampão fosfato-citrato 150 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,5, adições sucessivas de 20 mmol L<sup>-1</sup> EG em intervalos de 120s.



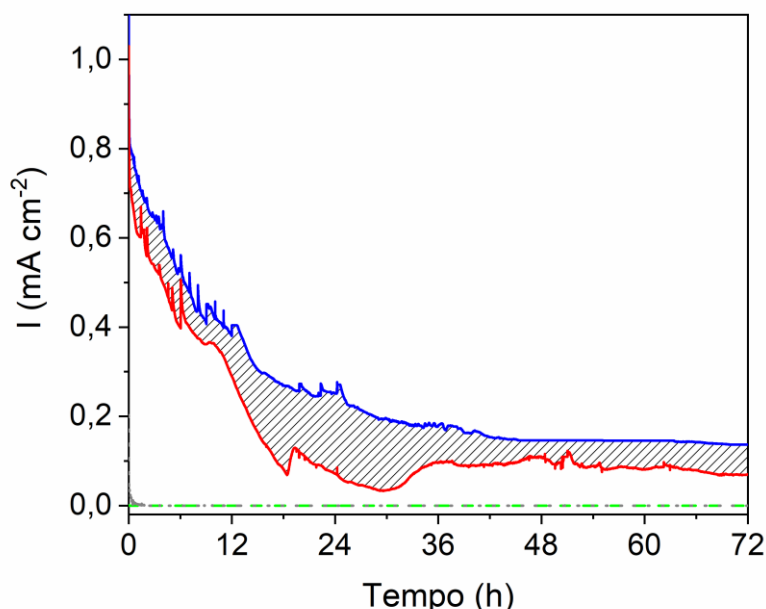
**Fonte:** autoria própria.

A Figura 36-b, correlaciona a corrente final da TCA (120 s) com diferentes concentrações de EG. Em concentrações superiores a 50 mmol L<sup>-1</sup>, o sistema TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx apresenta um aumento de corrente, em média, 14% superior ao sistema na ausência da enzima. Resultado semelhante foi observado na voltametria cíclica (Figura 35). O baixo ganho de corrente (14 %) frente ao relatado para o sistema TEMPO-LPEI/OxOx na oxidação de etanol [65] pode ser atribuído a ambos catalisadores (TEMPO-NH<sub>2</sub> e OxOx) estarem em solução; isso não é a condição ideal para comunicação eletrônica entre os catalisadores e o eletrodo. Neste caso o cátion oxiamonium, formado a partir da oxidação eletroquímica do TEMPO-NH<sub>2</sub>, catalisa a reação de oxidação do EG e é reduzido para hidroxilamina, a qual precisa se difundir até o eletrodo para ser oxidada novamente para o cátion oxiamonium e transferir os elétrons para o eletrodo.

Os subprodutos de oxidação do EG (GAld, AG, AGO, AO e AF) também foram analisados por CA. As curvas cronoamperométricas estão mostradas na Figura A5 no apêndice C. A análise da Figura A5 revelou que nenhum dos substratos avaliados com o sistema híbrido, TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx, apresentam valores superiores aos obtidos pelo sistema simples contendo apenas TEMPO-NH<sub>2</sub>. Diferente dos ensaios cronoamperométricos com o MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>, aqui nós temos um eletrodo de carbono vítreo, sem nenhum material depositado, isto prejudica a comunicação eletrônica da OxOx com eletrodo, impossibilitando a aferição do aumento de corrente em casos com período muito curto de análise. Como o eletrodo de carbono vítreo não é eletroativo, na região de potencial investigada, não se detecta eletroquimicamente os eventuais produtos formados.

Com o objetivo de quantificar e identificar os produtos formados da eletroxidação do EG, foi realizado eletrólises de 72h a um potencial constante de 0,75 V vs Ag/AgCl para os sistemas acima. A Figura 37 contém as curvas obtidas em tempo longo de eletrólise.

**Figura 37** - Curvas cronoamperométricas da oxidação do EG ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) na presença de TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx (linha azul), TEMPO-NH<sub>2</sub> (linha vermelha), enzima pura (eletrodo de papel de carbono na presença de OxOx - linha verde tracejada) e experimento controle (TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx na presença de ES - linha cinza tracejada). ES= tampão fosfato-citrato  $150 \text{ mmol L}^{-1}$ . [EG] =  $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $E_{ap} = 0,75 \text{ V vs Ag/AgCl}$ , [OxOx] =  $0,03 \text{ U mL}^{-1}$ .



**Fonte:** autoria própria.

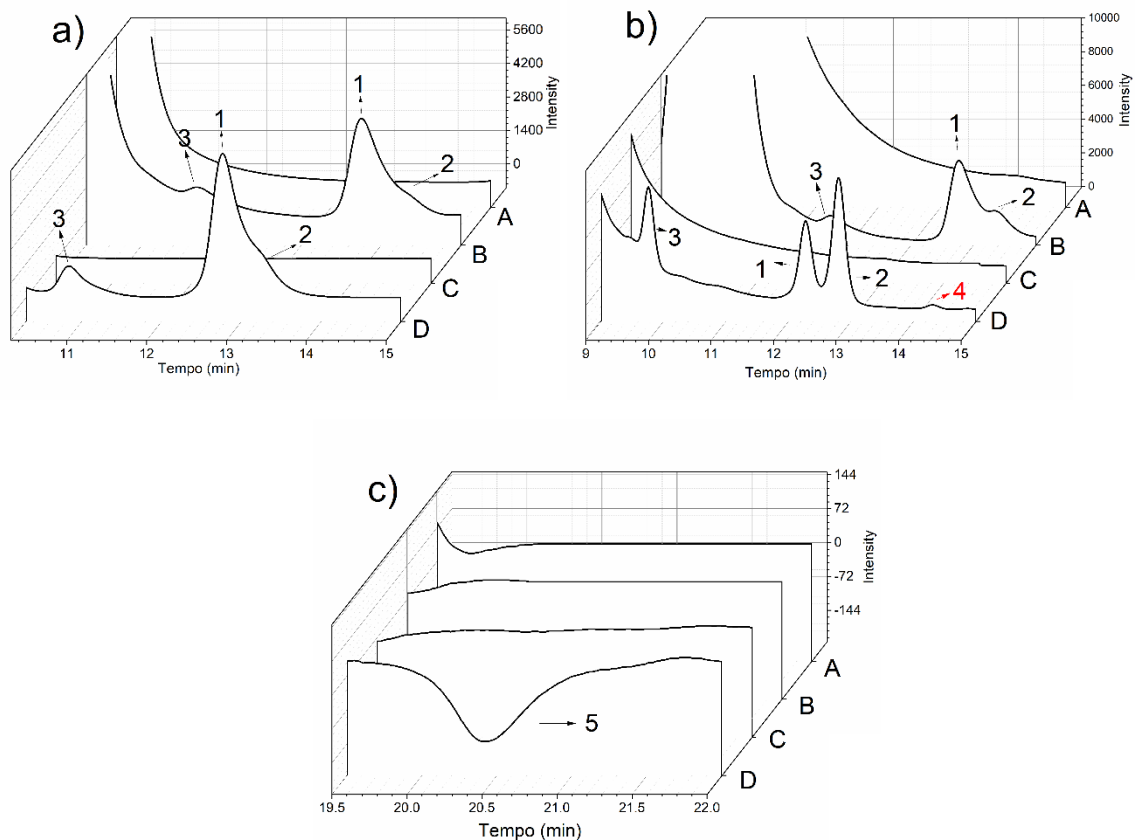
Semelhante ao sistema MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx (Figura 26), a densidade de corrente da oxidação do EG pelo sistema TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx (linha azul) foi maior em comparação ao sistema TEMPO-NH<sub>2</sub> (linha vermelha). O aumento de carga aferido foi de 58%, somente 7% menor que o obtido para o sistema híbrido inorgânico. Ou seja, o sistema TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx é mais ativo na oxidação do EG que o TEMPO-NH<sub>2</sub>, indicando que a OxOx pode oxidar os produtos formados pelo TEMPO-NH<sub>2</sub> coletando mais elétrons por molécula de combustível de partida.

Para verificar se o ES que contém ácido cítrico poderia ser oxidado durante os experimentos, realizou-se uma eletrólise de controle na ausência de EG (Figura 37 / linha cinza tracejada). De forma semelhante à reportada anteriormente [65] e discutida para o sistema MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx, a corrente foi muito baixa e não foi encontrado produtos de oxidação nas análises de CLAE-UV/RID.

Como descrito no tópico 3.2.10, as amostras foram cuidadosamente coletadas do meio reacional e analisadas por CLAE-UV/RID. A Figura 38 contém os

cromatogramas das análises por RID (Figura 38-a), por UV-vis (Figura 38-b) e as análises da presença de CO<sub>2</sub> (Figura 38-c), no tempo de 0 e 12h.

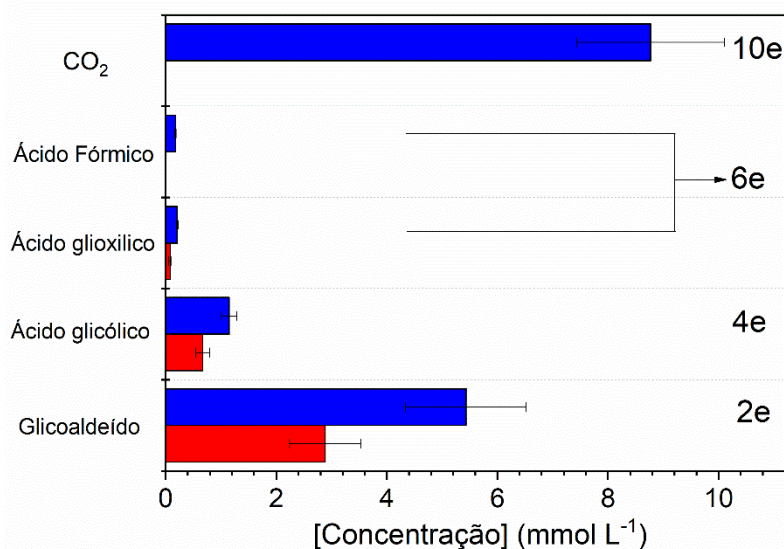
**Figura 38** - Cromatogramas dos produtos formados para a análise de 12h das eletrolise de EG (100 mmol L<sup>-1</sup>) na presença de TEMPO-NH<sub>2</sub> (A= 0h e B= 12h) e TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx (C=0h e D= 12h). (a) Detector RID, (b) UV (210 nm) e as (c) análises da presença de CO<sub>2</sub> (c). Coluna Aminex<sup>®</sup> HPX-87H (300x7,8 mm), fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,33 mM e temperatura 45°C. Eap= 0,75 V vs AgAgCl; ES= tampão fosfato-citrato 150 mmol L<sup>-1</sup>. 1- glicaldeído, 2- ácido glicólico, 3- ácido glioxílico, 4- ácido fórmico e 5- dióxido de carbono.



**Fonte:** autoria própria.

A identificação dos produtos formados foi feita por comparação com os tempos de eluição dos padrões analíticos injetados nas mesmas condições de análise. A Figura 39 mostra a distribuição dos produtos identificados na amostra de 12h.

**Figura 39** - Distribuição dos produtos da oxidação do EG ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) após 12h de eletrólise em TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx (azul) e TEMPO-NH<sub>2</sub> (vermelho). ES= tampão fosfato-citrato  $150 \text{ mmol L}^{-1}$ , [OxOx] =  $0,03 \text{ U mL}^{-1}$ ,  $E_{ap} = 0,75 \text{ V}$  versus Ag/AgCl.



**Fonte:** autoria própria.

As eletrólises contendo apenas o catalisador TEMPO-NH<sub>2</sub> apresentaram, após 12h três produtos de oxidação do EG: GAlD ( $2,88 \pm 0,64 \text{ mmol L}^{-1}$ ), AG ( $0,67 \pm 0,12 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e AGO ( $0,081 \pm 0,02 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Nenhum produto proveniente da clivagem da ligação C-C foi detectado. Comparando os produtos formados nas primeiras 12h de eletrólise para o sistema MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> e TEMPO-NH<sub>2</sub>, é possível verificar que o produto majoritário para o catalisador metálico (MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>) foi de AG (4 elétrons); já ao empregar o catalisador TEMPO-NH<sub>2</sub> o GAlD (2 elétrons) é o produto majoritário. A Figura 39 também mostra a detecção de pequena quantidade de AGO (6 elétrons) já nas primeiras 12h.

As eletrólises de EG, realizadas na presença da enzima (TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx), apresentaram os mesmos três subprodutos de oxidação observados no sistema contendo apenas TEMPO-NH<sub>2</sub>, porém, neste caso, a concentração foi superior: GAlD ( $5,42 \pm 1,09 \text{ mmol L}^{-1}$ ), AG ( $1,14 \pm 0,14 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e AGO ( $0,206 \pm 0,02 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Isto demonstra a possibilidade da OxOx de alguma forma facilitar o processo catalítico do TEMPO-NH<sub>2</sub>. Resultado similar foi observado por *Franco et al.* que no sistema MWCNTs/TEMPO-LPEI/ADH nos ensaios de eletrolise a presença de ácido acético aumentou 20% em comparação a ausência da enzima, demonstrando a influência da enzima no catalisador orgânico [62]. Além disso, foi detectado AF ( $0,178 \pm 0,011 \text{ mmol}$

L<sup>-1</sup>) e CO<sub>2</sub> (8,768 ± 1,339 mmol L<sup>-1</sup>), demonstrando que a OxOx cliva a ligação C-C dos ácidos gerados na oxidação do EG pelo TEMPO-NH<sub>2</sub>. No período de 12h o pico característico do EG teve uma queda média de 9,8% para o sistema TEMPO-NH<sub>2</sub> e de 19,6% para o TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx. A ação conjunta do catalisador orgânico e biológico, possibilita a obtenção dos 10 elétrons possíveis da oxidação do EG e melhora a ação do TEMPO-NH<sub>2</sub>.

Para entender a estabilidade do sistema e verificar as modificações nos produtos detectados, a eletrólise foi prolongada até 72h. A Tabela 9 contém a distribuição dos produtos para os tempos de 24, 48 e 72h.

**Tabela 9:** Distribuição dos produtos (mmol L<sup>-1</sup>) da oxidação do EG (100 mmol L<sup>-1</sup>) após 24h, 48h e 72h.

| mmol L <sup>-1</sup>  | 24        |           | 48       |         | 72       |         |
|-----------------------|-----------|-----------|----------|---------|----------|---------|
|                       | Orgânico* | Híbrido** | Orgânico | Híbrido | Orgânico | Híbrido |
| <b>GAld</b>           | 3,16 ±    | 6,34 ±    | 3,52 ±   | 7,07 ±  | 3,88 ±   | 5,42 ±  |
|                       | 1,06      | 1,16      | 0,60     | 0,65    | 0,49     | 0,79    |
| <b>AG</b>             | 1,84 ±    | 1,75 ±    | 3,99 ±   | 2,57 ±  | 6,15 ±   | 3,61 ±  |
|                       | 0,45      | 0,07      | 1,04     | 0,21    | 1,54     | 0,28    |
| <b>AGO</b>            | 0,05 ±    | 0,25 ±    | 0,07 ±   | 0,16 ±  | 0,08 ±   | 0,15 ±  |
|                       | 0,03      | 0,01      | 0,01     | 0,02    | 0,01     | 0,06    |
| <b>AF</b>             | 0         | 0,20 ±    | 0        | 0,19 ±  | 0        | 0,22 ±  |
|                       |           | 0,01      |          | 0,01    |          | 0,04    |
| <b>CO<sub>2</sub></b> | 0         | 8,39 ±    | 0        | 5,76 ±  | 0        | 5,44 ±  |
|                       |           | 2,44      |          | 2,59    |          | 2,77    |

\*Orgânico: TEMPO-NH<sub>2</sub>

\*\*Híbrido: TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx

Não houve detecção de nenhum produto novo, mesmo após o aumento do tempo de eletrólise. Após 72h o pico característico do EG teve uma queda média de 28,2% para o sistema TEMPO-NH<sub>2</sub> e de 31,2% para o TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx. Para o CO<sub>2</sub> ocorreu uma queda na quantidade observada. Esta diminuição pode estar relacionada a algum vazamento ou perda para o ambiente durante a coleta das amostras.

Apesar do aumento da quantidade detectada em comparação a 12h para o AG, AGO e AF para o TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx, eles não se acumulam na mesma proporção observada que em TEMPO-NH<sub>2</sub>. Isto se deve a reação da OxOx com o AG e AGO



como relatada no t3pico 4.3 e a a3o3o TEMPO-NH<sub>2</sub> sobre o AF como relatada anteriormente por *Hickey et al* [66].

Comparando os sistemas TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx com o MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx no per3iodo de 72h, observa-se que o TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx tem um desempenho superior frente 3s eletr3lises, gerando maiores densidade de corrente. Al3m disso, a carga total durante este per3iodo 3 4 vezes maior se compararmos ambos os sistemas na presen3a de OxOx. A quantidade de produtos de oxida3o3o detectados refor3a os melhores resultados do TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx frente ao MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx, como pode ser visto na Tabela 10. Este resultado deve ser visto com certa cautela, tendo em vista que estamos comparando um sistema totalmente homog3neo (TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx) com um sistema misto (heterog3neo/homog3neo) e desta forma o sistema de transfer3ncia de massa s3o bem distintos e podem interferir de forma significativa na efic3cia da rea3o3o.

**Tabela 10:** Produtos (mmol L<sup>-1</sup>) e carga (Coulombs) ap3s 72h de eletr3lises para os sistemas MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx (inorg3nico) e TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx (org3nico).

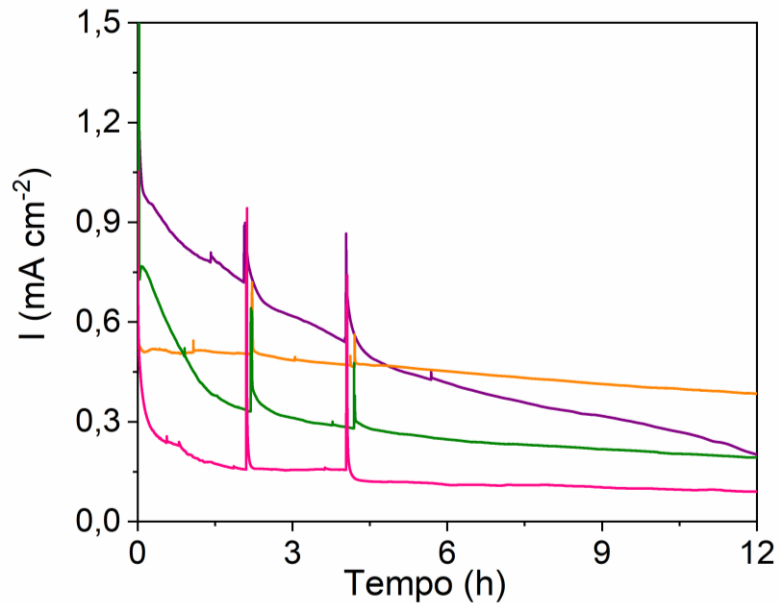
| mmol L <sup>-1</sup>  | MWCNTs-Pt <sub>65</sub> Sn <sub>35</sub> +OxOx |               | TEMPO-NH <sub>2</sub> +OxOx |              |
|-----------------------|--|---------------|-----------------------------|--------------|
|                       | Met3lico                                       | H3brido       | Org3nico                    | H3brido      |
| <b>Gald</b>           | 1,85 ± 0,43                                    | 1,03 ± 0,27   | 3,88 ± 0,49                 | 5,42 ± 0,79  |
| <b>AG</b>             | 14,14 ± 0,51                                   | 4,11 ± 0,49   | 6,15 ± 1,54                 | 3,61 ± 0,28  |
| <b>AGO</b>            | 0,013 ± 0,008                                  | 0,020 ± 0,001 | 0,08 ± 0,01                 | 0,15 ± 0,06  |
| <b>AF</b>             | 0  | 0             | 0                           | 0,22 ± 0,04  |
| <b>CO<sub>2</sub></b> | 0  | 4,72 ± 2,83   | 0                           | 5,44 ± 2,77  |
| <b>Carga/C</b>        | 8,43 ± 2,5 C                                   | 13,97 ± 3,0 C | 35,49 ± 4,01                | 56,05 ± 4,39 |

A oxida3o3o completa em um sistema envolvendo um derivado do catalisador org3nico TEMPO em conjunto com uma enzima, j3 foi relatada anteriormente na literatura para etanol [62,65,67,68], glicerol [63,64,66] e lactato [77]. Entretanto, esta 3 a primeira vez que 3 reportado para o EG, j3 que este combust3vel normalmente tem sua aplica3o3o restrita 3s c3lulas a combust3veis met3licas tradicionais [153,154] e a sua aplica3o3o em EBFC h3bridas na literatura foi reportada apenas uma 3nica vez [161].

Para elucidar a rota catal3tica de oxida3o3o do EG pelo sistema h3brido TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx foram realizadas eletr3lises de longa dura3o3o dos subprodutos de

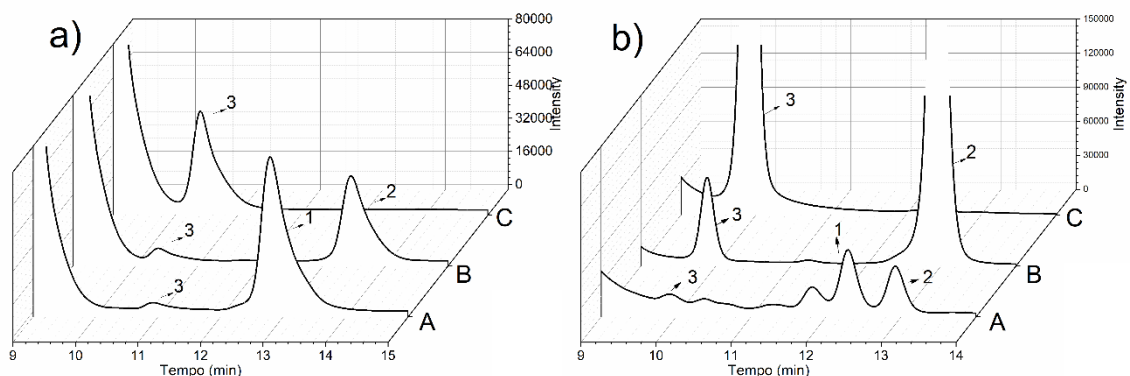
oxidação de EG, como descrito no tópico 3.2.10, na presença de TEMPO-NH<sub>2</sub>. As Figuras 40 e 41 contêm as curvas cronoamperométricas das eletrólises e os cromatogramas das análises por CLAE-UV/RID.

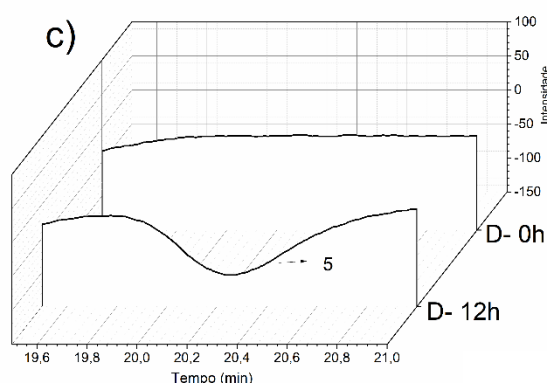
**Figura 40** - Curvas cronoamperométricas da oxidação do glicoadaldeído (linha roxa), ácido glicólico (linha laranja), ácido glioixílico (linha verde) e ácido fórmico (rosa) na presença de TEMPO-NH<sub>2</sub>. ES= tampão fosfato-citrato 150 mmol L<sup>-1</sup>. [substratos] = 100 mmol L<sup>-1</sup>, E<sub>ap</sub> = 0,75 V vs Ag/AgCl.



**Fonte:** autoria própria.

**Figura 41** - Cromatogramas dos produtos formados para a análise de 12h da eletrooxidação de (A) glicoadaldeído, (B) ácido glicólico e (C) ácido glioixílico (D) ácido fórmico na presença de TEMPO-NH<sub>2</sub>. Detector (a) RID, (b) UV (210 nm), (c) RID (para amostra ácido fórmico). Coluna Aminex<sup>®</sup> HPX-87H (300x7,8 mm), fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,33 mmol L<sup>-1</sup> e temperatura 45°C. E<sub>ap</sub>= 0,75 V vs Ag/AgCl; ES= tampão fosfato-citrato 150 mmol L<sup>-1</sup>. 1- glicoadaldeído, 2- ácido glicólico, 3- ácido glioixílico, 5- CO<sub>2</sub>.





Fonte: autoria própria.

De forma semelhante às eletrólises de longa duração com o EG, os picos observados foram comparados com os de soluções padrões e os resultados são mostrados na Tabela 11.

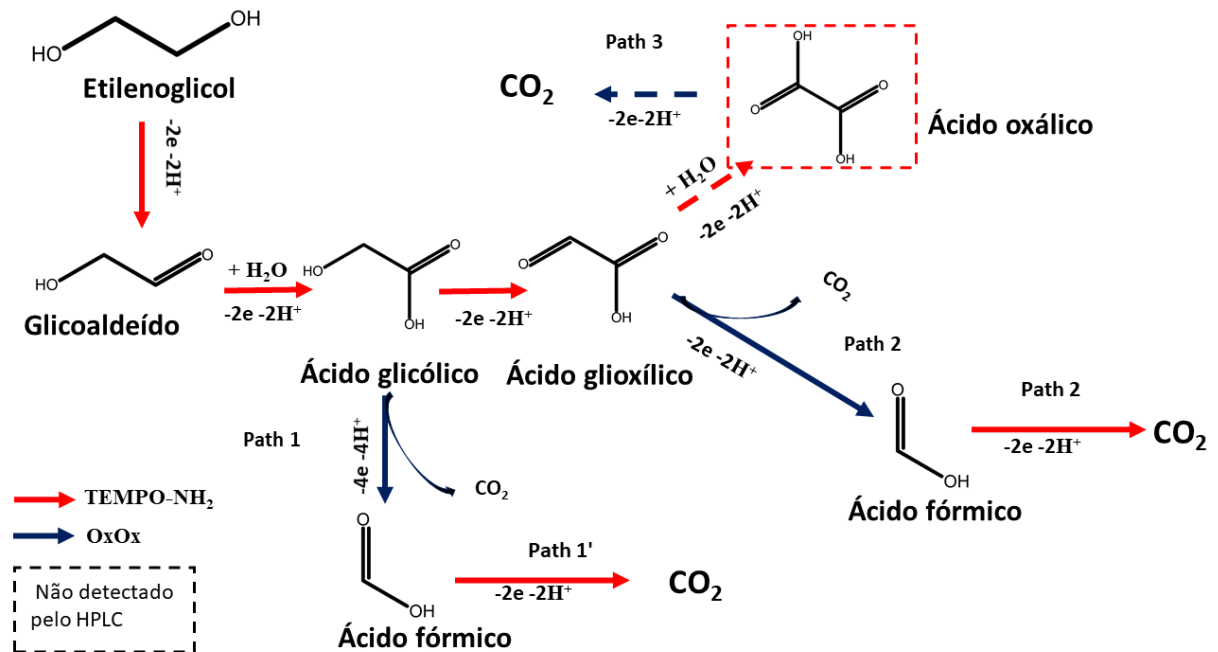
**Tabela 11:** Eletrólises (12h – 0,75 V vs Ag/AgCl) TEMPO-NH<sub>2</sub> para os subprodutos (100 mmol L<sup>-1</sup>) da oxidação do EG em pH 5,5.

| Substrato   | Produto                     | TEMPO-NH <sub>2</sub> (mmol L <sup>-1</sup> ) |
|-------------|-----------------------------|---|
| <b>GAld</b> | AG                          | 6,56  |
|             | AGO                         | 0,630   |
| <b>AG</b>   | AGO                         | 0,90  |
| <b>AGO*</b> | Nenhum produto identificado |   |
| <b>AF</b>   | CO <sub>2</sub>             | 0,27  |

TEMPO-NH<sub>2</sub> oxida o GAld formando os produtos de oxidação AG (6,56 mmol L<sup>-1</sup>) e AGO (0,630 mmol L<sup>-1</sup>). Já nas eletrólises de AG, detectou-se a formação de AGO (1,77 mmol L<sup>-1</sup>). Na oxidação de AGO foi observado na análise de HPLC a queda do pico característico deste substrato indicando seu consumo. Entretanto, não foi observado a formação de nenhum produto, provavelmente, o AGO foi oxidado para AO, o qual co-elui junto com o tampão (citrato), impossibilitando a sua identificação e atribuição. Uma observação que deve ser feita é que já foi relatado anteriormente a incapacidade do TEMPO-NH<sub>2</sub> em reagir com AO [63].

A Figura 42 mostra o mecanismo de oxidação do EG proposto para o sistema híbrido TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx.

**Figura 42** - Proposta do mecanismo de oxidação do EG TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx. A linha vermelha representa a oxidação mediada apenas por TEMPO-NH<sub>2</sub>, e a linha azul representa a oxidação enzimática mediada por OxOx.



**Fonte:** autoria própria.

Os resultados de oxidação do EG e seus subprodutos comprovam a rota proposta na Figura 42. Foi possível observar que o TEMPO-NH<sub>2</sub> oxida o EG para GAlD (2 elétrons), AG (4 elétrons), AGO (6 elétrons); posteriormente, o GAlD formado também reage com o catalisador orgânico formando AG (4 elétrons) e AGO (6 elétrons). Os ácidos formados também sofrem oxidação subsequentes dando origem a AGO e AO. A enzima OxOx age clivando a ligação C-C do AO e gerando CO<sub>2</sub>, e reage com AG e AGO formando AF (6 elétrons) e CO<sub>2</sub> (10 elétrons). Ao final, o TEMPO-NH<sub>2</sub> oxida o AF para CO<sub>2</sub>. Esta proposta de mecanismo explica o ganho de carga observado nas eletrólises do sistema híbrido (Figura 37) e como este sistema híbrido possibilita a coleta dos 10 elétrons possíveis da oxidação do EG.

Em resumo, o sistema TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx mostrou ser efetivo na oxidação do EG até CO<sub>2</sub>, semelhante ao relatado anteriormente para o glicerol [66] e etanol [68] em sistemas híbridos com TEMPO-NH<sub>2</sub>. Os seus resultados de densidade corrente, carga e produtos detectados foram superiores aos obtidos para o MWCNTs-

Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx. Além disso o custo e a disponibilidade comercial do TEMPO-NH<sub>2</sub>, tornam atrativo a sua utilização no desenvolvimento de biocélulas a combustíveis.

### 3. CONCLUSÕES

A enzima OxOx de *Ceriporiopsis subvermispota* obtida através da expressão do vetor em *Pichia pastori* KM71H gerou uma enzima com atividade superior ao relatado na literatura. Os eletrocatalisadores de MWCNTs-Pt e MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> demonstraram atividade eletrocatalítica para a oxidação do EG em meio levemente ácido (pH 5,5). Entretanto, o eletrodo contendo MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> apresentou um pico de oxidação em um menor sobrepotencial (50 mV), sendo este o motivo de ter sido escolhido para a preparação de um sistema com a enzima OxOx.

De forma semelhante o catalisador orgânico TEMPO-NH<sub>2</sub> demonstrou atividade eletrocatalítica para a oxidação do EG formando os mesmos produtos observados na eletroxidação eletroquímica pelas MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>.

Pela primeira vez foi demonstrado que MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx e TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx podem ser aplicados na oxidação completa do EG (10 elétrons). Os ensaios de voltametria cíclica dos sistemas híbridos (MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx e TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx) apresentaram correntes em média 1,6 e 1,2 vezes maiores em relação ao sistema na ausência da enzima. Também foi elucidado a cascata eletrocatalítica para a oxidação do EG em ambos os sistemas, através do estudo da rota eletroquímica e enzimática dos subprodutos de oxidação do EG. Foi proposto o mecanismo de oxidação do EG para os dois sistemas. MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> e TEMPO-NH<sub>2</sub>. Ambos sistemas oxidam EG para GAld, AG e AGO. Entre esses ácidos, um resultado interessante foi observar que MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> pode clivar as ligações C-C de AGO, para fornecer AF e CO<sub>2</sub>; E também clivar o AO gerando CO<sub>2</sub>.

A enzima OxOx não apenas reage com seu substrato (AO), mas também cliva a ligação C-C de AG e AGO, gerando CO<sub>2</sub> e AF. Para o MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>+OxOx o VCA ( $0,643 \pm 0,020$  V), a densidade de potência ( $332 \pm 28$   $\mu$ W cm<sup>-2</sup>) e de corrente ( $930 \pm 85$   $\mu$ A cm<sup>-2</sup>) são da mesma magnitude dos maiores valores relatados anteriormente para sistemas híbridos com etanol indicando que pode haver a troca de substrato mantendo-se a mesma ordem de grandeza de energia gerada.

Este estudo mostrou que a arquitetura bicatalítica MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> e o TEMPO-NH<sub>2</sub> atuam em conjunto com a OxOx, para aumentar a quantidade de energia através da oxidação do EG.

Destaca-se que ambos os sistemas híbridos exibiram altas taxas de atividade eletrocatalítica utilizando um combustível raramente relatado na literatura para EBFC. Este trabalho desempenha um papel importante na implementação de fontes alternativas de conversão de energia para aplicações práticas de longo prazo, contribuindo para o desenvolvimento de EBFC.

#### 4. Referências

- [1] T. Wheeler, J. von Braun, Climate Change Impacts on Global Food Security, *Science* (80-. ). 341 (2013) 508–513. <https://doi.org/10.1126/science.1239402>.
- [2] Y. Xu, V. Ramanathan, D.G. Victor, Global warming will happen faster than we think, *Nature*. 564 (2018) 30–32. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-07586-5>.
- [3] B.S. Silvestre, D.M. Țîrcă, Innovations for sustainable development: Moving toward a sustainable future, *J. Clean. Prod.* 208 (2019) 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.09.244>.
- [4] Nations U, The sustainable development goals report 2020, United Nations. (2020). <https://unstats.un.org/sdgs/report/2020/>.
- [5] F. Johnsson, J. Kjärstad, J. Rootzén, The threat to climate change mitigation posed by the abundance of fossil fuels, *Clim. Policy*. 19 (2019) 258–274. <https://doi.org/10.1080/14693062.2018.1483885>.
- [6] E. Kabir, P. Kumar, S. Kumar, A.A. Adelodun, K.-H. Kim, Solar energy: Potential and future prospects, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 82 (2018) 894–900. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.09.094>.
- [7] D.R. Raimundo, I.F.S. dos Santos, G.L. Tiago Filho, R.M. Barros, Evaluation of greenhouse gas emissions avoided by wind generation in the Brazilian energetic matrix: A retroactive analysis and future potential, *Resour. Conserv. Recycl.* 137 (2018) 270–280. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2018.06.020>.
- [8] D.M. Rosenberg, F. Berkes, R.A. Bodaly, R.E. Hecky, C.A. Kelly, J.W.M. Rudd, Large-scale impacts of hydroelectric development, *Environ. Rev.* 5 (1997) 27–54. <https://doi.org/10.1139/a97-001>.
- [9] T. Abbasi, S.A. Abbasi, Biomass energy and the environmental impacts associated with its production and utilization, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14 (2010) 919–937. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.11.006>.
- [10] O.Z. Sharaf, M.F. Orhan, An overview of fuel cell technology: Fundamentals and applications, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 32 (2014) 810–853. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.012>.
- [11] Empresa de Pesquisa Energética (Brasil), Balanço Energético Nacional 2020, Rio Janeiro EPE. (2020) 7–295. [https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-479/topico-528/BEN2020\\_sp.pdf](https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-479/topico-528/BEN2020_sp.pdf).
- [12] Y. Manoharan, S.E. Hosseini, B. Butler, H. Alzahrani, B.T.F. Senior, T. Ashuri,



- J. Krohn, Hydrogen Fuel Cell Vehicles; Current Status and Future Prospect, *Appl. Sci.* 9 (2019) 2296. <https://doi.org/10.3390/app9112296>.
- [13] L. Gong, Z. Yang, K. Li, W. Xing, C. Liu, J. Ge, Recent development of methanol electrooxidation catalysts for direct methanol fuel cell, *J. Energy Chem.* 27 (2018) 1618–1628. <https://doi.org/10.1016/j.jechem.2018.01.029>.
- [14] M.A.F. Akhairy, S.K. Kamarudin, Catalysts in direct ethanol fuel cell (DEFC): An overview, *Int. J. Hydrogen Energy.* 41 (2016) 4214–4228. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.12.145>.
- [15] E. Antolini, Glycerol Electro-Oxidation in Alkaline Media and Alkaline Direct Glycerol Fuel Cells, *Catalysts.* 9 (2019) 980. <https://doi.org/10.3390/catal9120980>.
- [16] A. Brouzgou, P. Tsiakaras, Electrocatalysts for Glucose Electrooxidation Reaction: A Review, *Top. Catal.* 58 (2015) 1311–1327. <https://doi.org/10.1007/s11244-015-0499-1>.
- [17] E.A.T. e E.R.G. H. Mercedes Villullas, Células a Combustível: energia limpa a partir de fontes renováveis, *Química Nov. Na Esc.* 15 (2002) 28–34.
- [18] A. Kirubakaran, S. Jain, R.K. Nema, A review on fuel cell technologies and power electronic interface, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 13 (2009) 2430–2440. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.04.004>.
- [19] K.W. Guo, Green nanotechnology of trends in future energy: a review, *Int. J. Energy Res.* 36 (2012) 1–17. <https://doi.org/10.1002/er.1928>.
- [20] S. de Aquino Neto, Preparação e caracterização de bioanodos para biocélula a combustível etanol/O<sub>2</sub>, Universidade de São Paulo, 2012. <https://doi.org/10.11606/T.59.2012.tde-29102012-155525>.
- [21] C. Santoro, C. Arbizzani, B. Erable, I. Ieropoulos, Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review, *J. Power Sources.* 356 (2017) 225–244. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.03.109>.
- [22] R.A. Bullen, T.C. Arnot, J.B. Lakeman, F.C. Walsh, Biofuel cells and their development, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2006) 2015–2045. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.01.030>.
- [23] A. Boudghene Stambouli, E. Traversa, Fuel cells, an alternative to standard sources of energy, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 6 (2002) 295–304. [https://doi.org/10.1016/S1364-0321\(01\)00015-6](https://doi.org/10.1016/S1364-0321(01)00015-6).
- [24] Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds,

- Proc. R. Soc. London. Ser. B, Contain. Pap. a Biol. Character. 84 (1911) 260–276. <https://doi.org/10.1098/rspb.1911.0073>.
- [25] A.T. Yahiro, S.M. Lee, D.O. Kimble, Bioelectrochemistry I-Enzyme Utilizing Bio-Fuel Cell Studies, *Biochim. Biophys. Acta - Spec. Sect. Biophys. Subj.* 88 (1964) 375–383. [https://doi.org/10.1016/0926-6577\(64\)90192-5](https://doi.org/10.1016/0926-6577(64)90192-5).
- [26] M. Holzinger, A. Le Goff, S. Cosnier, Carbon nanotube/enzyme biofuel cells, *Electrochim. Acta.* 82 (2012) 179–190. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.12.135>.
- [27] M. Gamella, A. Koushanpour, E. Katz, Biofuel cells – Activation of micro- and macro-electronic devices, *Bioelectrochemistry.* 119 (2018) 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.09.002>.
- [28] M. Grattieri, S.D. Minter, Self-Powered Biosensors, *ACS Sensors.* 3 (2018) 44–53. <https://doi.org/10.1021/acssensors.7b00818>.
- [29] A.A. Babadi, S. Bagheri, S.B.A. Hamid, Progress on implantable biofuel cell: Nano-carbon functionalization for enzyme immobilization enhancement, *Biosens. Bioelectron.* 79 (2016) 850–860. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.01.016>.
- [30] I. Jeerapan, J.R. Sempionatto, J. Wang, On-Body Bioelectronics: Wearable Biofuel Cells for Bioenergy Harvesting and Self-Powered Biosensing, *Adv. Funct. Mater.* 30 (2020) 1906243. <https://doi.org/10.1002/adfm.201906243>.
- [31] X. Xiao, T. Siepenkoetter, P.Ó. Conghaile, D. Leech, E. Magner, Nanoporous Gold-Based Biofuel Cells on Contact Lenses, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 10 (2018) 7107–7116. <https://doi.org/10.1021/acsam.7b18708>.
- [32] K. MacVittie, J. Halánek, L. Halámková, M. Southcott, W.D. Jemison, R. Lobel, E. Katz, From “cyborg” lobsters to a pacemaker powered by implantable biofuel cells, *Energy Environ. Sci.* 6 (2013) 81–86. <https://doi.org/10.1039/C2EE23209J>.
- [33] M. Southcott, K. MacVittie, J. Halánek, L. Halámková, W.D. Jemison, R. Lobel, E. Katz, A pacemaker powered by an implantable biofuel cell operating under conditions mimicking the human blood circulatory system – battery not included, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (2013) 6278. <https://doi.org/10.1039/c3cp50929j>.
- [34] M.A. Moqsud, K. Omine, N. Yasufuku, M. Hyodo, Y. Nakata, Microbial fuel cell (MFC) for bioelectricity generation from organic wastes, *Waste Manag.* 33

- (2013) 2465–2469. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.07.026>.
- [35] M.J. Cooney, E. Roschi, I.W. Marison, C. Comminellis, U. von Stockar, Physiologic studies with the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*: Evaluation for use in a biofuel cell, *Enzyme Microb. Technol.* 18 (1996) 358–365. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00132-8](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00132-8).
- [36] N. Mano, A. de Poulpique, O<sub>2</sub> Reduction in Enzymatic Biofuel Cells, *Chem. Rev.* 118 (2018) 2392–2468. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00220>.
- [37] G. Wu, Y. Gao, D. Zhao, P. Ling, F. Gao, Methanol/Oxygen Enzymatic Biofuel Cell Using Laccase and NAD<sup>+</sup>-Dependent Dehydrogenase Cascades as Biocatalysts on Carbon Nanodots Electrodes, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 9 (2017) 40978–40986. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b12295>.
- [38] D. Sokic-Lazic, S.D. Minteer, Citric acid cycle biomimic on a carbon electrode, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2008) 939–944. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.07.043>.
- [39] S. Aquino Neto, S.D. Minteer, A.R. de Andrade, Developing ethanol bioanodes using a hydrophobically modified linear polyethylenimine hydrogel for immobilizing an enzyme cascade, *J. Electroanal. Chem.* 812 (2018) 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.09.001>.
- [40] J. Tang, R.M.L. Werchmeister, L. Preda, W. Huang, Z. Zheng, S. Leimkühler, U. Wollenberger, X. Xiao, C. Engelbrekt, J. Ulstrup, J. Zhang, Three-Dimensional Sulfite Oxidase Bioanodes Based on Graphene Functionalized Carbon Paper for Sulfite/O<sub>2</sub> Biofuel Cells, *ACS Catal.* 9 (2019) 6543–6554. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b01715>.
- [41] K. Sakai, Y. Kitazumi, O. Shirai, K. Takagi, K. Kano, High-Power Formate/Dioxygen Biofuel Cell Based on Mediated Electron Transfer Type Bioelectrocatalysis, *ACS Catal.* 7 (2017) 5668–5673. <https://doi.org/10.1021/acscatal.7b01918>.
- [42] S. Aquino Neto, R.D. Milton, L.B. Crepaldi, D.P. Hickey, A.R. de Andrade, S.D. Minteer, Co-immobilization of gold nanoparticles with glucose oxidase to improve bioelectrocatalytic glucose oxidation, *J. Power Sources.* 285 (2015) 493–498. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2015.03.121>.
- [43] S. Xu, S.D. Minteer, Enzymatic Biofuel Cell for Oxidation of Glucose to CO<sub>2</sub>, *ACS Catal.* 2 (2012) 91–94. <https://doi.org/10.1021/cs200523s>.
- [44] J. Szczesny, N. Marković, F. Conzuelo, S. Zacarias, I.A.C. Pereira, W. Lubitz,

- N. Plumeré, W. Schuhmann, A. Ruff, A gas breathing hydrogen/air biofuel cell comprising a redox polymer/hydrogenase-based bioanode, *Nat. Commun.* 9 (2018) 4715. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07137-6>.
- [45] N. Lalaoui, A. de Poulpiquet, R. Haddad, A. Le Goff, M. Holzinger, S. Gounel, M. Mermoux, P. Infossi, N. Mano, E. Lojou, S. Cosnier, A membraneless air-breathing hydrogen biofuel cell based on direct wiring of thermostable enzymes on carbon nanotube electrodes, *Chem. Commun.* 51 (2015) 7447–7450. <https://doi.org/10.1039/C5CC02166A>.
- [46] X. Xiao, H. Xia, R. Wu, L. Bai, L. Yan, E. Magner, S. Cosnier, E. Lojou, Z. Zhu, A. Liu, Tackling the Challenges of Enzymatic (Bio)Fuel Cells, *Chem. Rev.* 119 (2019) 9509–9558. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00115>.
- [47] M.J. Moehlenbrock, S.D. Minteer, Extended lifetime biofuel cells, *Chem. Soc. Rev.* 37 (2008) 1188–1196. <https://doi.org/10.1039/b708013c>.
- [48] A.J. Bandodkar, J. Wang, Wearable Biofuel Cells: A Review, *Electroanalysis.* 28 (2016) 1188–1200. <https://doi.org/10.1002/elan.201600019>.
- [49] M. Rasmussen, S. Abdellaoui, S.D. Minteer, Enzymatic biofuel cells: 30 years of critical advancements, *Biosens. Bioelectron.* 76 (2016) 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.06.029>.
- [50] G.-C. Gil, I.-S. Chang, B.H. Kim, M. Kim, J.-K. Jang, H.S. Park, H.J. Kim, Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 327–334. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(02\)00110-0](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(02)00110-0).
- [51] R.L. Arechederra, S.D. Minteer, Complete Oxidation of Glycerol in an Enzymatic Biofuel Cell, *Fuel Cells.* 9 (2009) 63–69. <https://doi.org/10.1002/fuce.200800029>.
- [52] G.T.R. Palmore, H. Bertschy, S.H. Bergens, G.M. Whitesides, A methanol/dioxygen biofuel cell that uses NAD<sup>+</sup>-dependent dehydrogenases as catalysts: application of an electro-enzymatic method to regenerate nicotinamide adenine dinucleotide at low overpotentials, *J. Electroanal. Chem.* 443 (1998) 155–161. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(97\)00393-8](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(97)00393-8).
- [53] S. Xu, S.D. Minteer, Enzymatic Biofuel Cell for Oxidation of Glucose to CO<sub>2</sub>, *ACS Catal.* 2 (2012) 91–94. <https://doi.org/10.1021/cs200523s>.
- [54] D. Sokic-Lazic, A.R. de Andrade, S.D. Minteer, Utilization of enzyme cascades for complete oxidation of lactate in an enzymatic biofuel cell, *Electrochim. Acta.*

- 56 (2011) 10772–10775. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.01.050>.
- [55] M. Almunla, Y. Tepeli Büyüksünetçi, O. Akpolat, Ü. Anık, Development of Apple Tissue Based Biocathode and MWCNT–Pt–Au Nanomaterial Based Bioanode Biofuel Cell, *Electroanalysis*. 33 (2021) 873–881. <https://doi.org/10.1002/elan.202060425>.
- [56] Z. Wang, L. Xia, J. Xia, Z. An, S. Gong, Direct energy harvesting from starch by hybrid enzymatic and non-enzymatic cascade bioanode, *RSC Adv*. 6 (2016) 26421–26424. <https://doi.org/10.1039/C6RA02059C>.
- [57] A. Dector, R.A. Escalona-Villalpando, D. Dector, V. Vallejo-Becerra, A.U. Chávez-Ramírez, L.G. Arriaga, J. Ledesma-García, Perspective use of direct human blood as an energy source in air-breathing hybrid microfluidic fuel cells, *J. Power Sources*. 288 (2015) 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2015.04.089>.
- [58] V. Mani, R. Devasenathipathy, S.-M. Chen, J.-A. Gu, S.-T. Huang, Synthesis and characterization of graphene-cobalt phthalocyanines and graphene-iron phthalocyanine composites and their enzymatic fuel cell application, *Renew. Energy*. 74 (2015) 867–874. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.09.003>.
- [59] C.H. Kwon, Y. Ko, D. Shin, S.W. Lee, J. Cho, Highly conductive electrocatalytic gold nanoparticle-assembled carbon fiber electrode for high-performance glucose-based biofuel cells, *J. Mater. Chem. A*. 7 (2019) 13495–13505. <https://doi.org/10.1039/c8ta12342j>.
- [60] C.H. Kwon, Y. Ko, D. Shin, M. Kwon, J. Park, W.K. Bae, S.W. Lee, J. Cho, High-power hybrid biofuel cells using layer-by-layer assembled glucose oxidase-coated metallic cotton fibers, *Nat. Commun*. 9 (2018) 4479. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06994-5>.
- [61] S. Gentil, N. Lalaoui, A. Dutta, Y. Nedellec, S. Cosnier, W.J. Shaw, V. Artero, A. Le Goff, Carbon-Nanotube-Supported Bio-Inspired Nickel Catalyst and Its Integration in Hybrid Hydrogen/Air Fuel Cells, *Angew. Chemie Int. Ed*. 56 (2017) 1845–1849. <https://doi.org/10.1002/anie.201611532>.
- [62] J.H. Franco, S.A. Neto, D.P. Hickey, S.D. Minteer, A.R. de Andrade, Hybrid catalyst cascade architecture enhancement for complete ethanol electrochemical oxidation, *Biosens. Bioelectron*. 121 (2018) 281–286. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.09.011>.
- [63] S. Abdellaoui, D.P. Hickey, A.R. Stephens, S.D. Minteer, Recombinant oxalate

- decarboxylase: Enhancement of a hybrid catalytic cascade for the complete electro-oxidation of glycerol, *Chem. Commun.* 51 (2015) 14330–14333. <https://doi.org/10.1039/c5cc06131h>.
- [64] F.C. Macazo, D.P. Hickey, S. Abdellaoui, M.S. Sigman, S.D. Minteer, Polymer-immobilized, hybrid multi-catalyst architecture for enhanced electrochemical oxidation of glycerol, *Chem. Commun.* 53 (2017) 10310–10313. <https://doi.org/10.1039/C7CC05724E>.
- [65] J.H. Franco, P.Z. de Almeida, S. Abdellaoui, D.P. Hickey, P. Ciancaglini, M. de Lourdes T. M. Polizeli, S.D. Minteer, A.R. de Andrade, Bioinspired architecture of a hybrid bifunctional enzymatic/organic electrocatalyst for complete ethanol oxidation, *Bioelectrochemistry*. 130 (2019) 107331. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.107331>.
- [66] D.P. Hickey, M.S. McCammant, F. Giroud, M.S. Sigman, S.D. Minteer, Hybrid Enzymatic and Organic Electrocatalytic Cascade for the Complete Oxidation of Glycerol, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 15917–15920. <https://doi.org/10.1021/ja5098379>.
- [67] J.H. Franco, K.J. Klunder, J. Lee, V. Russell, A.R. de Andrade, S.D. Minteer, Enhanced electrochemical oxidation of ethanol using a hybrid catalyst cascade architecture containing pyrene-TEMPO, oxalate decarboxylase and carboxylated multi-walled carbon nanotube, *Biosens. Bioelectron.* 154 (2020) 112077. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112077>.
- [68] J.H. Franco, K.J. Klunder, V. Russell, A.R. de Andrade, S.D. Minteer, Hybrid enzymatic and organic catalyst cascade for enhanced complete oxidation of ethanol in an electrochemical micro-reactor device, *Electrochim. Acta.* 331 (2020) 135254. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2019.135254>.
- [69] L.M. Palma, T.S. Almeida, C. Morais, T.W. Napporn, K.B. Kokoh, A.R. de Andrade, Effect of Co-catalyst on the Selective Electrooxidation of Glycerol over Ruthenium-based Nanomaterials, *ChemElectroChem.* 4 (2017) 39–45. <https://doi.org/10.1002/celec.201600406>.
- [70] T.F.M. Moreira, Eletro-oxidação de etanol e glicerol em meio alcalino sob nanomateriais baseados em platina e paládio modificados com ródio, Universidade de São Paulo, 2021. <https://doi.org/10.11606/T.59.2021.tde-08032021-134715>.
- [71] C.S. Bonfin, Desenvolvimento de biocélulas a combustível de Etanol/O<sub>2</sub>,

- Universidade de São Paulo, 2019. <https://doi.org/10.11606/D.59.2019.tde-04122018-163105>.
- [72] H. Rana, P. Moussatche, L.S. Rocha, S. Abdellaoui, S.D. Minter, E.W. Moomaw, Isothermal titration calorimetry uncovers substrate promiscuity of bicupin oxalate oxidase from *Ceriporiopsis subvermispota*, *Biochem. Biophys. Reports*. 5 (2016) 396–400. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.01.016>.
- [73] P. Moussatche, A. Angerhofer, W. Imaram, E. Hoffer, K. Uberto, C. Brooks, C. Bruce, D. Sledge, N.G.J. Richards, E.W. Moomaw, Characterization of *Ceriporiopsis subvermispota* bicupin oxalate oxidase expressed in *Pichia pastoris*, *Arch. Biochem. Biophys.* 509 (2011) 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.02.022>.
- [74] C.S. Pundir, Purification and properties of oxalate oxidase from Sorghum leaves, *Phytochemistry*. 30 (1991) 1065–1067. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)95173-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)95173-2).
- [75] C. Aguilar, U. Urzúa, C. Koenig, R. Vicuña, Oxalate oxidase from *Ceriporiopsis subvermispota*: Biochemical and cytochemical studies, *Arch. Biochem. Biophys.* 366 (1999) 275–282. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1216>.
- [76] J. Chiriboga, Purification and properties of oxalic acid oxidase, *Arch. Biochem. Biophys.* 116 (1966) 516–523. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(66\)90057-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(66)90057-9).
- [77] J.H. Franco, M. Grattieri, A.R. de Andrade, S.D. Minter, Unveiling complete lactate oxidation through a hybrid catalytic cascade, *Electrochim. Acta*. 376 (2021) 138044. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2021.138044>.
- [78] L. Houget, J.; Mayer, A.; Plantefol, Sur une forme particulière d'oxydation biologique, *Compt. Rend.* 185 (1927) 304–306. [https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&as\\_sdt=0%2C5&q=J.+Houget%2C+A.+Mayer+and+L.+Plantefol%2C+Compt.+Rend.%2C+185%2C+304+%281927%29&btnG=](https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&as_sdt=0%2C5&q=J.+Houget%2C+A.+Mayer+and+L.+Plantefol%2C+Compt.+Rend.%2C+185%2C+304+%281927%29&btnG=).
- [79] O. Opaleye, R.S. Rose, M.M. Whittaker, E.J. Woo, J.W. Whittaker, R.W. Pickersgill, Structural and spectroscopic studies shed light on the mechanism of oxalate oxidase, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 6428–6433. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510256200>.
- [80] J.M. Dunwell, S. Khuri, P.J. Gane, Microbial Relatives of the Seed Storage Proteins of Higher Plants: Conservation of Structure and Diversification of Function during Evolution of the Cupin Superfamily, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*

- 64 (2000) 153–179. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.1.153-179.2000>.
- [81] P. Cassland, A. Sjöde, S. Winestrand, L.J. Jönsson, N.-O. Nilvebrant, Evaluation of Oxalate Decarboxylase and Oxalate Oxidase for Industrial Applications, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 161 (2010) 255–263. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8769-7>.
- [82] C. Thompson, J.M. Dunwell, C.E. Johnstone, V. Lay, J. Ray, M. Schmitt, H. Watson, G. Nisbet, Degradation of oxalic acid by transgenic oilseed rape plants expressing oxalate oxidase, *Euphytica*. 85 (1995) 169–172. <https://doi.org/10.1007/BF00023945>.
- [83] A. Hesse, D. Bongartz, H. Heynck, W. Berg, Measurement of urinary oxalic acid: A comparison of five methods, *Clin. Biochem.* 29 (1996) 467–472. [https://doi.org/10.1016/0009-9120\(96\)00067-7](https://doi.org/10.1016/0009-9120(96)00067-7).
- [84] R. Hönow, D. Bongartz, A. Hesse, An improved HPLC-enzyme-reactor method for the determination of oxalic acid in complex matrices, *Clin. Chim. Acta.* 261 (1997) 131–139. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(97\)06521-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(97)06521-2).
- [85] J.M. Dunwell, Cupins: A New Superfamily of Functionally Diverse Proteins that Include Germins and Plant Storage Proteins, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 15 (1998) 1–32. <https://doi.org/10.1080/02648725.1998.10647950>.
- [86] B.G. Lane, Oxalate oxidases and differentiating surface structure in wheat: Germins, *Biochem. J.* 349 (2000) 309–321. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3490309>.
- [87] A.E. Leek, V.S. Butt, Oxidation of Oxalate and Formate by Leaf Peroxisomes, *Biochem. J.* 128 (1972) 87. <https://doi.org/10.1042/bj1380217>.
- [88] T. Dahiya, S. Yadav, N. Chauhan, P. Handa, C.S. Pundir, Strawberry Fruit Oxalate Oxidase — Detection, Purification, Characterization and Physiological Role, *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 19 (2010) 247–250. <https://doi.org/10.1007/BF03263349>.
- [89] E.J. Woo, J.M. Dunwell, P.W. Goodenough, R.W. Pickersgill, Barley oxalate oxidase is a hexameric protein related to seed storage proteins: Evidence from X-ray crystallography, *FEBS Lett.* 437 (1998) 87–90. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01203-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01203-4).
- [90] B.G. Lane, J.M. Dunwell, J.A. Ray, M.R. Schmitt, A.C. Cuming, Germin, a protein marker of early plant development, is an oxalate oxidase, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 12239–12242. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)31377-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)31377-2).



- [91] H. KOYAMA, Purification and characterization of oxalate oxidase from *Pseudomonas* sp. OX-53., *Agric. Biol. Chem.* 52 (1988) 743–748. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.52.743>.
- [92] B.G. Lane, Oxalate, germin, and the extracellular matrix of higher plants, *FASEB J.* 8 (1994) 294–301. <https://doi.org/10.1096/fasebj.8.3.8143935>.
- [93] M.M. Whittaker, J.W. Whittaker, Characterization of recombinant barley oxalate oxidase expressed by *Pichia pastoris*, *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 7 (2002) 136–145. <https://doi.org/10.1007/s007750100281>.
- [94] H.-Y. Pan, M.M. Whittaker, R. Bouveret, A. Berna, F. Bernier, J.W. Whittaker, Characterization of wheat germin (oxalate oxidase) expressed by *Pichia pastoris*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356 (2007) 925–929. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.03.097>.
- [95] U. Urzúa, P.J. Kersten, R. Vicuña, Kinetics of Mn<sup>3+</sup>-oxalate formation and decay in reactions catalyzed by manganese peroxidase of *Ceriporiopsis subvermispora*, *Arch. Biochem. Biophys.* 360 (1998) 215–222. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0952>.
- [96] U. Urzúa, P.J. Kersten, R. Vicuña, Manganese peroxidase-dependent oxidation of glyoxylic and oxalic acids synthesized by *Ceriporiopsis subvermispora* produces extracellular hydrogen peroxide, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 68–73. <https://doi.org/10.1128/aem.64.1.68-73.1998>.
- [97] M.R. Escutia, L. Bowater, A. Edwards, A.R. Bottrill, M.R. Burrell, R. Polanco, R. Vicuña, S. Bornemann, Cloning and Sequencing of Two *Ceriporiopsis subvermispora* Bicupin Oxalate Oxidase Allelic Isoforms: Implications for the Reaction Specificity of Oxalate Oxidases and Decarboxylases, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 3608–3616. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3608-3616.2005>.
- [98] E.W. Moomaw, E. Hoffer, P. Moussatche, J.C. Salerno, M. Grant, B. Immelman, R. Uberto, A. Ozarowski, A. Angerhofer, Kinetic and Spectroscopic Studies of Bicupin Oxalate Oxidase and Putative Active Site Mutants, *PLoS One.* 8 (2013) e57933. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057933>.
- [99] D. Svedružić, S. Jónsson, C.G. Toyota, L.A. Reinhardt, S. Ricagno, Y. Lindqvist, N.G.J. Richards, The enzymes of oxalate metabolism: unexpected structures and mechanisms, *Arch. Biochem. Biophys.* 433 (2005) 176–192. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.08.032>.

- [100] A. Tanner, L. Bowater, S.A. Fairhurst, S. Bornemann, Oxalate Decarboxylase Requires Manganese and Dioxygen for Activity, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 43627–43634. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107202200>.
- [101] M.R. Burrell, V.J. Just, L. Bowater, S.A. Fairhurst, L. Requena, D.M. Lawson, S. Bornemann, Oxalate Decarboxylase and Oxalate Oxidase Activities Can Be Interchanged with a Specificity Switch of up to 282 000 by Mutating an Active Site Lid, *Biochemistry.* 46 (2007) 12327–12336. <https://doi.org/10.1021/bi700947s>.
- [102] G. Pozzi, M. Cavazzini, S. Quici, M. Benaglia, G. Dell'Anna, Poly(ethylene glycol)-Supported TEMPO: An Efficient, Recoverable Metal-Free Catalyst for the Selective Oxidation of Alcohols, *Org. Lett.* 6 (2004) 441–443. <https://doi.org/10.1021/ol036398w>.
- [103] M.F. Semmelhack, C.R. Schmid, Nitroxyl-mediated electro-oxidation of amines to nitriles and carbonyl compounds, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 6732–6734. <https://doi.org/10.1021/ja00360a042>.
- [104] L. De Luca, G. Giacomelli, S. Masala, A. Porcheddu, Trichloroisocyanuric/TEMPO Oxidation of Alcohols under Mild Conditions: A Close Investigation, *J. Org. Chem.* 68 (2003) 4999–5001. <https://doi.org/10.1021/jo034276b>.
- [105] Z. Zhou, L. Liu, TEMPO and its Derivatives: Synthesis and Applications, *Curr. Org. Chem.* 18 (2014) 459–474. <https://doi.org/10.2174/13852728113176660151>.
- [106] M. Hudlicky, *Oxidations in Organic Chemistry*, 2<sup>o</sup>, American Chemical Society, 1990.
- [107] A.J. Mancuso, S.-L. Huang, D. Swern, Oxidation of long-chain and related alcohols to carbonyls by dimethyl sulfoxide “activated” by oxalyl chloride, *J. Org. Chem.* 43 (1978) 2480–2482. <https://doi.org/10.1021/jo00406a041>.
- [108] D.B. Dess, J.C. Martin, Readily accessible 12-I-5 oxidant for the conversion of primary and secondary alcohols to aldehydes and ketones, *J. Org. Chem.* 48 (1983) 4155–4156. <https://doi.org/10.1021/jo00170a070>.
- [109] S.P. Mardur, G.S. Gokavi, Selective oxidation of alcohols to aldehydes by hydrogen peroxide using hexamolybdochromate(III) as catalyst, *J. Iran. Chem. Soc.* 7 (2010) 441–446. <https://doi.org/10.1007/BF03246030>.
- [110] B.J. Bergner, A. Schürmann, K. Peppler, A. Garsuch, J. Janek, TEMPO: A

- Mobile Catalyst for Rechargeable Li-O<sub>2</sub> Batteries, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 15054–15064. <https://doi.org/10.1021/ja508400m>.
- [111] Z. Zhang, P. Chen, T.N. Murakami, S.M. Zakeeruddin, M. Grätzel, The 2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinyloxy Radical: An Efficient, Iodine-Free Redox Mediator for Dye-Sensitized Solar Cells, *Adv. Funct. Mater.* 18 (2008) 341–346. <https://doi.org/10.1002/adfm.200701041>.
- [112] S. Abdellaoui, K.L. Knoche, K. Lim, D.P. Hickey, S.D. Minter, TEMPO as a Promising Electrocatalyst for the Electrochemical Oxidation of Hydrogen Peroxide in Bioelectronic Applications, *J. Electrochem. Soc.* 163 (2016) H3001–H3005. <https://doi.org/10.1149/2.0011604jes>.
- [113] C. Comminges, R. Barhdadi, A.P. Doherty, S. O'Toole, M. Troupel, Mechanism of 2,2',6,6'-Tetramethylpiperidin-N-oxyl-Mediated Oxidation of Alcohols in Ionic Liquids, *J. Phys. Chem. A* 112 (2008) 7848–7855. <https://doi.org/10.1021/jp801253n>.
- [114] R. Ciriminna, G. Palmisano, M. Pagliaro, Electrodes Functionalized with the 2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxy Radical for the Waste-Free Oxidation of Alcohols, *ChemCatChem* 7 (2015) 552–558. <https://doi.org/10.1002/cctc.201402896>.
- [115] D.P. Hickey, D.A. Schiedler, I. Matanovic, P.V. Doan, P. Atanassov, S.D. Minter, M.S. Sigman, Predicting Electrocatalytic Properties: Modeling Structure-Activity Relationships of Nitroxyl Radicals, *J. Am. Chem. Soc.* 137 (2015) 16179–16186. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b11252>.
- [116] P.L. Bragd, H. van Bekkum, A.C. Besemer, TEMPO-Mediated Oxidation of Polysaccharides: Survey of Methods and Applications, *Top. Catal.* 27 (2004) 49–66. <https://doi.org/10.1023/B:TOCA.0000013540.69309.46>.
- [117] P. Atkins, L. Jones, *Princípios de Química: Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente*, Bookman, 2001.
- [118] S. Iijima, Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature* 354 (1991) 56–58. <https://doi.org/10.1038/354056a0>.
- [119] M.H. Herbst, M.I.F. Macêdo, A.M. Rocco, Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar, *Quim. Nova* 27 (2004) 986–992. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000600025>.
- [120] B. Ribeiro, E.C. Botelho, M.L. Costa, C.F. Bandeira, Carbon nanotube buckypaper reinforced polymer composites: a review, *Polímeros* 27 (2017)

- 247–255. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.03916>.
- [121] M. Holzinger, A. Le Goff, S. Cosnier, Carbon nanotube/enzyme biofuel cells, *Electrochim. Acta.* 82 (2012) 179–190.  
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.12.135>.
- [122] R.H. Baughman, Carbon Nanotubes--the Route Toward Applications, *Science* (80-. ). 297 (2002) 787–792. <https://doi.org/10.1126/science.1060928>.
- [123] R. Vidu, M. Rahman, M. Mahmoudi, M. Enachescu, T.D. Poteca, I. Opris, Nanostructures: a platform for brain repair and augmentation, *Front. Syst. Neurosci.* 8 (2014) 1–24. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00091>.
- [124] G.O. Duff Putu, Jean Shoveller., Julio Montaner., Cindy Feng., Rachel Nicoletti., Kate Shannon ., Properties that Influence the Specific Surface Areas of Carbon Nanotubes and Nanofibers, *Ann. Occup. Hyg.* 176 (2013) 139–148.  
<https://doi.org/10.1093/annhyg/met042>.
- [125] A. Javey, The 2008 Kavli Prize in Nanoscience: Carbon Nanotubes, *ACS Nano.* 2 (2008) 1329–1335. <https://doi.org/10.1021/nn8003982>.
- [126] A. Merkoçi, M. Pumera, X. Llopis, B. Pérez, M. del Valle, S. Alegret, New materials for electrochemical sensing VI: Carbon nanotubes, *TrAC Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 826–838. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2005.03.019>.
- [127] J. Chen, Solution Properties of Single-Walled Carbon Nanotubes, *Science* (80-. ). 282 (1998) 95–98. <https://doi.org/10.1126/science.282.5386.95>.
- [128] P.-C. Ma, N.A. Siddiqui, G. Marom, J.-K. Kim, Dispersion and functionalization of carbon nanotubes for polymer-based nanocomposites: A review, *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* 41 (2010) 1345–1367.  
<https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2010.07.003>.
- [129] A. Savk, B. Özdil, B. Demirkan, M.S. Nas, M.H. Calimli, M.H. Alma, Inamuddin, A.M. Asiri, F. Şen, Multiwalled carbon nanotube-based nanosensor for ultrasensitive detection of uric acid, dopamine, and ascorbic acid, *Mater. Sci. Eng. C.* 99 (2019) 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.113>.
- [130] H. Karimi-Maleh, K. Cellat, K. Arıkan, A. Savk, F. Karimi, F. Şen, Palladium–Nickel nanoparticles decorated on Functionalized-MWCNT for high precision non-enzymatic glucose sensing, *Mater. Chem. Phys.* 250 (2020) 123042.  
<https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2020.123042>.
- [131] T.H. Ko, J.-G. Seong, S. Radhakrishnan, C.-S. Kwak, M.-S. Khil, H.-Y. Kim, B.-S. Kim, Dual functional nickel cobalt/MWCNT composite electrode-based

- electrochemical capacitor and enzymeless glucose biosensor applications: Influence of Ni/Co molar ratio, *J. Ind. Eng. Chem.* 73 (2019) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.01.009>.
- [132] R. Vicentini, W.G. Nunes, L.H. da Costa, L.M. Da Silva, B. Freitas, A.M. Pascon, O. Vilas-Boas, H. Zanin, Multi-walled carbon nanotubes and activated carbon composite material as electrodes for electrochemical capacitors, *J. Energy Storage*. 33 (2021) 100738. <https://doi.org/10.1016/j.est.2019.04.012>.
- [133] A. Bhaskar, M. Deepa, T. Narasinga Rao, MoO<sub>2</sub>/Multiwalled Carbon Nanotubes (MWCNT) Hybrid for Use as a Li-Ion Battery Anode, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 5 (2013) 2555–2566. <https://doi.org/10.1021/am3031536>.
- [134] X. Chen, H. Zhu, Y.-C. Chen, Y. Shang, A. Cao, L. Hu, G.W. Rubloff, MWCNT/V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Core/Shell Sponge for High Areal Capacity and Power Density Li-Ion Cathodes, *ACS Nano*. 6 (2012) 7948–7955. <https://doi.org/10.1021/nn302417x>.
- [135] V. Bambagioni, C. Bianchini, A. Marchionni, J. Filippi, F. Vizza, J. Teddy, P. Serp, M. Zhiani, Pd and Pt–Ru anode electrocatalysts supported on multi-walled carbon nanotubes and their use in passive and active direct alcohol fuel cells with an anion-exchange membrane (alcohol=methanol, ethanol, glycerol), *J. Power Sources*. 190 (2009) 241–251. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2009.01.044>.
- [136] E.O. Eren, N. Özkan, Y. Devrim, Polybenzimidazole-modified carbon nanotubes as a support material for platinum-based high-temperature proton exchange membrane fuel cell electrocatalysts, *Int. J. Hydrogen Energy*. 46 (2021) 29556–29567. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.07.101>.
- [137] J. Chen, J. Yang, L. Jiang, X. Wang, D. Yang, Q. Wei, Y. Wang, R. Wang, Y. Liu, Y. Yang, Improved electrochemical performances by Ni-catecholate-based metal organic framework grown on NiCoAl-layered double hydroxide/multi-wall carbon nanotubes as cathode catalyst in microbial fuel cells, *Bioresour. Technol.* 337 (2021) 125430. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125430>.
- [138] A. Mehdinia, E. Ziaei, A. Jabbari, Multi-walled carbon nanotube/SnO<sub>2</sub> nanocomposite: a novel anode material for microbial fuel cells, *Electrochim. Acta*. 130 (2014) 512–518. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.03.011>.
- [139] H. Wang, H. Jiang, S. Wang, W. Shi, J. He, H. Liu, Y. Huang, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>–MWCNT magnetic nanocomposites as efficient peroxidase mimic catalysts in a Fenton-

- like reaction for water purification without pH limitation, *RSC Adv.* 4 (2014) 45809–45815. <https://doi.org/10.1039/C4RA07327D>.
- [140] Z. Rong-Bin, L. Lei, Z. Xian-Rong, S. Jin-Yan, W. Tao, C. Jian-Xin, Catalytic Properties of Ni /MWCNT and La-Promoted Ni /MWCNT for Methanation of Carbon Dioxide Reaction, *Acta Physico-Chimica Sin.* 28 (2012) 1951–1956. <https://doi.org/10.3866/PKU.WHXB201206041>.
- [141] Y. Ogawa, S. Yoshino, T. Miyake, M. Nishizawa, Surfactant-assisted direct electron transfer between multi-copper oxidases and carbon nanotube-based porous electrodes, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2014) 13059–13062. <https://doi.org/10.1039/C4CP00872C>.
- [142] F.L.S. Purgato, P. Olivi, J.-M. Léger, A.R. de Andrade, G. Tremiliosi-Filho, E.R. Gonzalez, C. Lamy, K.B. Kokoh, Activity of platinum–tin catalysts prepared by the Pechini–Adams method for the electrooxidation of ethanol, *J. Electroanal. Chem.* 628 (2009) 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2009.01.010>.
- [143] L.M. Palma, T.S. Almeida, A.R. de Andrade, Comparative study of catalyst effect on ethanol electrooxidation in alkaline medium: Pt- and Pd-based catalysts containing Sn and Ru, *J. Electroanal. Chem.* 878 (2020) 114592. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114592>.
- [144] A.O. Neto, R.R. Dias, M.M. Tusi, M. Linardi, E. V. Spinacé, Electro-oxidation of methanol and ethanol using PtRu/C, PtSn/C and PtSnRu/C electrocatalysts prepared by an alcohol-reduction process, *J. Power Sources.* 166 (2007) 87–91. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2006.12.088>.
- [145] A.O. Neto, T.R.R. Vasconcelos, R.W.R.V. Da Silva, M. Linardi, E.V. Spinacé, Electro-oxidation of ethylene glycol on PtRu/C and PtSn/C electrocatalysts prepared by alcohol-reduction process, *J. Appl. Electrochem.* 35 (2005) 193–198. <https://doi.org/10.1007/s10800-004-5824-5>.
- [146] D. González-Quijano, W.J. Pech-Rodríguez, J.I. Escalante-García, G. Vargas-Gutiérrez, F.J. Rodríguez-Varela, Electrocatalysts for ethanol and ethylene glycol oxidation reactions. Part I: Effects of the polyol synthesis conditions on the characteristics and catalytic activity of Pt–Sn/C anodes, *Int. J. Hydrogen Energy.* 39 (2014) 16676–16685. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.04.125>.
- [147] E. V. Spinacé, L.A. Farias, M. Linardi, A.O. Neto, Preparation of PtSn/C and PtSnNi/C electrocatalysts using the alcohol-reduction process, *Mater. Lett.* 62

- (2008) 2099–2102. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2007.11.023>.
- [148] L. L. de Souza, Direct Oxidation of Ethylene Glycol on PtSn/C for Application in Alkaline Fuel Cell, *Int. J. Electrochem. Sci.* 12 (2017) 11855–11874. <https://doi.org/10.20964/2017.12.57>.
- [149] M. Rodrigues da Silva, A.C.D. Ângelo, Synthesis and Characterization of Ordered Intermetallic Nanostructured PtSn/C and PtSb/C and Evaluation as Electrodes for Alcohol Oxidation, *Electrocatalysis*. 1 (2010) 95–103. <https://doi.org/10.1007/s12678-010-0010-5>.
- [150] A.O. Neto, M. Linardi, E. V. Spinacé, Electro-oxidation of ethylene glycol on PtSn/C and PtSnNi/C electrocatalysts, *Ionics (Kiel)*. 12 (2006) 309–313. <https://doi.org/10.1007/s11581-006-0053-z>.
- [151] K. Miecznikowski, WO<sub>3</sub> decorated carbon nanotube supported PtSn nanoparticles with enhanced activity towards electrochemical oxidation of ethylene glycol in direct alcohol fuel cells, *Arab. J. Chem.* 13 (2020) 1020–1031. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.09.005>.
- [152] M.Z.F. Kamarudin, S.K. Kamarudin, M.S. Masdar, W.R.W. Daud, Review: Direct ethanol fuel cells, *Int. J. Hydrogen Energy*. 38 (2013) 9438–9453. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.07.059>.
- [153] A. Serov, C. Kwak, Recent achievements in direct ethylene glycol fuel cells (DEGFC), *Appl. Catal. B Environ.* 97 (2010) 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2010.04.011>.
- [154] L. An, R. Chen, Recent progress in alkaline direct ethylene glycol fuel cells for sustainable energy production, *J. Power Sources*. 329 (2016) 484–501. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2016.08.105>.
- [155] S. Aquino Neto, T.S. Almeida, L.M. Palma, S.D. Minteer, A.R. de Andrade, Hybrid nanocatalysts containing enzymes and metallic nanoparticles for ethanol/O<sub>2</sub> biofuel cell, *J. Power Sources*. 259 (2014) 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2014.02.069>.
- [156] K.I. Ozoemena, Nanostructured platinum-free electrocatalysts in alkaline direct alcohol fuel cells: catalyst design, principles and applications, *RSC Adv.* 6 (2016) 89523–89550. <https://doi.org/10.1039/C6RA15057H>.
- [157] H. Yue, Y. Zhao, X. Ma, J. Gong, Ethylene glycol: properties, synthesis, and applications, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 4218. <https://doi.org/10.1039/c2cs15359a>.

- [158] M.M. Moore, S.G. Kanekar, R. Dhamija, Ethylene Glycol Toxicity: Chemistry, Pathogenesis, and Imaging, *Radiol. Case Reports*. 3 (2008) 122.  
<https://doi.org/10.2484/rcr.v3i1.122>.
- [159] C. Guo, K.E. McMartin, The cytotoxicity of oxalate, metabolite of ethylene glycol, is due to calcium oxalate monohydrate formation, *Toxicology*. 208 (2005) 347–355. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.11.029>.
- [160] M. Lovrić, P. Granić, M. Čubrilo-Turek, Z. Lalić, J. Sertić, Ethylene glycol poisoning, *Forensic Sci. Int.* 170 (2007) 213–215.  
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.03.025>.
- [161] A. Falase, K. Garcia, C. Lau, J. Roy, P. Atanassov, Hybrid Nano-Structured Platinum-Based Catalyst/Enzyme Anode for Oxidation of Ethanol and Ethylene Glycol, *ECS Electrochem. Lett.* 1 (2012) F9–F11.  
<https://doi.org/10.1149/2.008201eel>.
- [162] U. Manual, pPIC6 A , B , and C Pichia expression vectors for selection on blasticidin and purification of ii, *In Vitro*. (2010).
- [163] L. REQUENA, S. BORNEMANN, Barley (*Hordeum vulgare*) oxalate oxidase is a manganese-containing enzyme, *Biochem. J.* 343 (1999) 185–190.  
<https://doi.org/10.1042/0264-6021:3430185>.
- [164] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [165] T.S. Almeida, L.M. Palma, P.H. Leonello, C. Morais, K.B. Kokoh, A.R. De Andrade, An optimization study of PtSn/C catalysts applied to direct ethanol fuel cell: Effect of the preparation method on the electrocatalytic activity of the catalysts, *J. Power Sources*. 215 (2012) 53–62.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2012.04.061>.
- [166] T.S. Almeida, C. Garbim, R.G. Silva, A.R. De Andrade, Addition of iron oxide to Pt-based catalyst to enhance the catalytic activity of ethanol electrooxidation, *J. Electroanal. Chem.* 796 (2017) 49–56.  
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.04.039>.
- [167] J.G.R. Antonio, J.H. Franco, P.Z. Almeida, T.S. Almeida, M. de L. Teixeira de Morais Polizeli, S.D. Minter, A. Rodrigues de Andrade, Carbon Nanotube PtSn Nanoparticles for Enhanced Complete Biocatalytic Oxidation of Ethylene Glycol in Biofuel Cells, *ACS Mater. Au.* (2021) acsmaterialsau.1c00029.



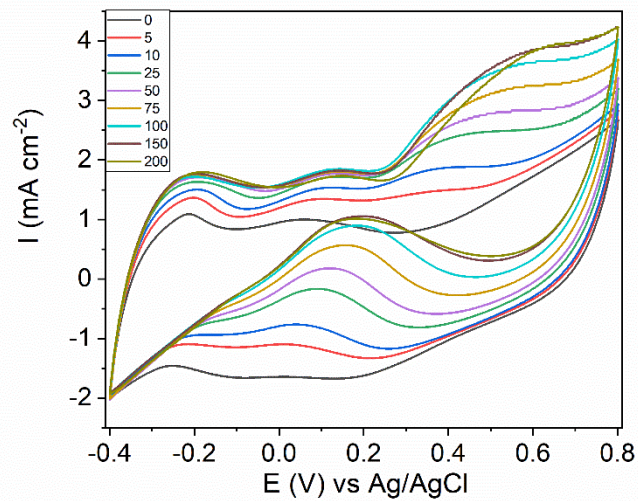
- <https://doi.org/10.1021/acsmaterialsau.1c00029>.
- [168] J. Labuda, R.P. Bowater, M. Fojta, G. Gauglitz, Z. Glatz, I. Hapala, J. Havliš, F. Kilar, A. Kilar, L. Malinovská, H.M.M. Sirén, P. Skládal, F. Torta, M. Valachovič, M. Wimmerová, Z. Zdráhal, D.B. Hibbert, Terminology of bioanalytical methods (IUPAC Recommendations 2018), *Pure Appl. Chem.* 90 (2018) 1121–1198. <https://doi.org/10.1515/pac-2016-1120>.
- [169] E.W. Moomaw, R. Uberto, C. Tu, Membrane inlet mass spectrometry reveals that *Ceriporiopsis subvermisporea bicupin* oxalate oxidase is inhibited by nitric oxide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450 (2014) 750–754. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.06.040>.
- [170] E. Antolini, F. Colmati, E.R. Gonzalez, Ethanol oxidation on carbon supported (PtSn)alloy/SnO<sub>2</sub> and (PtSnPd)alloy/SnO<sub>2</sub> catalysts with a fixed Pt/SnO<sub>2</sub> atomic ratio: Effect of the alloy phase characteristics, *J. Power Sources.* 193 (2009) 555–561. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2009.04.039>.
- [171] Y. Liu, P. Hu, M. Wei, C. Wang, Electrocatalytic Study of Ethylene Glycol Oxidation on Pt 3 Sn Alloy Nanoparticles, *ChemElectroChem.* 6 (2019) 1004–1008. <https://doi.org/10.1002/celec.201801616>.
- [172] J.M. Sieben, M.M.E. Duarte, Nanostructured Pt and Pt–Sn catalysts supported on oxidized carbon nanotubes for ethanol and ethylene glycol electro-oxidation, *Int. J. Hydrogen Energy.* 36 (2011) 3313–3321. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.12.020>.
- [173] F. Colmati, E. Antolini, E.R. Gonzalez, Effect of temperature on the mechanism of ethanol oxidation on carbon supported Pt, PtRu and Pt<sub>3</sub>Sn electrocatalysts, *J. Power Sources.* 157 (2006) 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2005.07.087>.
- [174] M. Watanabe, S. Motoo, Electrocatalysis by ad-atoms. Part II. Enhancement of the oxidation of methanol on platinum by ruthenium ad-atoms, *J. Electroanal. Chem.* 60 (1975) 267–273. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(75\)80261-0](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(75)80261-0).
- [175] S. Luo, W. Chen, Y. Cheng, X. Song, Q. Wu, L. Li, X. Wu, T. Wu, M. Li, Q. Yang, K. Deng, Z. Quan, Trimetallic Synergy in Intermetallic PtSnBi Nanoplates Boosts Formic Acid Oxidation, *Adv. Mater.* 31 (2019) 1903683. <https://doi.org/10.1002/adma.201903683>.
- [176] S. Stevanović, D. Tripković, V. Tripković, D. Minić, A. Gavrilović, A. Tripković, V.M. Jovanović, Insight into the Effect of Sn on CO and Formic Acid Oxidation

- at PtSn Catalysts, *J. Phys. Chem. C*. 118 (2014) 278–289.  
<https://doi.org/10.1021/jp408207u>.
- [177] R.G. Da Silva, A. Rodrigues de Andrade, K. Servat, C. Morais, T.W. Napporn, K.B. Kokoh, Insight into the Electrooxidation Mechanism of Ethylene Glycol on Palladium-Based Nanocatalysts: In Situ FTIRS and LC-MS Analysis, *ChemElectroChem*. 7 (2020) 4326–4335.  
<https://doi.org/10.1002/celec.202001019>.
- [178] L. Demarconnay, S. Brimaud, C. Coutanceau, J.-M. Léger, Ethylene glycol electrooxidation in alkaline medium at multi-metallic Pt based catalysts, *J. Electroanal. Chem.* 601 (2007) 169–180.  
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2006.11.006>.
- [179] L. Zhang, L. Bai, M. Xu, L. Han, S. Dong, High performance ethanol/air biofuel cells with both the visible-light driven anode and cathode, *Nano Energy*. 11 (2015) 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2014.10.020>.
- [180] S. Aquino Neto, T.S. Almeida, D.M. Belnap, S.D. Minter, A.R. De Andrade, Enhanced Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide electrocatalysis onto multi-walled carbon nanotubes-decorated gold nanoparticles and their use in hybrid biofuel cell, *J. Power Sources*. 273 (2015) 1065–1072.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2014.09.074>.
- [181] C.S. Bonfin, J.H. Franco, A.R. de Andrade, Ethanol bioelectrooxidation in a robust poly(methylene green-pyrrole)- mediated enzymatic biofuel cell, *J. Electroanal. Chem.* 844 (2019) 43–48.  
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.04.075>.
- [182] S. Topcagic, S.D. Minter, Development of a membraneless ethanol/oxygen biofuel cell, *Electrochim. Acta*. 51 (2006) 2168–2172.  
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2005.03.090>.
- [183] J.E. Nutting, M. Rafiee, S.S. Stahl, Tetramethylpiperidine N -Oxyl (TEMPO), Phthalimide N -Oxyl (PINO), and Related N -Oxyl Species: Electrochemical Properties and Their Use in Electrocatalytic Reactions, *Chem. Rev.* 118 (2018) 4834–4885. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00763>.

## 5. APÊNDICES

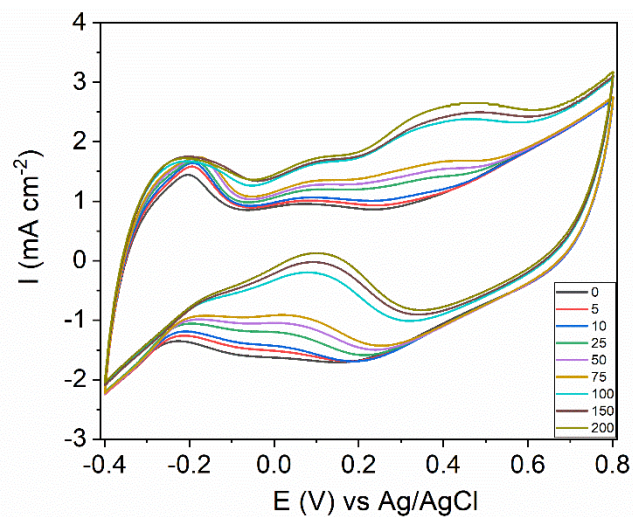
### APÊNDICE A - Material suplementar da análise do sistema MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>.

**Figura A1:** Curvas voltamétricas em diferentes concentrações de EG com eletrodos modificados por MWCNTs-Pt. ES= tampão fosfato-citrato 150 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,5,  $\nu = 30 \text{ mV s}^{-1}$ .



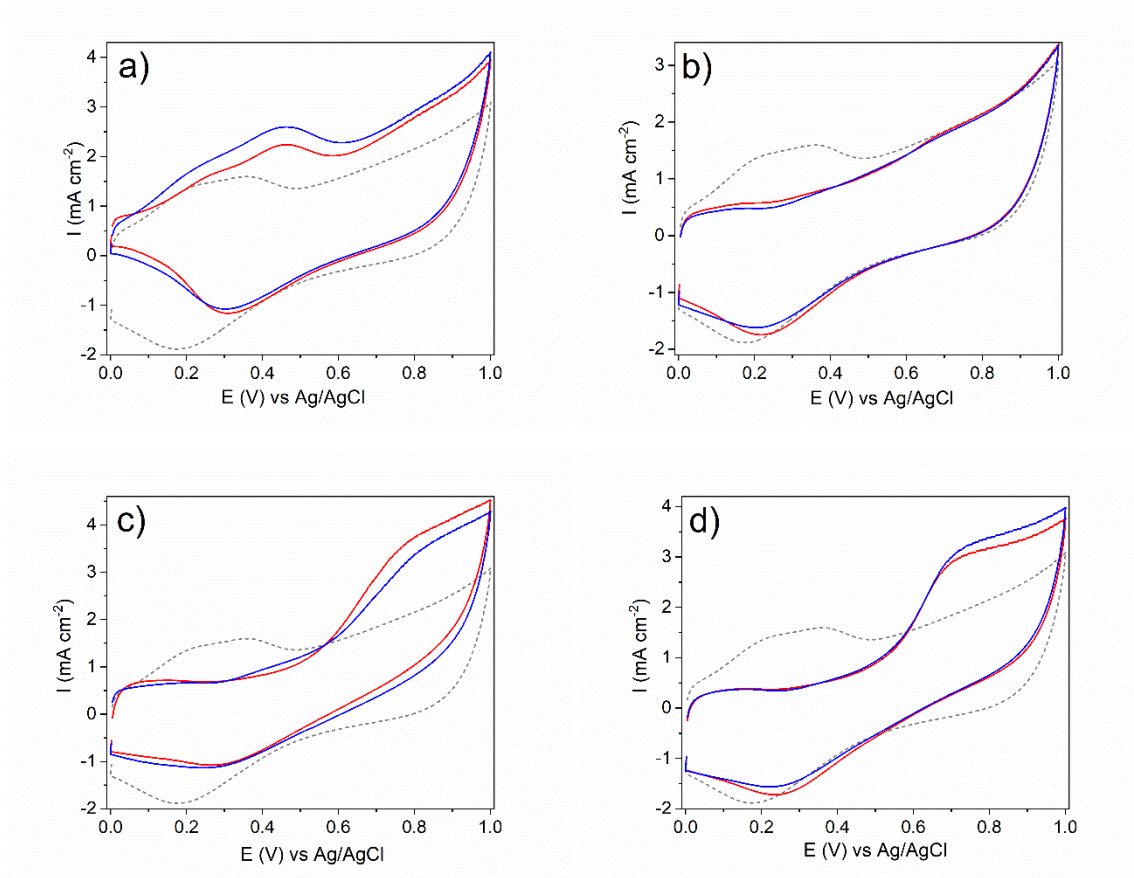
**Fonte:** autoria própria.

**Figura A2:** Curvas voltamétricas em diferentes concentrações de EG com eletrodos modificados por MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>. ES= tampão fosfato-citrato 150 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,5,  $\nu = 30 \text{ mV s}^{-1}$ .



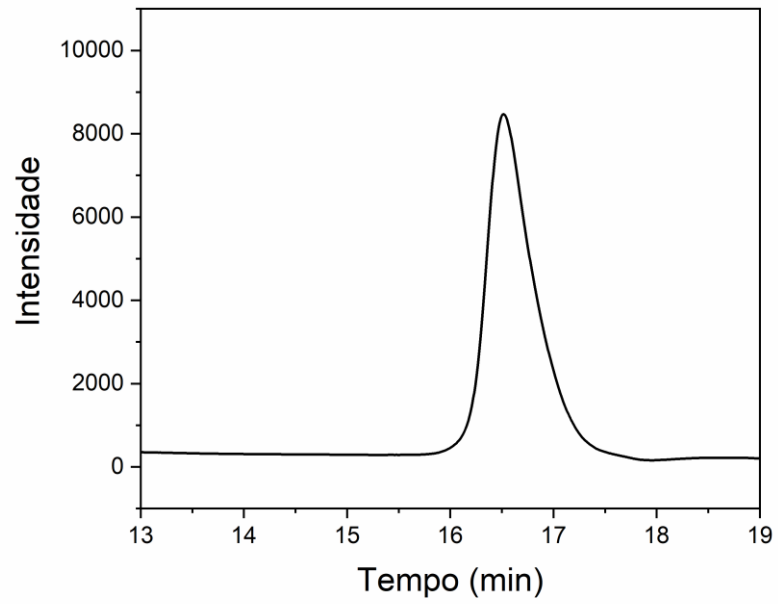
**Fonte:** autoria própria.

**Figura A3:** Curvas voltamétricas do sistema MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> (linha vermelha), MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub> (linha azul) e ES (linha pontilhada cinza) com os subprodutos (20 mmol L<sup>-1</sup>) de oxidação do EG. a) Glicualdeído; b) Ácido glicólico; c) Ácido glioxílico; d) Ácido oxálico. ES= tampão fosfato-citrato 150 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,5,  $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$ ; [OxOx]=0,03 U mL<sup>-1</sup>.



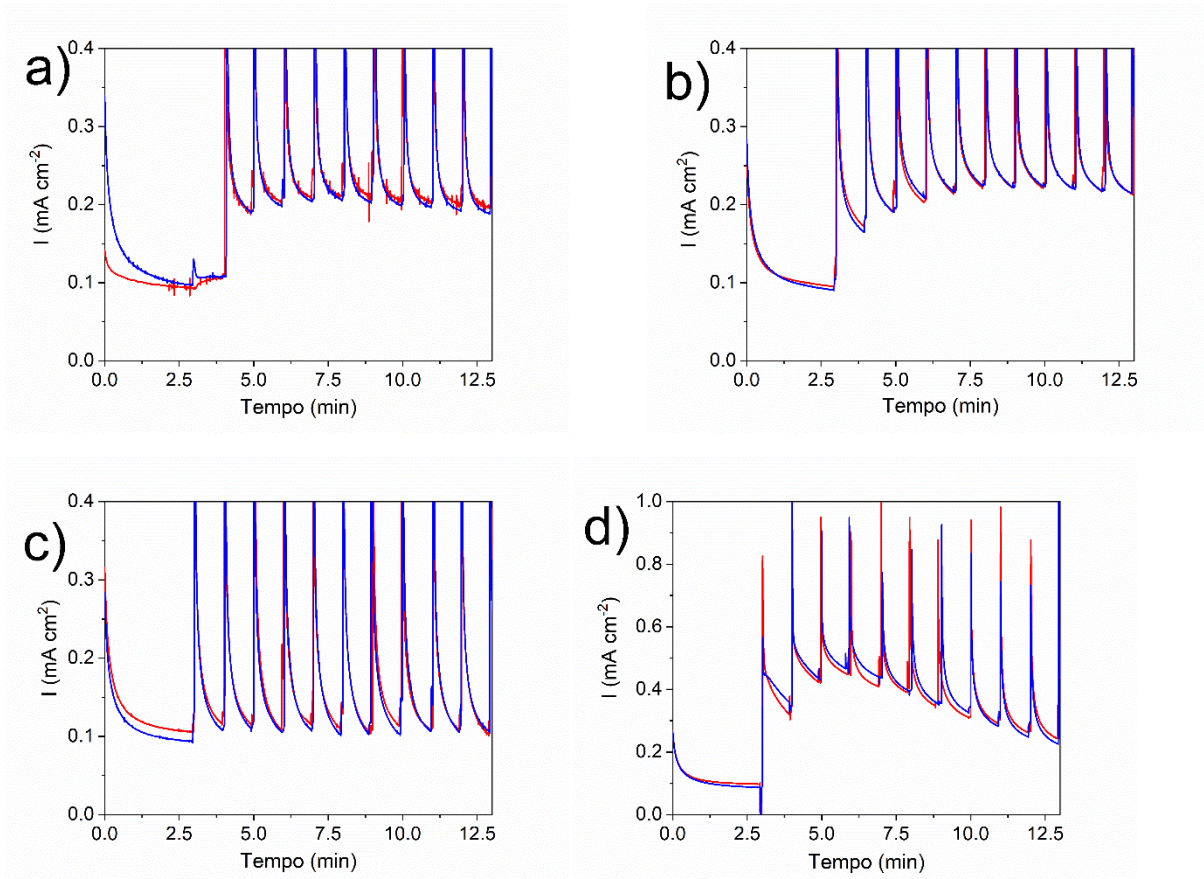
Fonte: autoria própria.

**Figura A4:** Cromatograma (detector RID) de 0h de EG ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) antes da eletrólise com MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>. Coluna Aminex® HPX-87H (300x7,8 mm), fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,33 mM e temperatura 45°C. ES= tampão fosfato-citrato  $150 \text{ mmol L}^{-1}$ .



## APÊNDICE B - Material suplementar da análise do sistema TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx

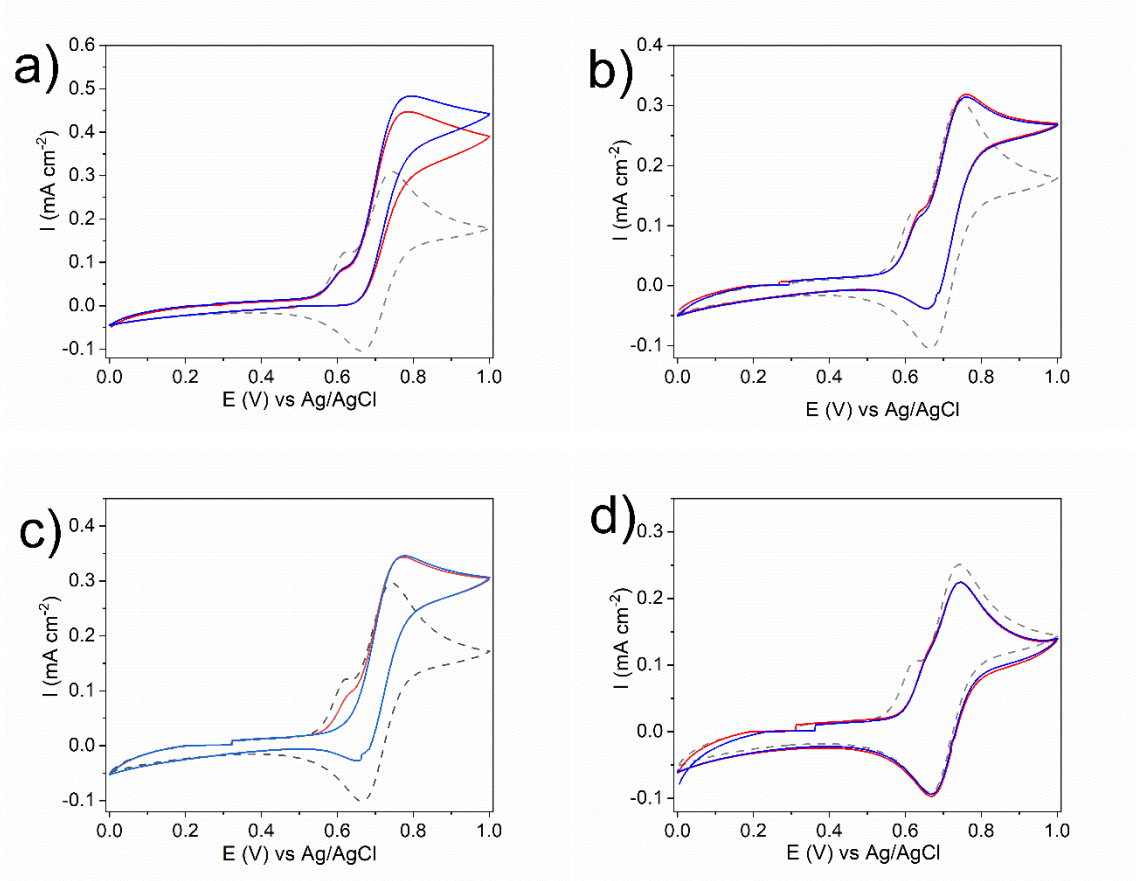
**Figura A5:** Ensaios cronoamperométricos realizados na presença de TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx (linha azul) e TEMPO-NH<sub>2</sub> (linha vermelha). Adições sucessivas de 4 mmol L<sup>-1</sup> ácido glicólico (a), ácido glioxílico (b), ácido oxálico (c) e ácido fórmico (d) em um potencial de oxidação fixo (0,750 V vs Ag/AgCl). ES= tampão fosfato-citrato 150 mmol L<sup>-1</sup>, [TEMPO-NH<sub>2</sub>]= 5 mmol L<sup>-1</sup>, [OxOx] = 0,03 U mL<sup>-1</sup>.



Fonte: autoria própria.



**Figura A6** - Curvas voltamétricas do sistema TEMPO-NH<sub>2</sub> (linha vermelha), TEMPO-NH<sub>2</sub>+OxOx (linha azul) e ES (linha pontilhada cinza) com os subprodutos (20 mmol L<sup>-1</sup>) de oxidação do EG. a) Glicualdeído; b) Ácido glicólico; c) Ácido glioxílico; d) Ácido oxálico. ES= tampão fosfato-citrato 150 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,5,  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ ; [TEMPO-NH<sub>2</sub>]= 5 mmol L<sup>-1</sup>; [OxOx]=0,03 U mL<sup>-1</sup>.



Fonte: autoria própria.

## APÊNDICE C – Divulgação científica oriunda da dissertação

### - Apresentação em congressos:

**Nome do evento:** 71st Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry.

**Período:** 31 de agosto a 4 de setembro de 2020. **Local do evento:** Online.

Foi apresentado de forma oral pela Professora Dra. Adalgisa Rodrigues de Andrade um trabalho derivado dos meus resultados do mestrado "Enhanced of ethylene glycol electrooxidation by hybrid catalytic systems" (autores: Jesimiel G. R. Antônio, Sidney A. Neto, Maria de Lourdes T. M. Polizeli, Shelly D. Minter, Jefferson H. Franco, Adalgisa R. de Andrade)

**Nome do evento:** 239th Electrochemical Society Meeting, realizada de forma virtual, USA,

**Período:** 30 de maio a 3 de junho de 2021. **Local do evento:** Online

Foi apresentado pela Professora Dra. Adalgisa Rodrigues de Andrade uma palestra, qual teve parte dos resultados deste mestrado apresentado. Trabalho "Hybrid Electrocatalysts for Bioelectrooxidation of Small Alcohols: Ethanol and Ethylene Glycol" (autores: Jefferson Honorio Franco, Jesimiel G. Rodrigues Rodrigues Antônio, Shelley Minter, Paula Z. Almeida, Maria Lourdes T. Moraes Polizeli e Adalgisa Rodrigues De Andrade).

### - Trabalho (poster) aceito para congressos futuro:

**Nome do evento:** XXIII SIBEE - Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica

**Período:** 24 a 26 de novembro de 2021 **Local do evento:** Online

**Trabalho:** Oxidação completa do etilenoglicol em um sistema híbrido (autores: Jesimiel G. R. Antonio, Jefferson H. Franco, Paula Z. Almeida, Maria L. T. M. Polizeli, Adalgisa R. De Andrade).

### - Artigo publicado:

**Título:** Carbon nanotube PtSn nanoparticles for enhanced complete biocatalytic oxidation of ethylene glycol in biofuel cells (autores: J. G. R. Antonio, J. Honorio Franco, P. Z. Almeida, T. S. Almeida, M. L. T. M. Polizeli, S. D. Minter, A. R. De Andrade)

**Revista:** ACS Materials Au

### - Artigo em processo de escrita:

**Título:** Evaluation of TEMPO-NH<sub>2</sub> and oxalate oxidase enzyme for complete oxidation of ethylene glycol (autores: Jesimiel G. R. Antonio, Jefferson H. Franco, Paula Z. Almeida, Maria L. T. M. Polizeli, Adalgisa R. De Andrade).

**Revista:** ChemElectroChem



## APÊNDICE D – Trabalhos futuros

O presente trabalho gera algumas possibilidades de estudos futuros:

- Estudos computacionais para entender o aumento da atividade do TEMPO-NH<sub>2</sub> na presença da OxOx;
- Imobilização do catalisador TEMPO ou derivado em conjunto com a OxOx. Durante este mestrado foi tentado utilizar o sistema TEMPO-LPEI+OxOx imobilizado sobre o eletrodo, de forma semelhante a relatada por *Franco et al* [65]. Entretanto, o sistema demonstrou ser instável na presença de etilenoglicol, sendo assim descontinuado do estudo;
- Imobilização da OxOx sobre o MWCNTs-Pt<sub>65</sub>Sn<sub>35</sub>;
- Troca da OxOx pela OxDc, que demonstrou resultados promissores na literatura para etanol [68], glicerol [63] e lactato [77], em sistemas híbridos orgânicos.