



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>*

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.

110 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. 110 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 1,2 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 (FA), ácido glicólico (GA), 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. 110 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 1.2 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.

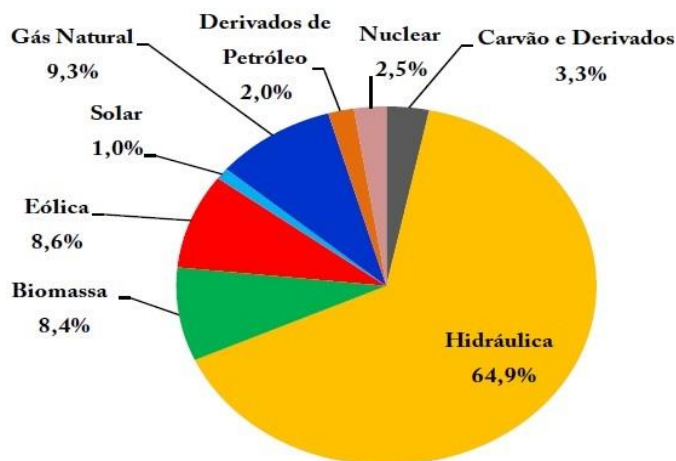
# 1. INTRODUÇÃO

## 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 metas de desenvolvimento sustentável para 2030. Dentre elas, a demanda de uma energia limpa acessível [4]. Entretanto, 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 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.

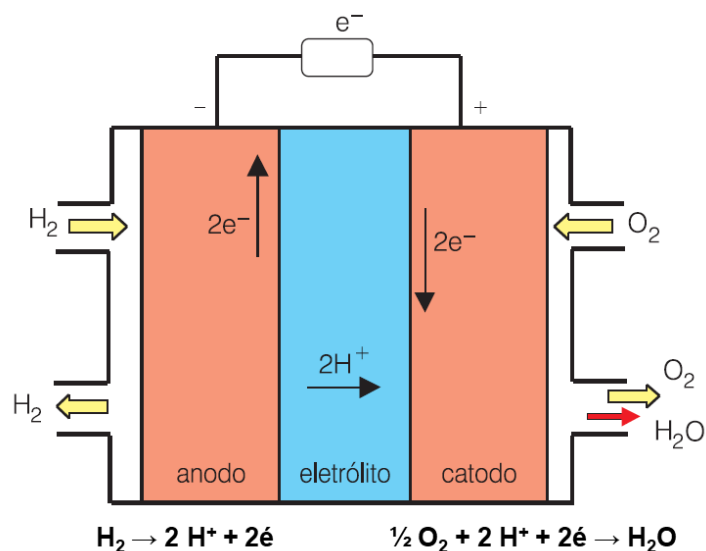


**Fonte:** adaptado de Balanço energético 2020 [11].

Dentre estas fontes alternativas, uma que ainda não tem o seu potencial completamente explorado, são as células a combustíveis. 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].

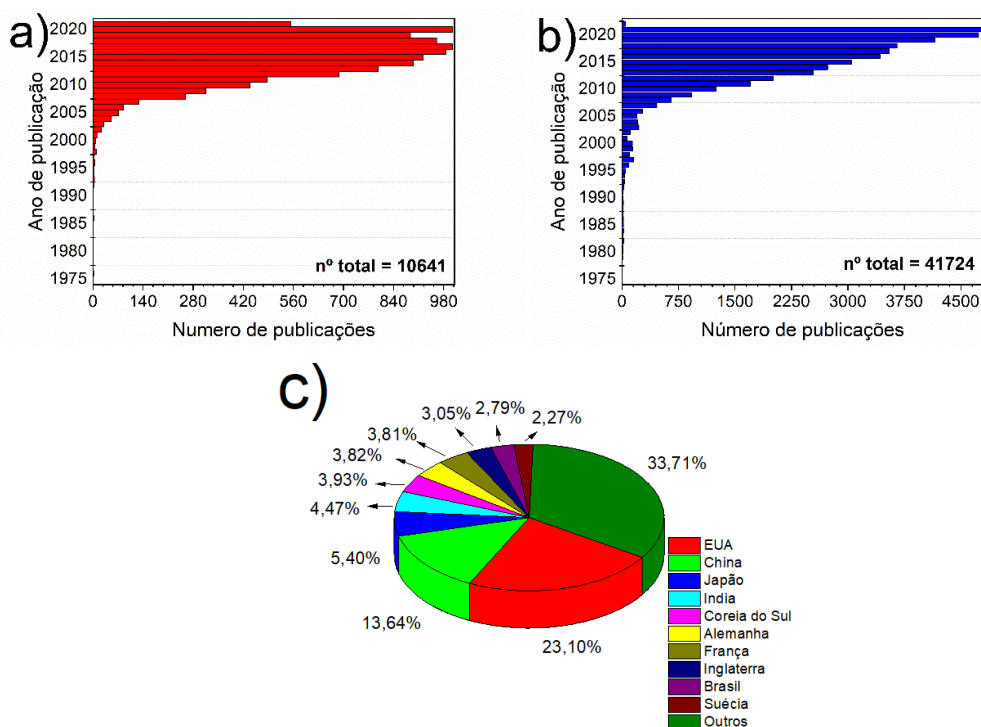
## 1.2. BIOCÉLULAS A COMBUSTÍVEL

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 [31], relógios [32] e marca passo [33].

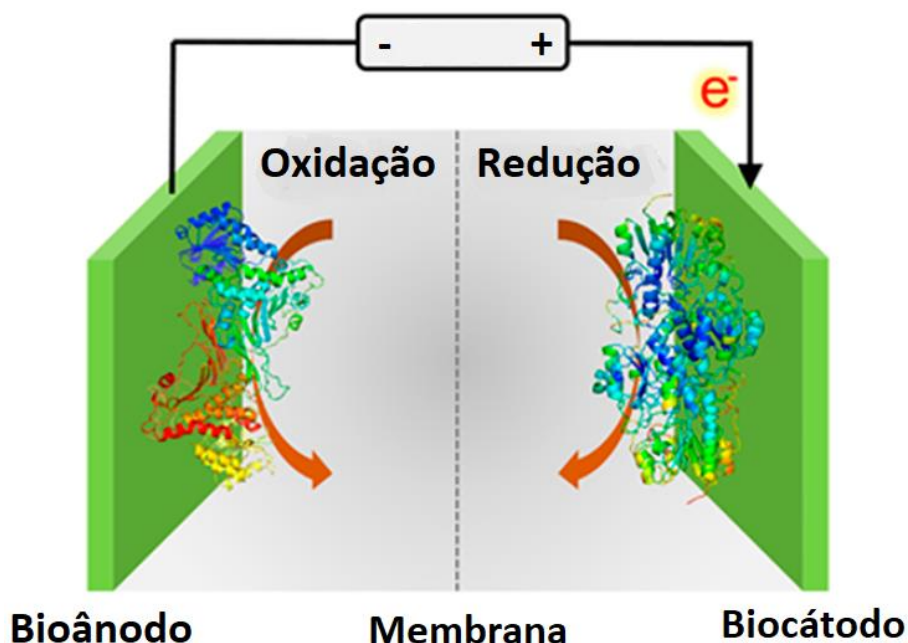
Além das possíveis aplicações práticas das biocélulas, as pesquisas são impulsionadas pelas vantagens delas frente as células a combustíveis tradicionais. Os catalisadores utilizados são renováveis (enzimas ou micro-organismos), ou seja, podem ser facilmente produzidos, não sendo necessário depender 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 eletrocatalizador 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][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 conduções 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 gluteraldeído (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> nos pHs 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 (V)</b>	<b>Potência (<math>\mu\text{A cm}^{-2}</math>)</b>	<b><math>I_{\text{max}}</math> (<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- LPEI/OxDc</b>	Glicerol	*	*	1300	[64]
<b>MG/MWCNTs/TEMPO- LPEI/ADH+AldDH+NAD<sup>+</sup></b>	Etanol	0.649	378,2	1087	[62]
<b>MWCNT-COOH/TEMPO- LPEI/OxOx</b>	Etanol	0.492	302,5	821,1	[65]
<b>MWCNT-COOH/Pireno- 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]

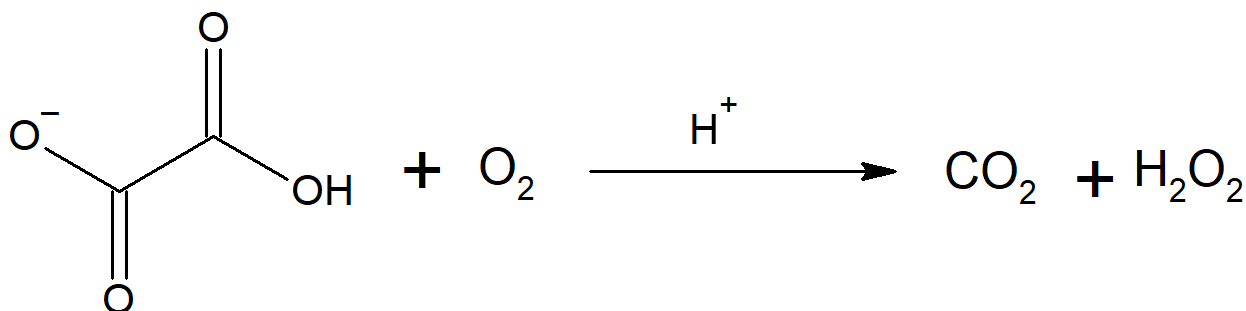
\*valor não relatado

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> reduzido 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].

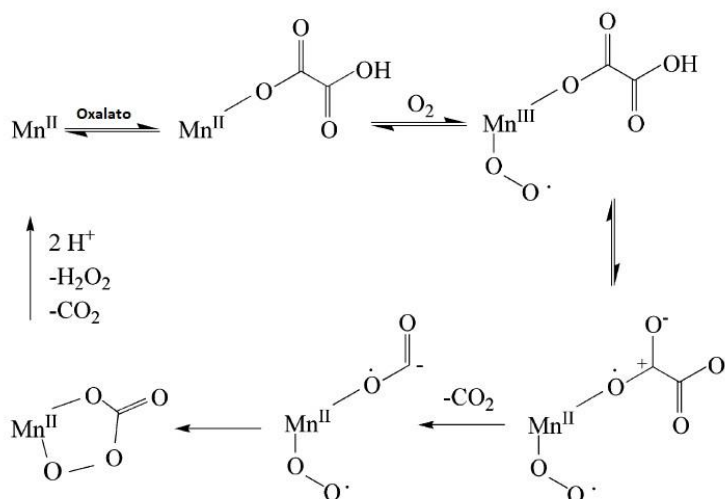
A OxOx de *Ceriporiopsis subvermispora* foi primeiramente identificada por *Aguilar et al.* [75]. Neste fungo, basidiomiceto ligninolítico, é proposto que a OxOx é transportada para o espaço periplasmático, no qual ela oxida o ácido oxálico liberado durante o crescimento do fungo, com o objetivo de prover 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 CO<sub>2</sub> 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 Mn(II), seguido da oxidação para 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][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. CATALIZADOR TEMPO E SEUS DERIVADOS**

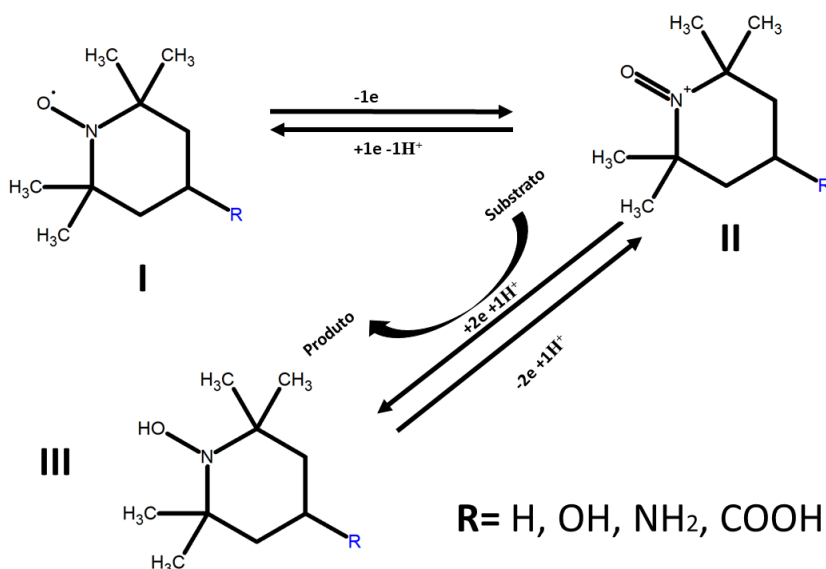
Muitas das enzimas utilizadas nos estudos de desenvolvimento de biocélulas são limitadas pela sua estabilidade, elevada especificidade do substrato e diferentes condições operacionais (pH, temperatura e eletrólitos). Por outro lado, catalisadores orgânicos, tais como *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (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 oxidação seletiva é uma grande vantagem, pois os

métodos tradicionais utilizam reagentes tóxicos ou que geram resíduos tóxicos, como os métodos baseados em crômio, dióxido de manganês, dimetil sulfoxido, 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



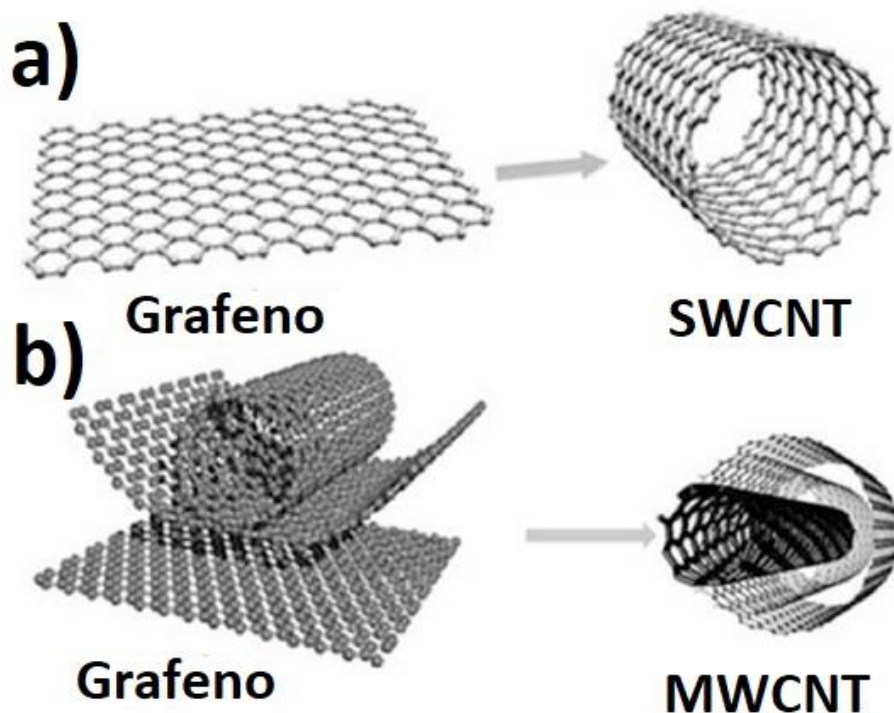
ligações C-C aliada aos catalisadores orgânicos. Tem-se como exemplos os trabalhos desenvolvidos por *Franco et al.* [68,77] e *Hickey et al.* [66] que aplicaram o TEMPO-NH<sub>2</sub> em conjunto com a OxOx para obter a oxidação completa do etanol, lactato e glicerol.

## **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 Iijima 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].

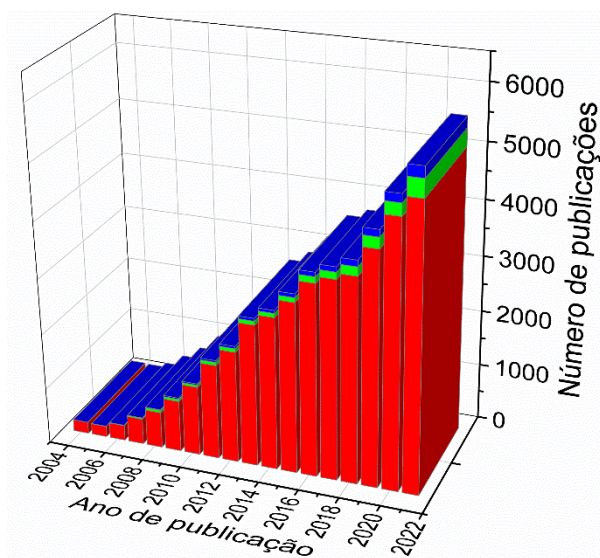
Os MWCNTs possuem aplicações em diversas áreas, na eletroquímica se destacam a sua utilização em: sensores [129,130], capacitores [131,132], baterias [133,134], células a combustíveis [135,136], biocélulas a combustíveis microbianas

[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 ( $78,2 \text{ }^\circ\text{C}$ ). 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 [157]. 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.

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. 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 GOA, para fornecer FA 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 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. Akhairi, 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/acami.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 Poulpiquet, 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. Minter, 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. Minter, 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/celc.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 subvermispora*, *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 subvermispora* 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 subvermispora*: 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. Winstrand, 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. Minteer, 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. Minteer, 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] 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>.
- [158] U. Manual, pPIC6 A , B , and C Pichia expression vectors for selection on blasticidin and purification of ii, *In Vitro.* (2010).
- [159] 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>.
- [160] 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).
- [161] 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>.
- [162] 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>.
- [163] 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, Carbon nanotube PtSn nanoparticles for enhanced complete biocatalytic oxidation of ethylene glycol in biofuel cells, *ACS Mater. Au.* (n.d.).
- [164] 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>.
- [165] E.W. Moomaw, R. Uberto, C. Tu, Membrane inlet mass spectrometry reveals



- that Ceriporiopsis subvermispora 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>.
- [166] 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>.
- [167] Y. Liu, P. Hu, M. Wei, C. Wang, Electrocatalytic Study of Ethylene Glycol Oxidation on Pt<sub>3</sub>Sn Alloy Nanoparticles, *ChemElectroChem.* 6 (2019) 1004–1008. <https://doi.org/10.1002/celec.201801616>.
- [168] 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>.
- [169] 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>.
- [170] 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).
- [171] 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>.
- [172] 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>.
- [173] 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>.

- [174] 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>.
- [175] S. Aquino Neto, T.S. Almeida, D.M. Belnap, S.D. Minteer, 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>.
- [176] 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>.
- [177] S. Topcagic, S.D. Minteer, Development of a membraneless ethanol/oxygen biofuel cell, *Electrochim. Acta*. 51 (2006) 2168–2172. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2005.03.090>.
- [178] 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>.