



Desenvolvimento de uma célula de combustível enzimática de glicose/O₂ baseada em papel

RICARDO JORGE FRAGA PINTO

outubro de 2024

Desenvolvimento de uma célula de combustível enzimática de glicose/O₂ baseada em papel

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biorrecursos

Ricardo Jorge Fraga Pinto

Orientadora: Simone Morais (REQUIMTE-LAQV, Instituto Superior de Engenharia)

Coorientador: Álvaro Torrinha (REQUIMTE-LAQV, Instituto Superior de Engenharia)

Este estudo recebeu apoio dos projetos NATURIST 2022. 07089.PTDC (doi: 10.54499/2022.07089.PTDC) e PaperSenseMIP PTDC/QUI-QAN/3899/2021 (doi: 10.54499/PTDC/QUI-QAN/3899/2021) da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (MCTES) através de fundos nacionais.

Resumo

A crescente preocupação com as mudanças climáticas e a necessidade de reduzir as emissões de gases com efeito de estufa têm aumentado a procura por soluções energéticas mais limpas e sustentáveis, assim como a utilização de materiais mais amigos do ambiente e reutilizáveis. Neste contexto, a presente dissertação propõe o desenvolvimento de uma célula de biocombustível enzimática de glicose/ O_2 (EBFC), utilizando papel como substrato para os eletrodos, minimizando e reduzindo o uso de material, com o intuito de aumentar a sustentabilidade ambiental no fabrico de dispositivos analíticos. A EBFC é composta por dois bioeletrodos, com imobilização das enzimas glicose desidrogenase (bioânodo) e bilirrubina oxidase (biocátodo).

A seleção do nanomaterial adequado para a construção dos eletrodos foi realizada utilizando voltametria cíclica (CV), uma técnica eletroquímica que permite comparar a eficiência de diferentes nanomateriais em termos de transferência eletrónica e atividade de oxidação-redução. Foram testados dois nanomateriais de carbono (carbono mesoporoso e negro de fumo), bem como dois solventes diferentes na sua dispersão, nomeadamente N,N-dimetilformamida (DMF) e dodecil sulfato de sódio (SDS) tendo-se verificado que o carbono mesoporoso, dispersado em DMF, apresentou o melhor desempenho, sendo então selecionado para a construção dos biossensores. Este material demonstrou uma capacidade superior de imobilização de enzimas, facilitando a transferência direta de eletrões e aumentando a eficiência dos processos redox.

Os bioeletrodos desenvolvidos com base neste nanomaterial foram inicialmente caracterizados como biossensores para os seus substratos (glicose e O_2) usando as técnicas CV e amperometria. No caso do biossensor de glicose, foram alcançados resultado com uma sensibilidade de 3,33 $\mu A/mM$ e um limite de deteção (LOD) de 0,049 mM. Já no biossensor de oxigénio, obteve-se uma sensibilidade de 32,54 $\mu A/mM$, com um LOD de 0,002 mM.

A célula de combustível enzimática glicose/ O_2 foi então construída usando o bioeletrodo papel(MC)/GDH, como ânodo, e bioeletrodo papel(MC)/BOx, como cátodo. As curvas de polarização da célula de combustível permitiram analisar o seu desempenho energético. A

potência máxima gerada pela célula foi de 0,13 μ W na presença de glicose, um valor baixo, mas suficiente para aplicações em biossensores de baixo consumo energético.

Apesar da potência gerada ser relativamente baixa, a EBFC desenvolvida demonstra um elevado potencial para ser utilizada como um biossensor autossuficiente na determinação de glicose, especialmente em dispositivos biomédicos portáteis. Esta tecnologia inovadora representa um passo importante na criação de soluções sustentáveis e ecológicas para a monitorização de saúde, alinhando-se com as exigências atuais de energias renováveis e dispositivos autossustentáveis.

Palavras-chave: Célula de combustível; Biossensor auto-alimentado; Enzimas; Glicose; Eléttodos de papel

Abstract

The growing concern about climate change and the need to reduce greenhouse gas emissions have increased the search for cleaner and more sustainable energy solutions, as well as the use of more environmentally friendly and reusable materials. In this context, this dissertation proposes the development of a glucose/O₂ enzymatic biofuel cell (EBFC), using paper as a substrate for the electrodes, minimizing and reducing the use of material with the aim of increasing environmental sustainability in the manufacture of analytical devices. The EBFC was composed of two paper bioelectrodes, with immobilization of the enzymes glucose dehydrogenase (bioanode) and bilirubin oxidase (biocathode).

The selection of the appropriate nanomaterial for the construction of the electrodes was carried out using cyclic voltammetry (CV), an electrochemical technique that allows the efficiency of different nanomaterials to be compared in terms of electron transfer and redox activity. Two carbon nanomaterials were tested (mesoporous carbon and carbon black), as well as two different solvents in their dispersion, namely N,N-dimethylformamide (DMF) and sodium dodecyl sulfate (SDS), and it was found that mesoporous carbon, dispersed in DMF, showed the best performance and was therefore selected for the construction of the biosensors. This material showed a superior capacity for immobilizing enzymes, facilitating the direct transfer of electrons and increasing the efficiency of redox processes.

The bioelectrodes developed based on this nanomaterial were initially characterized as biosensors for their substrates (glucose and O₂) using CV and amperometric techniques. In the case of the glucose biosensor, results were obtained with a sensitivity of 3.33 μA/mM and a limit of detection (LOD) of 0.049 mM. For the oxygen biosensor, a sensitivity of 32.54 μA/mM was obtained, with an LOD of 0.002 mM.

The glucose/O₂ enzymatic fuel cell was then constructed using the paper(MC)/GDH bioelectrode as the anode and the paper(MC)/BOx bioelectrode as the cathode. The polarization curves of the fuel cell allowed its energy performance to be analyzed. The maximum power generated by the cell was 0.13 μW in the presence of glucose, a low value, but sufficient for applications in low-energy biosensors.

Although the power generated is relatively low, the EBFC developed has a high potential to be used as a self-sufficient biosensor for glucose determination, especially in portable biomedical devices. This innovative technology represents an important step in the creation of sustainable and ecological solutions for health monitoring, in line with current demands for renewable energies and self-sustaining devices.

Keywords: Fuel cell; Self-powered biosensor; Enzymes; Glucose; Paper electrodes

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos os que me apoiaram e orientaram durante todo o meu percurso acadêmico, proporcionando a conclusão de uma nova etapa da vida.

Aos meus orientadores, Álvaro Torrinha e Simone Moraes, por me terem sido cruciais no apoio e ajuda, que fez com que fosse possível a realização deste trabalho.

Aos meus amigos e familiares que sempre estiveram presentes e me apoiaram durante toda a minha vida pessoal e acadêmica, proporcionando um bom estado psicológico.

A todos vocês, os meus sinceros agradecimentos.

Índice

1	Revisão da Literatura	1
1.1	Tecnologia e Padrões de Consumo Energético	1
1.2	Células de Combustível.....	2
1.3	Células de combustível biológicas	3
1.3.1	Células de biocombustível enzimáticas	4
1.3.2	Enzimas nas células de biocombustível	7
1.3.3	Estratégias para a Imobilização de Enzimas	8
1.3.4	(Nano)materiais de carbono	9
1.4	Eletroquímica	11
1.4.1	Voltametria cíclica.....	12
1.4.2	Amperometria	14
2	Objetivos	15
3	Materiais e métodos	16
3.1	Reagentes, materiais, soluções	16
3.2	Preparação de bioelétrodos	17
3.2.1	Fabrico do bioelétrodo BOx.....	17
3.2.2	Fabrico do bioelétrodo GDH	18
3.2.3	Fabrico da célula de combustível enzimática.....	18
4	Resultados e discussão	19
4.1	Construção e otimização dos sensores em papel	19
4.2	Caracterização do bioelétrodo BOx como biossensor de oxigénio	20
4.3	Caracterização dos bioelétrodos GDH como biossensores de glicose	22
4.4	Montagem e caraterização da célula de combustível enzimática glicose/O ₂	25
5	Conclusões	28
	Bibliografia	30
	Anexos	34

Lista de Figuras

Fig. 1 - Quotas de produção global de eletricidade ao longo dos anos	1
Fig. 2 – Esquema da célula de combustível de hidrogénio.	3
Fig. 3 – Esquema de uma EBFC de segunda geração	5
Fig. 4 – Estratégias de Imobilização de Enzimas	8
Fig. 5 – Exemplo de um voltamograma de uma espécie redox	12
Fig. 6 - Eléttodos de papel preparados com carbono mesoporoso e negro de fumo (esquerda) e esquema indicando as dimensões da área eletroativa (direita).	17
Fig. 7 - Voltamogramas cíclicos dos eléctrodos de papel feitos com MC em DMF em SDS e CB em SDS e DMF obtidos em 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ e 0,1 M KCl . Velocidade de varrimento: 50 mV/s	19
Fig. 8 – Voltamograma cíclico do bioeléttrodo BOx na presença e ausência de O_2 em tampão PBS 0,1 M, pH 7. Velocidade de varrimento: 10 mV/s.....	20
Fig. 9 – Amperometria do bioeléttrodo Box realizada a 0 V em tampão PBS 0,1 M, pH 7.	21
Fig. 10 – Curva de calibração do bioeléttrodo BOx.....	22
Fig. 11 – Voltamogramas cíclicos do bioeléttrodo GDH na presença e ausência de glicose em tampão PBS 0,1 M pH 7. Velocidade de varrimento: 10 mV/s.	23
Fig. 12 – Amperometria do bioeléttrodo GDH realizada a 0,5 V em tampão PBS 0,1 M pH 7....	24
Fig. 13 – Curva de calibração do bioeléttrodo GDH	25
Fig. 14 – Curvas de polarização da BFC na presença e ausência de glicose em tampão PBS 0,1 M pH 7 (com ar dissolvido)	26
Fig. 15 – Curvas de potência da BFC na presença e ausência de glicose em tampão PBS 0,1 M pH 7 (com ar dissolvido).....	27

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Comparação dos picos voltamétricos de oxidação e redução para MC e CB em diferentes meios dispersivos.....	20
Tabela A1 – Intensidade de corrente consoante os níveis de concentração de O ₂	34

Abreviaturas

IEA - Agência Internacional de Energia

BFCs - Células de combustível biológicas (biofuel cells)

EBFCs - Células de biocombustível enzimáticas

GOx - Glicose oxidase

GDH - Glicose dehidrogenase

LbL - Layer-by-Layer

CNTs - Nanotubos de carbono

CB - Negro de fumo (carbon black)

MC - Carbono mesoporoso (mesoporous carbon)

VC - Voltametria cíclica

DMF - N,N-dimetilformamida

SDS - Dodecilsulfato de sódio

PBSE - Éster succinimidílico do ácido pireno-butanóico

PBS - Solução tampão de fosfato

LOD - Limite de detecção (limit of detection)

OCP - Potencial de circuito aberto (open circuit potential)

1 Revisão da Literatura

1.1 Tecnologia e Padrões de Consumo Energético

O consumo mundial de energia aumentou significativamente nas últimas décadas, devido ao crescimento populacional e ao desenvolvimento de novas economias. Historicamente, os combustíveis fósseis (petróleo, gás natural e carvão) dominaram a matriz energética mundial devido à sua disponibilidade e composição. No entanto, a dependência de combustíveis fósseis tem consequências ambientais significativas, incluindo emissões de gases com efeito de estufa, poluição atmosférica e alterações climáticas graves, com consequências diretas para a saúde das pessoas e do ecossistema [1].

A transição para novas fontes de energia tornou-se uma prioridade mundial em resposta a estes problemas. Fontes como a energia solar, eólica e hídrica, bem como novas tecnologias, como células de combustível, são amplamente estudadas e implementadas em diferentes regiões. De acordo com a Agência Internacional de Energia (IEA), em 2023, as energias renováveis representaram mais de um terço da produção de energia mundial, e há uma tendência crescente em direção à descarbonização das economias, como representado na Fig. 1 [2].

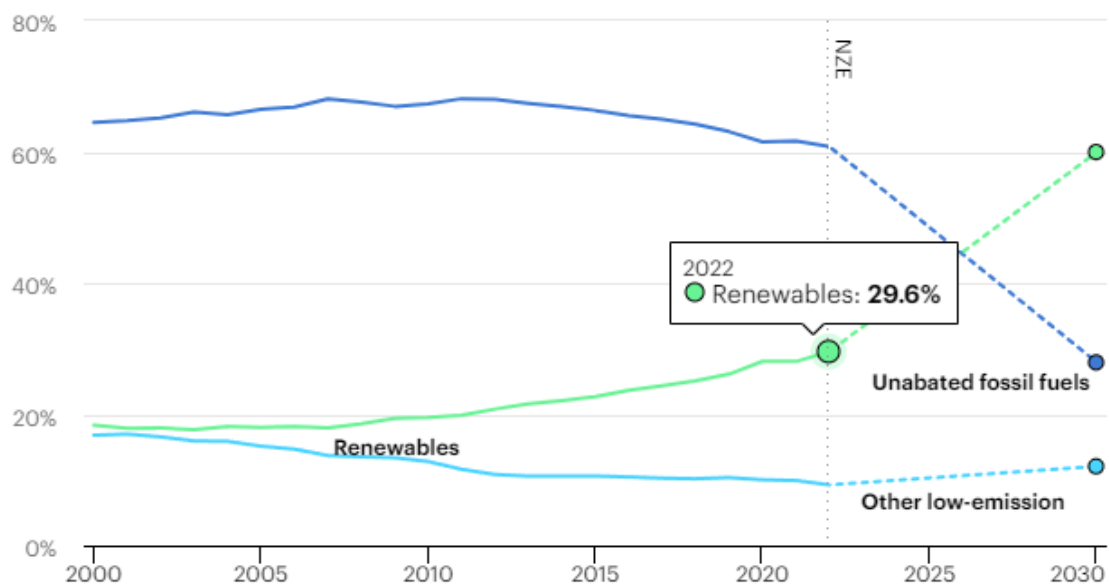


Fig. 1 - Quotas de produção global de eletricidade ao longo dos anos [2].

Neste contexto, as células de combustível surgem como uma boa opção, especialmente pela sua capacidade de produzir energia limpa a partir de combustíveis mais acessíveis e menos poluentes, sendo assim uma alternativa ambientalmente sustentável aos sistemas de conversão de energia tradicionais.

1.2 Células de Combustível

As células de combustível são dispositivos eletroquímicos que convertem diretamente a energia química de um combustível em energia elétrica através de reações redox. Estas apresentam muitas vantagens em relação aos métodos tradicionais de produção de energia. Uma das vantagens é a sua elevada eficiência, especialmente em sistemas de aquecimento e eletricidade. Ao contrário das centrais elétricas convencionais, que sofrem grandes perdas de energia sob a forma de calor, as células de combustível convertem diretamente a energia química em energia elétrica, resultando em menos desperdício [3].

Outra vantagem importante é o facto de que as células de combustível funcionarem de forma silenciosa e sem emissões de gases poluentes, quando utilizam, por exemplo, hidrogénio como combustível. Isto torna estas células ideais para uma variedade de aplicações, desde transporte limpo até sistemas de armazenamento de energia em cidades, onde a poluição sonora e a qualidade do ar são um problema [4] [5].

No entanto, existem desafios significativos associados à implementação em larga escala das células de combustível, especialmente as de hidrogénio. O custo elevado dos materiais, particularmente dos catalisadores de platina, representa um grande obstáculo à comercialização. Além disso, a infraestrutura necessária para a produção, armazenamento e distribuição de hidrogénio ainda está em desenvolvimento, o que limita a acessibilidade e a conveniência do uso de células de combustível em diversas indústrias [6]. Para além do mais a obtenção do combustível para alimentar as células de combustível não é totalmente limpa, não estando assim isenta de emissões com efeito de estufa.

A estrutura básica de uma célula de combustível é composta por um ânodo, um cátodo e um eletrólito, que conduz os iões entre os elétrodos, mas impede a passagem direta dos eletrões. O princípio de funcionamento envolve a oxidação de um combustível no ânodo, onde os

elétrões e íons são libertados, enquanto no cátodo ocorre a redução do oxidante, geralmente oxigénio.

No tipo mais comum de célula de combustível, o hidrogénio é utilizado como combustível. Quando o hidrogénio é oxidado no ânodo, os eletrões libertados passam por um circuito externo, gerando uma corrente elétrica. No cátodo, o oxigénio é reduzido e reage com o hidrogénio para formar água como subproduto (Fig. 2). Este processo é altamente eficiente, permitindo a conversão direta de energia química em energia elétrica [4].

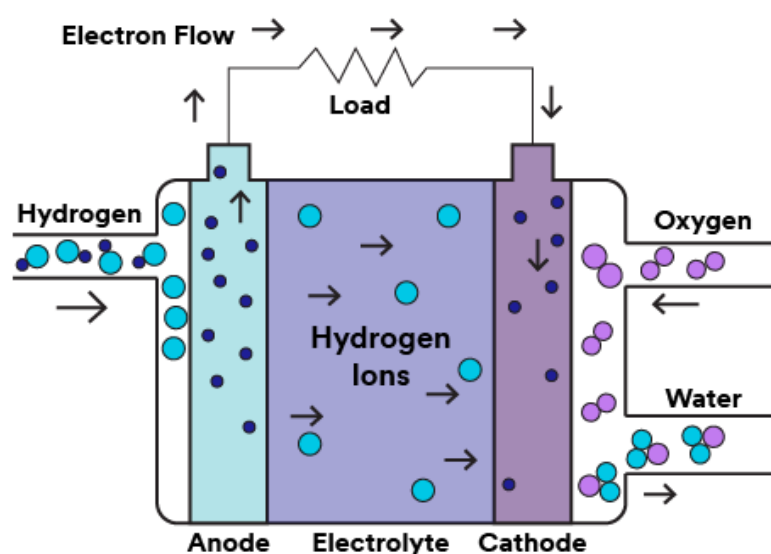


Fig. 2 – Esquema da célula de combustível de hidrogénio [5].

Além do hidrogénio, outros tipos de células de combustível utilizam metanol, amoníaco e outras substâncias químicas. Embora estas tecnologias ofereçam vantagens em termos de eficiência energética e emissões reduzidas, enfrentam desafios, como a necessidade de materiais caros (platina para catalisadores) e a complexidade na produção e armazenamento do combustível. Estas limitações têm incentivado novos desenvolvimentos, como é o caso das células combustíveis biológicas que produzem eletricidade de forma mais sustentável [3].

1.3 Células de combustível biológicas

As células de combustível biológicas (biofuel cells, BFCs) representam uma categoria especial de células de combustível que utilizam compostos biológicos, como hidratos de carbono, álcoois ou ácidos gordos, para a produção de energia. O uso de biocatalisadores, como enzimas

ou microrganismos, permite que estas células funcionem sob condições mais flexíveis, como temperatura ambiente e pH neutro. Para além disso usam como combustível compostos presentes em fluidos biológicos em abundância como a glicose ou até resíduos orgânicos, o que as torna altamente compatíveis com aplicações biomédicas e ambientais [7].

No entanto, o desempenho das células de biocombustível ainda está aquém do esperado para muitas aplicações comerciais. As principais limitações estão relacionadas com a baixa densidade de energia produzida e a vida útil reduzida dos biocatalisadores, como as enzimas, que sofrem de perda de atividade ao longo do tempo devido à degradação e inativação. Estes desafios têm orientado a investigação para a melhoria da imobilização de enzimas, bem como para o uso de nanomateriais que possam aumentar a eficiência da transferência de eletrões e a estabilidade dos sistemas enzimáticos [8].

1.3.1 Células de biocombustível enzimáticas

As células de biocombustível enzimáticas (EBFCs) são uma subclasse das células de biocombustível que utilizam enzimas como biocatalisadores para promover reações redox. Estas células demonstram um elevado potencial para uma vasta gama de aplicações, especialmente em dispositivos portáteis e eletrónica de baixa potência, devido à sua capacidade de gerar energia elétrica a partir de substratos biológicos como a glicose, etanol, colesterol e outros compostos orgânicos. O princípio fundamental das EBFCs baseia-se na conversão de energia química, proveniente dos substratos, em energia elétrica, utilizando enzimas como catalisadores, em vez de metais nobres ou microrganismos inteiros, como em outros tipos de células de combustível.

Tal como as células de combustível tradicionais, as EBFCs (Fig. 3) são constituídas por dois eletrodos, contudo designados especificamente de bioânodo e biocátodo por incorporarem elementos biológicos. No bioânodo estão imobilizadas enzimas na superfície do eletrodo que promovem a oxidação do combustível enquanto no biocátodo estão enzimas que promovem a catálise de um oxidante, normalmente oxigénio. Contudo, nas EBFCs não é estritamente necessário a presença de enzimas no cátodo podendo este ser inorgânico, sendo designadas de células de combustível biológicas semi-enzimáticas. O princípio de funcionamento das EBFCs baseia-se na produção de energia espontânea promovida pela catálise enzimática de uma forma mais seletiva quando os compostos combustível e oxidante estão presentes numa

solução, o eletrólito. Assim, quando a EBFC está mergulhada numa solução com estes compostos, no bioânodo ocorre a oxidação espontânea do combustível que é um composto substrato da enzima, sendo que os elétrons gerados são transferidos para o eletrodo e percorrem num circuito externo até ao biocátodo ou ocorre redução do oxidante através da enzima aí imobilizada, gerando-se um subproduto derivado do fluxo de prótons do bioânodo para o biocátodo. Esta biotecnologia tem visto diversos avanços ao longo do tempo, sendo o tipo de EBFC dividida em 3 gerações de acordo com variações no seu princípio de funcionamento. Nas BFCs de primeira geração as enzimas eram adicionadas à solução eletrólito não havendo uma imobilização das enzimas ao eletrodo ou então a imobilização promovida era apenas física, levando a baixas eficiências na produção de energia e a baixa estabilidade. Nas EBFCs de segunda geração são usados compostos mediadores redox, tanto imobilizados nos eletrodos ou em solução que promovem uma melhor eficiência na transferência de elétrons entre enzima e eletrodo. Nas EBFCs de terceira geração as enzimas são imobilizadas aos eletrodos de uma forma eficiente através de compostos ligantes que não necessitam de mediadores redox, havendo uma transferência direta de elétrons entre a enzima e o eletrodo o que simplifica o sistema. Na Fig. 3 está representado um exemplo de uma EBFC de segunda geração [9].

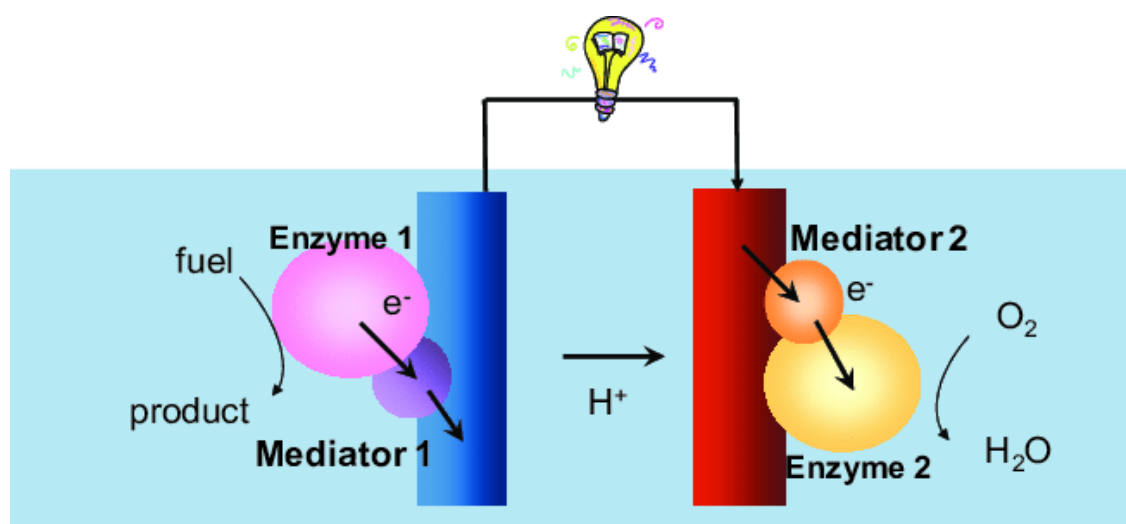


Fig. 3 – Esquema de uma célula de biocombustível enzimática de segunda geração [9]

As EBFCs apresentam várias vantagens em comparação com outras tecnologias de células de combustível, incluindo:

- Biocompatibilidade: Devido ao uso de enzimas, as EBFCs são adequadas para aplicações biomédicas, como sensores implantáveis e dispositivos vestíveis que podem gerar energia diretamente a partir de fluidos corporais (por exemplo, glicose presente no sangue ou suor) [6].
- Fontes renováveis de combustível: As EBFCs utilizam biomoléculas renováveis, como a glicose, etanol, colesterol, lactato, etc., o que as torna uma alternativa mais sustentável em comparação com combustíveis fósseis ou hidrogénio. Estas biomoléculas são abundantes e podem ser extraídas de fluidos biológicos ou resíduos orgânicos, tornando o processo mais sustentável e económico.
- Condições amenas de operação: Ao contrário das células de combustível que funcionam a altas temperaturas, as EBFCs podem operar em condições ambientais (temperatura ambiente, pH neutro ou ligeiramente ácido), o que é ideal para dispositivos de baixo custo e para aplicações em ambientes biológicos [7].
- Simplificação do sistema: O uso de enzimas como biocatalisadores permite simplificar o sistema construtivo. Como as enzimas são seletivas para os seus substratos não ocorre reações cruzadas o que levaria a curto-circuito. Assim o uso de membrana a separar os compartimentos do ânodo e cátodo deixa de ser necessário podendo ambos os elétrodos estarem mergulhados na mesma solução. Isto permite reduzir significativamente o tamanho das BFC, permitindo assim serem implantadas.

Apesar de quantidade energia gerada ser baixa, as EBFCs têm um futuro promissor numa ampla gama de aplicações. Uma das áreas mais promissoras é a eletrónica vestível, onde as células de biocombustível podem gerar energia a partir de fluidos corporais, como o suor, para alimentar sensores de saúde e dispositivos portáteis. Outra aplicação importante encontra-se no campo dos biossensores autossustentáveis, onde as EBFCs podem alimentar dispositivos de monitorização de analitos com interesse clínico relevante como é o caso de glicose para diabéticos, fornecendo uma fonte de energia constante e renovável [10].

Além disso, as BFCs estão a ser exploradas para utilização em sistemas de energia descentralizados, onde podem operar em ambientes com pouca infraestrutura energética, utilizando biomassa ou resíduos orgânicos como fonte de combustível. A combinação da sua

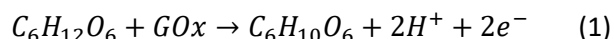
eficiência em condições amenas e o seu potencial de sustentabilidade tornam-nas candidatas promissoras para tecnologias de energia verde.

1.3.2 Enzimas nas células de biocombustível

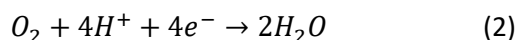
As enzimas são proteínas altamente específicas que catalisam reações bioquímicas, acelerando processos que de outra forma ocorreriam a uma velocidade muito mais lenta. Estas desempenham um papel fundamental nas EBFCs, atuando como biocatalisadores em reações específicas, com comportamento e eficiência semelhantes aos metais preciosos, permitindo assim a sua substituição o que leva a uma redução dos custos de fabrico e ambiental [11].

Como exemplo, as células de biocombustível de glicose/O₂ têm recebido uma atenção particular devido a certos aspetos, nomeadamente à abundância de glicose em fluidos corporais, à disponibilidade e eficiência das enzimas que catalisam glicose como por exemplo a glicose oxidase (GOx) e a glicose dehidrogenase (GDH) e também devido ao sucesso de mercado do biossensor para glicose que faz uso da GOx [6].

A equação de oxidação da glicose por parte da GOx no ânodo pode ser representada da seguinte forma:



No biocátodo são imobilizadas enzimas que usam oxigénio como co-substrato. A título de exemplo temos a laccase e a bilirubin oxidase. A redução do oxigénio no cátodo pode ser representada pela seguinte equação:



A integração desta tecnologia em plataformas baseadas em papel tem demonstrado um grande potencial para dispositivos descartáveis e vestíveis. O papel atua como uma plataforma leve e porosa, que facilita a difusão de reagentes, permitindo a construção de células finas e flexíveis. Estudos recentes exploraram o uso de grafite de lápis como material para elétrodos, oferecendo uma superfície condutora de baixo custo [12].

Apesar das vantagens, a utilização de enzimas em células de biocombustível também apresenta desafios. As enzimas podem perder atividade ao longo do tempo devido a fatores como a desnaturação, inativação térmica ou degradação, o que limita a vida útil das EBFCs. Para superar esses problemas, estão a ser desenvolvidas estratégias para a imobilização de enzimas em

superfícies de elétrodos. A imobilização das enzimas pode aumentar a sua estabilidade, melhorar a transferência de elétrões e, conseqüentemente, aumentar a eficiência geral das EBFCs [13] [14].

As pesquisas mais recentes têm se concentrado no desenvolvimento de técnicas para estabilizar as enzimas em condições operacionais. Uma das abordagens mais promissoras é a imobilização das enzimas em materiais condutores, como nanotubos de carbono, o que não apenas aumenta a estabilidade das enzimas, mas também melhora a transferência de elétrões entre a enzima e o elétrodo [15].

1.3.3 Estratégias para a Imobilização de Enzimas

A imobilização de enzimas é uma técnica fundamental no desenvolvimento de EBFCs, a eficiência e a estabilidade das EBFCs dependem fortemente da forma como as enzimas são imobilizadas nos elétrodos. As técnicas de imobilização têm como objetivo melhorar a estabilidade, a atividade enzimática e a transferência de elétrões, permitindo o uso das enzimas de forma mais eficaz durante mais tempo.

Alguns dos exemplos de técnicas de imobilização de enzimas são a imobilização covalente, o encapsulamento de enzimas em matrizes poliméricas, os dendríticos e nanomateriais e crosslinking, estando representados na Fig. 4:

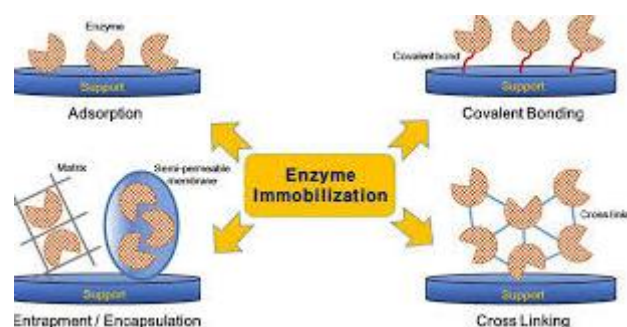


Fig. 4 – Estratégias de Imobilização de Enzimas [16]

A imobilização covalente envolve a ligação das enzimas ao elétrodo por meio de interações químicas fortes, como ligações covalentes. Este método é amplamente utilizado porque proporciona uma fixação estável da enzima no suporte, aumentando a durabilidade e a

resistência à lixiviação. Por exemplo, a ligação de enzimas como a GOx a superfícies modificadas de elétrodos, através de materiais como o polipirrol, tem demonstrado aumentar a eficiência e a estabilidade do sistema [14]. Além disso, estudos recentes com nanopartículas de ouro mostraram que estas podem criar uma interface amigável das proteínas, permitindo a imobilização covalente estável das enzimas [17].

O encapsulamento de enzimas em matrizes poliméricas é uma técnica amplamente utilizada para preservar a atividade enzimática e proteger as enzimas de condições ambientais adversas. Materiais como quitosana, polipirrol e alginato são utilizados para criar uma matriz envolvente, mantendo a enzima próxima da superfície do eletrodo, o que favorece a transferência de elétrons. A técnica de Layer-by-Layer (LbL) tem sido usada para criar filmes multicamadas de polímeros que encapsulam enzimas e melhoram a estabilidade e a atividade em EBFCs [18].

O uso de dendríticos e nanomateriais tem revolucionado a imobilização de enzimas, permitindo a criação de elétrodos de alta eficiência. Materiais como nanotubos de carbono (CNTs), óxidos de grafeno, e nanofibras de carbono são utilizados para aumentar a área de superfície do eletrodo assim como a quantidade de biomoléculas ligadas, melhorando a transferência de elétrons entre a enzima e o eletrodo [19][20]. Estes nanomateriais também ajudam a estabilizar as enzimas, permitindo que operem durante mais tempo em condições ambientais adversas. Estudos demonstraram que a combinação de mediadores redox com nanomateriais pode aumentar significativamente a eficiência da transferência eletrônica em EBFCs [21].

A técnica de crosslinking envolve a formação de redes intermoleculares que mantêm as enzimas ligadas ao suporte do eletrodo. O glutaraldeído é comumente usado como agente de ligação cruzada para formar redes estáveis de enzimas em elétrodos. Este método é altamente eficaz para evitar a lixiviação das enzimas e melhorar a durabilidade, mas pode reduzir a atividade enzimática devido à restrição da mobilidade da enzima. No entanto, o crosslinking continua a ser uma das opções mais eficazes para aplicações de longa duração, especialmente em dispositivos que requerem alta estabilidade, como biossensores [22].

1.3.4 (Nano)materiais de carbono

Os (nano)materiais de carbono, como por exemplo os CNTs, o grafeno, carbono mesoporoso e negro de fumo desempenham um papel crucial no desenvolvimento de tecnologias avançadas

de sensores e de células de combustível, graças às suas propriedades únicas, como elevada condutividade elétrica, grande área de superfície específica e excelente resistência mecânica e química. Estes materiais são usados tanto como suportes para a imobilização de enzimas em EBFCs quanto como mediadores para melhorar a transferência eletrônica. Algumas características destes materiais são apresentadas em seguida:

- Elevada condutividade elétrica: A condutividade elétrica dos materiais à base de carbono melhora a transferência eletrônica entre as enzimas e os eletrodos, aumentando a eficiência geral da célula de biocombustível [10]. Esta característica é essencial para aumentar a corrente gerada em EBFCs, uma vez que promove a oxidação mais rápida de substratos como a glicose.
- Grande área de superfície: A grande área de superfície, especialmente dos CNTs e do grafeno, permite uma maior imobilização de enzimas, o que maximiza o contato entre os biocatalisadores e o substrato. Além disso, facilita a adsorção de mediadores redox e substratos de combustível, resultando numa maior eficiência da célula. [23]
- Compatibilidade biológica: Estudos mostram que os (nano)materiais de carbono, quando usados em concentrações adequadas, são biocompatíveis, tornando-os adequados para aplicações biomédicas, como dispositivos implantáveis e sensores vestíveis [24]. A biocompatibilidade é uma vantagem significativa quando as células de biocombustível são aplicadas em ambientes biológicos, como na monitorização da glicose em dispositivos para diabéticos.
- Estabilidade química e mecânica: Os (nano)materiais de carbono são altamente estáveis em termos químicos e mecânicos, o que garante que os eletrodos revestidos com CNTs ou grafeno possam operar durante longos períodos sem degradação. Esta durabilidade é essencial para garantir a longevidade dos dispositivos de biocombustível. [25]

Os CNTs têm uma ampla gama de aplicações nas BFCs devido às suas propriedades únicas. Podem ser utilizados tanto em bioânodos como em biocátodos, suportando a imobilização de enzimas e facilitando a DET. Um exemplo de aplicação é o uso de CNTs em biossensores de glicose, onde ajudam a transferir os eletrões gerados na oxidação da glicose para o eletrodo, sem a necessidade de mediadores redox externos. [10]

Além de serem utilizados individualmente, (nano)materiais de carbono podem ser combinados entre si ou entre outros materiais para formar estruturas compósitas. Essas combinações resultam em materiais com propriedades otimizadas e sinérgicas para melhorar ainda mais a eficiência das EBFCs. Por exemplo, a combinação de (nano)materiais de carbono com polímeros condutores tem demonstrado aumentar a estabilidade das enzimas e a eficiência da transferência de elétrões, resultando em células de biocombustível de maior desempenho. [26]

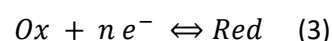
Apesar das vantagens, o uso de nanomateriais de carbono em células de biocombustível ainda enfrenta desafios. Um dos principais problemas é o custo elevado da produção de nanotubos de carbono e grafeno de alta qualidade. Além disso, a toxicidade potencial de alguns nanomateriais de carbono ainda precisa ser melhor compreendida, especialmente para aplicações biomédicas [24]. Assim estruturas de carbono como o negro de fumo (carbon black, CB) e carbono mesoporoso (mesoporous carbon, MC) podem ser alternativas viáveis aos CNTs e grafeno, sendo muito mais baratos apesar de apresentarem uma menor área superficial.

1.4 Eletroquímica

As técnicas eletroquímicas são métodos utilizados para estudar reações químicas que envolvem a transferência de elétrões. Através destas técnicas, é possível obter informações sobre o comportamento de materiais e compostos passíveis de se oxidarem (perderem elétrões) e/ou reduzirem (ganharem elétrões). Este princípio é inerente às células de combustível e é muito usado no desenvolvimento de (bio)sensores, permitindo estudar a eficiência e a cinética das reações redox que ocorrem nesses sistemas.

Em eletroquímica são utilizadas células compostas por eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e um contra eletrodo.

A equação geral para uma reação redox é representada da seguinte forma:



Onde:

- **O** é a espécie oxidada
- **R** é a espécie reduzida
- **n** é o número de eletrões transferidos.

A voltametria e a amperometria são duas técnicas eletroquímicas amplamente usadas no desenvolvimento e caracterização de (bio)sensores e BFCs.

1.4.1 Voltametria cíclica

Na voltametria cíclica (VC), um potencial é aplicado a um eléctrodo de trabalho de forma linear em função do tempo, enquanto se mede a corrente resultante da oxidação ou redução de espécies eletroativas na superfície do eléctrodo. O potencial é varrido num ciclo que vai de um valor inicial até um valor máximo (pico de oxidação), e depois é invertido até um valor mínimo (pico de redução) até retornar ao valor inicial, formando um ciclo completo. O gráfico da corrente versus potencial (voltamograma) (Fig. 5) fornece informações sobre os processos redox que ocorrem na superfície do eléctrodo [27].

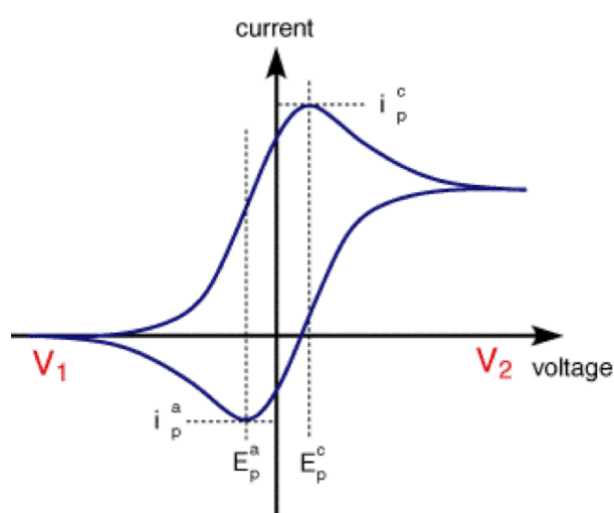


Fig. 5 – Exemplo de um voltamograma de uma espécie redox [28]

Um voltamograma cíclico típico de uma espécie redox que envolve a transferência de 1 elétron apresenta um pico de oxidação durante o primeiro varrimento, seguido por um pico de redução simétrico no varrimento de retorno. A magnitude dos picos de corrente e a sua separação fornecem informações sobre a natureza do sistema redox.

A corrente de pico para uma reação reversível pode ser estimada pela equação de Randles-Sevcik, que relaciona a corrente de pico (i_p) com a concentração do analito, a área do eletrodo, o número de elétrons envolvidos e a velocidade de varrimento do potencial:

$$i_p = (2.69 \times 10^5)n^{3/2}ACD^{1/2}v^{1/2} \quad (4)$$

Onde:

- i_p é a corrente de pico (A),
- n é o número de elétrons envolvidos,
- A é a área do eletrodo (cm²),
- C é a concentração do analito (mol/cm³),
- D é o coeficiente de difusão (cm²/s),
- v é a velocidade de varrimento (V/s).

A equação de Randles-Sevcik é importante para avaliar a difusão controlada de espécies redox em soluções, fornecendo uma forma quantitativa de analisar as reações eletroquímicas.

A VC é frequentemente usada para caracterizar biossensores. A corrente medida num biossensor é proporcional à concentração do analito, permitindo a monitorização de espécies como glicose em soluções fisiológicas [29].

Também é uma técnica essencial na caracterização das EBFCs, permitindo o estudo da cinética de oxidação de combustíveis e a eficiência de transferência eletrónica em sistemas enzimáticos. Ao modificar os eletrodos com (nano)materiais de carbono, a VC ajuda a verificar se a eficiência da célula foi melhorada e se a imobilização de enzimas foi bem-sucedida [30].

Esta técnica apresenta algumas vantagens, nomeadamente a sua simplicidade e versatilidade, a observação da reversibilidade das reações redox e a análise quantitativa da cinética de transferência de eletrões, contudo não é tão sensível como a amperometria

1.4.2 Amperometria

A amperometria envolve a medição da corrente ao longo do tempo resultante de uma reação redox que ocorre na superfície de um eletrodo quando um potencial constante é aplicado. A corrente medida é proporcional à concentração da espécie eletroativa, o que a torna útil para a análise quantitativa de compostos. Esta técnica é amplamente utilizada em diversas áreas, entre eles, o desenvolvimento de biossensores e EBFCs [31].

Na amperometria, um potencial constante é aplicado ao eletrodo de trabalho, e a corrente resultante é medida enquanto ocorre uma reação redox na superfície do eletrodo.

A amperometria é a base para muitos biossensores enzimáticos, onde as enzimas catalisam a oxidação ou redução de substratos e a corrente gerada é proporcional à concentração do substrato no meio [32].

Em EBFCs, a amperometria pode ser usada para monitorizar a corrente gerada pelas reações redox catalisadas por enzimas. O sinal amperométrico indica diretamente a eficiência da conversão de energia química em energia elétrica.

Esta técnica apresenta algumas vantagens como a alta sensibilidade, respostas rápidas e a simplicidade [32].

2 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento de uma célula de combustível enzimática de glicose/O₂ baseada em elétrodos feitos de papel, com o intuito de aumentar a sustentabilidade ambiental no fabrico de dispositivos analíticos.

Os objetivos específicos foram os seguintes:

- Fabrico dos tradutores através da técnica de impressão em papel baseados em materiais de carbono alternativos;
- Selecionar o melhor (nano)material de carbono para o fabrico dos transdutores, servindo como superfície de imobilização das enzimas;
- Caracterização do biocátodo como um biossensor para o oxigénio;
- Caracterização do bioânodo como um biossensor para a glicose;
- Montagem da EBFC e avaliação da sua eficiência na produção de energia.

As caracterizações foram efetuadas exclusivamente através de técnicas eletroquímicas, nomeadamente, voltametria cíclica, amperometria e voltametria de varrimento linear.

3 Materiais e métodos

3.1 Reagentes, materiais, soluções

Os reagentes utilizados durante todo este trabalho são: Cloreto de potássio (KCl), hexacianoferrato de potássio III ($K_3[Fe(CN)_6]$), hexacianoferrato de potássio II tri-hidratado ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot H_2O$), N,N-dimetilformamida (DMF), dodecilsulfato de sódio (SDS), fosfato de potássio dibásico, fosfato de potássio monobásico, e éster succinimidílico do ácido pirenobutanóico (PBSE).

Adquiriu-se as enzimas GDH e BOx à Creative Enzymes (EUA) e à Sigma- Aldrich (Alemanha), respetivamente. Preparou-se as soluções enzimáticas com concentrações de 1 mg/mL para GDH e 0,1 mg/mL para BOx em solução tampão de fosfato (PBS) 0,01 M pH 7 e armazenou-se a uma temperatura de cerca de 4 °C.

Os nanomateriais de carbono, CB e MC, foram dispersos a uma concentração de 1 mg/mL em SDS (1%) ou DMF num banho de ultrassons (ultrassons: JP Seleta Ultrasounds HD, Espanha) durante 90 minutos e armazenados à temperatura ambiente até ao seu uso. Uma solução stock de glicose 10 mM foi preparada em 0,1 M PBS pH 7.

Utilizou-se, como eletrólito, um tampão fosfato salino 0,1 M (PBS, pH 7) através da mistura de fosfato de potássio dibásico com fosfato de potássio monobásico. Sempre que necessário, purgou-se o eletrólito com azoto (99,99%) durante 15 minutos antes da análise.

Preparou-se uma solução aquosa equimolar (5 mM) de $K_4[Fe(CN)_6] \cdot H_2O$ e $K_3[Fe(CN)_6]$ em KCl 0,1 M para avaliação e comparação do desempenho dos elétrodos de papel nanoestruturados.

Efetou-se todas as medições eletroquímicas com um potencióstato Autolab PGSTAT12 (Metrohm), controlado pelo software GPES versão 4.9 (Herisau, Suíça), utilizando uma célula de três elétrodos para a caracterização dos (bio)sensores, composta pelos (bio)sensores como elétrodos de trabalho, elétrodo de platina como contra elétrodo e Ag/AgCl (3 M, KCl) como elétrodo de referência. Quanto às caracterizações das BFCs, foi utilizada uma configuração de dois elétrodos composta pelo bioânodo e pelo biocátodo.

3.2 Preparação de bioelétrodos

Para a preparação dos bioelétrodos, realizou-se uma impressão de tiras de ouro em papel impermeável, utilizando uma máquina de impressão a jato de tinta (Fujifilm Dimatix DMP-2850). De seguida, depositou-se (40 μ L no total, dividido por duas alíquotas) os (nano)materiais a serem estudados (MC e CB), numa extremidade do conector de ouro, num retângulo de aproximadamente 0,6 x 0,8 cm, delimitado previamente por verniz e seco sob uma lâmpada quente. Previamente à deposição, os (nano)materiais foram dispersos DMF e numa solução aquosa de SDS (1%) a concentrações de 1 mg/mL A Fig. 6 apresenta um esquema e uma imagem real dos elétrodos em papel preparados em laboratório.

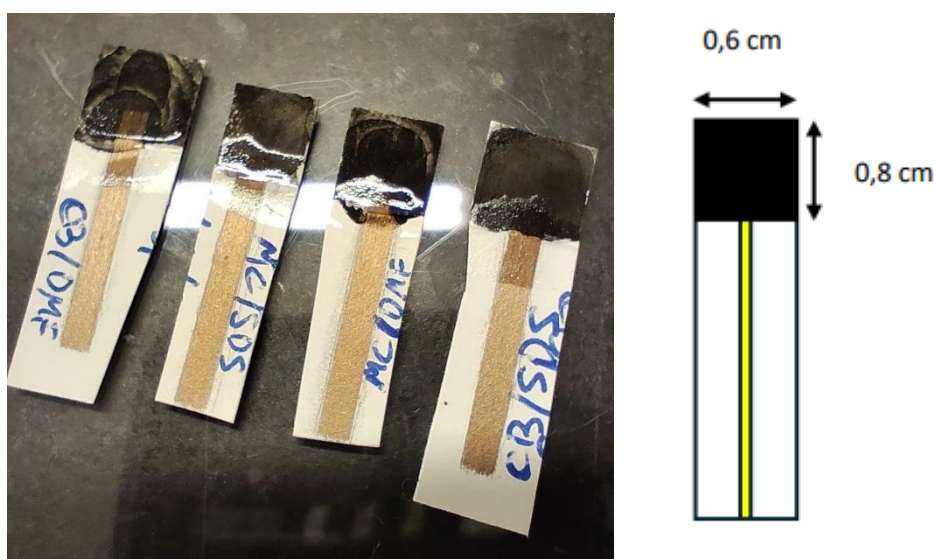


Fig. 6 - Elétrodos de papel preparados com carbono mesoporoso e negro de fumo (esquerda) e esquema indicando as dimensões da área eletroativa (direita).

3.2.1 Fabrico do bioelétrodo BOx

Procedeu-se à imobilização da enzima BOx no elétrodo de papel(MC), utilizando um agendo de ligação (PBSE). Esta solução foi preparada numa concentração de 10 mM dissolvida em DMF num Eppendorf de 1,5 mL com a parte MC do papel(MC) submersa na solução durante 1 hora. De seguida, lavou-se o DMF da superfície do elétrodo por imersão em água durante alguns segundos. Adicionou-se cerca de 20 μ L de solução enzimática (0,1 mg/mL) ao elétrodo modificado, ocorrendo a incubação durante 90 minutos à temperatura ambiente e sob

atmosfera húmida para evitar a secura. Por fim, armazenou-se em tampão diluído (0,01 M PBS pH 7) a cerca de uma temperatura de 4 °C até ser necessário. Este bioelétrodo é doravante designado por papel(MC)/BOx.

Testou-se este bioelétrodo para a determinação do oxigénio por CV e amperometria em eletrólito (0,1 M PBS pH 7) na presença e ausência (purgado com azoto durante 15 minutos) de oxigénio.

3.2.2 Fabrico do bioelétrodo GDH

O bioelétrodo GDH preparou-se de forma semelhante ao bioelétrodo BOx, contudo depositando-se solução de enzima GDH 1 mg/mL e incubando por 2 h. Este bioelétrodo é doravante designado por papel(MC)/GDH.

Testou-se este bioelétrodo para a determinação de glicose por voltametria cíclica e amperometria em eletrólito (0,1 M PBS pH 7) na presença e ausência de glicose 5 mM.

3.2.3 Fabrico da célula de combustível enzimática

Montou-se a BFC de glicose/O₂ com o papel(MC)/GDH como bioânodo e o papel(MC)/BOx como biocátodo e testou-se em condições tamponadas (0,1 M PBS pH 7) na presença e ausência de glicose através da técnica de voltametria de varrimento linear a 1 mV/s utilizando o equipamento potencióstato.

4 Resultados e discussão

4.1 Construção e otimização dos sensores em papel

Foram testados dois materiais de carbono no fabrico dos elérodos à base de papel, nomeadamente o MC e CB. Estes materiais foram escolhidos e comparados por apresentarem boa eficiência eletroquímica, mas com custo de produção mais baixo quando comparados com grafeno ou CNTs. A comparação voltamétrica para o hexacianoferrato está apresentada na Fig. 7. Observando os voltamogramas, aparentemente foram obtidos picos voltamétricos de oxidação e redução mais elevados para o elédrodo à base de MC em DMF, sendo isto efetivamente confirmado através da medição dos picos, apresentados na tabela 1. Com base nestes resultados, o elédrodo escolhido para o desenvolvimento dos bioelérodos foi o elédrodo de papel feito à base de MC disperso em DMF.

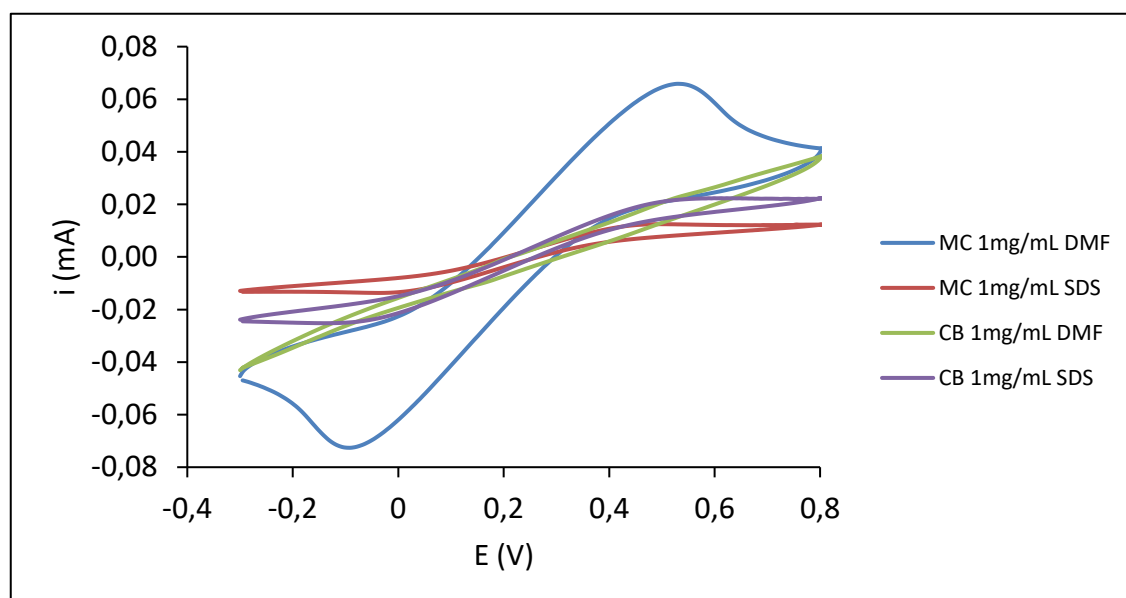


Fig. 7 - Voltamogramas cíclicos dos elérodos de papel feitos com MC em DMF em SDS e CB em SDS e DMF obtidos em 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ e 0,1 M KCl . Velocidade de varrimento: 50 mV/s

Tabela 1 – Comparação dos picos voltamétricos de oxidação e redução para MC e CB em diferentes meios dispersivos

Material de carbono	i_p oxidação (mA)	i_p redução (mA)
Carbono mesoporoso (em DMF)	0,065	0,07
Carbono mesoporoso (em SDS)	0,014	0,014
Negro de fumo (em DMF)	-	-
Negro de fumo (em SDS)	0,024	0,026

4.2 Caracterização do bioelétrodo BOx como biossensor de oxigénio

O bioelétrodo papel(MC)/BOx foi avaliado quanto à eficiência na redução do oxigénio sendo assim aplicado como um biossensor. Inicialmente a avaliação foi feita por CV, primeiramente numa solução eletrolítica (9 ml de uma solução PBS 0,1 M) isenta de oxigénio e, em seguida, no mesmo eletrólito com oxigénio naturalmente difundido do ar (Fig. 8).

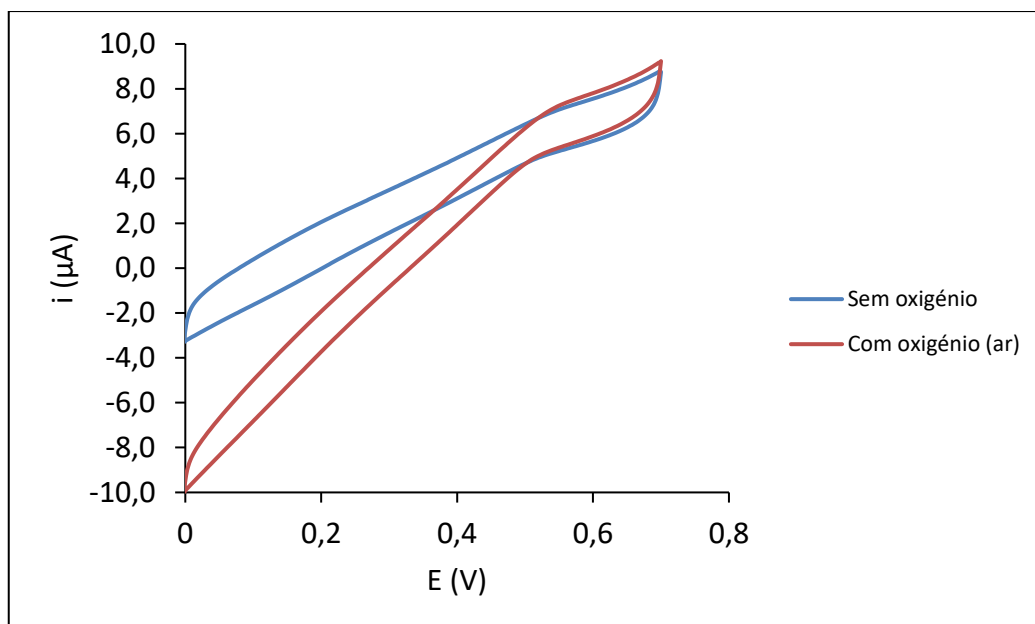


Fig. 8 – Voltamograma cíclico do bioelétrodo BOx na presença e ausência de O_2 em tampão PBS 0,1 M, pH 7. Velocidade de varrimento: 10 mV/s.

Consegue-se verificar diferenças entre os voltamogramas, nomeadamente na presença de oxigénio o voltamograma desloca-se para valores bastantes mais negativos de corrente elétrica,

por exemplo para 0 V ($-9,97 \mu\text{A}$) face aos resultados do bioelétrodo sem a presença de oxigénio ($-3,28 \mu\text{A}$) o que indica a redução de oxigénio por parte da enzima Box.

Após uma avaliação mais qualitativa procedeu-se à determinação do oxigénio por amperometria (Fig. 9). Esta foi realizada a potencial constante de 0 V (valor para o qual a diferença de corrente é máxima), iniciando-se com a solução purgada de oxigénio e adicionando-se progressivamente 400 μL de eletrólito contendo ar (21% oxigénio, 79% azoto). Durante este processo, antes de cada adição, é retirado exatamente o mesmo volume de solução purgada, mantendo assim sempre o mesmo volume.

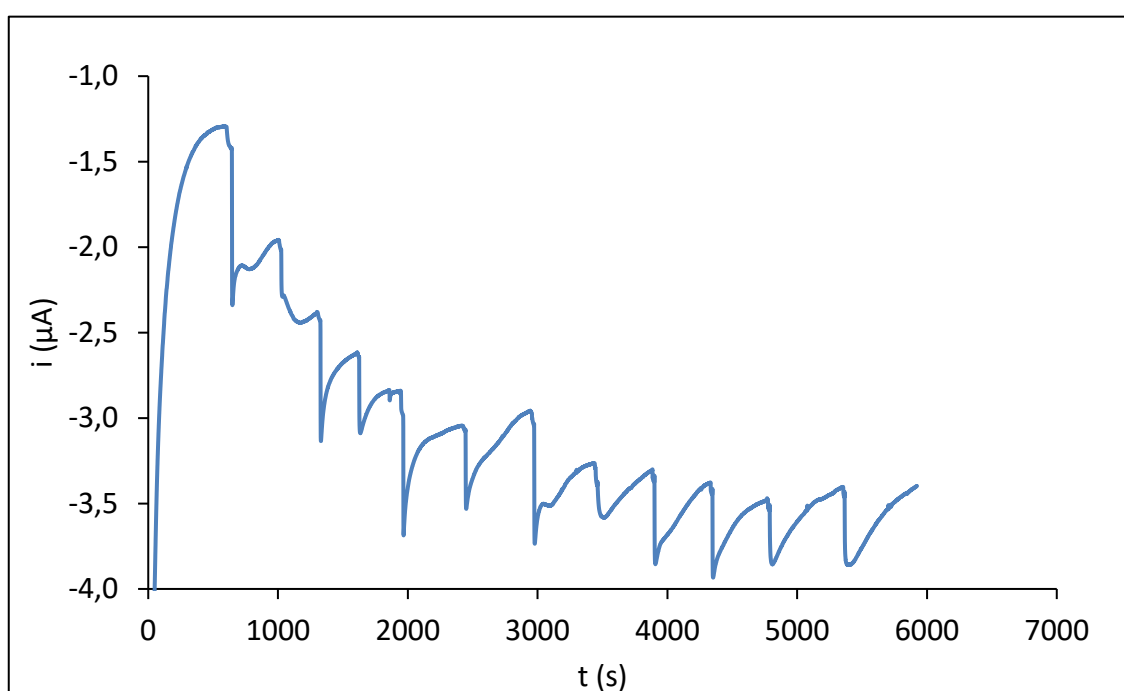


Fig. 9 – Amperometria do bioelétrodo Box realizada a 0 V em tampão PBS 0,1 M, pH 7.

A cada adição de eletrólito com ar (oxigénio) verificou-se um deslocamento de corrente para valores mais negativos de uma forma proporcional o que indica, mais uma vez a redução do oxigénio por parte do bioelétrodo (Tabela A1; Anexos). Esta proporcionalidade entre corrente e concentração permitiu a construção de uma curva de calibração representada na Fig. 10.

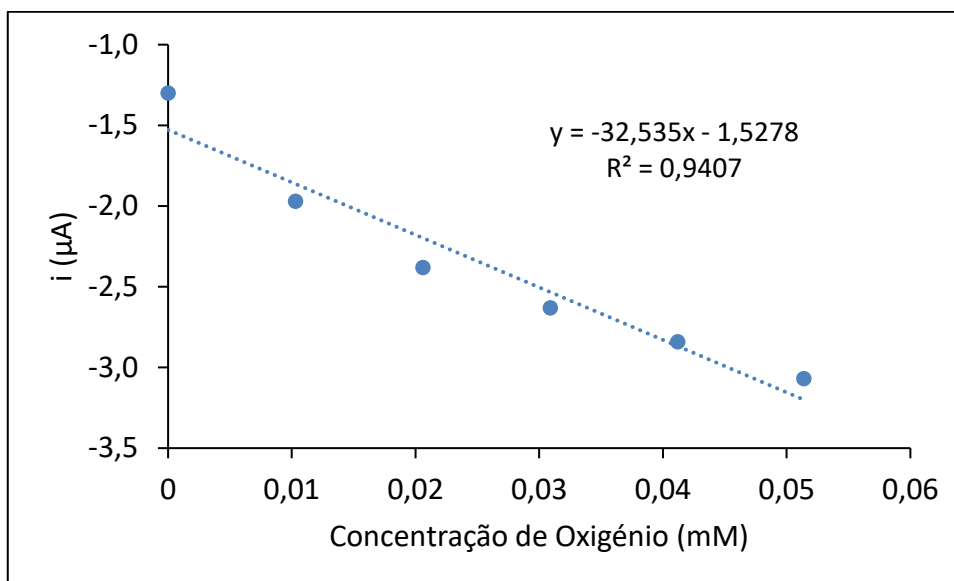


Fig. 10 – Curva de calibração do bioelétrico BOx

A calibração permitiu identificar uma zona linear na determinação do oxigênio por parte do bioelétrodo até concentrações de cerca de 0,051 mM, apresentando o bioelétrodo uma sensibilidade de 32,54 $\mu\text{A}/\text{mM}$. O limite de detecção (limit of detection, LOD) é calculado através do declive da curva e do desvio padrão do branco pela seguinte equação [33]:

$$LOD = \frac{\sigma_{blank}}{S} \quad (5)$$

O LOD correspondeu a 0,002 mM, provando assim, que o bioelétrodo papel(MC)/BOx é muito sensível na determinação do oxigênio.

4.3 Caracterização dos bioelétrodos GDH como biossensores de glicose

Tal como no bioelétrodo anterior, o bioelétrodo papel(MC)/GDH foi avaliado em primeiro lugar por CV em relação à eficiência na oxidação da glicose, numa solução tamponada (PBS 0,1 M pH 7) na presença e ausência de glicose (Fig. 11).

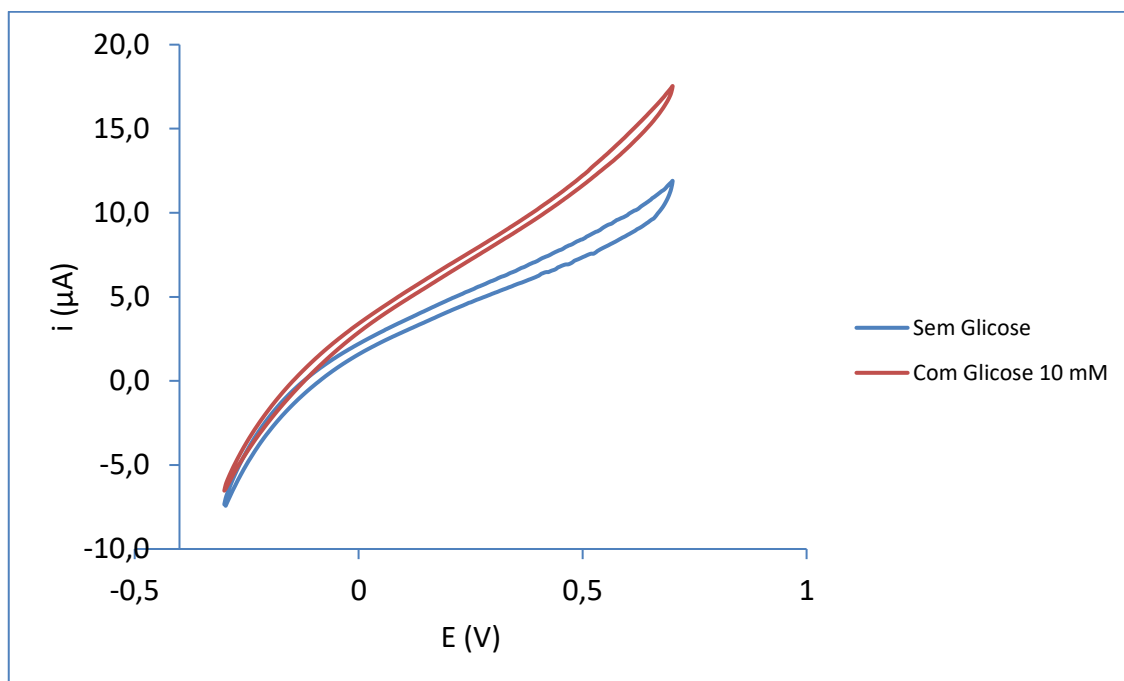


Fig. 11 – Voltamogramas cíclicos do bioelétrodo GDH na presença e ausência de glicose em tampão PBS 0,1 M pH 7. Velocidade de varrimento: 10 mV/s.

Consegue-se verificar na Fig. 11 que, na presença de glicose, o voltamograma tende para valores mais elevados de corrente, indicando assim, a oxidação da glicose por parte da enzima.

A análise amperométrica para determinação de glicose foi realizada a potencial constante de 0,5 V, adicionando-se alíquotas de solução stock de glicose 10 mM numa solução inicial sem glicose (Fig. 12).

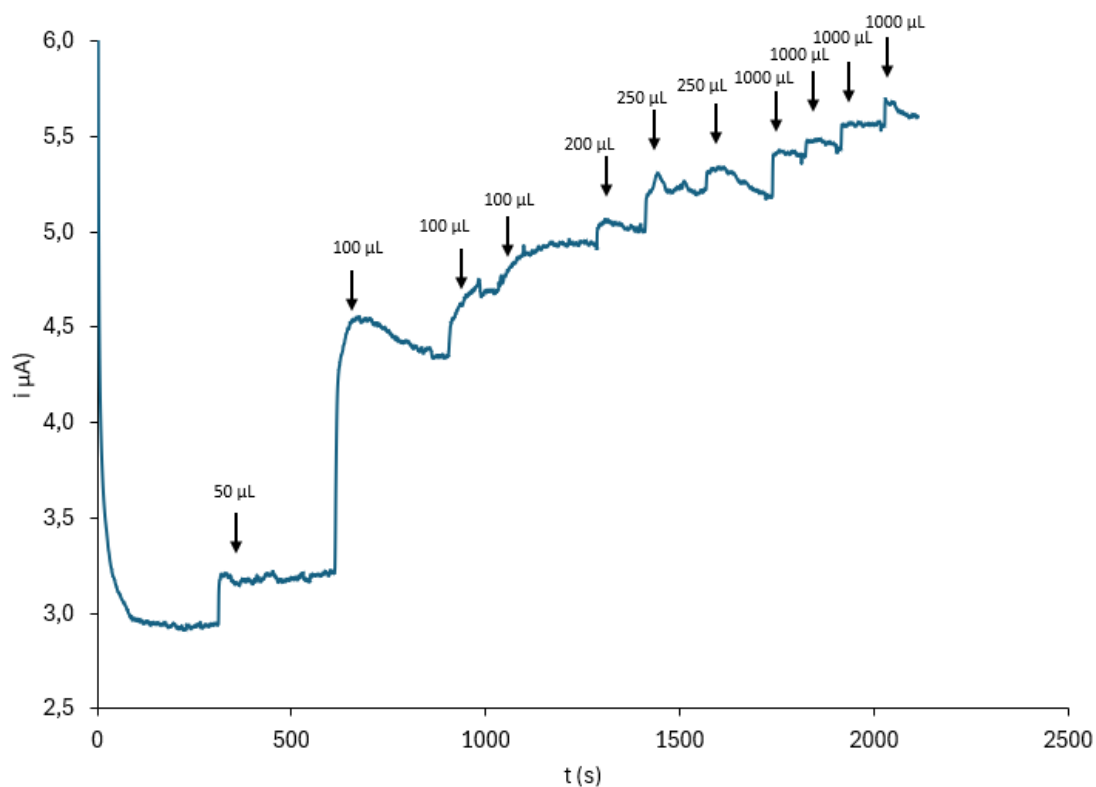


Fig. 12 – Amperometria do bioelétrodo GDH realizada a 0,5 V em tampão PBS 0,1 M pH 7.

Após a estabilização inicial da corrente, a adição de sucessivas alíquotas de glicose levou ao aumento de corrente para valores cada vez mais positivos de uma forma proporcional. Assim foi realizada a curva de calibração (Fig. 13) entre a concentração de glicose e a corrente gerada. A glicose pode assim ser determinada por este bioelétrodo até uma concentração de 0,65 mM, tendo uma sensibilidade de 3,33 $\mu\text{A}/\text{mM}$ e um LOD de 0,049 mM, de acordo com a equação 5.

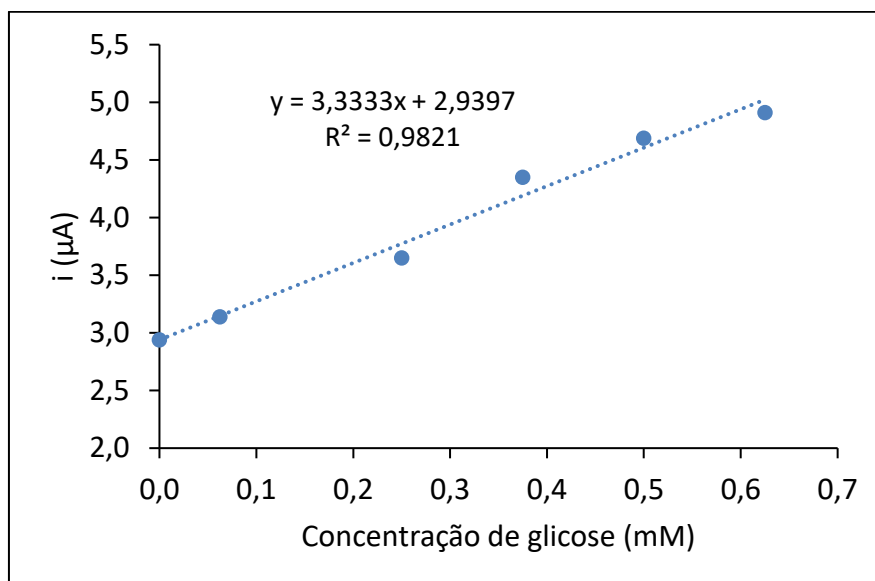


Fig. 13 – Curva de calibração do bioelétrodo GDH

4.4 Montagem e caracterização da célula de combustível enzimática glicose/ O_2

Na fase final deste trabalho, seguiu-se a montagem da BFC glicose/ O_2 , utilizando como ânodo o bioelétrodo papel(MC)/GDH e como cátodo o bioelétrodo papel(MC)/BOx. Ambos foram ligados ao potenciostato, utilizando voltametria de varrimento linear para determinação das curvas de polarização (Fig. 14) na presença e na ausência de glicose em solução tampão com ar (oxigênio).

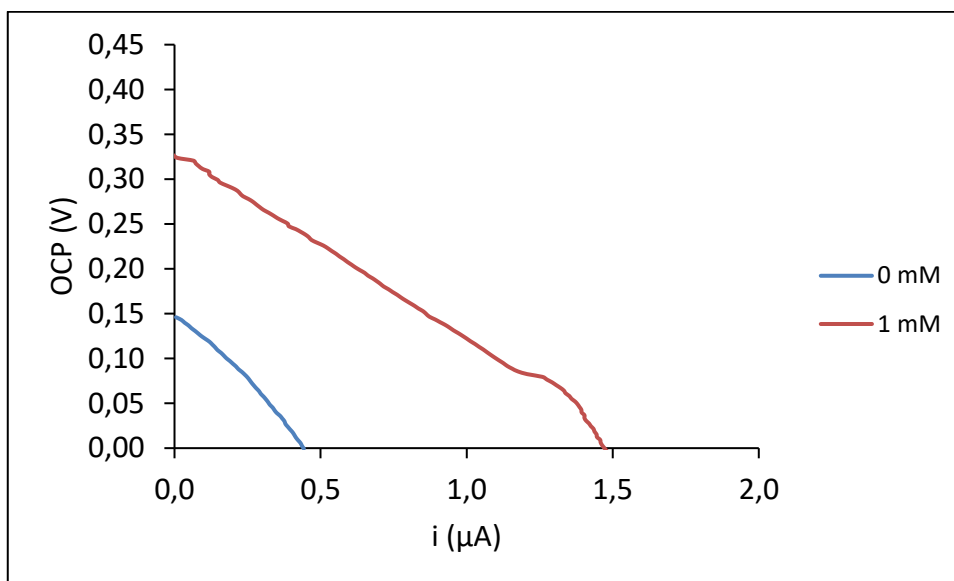


Fig. 14 – Curvas de polarização da BFC na presença e ausência de glicose em tampão PBS 0,1 M pH 7 (com ar dissolvido)

Analisando a Fig. 8 verifica-se que na ausência de glicose a corrente máxima gerada é negligente ($<0,5 \mu\text{A}$) e o potencial de circuito aberto (open circuit potential, OCP) corresponde a 0,15 V. Na presença de 1mM de glicose verifica-se um aumento da corrente gerada ($\approx 1,5 \mu\text{A}$) e o OCP aumentou para 0,33 V o que indica o bom funcionamento da BFC.

As respectivas curvas de potência (Fig. 15) foram determinadas através da aplicação da seguinte equação:

$$P = E \times i \quad (6)$$

Onde, P é a potência (W), E é a tensão (V) e i é a intensidade da corrente (A).

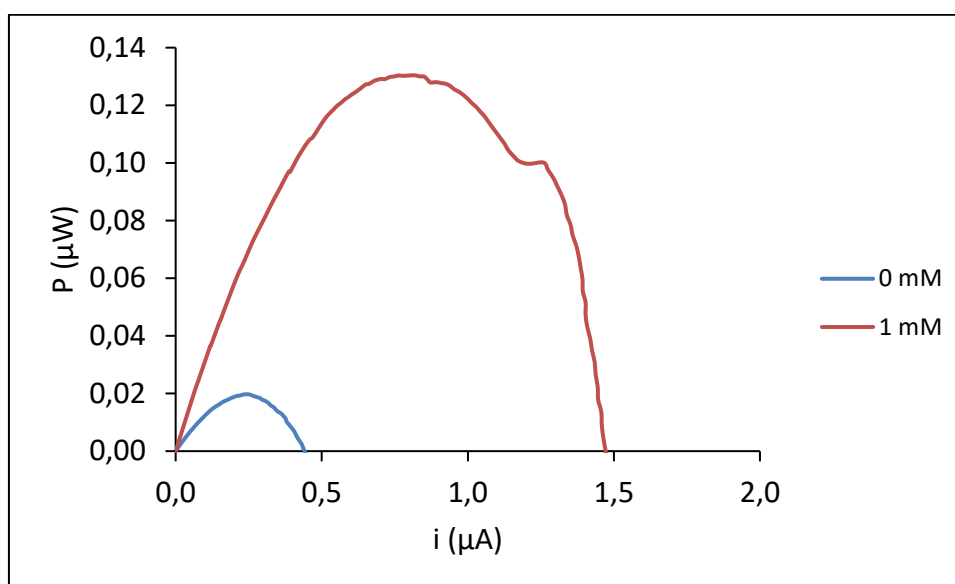


Fig. 15 – Curvas de potência da BFC na presença e ausência de glicose em tampão PBS 0,1 M pH 7 (com ar dissolvido)

A potência máxima gerada pela BFC à base de papel correspondeu a cerca de 0,13 μW o que contrasta com a potencia de 0,02 μW na ausência de glicose, atestando uma vez mais a funcionalidade da BFC.

5 Conclusões

A presente dissertação abordou o desenvolvimento de uma célula de combustível enzimática de glicose/O₂ baseada em papel, com o objetivo de criar uma alternativa mais sustentável para a produção de energia. A escolha de elétrodos de papel, combinada com a utilização de nanomateriais de carbono e enzimas imobilizadas, demonstrou ser uma abordagem promissora para o desenvolvimento de dispositivos bioenergéticos portáteis, de baixo custo e ecológicos.

Os resultados obtidos confirmam o potencial das EBFCs para gerar eletricidade a partir de substratos biológicos, como a glicose, com uma eficiência razoável, mesmo em condições de operação amenas, como a temperatura ambiente e pH neutro. O uso de materiais como o carbono mesoporoso e o negro de fumo para a imobilização de enzimas mostrou-se eficaz na promoção da transferência eletrônica e na estabilidade dos biocatalisadores, superando alguns dos desafios enfrentados pelas EBFCs tradicionais.

Apesar da potência gerada ser baixa, esta EBFC tem potencial para ser aplicada como um biossensor autossuficiente em termos energéticos na determinação de glicose, especialmente em sistemas biomédicos. A sua capacidade de operar a partir de fontes de combustível renováveis, como a glicose presente no suor ou no sangue, reforça a sua aplicabilidade em dispositivos de monitorização de saúde.

Embora os resultados sejam encorajadores, há ainda desafios a superar, particularmente no que se refere à longevidade dos biocatalisadores e à otimização da eficiência energética. A degradação das enzimas ao longo do tempo e a complexidade na produção em larga escala de elétrodos de papel são questões que devem ser abordadas em trabalhos futuros. Adicionalmente, a integração desta tecnologia em sistemas de monitorização de saúde requer melhorias na miniaturização e robustez dos dispositivos.

De forma geral, esta investigação contribui para o avanço no campo das células de combustível enzimáticas, propondo uma solução sustentável e inovadora para a produção de energia. O conceito de EBFCs descartáveis e portáteis, especialmente em dispositivos biomédicos, é uma das áreas com maior potencial para o desenvolvimento futuro, alinhando-se com a crescente necessidade de tecnologias verdes e soluções de energia renovável.

Bibliografia

- [1] Harvard T.H. Chan School of Public Health. (2019, January 7). Fossil fuels & health. C-CHANGE | Harvard T.H. Chan School of Public Health.
- [2] International Energy Agency (IEA). (2023). Renewables - Energy system. <https://www.iea.org/energy-system/renewables>
- [3] Lucia, U. (2014). Overview on fuel cells. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 30, 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.09.025>
- [4] Office of Energy Efficiency and Renewable Energy. (n.d.). Fuel cell basics. Energy.gov. <https://www.energy.gov/eere/fuelcells/fuel-cell-basics>
- [5] 3M, 2024. *Fuel Cells: Hydrogen Technology*. 3M New Zealand. Available at: https://www.3mnz.co.nz/3M/en_NZ/hydrogen-technology-nz/applications/fuel-cells/
- [6] Katz, E., & Bollella, P. (2020). Fuel cells and biofuel cells: From past to perspectives. *Israel Journal of Chemistry*, 61(1–2), 68–84. <https://doi.org/10.1002/ijch.202000039>
- [7] Bullen, R. A., Arnot, T. C., Lakeman, J. B., & Walsh, F. C. (2006). Biofuel cells and their development. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(11), 2015–2045. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.01.030>
- [8] Zebda, A., Cosnier, S., Alcaraz, J. P., Holzinger, M., Le Goff, A., & Gondran, C. (2018). Challenges for successful implantation of biofuel cells. *Bioelectrochemistry*, 124, 57–72. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.05.011>
- [9] Zebda, A., Innocent, C., Renaud, L., Cretin, M., Pichot, F., Ferrigno, R. & Tingry, S., 2011. Enzyme-Based Microfluidic Biofuel Cell to Generate Micropower. *InTech*. DOI: 10.5772/17190. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/221914250>
- [10] Luo, C., Xie, H., Wang, Q., Luo, G., & Liu, C. (2015). A review of the application and performance of carbon nanotubes in fuel cells. *Journal of Nanomaterials*, 2015, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/560392>

- [11] Inamuddin, et al. (2019). Enzymatic Fuel Cells: Materials and Applications. Materials Research Foundations. DOI: 10.21741/9781644900079.
- [12] Tavares, M. (2020). Development of a membraneless enzymatic glucose/O₂ biofuel cell based on pencil graphite transducers. Instituto Superior de Engenharia do Porto.
- [13] Basso, A., & Serban, S. (2019). Industrial applications of immobilized enzymes—A review. *Molecular Catalysis*, 479(110607), 2468-8231. DOI: 10.1016/j.mcat.2019.110607.
- [14] Schuhmann, W., Lammert, R., Uhe, B., Schmidt, H.-L, Polypyrrole, a new possibility for covalent binding of oxidoreductases to electrode surfaces as a base for stable biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1999. Vol. 1(1-6): p. 537-541. DOI: 10.1016/0925-4005(90)80268-5.
- [15] Al-Lolage, F. A., Meneghello, M., Ma, S., Ludwig, R., & Bartlett, P. N. (2017). A flexible method for the stable, covalent immobilization of enzymes at electrode surfaces. *ChemElectroChem*, 4(6), 1528–1534. <https://doi.org/10.1002/celec.201700135>
- [16] Microscopia IWM (2020) *Immobilization of Enzyme*. Disponível em: <https://microscopiaiwm.wordpress.com/2020/10/16/immobilization-of-enzyme/>
- [17] Silveira, C. M., Antunes, F. E., Faro, H. M., & Lopes, C. M. (2019). Star-shaped gold nanoparticles as friendly interfaces for protein electrochemistry: The case study of cytochrome c. *ChemElectroChem*, 6(17), 4696–4703. <https://doi.org/10.1002/celec.201901393>
- [18] Barsana, M.M., David, M., Florescu, M., Tugule, L., Brett, C.M.A., A new self-assembled layer-by-layer glucose biosensor based on chitosan biopolymer entrapped enzyme with nitrogen doped graphene. *Bioelectrochemistry*, 2014. Vol. 99: p. 46-52. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2014.06.004.
- [19] Dominguez-Benetton, X., et al. (2013). Enzymatic electrosynthesis: an overview on the progress in enzyme electrodes for the production of electricity, fuels and chemicals. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, Vol. S6(007), 1-20. DOI: 10.4172/1948-5948.S6-007.
- [20] Zhang, Y.-H.P., Myung, S., You, C., Zhu, Z., Rollin, J.A., Toward low-cost biomanufacturing through in vitro synthetic biology: bottom-up design. *Journal of Materials Chemistry*, 2011. Vol. 21(47): p. 18877-18886. DOI: 10.1039/C1JM12078F.

- [21] Hitaishi, V.P., et al. (2018). Controlling Redox Enzyme Orientation at Planar Electrodes. *Catalysts*, 8(5), 192. DOI: 10.3390/catal8050192.
- [22] Ensafi, A.A. (2019). *Electrochemical Biosensors*. Vol. 1. Elsevier. ISBN: 9780128164914.
- [23] Raval, J.P., Joshi, P., & Chejara, D.R. (2018). Carbon nanotube for targeted drug delivery. *Elsevier eBooks*, 203-216. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813741-3.00009-1>
- [24] Grabinski, C., Hussain, S., Lafdi, K., Braydich-Stolle, L., & Schlager, J. (2007). Effect of particle dimension on biocompatibility of carbon nanomaterials. *Carbon*, 45(14), 2828–2835. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2007.08.039>
- [25] Filchakova, M. (2021). Multi-walled carbon nanotubes. *Tuball*. <https://tuball.com/articles/multi-walled-carbon-nanotubes>
- [26] Zhang, Y., Liu, H., Yang, Z., Ji, S., Wang, J., Pang, P., Feng, L., Wang, H., Wu, Z., Yang, W., An acetylcholinesterase inhibition biosensor based on a reduced graphene oxide/silver nanocluster/chitosan nanocomposite for detection of organophosphorus pesticides. *Analytical Methods*, 2015. Vol. 7(15): p. 6213-6219. DOI: 10.1039/C5AY01439E.
- [27] Borchert, H. (2014). *Cyclic Voltammetry*. *Springer Series in Materials Science*, pp. 111–117. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-04388-3_7.
- [28] PalmSens (n.d.). Voltammogram. Disponível em: <https://www.palmsens.com/knowledgebase-article/voltammogram/>
- [29] Soares, E. (2021). *Cap 1 Biomoléculas*. moodle.isep.ipp.pt. Disponível em: [https://moodle.isep.ipp.pt/pluginfile.php/116472/mod_resource/content/1/Cap%201%20Bio moleculas.pdf](https://moodle.isep.ipp.pt/pluginfile.php/116472/mod_resource/content/1/Cap%201%20Bio%20moleculas.pdf)
- [30] Kelly, R. S. (2016). *II. Voltammetric Methods*. *Chemistry LibreTexts*. Disponível em: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Analytical_Sciences_Digital_Library/Courseware/Analytical_Electrochemistry%3A_The_Basic_Concepts/04_Voltammetric_Methods](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Analytical_Sciences_Digital_Library/Courseware/Analytical_Electrochemistry%3A_The_Basic_Concepts/04_Voltammetric_Methods)

[31] Felix, F. S., & Angnes, L. (2010). Fast and Accurate Analysis of Drugs Using Amperometry Associated With Flow Injection Analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(12), 4784-4804.
<https://doi.org/10.1002/jps.22192>

[32] Amine, A., & Mohammadi, H. (2020). *Amperometry*. Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/344218327_Amperometry

[33] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Pearson/Prentice Hall, 2005.

Anexos

A- Anexos referentes à caracterização do bioelétrodo BOx como biossensor de oxigênio

Tabela A1 – Intensidade de corrente consoante os níveis de concentração de O₂

Volume adicionado (μL)	Concentração de O₂ (mM)	I (μA)
0	0	-1,30E+00
400	0,0103	-1,97E+00
400	0,0206	-2,38E+00
400	0,0309	-2,63E+00
400	0,0412	-2,84E+00
400	0,0514	-3,07E+00
400	0,0617	-2,96E+00
400	0,072	-3,28E+00
400	0,0823	-3,34E+00
400	0,0926	-3,41E+00
400	0,103	-3,51E+00
400	0,1134	-3,43E+00
400	0,1237	-3,41E+00