



Desenvolvimento de uma célula de biocombustível enzimática de colesterol/O₂ feito em papel

MARIANA MONTEIRO LOPES

Julho de 2025

Desenvolvimento de uma célula de biocombustível enzimática de colesterol/O₂ feito em papel

Mariana Monteiro Lopes

**Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química, Área de Especialização em Energia e Biorrefinaria**

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.

Sumário

A crescente necessidade de soluções energéticas sustentáveis tem impulsionado a investigação no campo das células de biocombustível enzimáticas (EBFCs), dispositivos bioeletroquímicos que aliam a conversão de energia química em eletricidade à detecção seletiva de analitos fisiológicos. No presente trabalho, foi desenvolvido um protótipo de célula de biocombustível enzimática, construída sobre um substrato de papel modificado, com o objetivo de permitir a detecção seletiva do colesterol – um biomarcador de relevância clínica no diagnóstico e monitorização de doenças cardiovasculares.

A célula proposta assenta na utilização da enzima colesterol oxidase (ChOx) como biocatalisador no bioânodo e da bilirrubina oxidase (BOx) no biocátodo, integrando elétrodos serigrafados de ouro modificados com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) com e sem recurso a mediador redox de eletrões (tionina) e agentes de ligação para promover uma melhor imobilização e transferência de eletrões. A caracterização eletroquímica do bioânodo e biocátodo foi realizada como biossensores para colesterol e oxigénio respetivamente através das técnicas de voltametria cíclica e de amperometria, permitindo avaliar a eficiência da transferência eletrónica, a sensibilidade do sistema à presença de cada substrato

A célula de biocombustível colesterol/O₂ foi depois caracterizada pela conjugação do bioânodo e biocátodo através de voltametria de varrimento linear obtendo-se as curvas de polarização e consequentemente de potência. O potencial de circuito aberto (OCP) da célula de biocombustível atingiu um valor de 0,36 V e uma potencia máxima de 0,41 μW antevendo-se o seu potencial uso como biossensor energeticamente autoalimentado para determinação de colesterol.

Este sistema é promissor para aplicações biomédicas portáteis, como a monitorização não invasiva de biomarcadores, uma vez que incorpora materiais com baixo custo e alto desempenho em transdutores mais sustentáveis.

O potencial das EBFC como ferramentas analíticas inovadoras e energeticamente autónomas é reforçado por este estudo, o que promove tecnologias bioeletroquímicas sustentáveis.

Palavras-chave: Célula de biocombustível enzimática, colesterol, biossensor eletroquímico, elétrodo, nanotubos de carbono, transferência eletrónica direta

Abstract

The growing demand for sustainable energy solutions has driven research in the field of enzymatic biofuel cells (EBFCs), bioelectrochemical devices that combine the conversion of chemical energy into electricity with the selective detection of physiological analytes. In the present work, an enzymatic biofuel cell prototype was developed on a modified paper substrate, aimed at enabling the selective detection of cholesterol—a clinically relevant biomarker for the diagnosis and monitoring of cardiovascular diseases.

The proposed cell is based on the use of the enzyme cholesterol oxidase (ChOx) as the biocatalyst at the bioanode and bilirubin oxidase (BOx) at the biocathode, incorporating screen-printed gold electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs), with and without the use of an electron transfer mediator (thionine) and binding agents to promote improved enzyme immobilization and electron transfer. Electrochemical characterization of the bioanode and biocathode as biosensors for cholesterol and oxygen, respectively, was carried out using cyclic voltammetry and amperometry techniques, allowing the evaluation of electron transfer efficiency and system sensitivity to each substrate.

The cholesterol/O₂ biofuel cell was subsequently characterized by combining the bioanode and biocathode through linear sweep voltammetry, yielding polarization and corresponding power curves. The open circuit potential (OCP) of the biofuel cell reached 0.36 V, with a maximum power output of 0.41 μW, indicating its potential as a self-powered biosensor for cholesterol determination.

This system shows promise for portable biomedical applications, such as non-invasive biomarker monitoring, as it incorporates low-cost, high-performance materials in more sustainable transducers.

The potential of EBFCs as innovative and energy-autonomous analytical tools is reinforced by this study, promoting the development of sustainable bioelectrochemical technologies.

Keywords: Enzymatic biofuel cell, cholesterol, electrochemical biosensor, electrode, carbon nanotubes, direct electron transfer

Agradecimentos

Ao concluir esta dissertação, não posso deixar de expressar a minha gratidão a todos os que, de diferentes formas, contribuíram para a sua concretização.

Aos meus orientadores, Doutora Simone Morais e Doutor Álvaro Torrinha, expresso o meu profundo agradecimento pela orientação rigorosa, pela disponibilidade constante e pelo acompanhamento atento ao longo de todas as fases deste trabalho. O seu contributo foi decisivo para a realização desta dissertação.

Ao Instituto Superior de Engenharia do Porto, pelo ensino exigente e pela formação sólida que me proporcionou ao longo do meu percurso académico.

A todos os docentes, colegas e técnicos com quem tive oportunidade de aprender e colaborar, deixo também o meu reconhecimento.

À minha família, um agradecimento profundo pelo apoio constante, pelo incentivo nos momentos difíceis e pela confiança inabalável ao longo de todo este caminho.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Enquadramento	1
1.2. Células de Biocombustível	3
1.2.1. História e Evolução das Células de Biocombustível.....	3
1.2.2. Princípios de Funcionamento	5
1.2.3. Papel das Enzimas e Microrganismos	7
1.2.4. Fatores que Influenciam o Desempenho das Células de Biocombustível	9
1.2.5. Componentes das Células de Biocombustível.....	10
1.2.6. Aplicações das Células de Biocombustível.....	14
1.3. Células de Biocombustível Enzimáticas.....	18
1.3.1. Princípios de Funcionamento das Células de Biocombustível Enzimáticas.....	19
1.3.2. Materiais Utilizados nas Células de Biocombustíveis Enzimáticas e Imobilização de enzimas.....	22
1.3.3. Aplicações das Células de Biocombustível Enzimáticas	25
1.3.4. Estado da Arte das Células de Biocombustível Enzimáticas para a Detecção de Colesterol	27
1.4. Técnicas Eletroquímicas.....	30
1.4.1. Configuração Eletroquímica e Escolha dos Eléttodos	30
1.4.2. Voltametria Cíclica	32
1.4.3. Amperometria.....	36
1.5. Organização da dissertação	38
2. Objetivos	39
3. Parte Experimental	41
3.1. Reagentes, Materiais, Soluções e Instrumentação	41
3.2. Preparação dos eléctrodos.....	42
3.3. Preparação do bioeléttrodo ChOx.....	43
3.4. Preparação do bioeléttrodo BOx.....	44
3.5. Preparação da célula de biocombustível colesterol/O ₂	46
4. Resultados e Discussão.....	47
4.1. Caracterização eletroquímica do eléctrodo de papel	47
4.2. Caracterização do bioânodo como biossensor para o colesterol	48
4.2.1. Tionina como mediador	48
4.2.2. Sem mediador.....	52

4.3.	Caracterização do biocátodo como biossensor para o oxigénio	56
4.4.	Caracterização da célula de biocombustível colesterol/O ₂	60
5.	Conclusão	65
	Referências	67
	Anexo A	77
	Anexo B	78

Lista de Figuras

Figura 1. Evolução da Geração de Eletricidade por Fontes Renováveis (2000-2025) (Blog, 2024).	1
Figura 2. Evolução histórica das células de biocombustível (Song, Y. and Wang, C., 2019).	5
Figura 3. Esquema de funcionamento de uma célula de biocombustível enzimática (Nasar, A. and Perveen, R., 2019).....	8
Figura 4. Esquema de uma célula de biocombustível microbiana fotossintética (Gamachis Korsia et al., 2025).....	9
Figura 5. Esquema dos componentes de uma célula de biocombustível (Zhou et al., 2023)....	14
Figura 6. Exemplos de dispositivos médicos implantáveis e portáteis, incluindo neuro estimuladores, bombas de insulina, marca-passos e implantes sensoriais, que poderiam beneficiar da integração de células de biocombustível como fonte de energia sustentável (Katz and Bollell, 2020).	15
Figura 7. Célula de combustível microbiana para a produção de bioeletricidade a partir de diferentes fontes de resíduos (Hoang et al., 2022).	16
Figura 8. Dispositivo eletrônico portátil equipado com células de biocombustível miniaturizadas (Ces.tech, 2025).	17
Figura 9. Representação esquemática de um “gastrobot” (Usf.edu, 2025).....	18
Figura 10. Exemplo esquemático de uma célula de biocombustível enzimática (Xiao, 2021)...	19
Figura 11. (A) Biossensor de colesterol (bioânodo) e (B) biocátodo redutor de O ₂ acoplados numa configuração de célula de combustível enzimática. (del Barrio et al., 2022).....	20
Figura 12. Representação esquemática dos dois mecanismos principais de transferência eletrônica nas EBFCs. À esquerda, a Transferência Eletrônica Direta (DET) e à direita a Transferência Eletrônica Mediada (MET) (Eman Serag, Azza El-Maghraby and Nemr, 2021). ..	22
Figura 13. Representação de nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT) (Ossila, n.d.).	24
Figura 14. (a) Desenho esquemático da montagem de um patch de iontoforese transdérmica baseado num EBFC de frutose/O ₂ . (b) Foto digital do patch montado num ser humano e um esquema do mecanismo de administração do medicamento. (Xiao, 2021).....	25
Figura 15. Biossensores de autopotência vestível capaz de detetar o lactato ou a glicose no suor. (Suntisak Khumngern and Itthipon Jeerapan, 2024).....	26
Figura 16. O primeiro protótipo de um biossensor autossustentável vestível (Wang et al., 2021).....	27
Figura 17. Representação de uma célula eletroquímica) (Anon, n.d.).....	31
Figura 18. Exemplo de um voltamograma para uma espécie (PalmSens, n.d.).....	34
Figura 19. Eléttodos de papel serigrafados com ouro/prata antes (imagem da esquerda) e após deposição de MWCNT (imagem da direita).	42
Figura 20. Eléttodos serigrafados durante o processo de secagem da dispersão de MWCNT (em DMF) sob lâmpada de aquecimento infravermelha.	43
Figura 21. Bioeléttodos modificados durante o período de incubação com a enzima colesterol oxidase (ChOx), sob atmosfera húmida e protegidos da luz.	44
Figura 22. Bioeléttodos modificados durante o período de incubação com a enzima bilirrubina oxidase (BOx), sob atmosfera húmida e protegidos da luz.	45
Figura 23. Representação esquemática da célula de biocombustível.	46

Figura 24. Voltamogramas cíclicos obtidos para os elétrodos de papel com ouro (papel(Au)) e modificados com MWCNT (papel(Au)/MWCNT), em 5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. A análise foi realizada a velocidade de varrimento de 50 mV/s.....	47
Figura 25. Voltamogramas cíclicos do bioelétrodo com tionina (papel(Au)/MWCNT/tionina/ChOx) registados na ausência (linha azul) e presença (linha laranja) de colesterol (5 mM) em PBS 0,1 M (pH 7,3).....	49
Figura 26. Resposta amperométrica do bioelétrodo papel(Au)/MWCNT/tionina/ChOx, após sucessivas adições de colesterol em 0,1 M PBS pH 7,3, sob potencial aplicado constante de +0,6V.....	50
Figura 27. Curva de calibração do bioelétrodo papel(Au)/MWCNT/tionina/Chox para colesterol, obtida a partir da resposta amperométrica para diferentes concentrações de colesterol.	51
Figura 28. Voltamogramas cíclicos do bioelétrodo papel(Au)/MWCNT/ChOx registados na ausência (linha laranja) e presença de colesterol 5 mM (linha azul) em PBS 0,1 M (pH 7,3). Velocidade de varrimento: 10 mV/s.....	53
Figura 29. Resposta amperométrica do bioelétrodo papel(Au)/MWCNT/ChOx, após sucessivas adições de colesterol em PBS 0,1 M pH 7,3), sob potencial aplicado constante de +0,6V.....	54
Figura 30. Curva de calibração do biossensor enzimático para colesterol obtida a partir da resposta amperométrica a diferentes concentrações de analito.	55
Figura 31. Voltamogramas cíclicos do bioelétrodo papel(Au)/MWCNT/PBSE/BOx registados na ausência (linha azul) e presença (linha laranja) de oxigénio em PBS 0,1 M (pH 7,3). Velocidade de varrimento: 10 mV/s.	56
Figura 32. Resposta amperométrica do bioelétrodo papel(Au)/MWCNT/PBSE/BOx, após sucessivas adições de oxigénio, sob potencial aplicado constante de 0V, a) sem e b) com ajuste da escala da corrente.	58
Figura 33. Curva de calibração do biossensor enzimático para o oxigénio, obtida a partir da resposta amperométrica a diferentes concentrações de analito.	59
Figura 34. Curvas de polarização célula de biocombustível enzimática Colesterol/ O_2 , na ausência (0 mM) e na presença (0,5 mM) de colesterol e com oxigénio dissolvido naturalmente no eletrólito. Velocidade de varrimento: 1 mV/s.	61
Figura 35. Curvas de potência (P) em função da corrente (i) para a célula de biocombustível Colesterol/ O_2 , na ausência (0 mM) e na presença de 0,5 mM de colesterol.....	62
Figura B1. Voltamogramas cíclicos obtidos para o elétrodo modificado com tionina ao longo de 25 ciclos sucessivos.	78

Lista de Tabelas

Tabela 1. Estudos sobre EBFC para Detecção de Colesterol.	28
Tabela 2. Comparação entre a voltametria cíclica e a amperometria.	37

Acrónimos e Símbolos

A	Área do eléctrodo de trabalho (cm^2)
BFCs	Células de biocombustível
BOx	Bilirubina oxidase
C_0	Concentração do analito (mol cm^{-3})
ChDH	Colesterol desidrogenase
ChOx	Colesterol oxidase
CNTs	Nanotubos de carbono
DET	Transferência eletrónica direta
DMF	N,N-dimetilformamida
D_0	Coefficiente de difusão da espécie eletroativa ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)
EA	Eléctrodo auxiliar
E	Potencial eletroquímico
E^0	Potencial padrão
EBFCs	Células de biocombustível enzimáticas
ER	Eléctrodo de referência
ET	Eléctrodo de trabalho
F	Constante de Faraday (C mol^{-1})
I	Corrente eléctrica (A)
i_p	Corrente de pico
LOD	Limite de deteção
MFCs	Células de biocombustível microbianas
MET	Transferência eletrónica mediada

MWCNT	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas
<i>n</i>	Número de eletrões envolvidos na reação
OCP	Potencial de circuito aberto
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PBSE	Éster succinimidil do ácido 1-pirenilbutanoico
R	Constante dos gases perfeitos ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)
Red	Forma reduzida da espécie
SCE	Eléctrodo de calomelano saturado
SHE	Eléctrodo de hidrogénio padrão
SWCNT	Nanotubos de carbono de parede simples
T	Temperatura absoluta (K)
<i>v</i>	Velocidade de varrimento (mV/s)
VC	Voltametria Cíclica

1. Introdução

1.1. Enquadramento

A transição para fontes de energia sustentáveis tornou-se uma prioridade global, dada a crescente preocupação com os impactos ambientais, sociais e económicos associados ao uso predominante de combustíveis fósseis. O atual modelo de produção e consumo energético é insustentável a longo prazo, contribuindo significativamente para a emissão de gases de efeito estufa e para a intensificação das mudanças climáticas. Assim, a procura por alternativas limpas e eficientes tem sido um dos desafios mais prementes enfrentados pela comunidade científica e pelos responsáveis pela formulação de políticas energéticas ([Grubler, A., 2012](#); [Araújo, K., 2014](#); [Gatto, A., 2022](#)).

Nas últimas décadas, a adoção de fontes de energia sustentáveis tem acelerado, resultando num aumento substancial da participação das energias renováveis na matriz elétrica global. Conforme ilustrado na Figura 1, as energias renováveis, como a energia solar e eólica, têm mostrado um crescimento notável e a tendência é de continuidade desse crescimento. Estas fontes limpas têm sido fundamentais para reduzir a dependência de combustíveis fósseis e contribuir para os objetivos globais de descarbonização do setor energético. A utilização dessas fontes está alinhada com os esforços globais para mitigar os impactos das mudanças climáticas e promover um futuro energético mais sustentável ([Gatto, A., 2022](#); [Sovacool, B.K., 2016](#); [Berkhout, F. et al, 2012](#)).

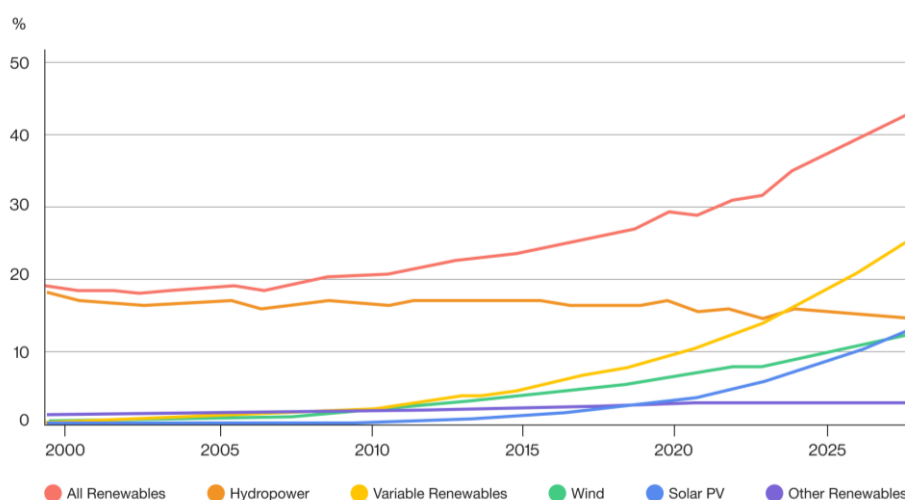


Figura 1. Evolução da Geração de Eletricidade por Fontes Renováveis (2000-2025) ([Blog, 2024](#)).

Entre as alternativas inovadoras para a produção de energia, as células de combustível têm se destacado como uma tecnologia promissora para suprir a crescente procura energética sem comprometer o meio ambiente. Tradicionalmente, as células de combustível baseiam-se na utilização de catalisadores metálicos para promover reações eletroquímicas que convertem a energia química de um combustível, como por exemplo o hidrogénio, diretamente em eletricidade. No entanto, desafios como o elevado custo dos materiais e a necessidade de membranas seletivas têm impulsionado pesquisas para o desenvolvimento de sistemas mais acessíveis e sustentáveis ([Mexicana De Física, S. and México Cano-Castillo, A., n.d.](#)).

Neste contexto, as células de biocombustível surgem como uma alternativa inovadora, utilizando enzimas ou microrganismos como catalisadores para a conversão de substratos orgânicos em energia elétrica. As células de biocombustível enzimáticas, em particular, têm despertado grande interesse devido à sua especificidade catalítica e ao potencial para miniaturização. Estas células eliminam a necessidade de membranas separadoras e podem operar utilizando substratos presentes em fluidos biológicos, como a glicose, o que as torna promissoras para aplicações biomédicas, incluindo dispositivos implantáveis ([Leech, D, et al., 2012](#)).

Apesar das vantagens oferecidas pelas células de biocombustível enzimáticas, existem diversos desafios que ainda precisam ser superados para que esta tecnologia possa ser amplamente implementada. A estabilidade das enzimas ao longo do tempo, a eficiência na transferência de elétrons entre os eletrodos e a produção de potência suficiente para alimentar dispositivos são algumas das questões que continuam a ser objeto de investigação. Além disso, a otimização de materiais para a imobilização enzimática e a integração destas células com sistemas de armazenamento de energia são aspetos cruciais para sua viabilidade prática ([Mexicana De Física, S. and México Cano-Castillo, A., n.d.](#); [Leech, D, et al., 2012](#)).

Diante da necessidade urgente de soluções energéticas sustentáveis, as células de biocombustível representam uma abordagem inovadora com aplicações potenciais em diversas áreas, desde a geração distribuída de energia até a alimentação de dispositivos eletrônicos portáteis e implantes biomédicos. O desenvolvimento desta tecnologia está alinhado com os objetivos de sustentabilidade e descarbonização da matriz energética global, contribuindo para um futuro mais limpo e eficiente ([Hart, D., 2000](#)).

1.2. Células de Biocombustível

A crescente necessidade de fontes de energia sustentáveis e ambientalmente responsáveis tem impulsionado o desenvolvimento de novas tecnologias eletroquímicas para a conversão energética. Neste contexto, as células de biocombustível, ou *biofuel cells* (BFCs), surgem como uma alternativa promissora, permitindo a conversão direta da energia química de substratos orgânicos em eletricidade através de reações bioeletroquímicas catalisadas por biocatalisadores, como enzimas ou microrganismos.

Ao contrário das células de combustível convencionais, que utilizam metais preciosos como catalisadores, as células de biocombustível empregam sistemas biológicos para promover a oxidação dos combustíveis. Esta abordagem biotecnológica oferece vantagens como biocompatibilidade e operação em condições amenas, tornando essas células promissoras para aplicações biomédicas e ambientais. Além da biocompatibilidade, estas células operam sob condições amenas de temperatura e pH, o que amplia o seu potencial de aplicação em dispositivos implantáveis, sensores bioeletrônicos e sistemas de conversão energética sustentáveis.

Apesar do interesse crescente e das vantagens inerentes à sua concepção, o desenvolvimento das células de biocombustível enfrenta desafios técnicos como a baixa eficiência da transferência eletrônica entre os biocatalisadores e os eletrodos, a degradação enzimática ao longo do tempo e a competitividade econômica em relação a tecnologias convencionais. A evolução destas células ao longo das últimas décadas reflete avanços significativos na bioeletroquímica, na engenharia de materiais e na biotecnologia, abrindo caminho para novas aplicações e aprimoramentos tecnológicos ([Dong, 2024](#); [Tayhas, G. et al., n.d.](#); [Davis, F. and Higson, S.P.J., 2007](#)).

1.2.1. História e Evolução das Células de Biocombustível

A relação entre sistemas biológicos e eletricidade foi observada pela primeira vez no final do século XVIII, quando Luigi Galvani demonstrou que impulsos elétricos podiam induzir contrações musculares em tecidos biológicos, estabelecendo as bases do estudo da bioeletricidade. No entanto, a conversão direta de energia bioquímica em eletricidade só foi demonstrada experimentalmente no início do século XX.

Em 1910, o microbiologista inglês M. C. Potter realizou as primeiras experiências documentadas sobre a geração de eletricidade a partir da oxidação biológica de substratos orgânicos. Utilizando bactérias do gênero *Escherichia coli*, Potter demonstrou que a atividade metabólica microbiana poderia ser explorada para a conversão de energia química em energia elétrica, embora as densidades de corrente obtidas fossem extremamente baixas para aplicações práticas.

Na década de 1930, B. Cohen expandiu esses estudos ao conectar múltiplas células de biocombustível microbianas em série, alcançando tensões superiores a 35 V. Cohen conectou múltiplas células em série, obtendo tensões superiores a 35 V, embora com correntes extremamente baixas. Estes avanços, embora promissores, não foram imediatamente explorados para aplicações tecnológicas, devido às limitações dos elétrodos e à ineficiência da transferência eletrônica entre os microrganismos e os elétrodos.

O interesse pelas células de biocombustível ressurgiu na segunda metade do século XX, impulsionado pelos programas espaciais norte-americanos, que investigaram o potencial destas células como uma tecnologia para a conversão de resíduos orgânicos em energia elétrica em missões espaciais de longa duração. Simultaneamente, avanços na bioeletroquímica permitiram o desenvolvimento das primeiras células de biocombustível enzimáticas, nas quais enzimas purificadas substituíram microrganismos inteiros como catalisadores das reações bioeletroquímicas.

Na década de 1960, pesquisas sobre células de biocombustível enzimáticas começaram a ganhar relevância no contexto biomédico, com investigações focadas na utilização desses dispositivos como fontes de energia para equipamentos médicos implantáveis, incluindo marca-passos e biossensores. O uso de enzimas específicas para catalisar reações redox proporcionou maior seletividade na conversão energética, embora a estabilidade dos biocatalisadores permanecesse um desafio significativo.

Nas últimas décadas, o avanço da nanotecnologia, da engenharia genética e do design de elétrodos tem contribuído para o aprimoramento das células de biocombustível, aumentando sua eficiência e ampliando as suas possíveis aplicações. Pesquisas recentes têm explorado novos materiais para elétrodos biocompatíveis, estratégias de imobilização de enzimas e técnicas de engenharia de microrganismos para otimizar a produção de eletricidade a partir de substratos renováveis.

Embora ainda existam desafios a serem superados, as células de biocombustível representam uma tecnologia emergente com potencial para aplicações biomédicas, ambientais e energéticas, refletindo um avanço significativo na interface entre biotecnologia e eletroquímica ([Davis, F. and Higson, S.P.J., 2007](#); [Bullen, R.A., 2006](#)).

A Figura 2 apresenta uma linha de tempo com os principais avanços no desenvolvimento das células de biocombustível, desde a descoberta da bioeletricidade por Galvani até aos mais recentes avanços na nanotecnologia e na eficiência energética.

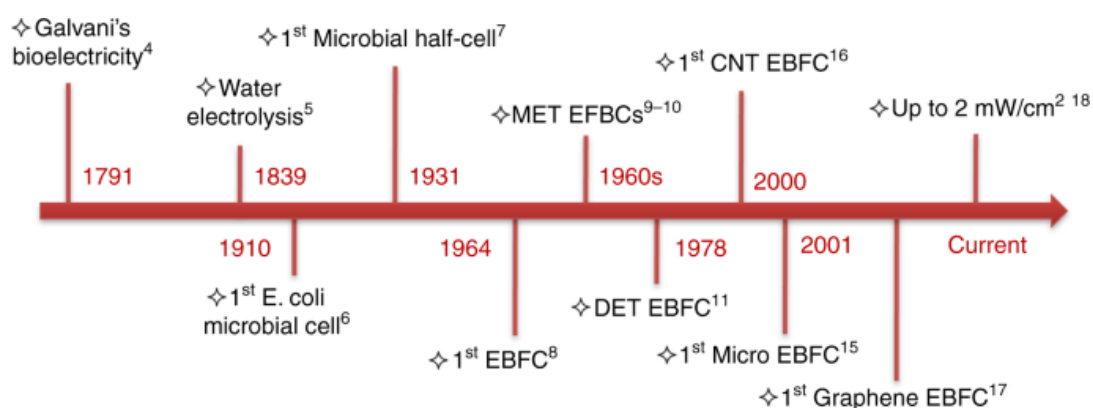


Figura 2. Evolução histórica das células de biocombustível ([Song, Y. and Wang, C., 2019](#)).

1.2.2. Princípios de Funcionamento

A evolução histórica das células de biocombustível reflete avanços significativos na bioeletroquímica e na engenharia de materiais. Para compreender melhor o funcionamento destas células, é essencial analisar os seus princípios básicos de operação.

As células de biocombustível, ou *biofuel cells* (BFCs), são dispositivos bioeletroquímicos que convertem a energia química de substratos orgânicos diretamente em energia elétrica através de reações de oxidação e redução. O seu princípio de funcionamento é semelhante ao das células de combustível convencionais, contudo, distinguem-se pelo uso de biocatalisadores, como enzimas ou microrganismos, em vez de catalisadores metálicos, como a platina ([Dong, 2024](#); [Davis, F. and Higson, S.P.J., 2007](#); [Kižys, K. et al., 2023](#)).

O processo ocorre em duas semirreações eletroquímicas:

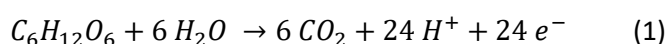
- No ânodo, o substrato orgânico é oxidado por biocatalisadores (enzimas ou microrganismos), liberando elétrons e íons H^+ .
- Os elétrons percorrem um circuito externo, gerando corrente elétrica utilizável.
- Os íons H^+ migram através do eletrólito para o cátodo, onde ocorre a redução do oxidante (normalmente oxigênio), formando água ou outros subprodutos.

Uma das principais vantagens das células de biocombustível reside na sua capacidade de operar em condições amenas, como temperatura ambiente e pH fisiológico, tornando-as ideais para aplicações biomédicas, ambientais e energéticas.

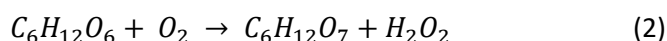
Assim, de uma forma resumida, o funcionamento das células de biocombustível baseia-se em reações redox, que envolvem a transferência de elétrons entre um dador de elétrons (substrato) e um aceitador final (normalmente oxigênio) ([Kižys, K. et al., 2023](#); [Srinithya Ravinuthala and Das, S.P., 2022](#)).

Reação no ânodo/bioânodo (oxidação da glicose):

A glicose, um dos substratos mais estudados, sofrendo oxidação e gerando elétrons, prótons e um subproduto. Num transdutor inorgânico, a reação de oxidação da glicose no ânodo é a seguinte:



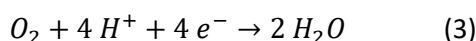
Contudo, utilizando uma enzima imobilizada no ânodo (bioânodo) a reação muda completamente e de acordo com o tipo de enzima usada e o possível uso de mediadores de elétrons. Por exemplo, considerando a enzima glucose oxidase, a reação de conversão da glicose é a seguinte:



Ocorrendo depois o processamento do peróxido de hidrogênio.

Reação no cátodo (redução do oxigênio):

O cátodo recebe os elétrons gerados no ânodo convertendo depois um oxidante, por exemplo, o oxigênio, sendo a reação global igual quer seja por via de enzimas ou não:



A combinação destas reações resulta na conversão direta da energia química armazenada na biomolécula em energia elétrica, sem necessidade de combustão ou conversão térmica intermediária.

Outros substratos são passíveis de serem catalisados sendo a escolha do substrato dependente da aplicação pretendida, da eficiência da oxidação e da seletividade do biocatalisador utilizado. ([Dong, 2024](#); [Kizys, K. et al., 2023](#); [Srinithya Ravinuthala and Das, S.P., 2022](#)).

1.2.3. Papel das Enzimas e Microrganismos

A eficiência das células de biocombustível está diretamente relacionada ao tipo de biocatalisador utilizado. Com base nisso, as células de biocombustível são classificadas em enzimáticas ou microbianas, dependendo da natureza do catalisador biológico:

1.2.3.1. Células de Biocombustível Enzimáticas

Nas células de biocombustível enzimáticas, enzimas isoladas catalisam as reações redox, permitindo uma conversão eficiente de energia química em energia elétrica. Estas células apresentam:

- Alta seletividade catalítica, pois cada enzima é específica para um substrato.
- Operação sob condições fisiológicas suaves, como temperatura e pH moderados.
- Potencial aplicação em dispositivos biomédicos, como sensores implantáveis para monitorização de glicose no sangue.

No entanto, as principais limitações destas células incluem a instabilidade das enzimas, que podem sofrer desnaturação, e a necessidade de técnicas de imobilização enzimática para prolongar sua atividade catalítica ([Wang et al., 2025](#); [Chakraborty et al., 2024](#); [Nasar, A. and Perveen, R., 2019](#)).

A Figura 3 ilustra o princípio de funcionamento das células de biocombustível enzimáticas.

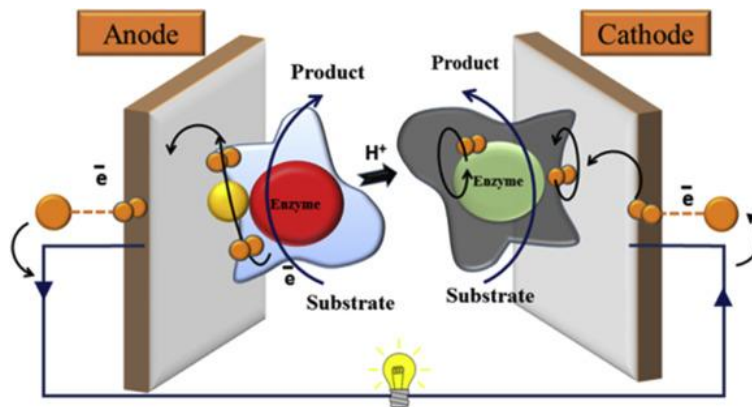


Figura 3. Esquema de funcionamento de uma célula de biocombustível enzimática (Nasar, A. and Perveen, R., 2019).

1.2.3.2. Células de Biocombustível Microbianas

Nas células de biocombustível microbianas, microrganismos vivos, como bactérias ou leveduras, oxidam substratos orgânicos e transferem elétrons para o ânodo. Estas células são particularmente interessantes para:

- Tratamento de efluentes, pois degradam a matéria orgânica enquanto geram eletricidade.
- Utilização de substratos complexos, como resíduos agroindustriais e esgotos.
- Aplicações ambientais e energéticas, convertendo biomassa em eletricidade sustentável.

Os microrganismos podem transferir elétrons para o ânodo por três mecanismos principais:

- **Transferência direta** – Quando as bactérias possuem proteínas condutoras que fazem contato direto com o ânodo.
- **Mediadores redox** – Algumas bactérias excretam moléculas como flavinas ou quinonas, que transportam elétrons para o ânodo.
- **Nanofios bacterianos** – Certos microrganismos, como *Geobacter* e *Shewanella*, desenvolvem estruturas condutoras que funcionam como "fios elétricos" naturais.

Os desafios associados às MFCs incluem baixa densidade de potência, necessidade de eletrodos otimizados e a lenta transferência de elétrons, que afeta a eficiência global do sistema (Yamashita, T. and Yokoyama, H., 2018; Xie, R. et al., 2022; Gamachis Korsá et al., 2025).

A Figura 4 apresenta o princípio de funcionamento das células de biocombustível microbianas fotossintéticas.

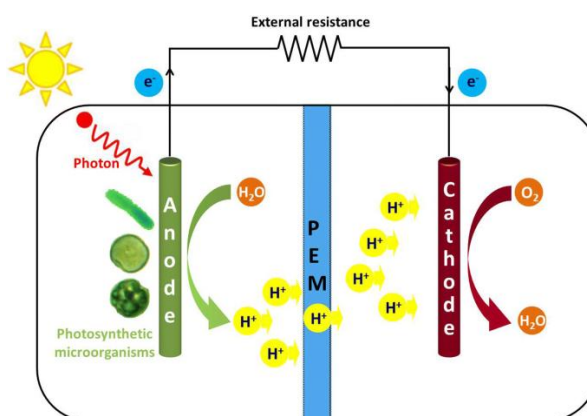


Figura 4. Esquema de uma célula de biocombustível microbiana fotossintética (Gamachis Korsá et al., 2025).

1.2.4. Fatores que Influenciam o Desempenho das Células de Biocombustível

A eficiência das células de biocombustível é influenciada por vários fatores, incluindo:

- **Tipo e Concentração do Substrato**

A natureza do substrato afeta diretamente a densidade de potência gerada. Substratos como a glicose apresentam elevado rendimento energético, enquanto compostos mais complexos podem necessitar de reações adicionais para a sua degradação completa.

- **Tipo de Biocatalisador**

As enzimas apresentam alta seletividade, mas são instáveis. Os microrganismos por sua vez são robustos, mas podem ter uma taxa de transferência de elétrons inferior e não são tão seletivos.

- **Material dos Eléttodos**

Os eléttodos devem ter alta condutividade elétrica, ser biocompatíveis e permitir uma boa adsorção dos biocatalisadores. Materiais como carbono poroso, nanotubos de carbono e óxidos metálicos são frequentemente investigados.

- **Transferência Eletrônica**

A eficiência da célula de biocombustível depende da rapidez com que os elétrões são transferidos do substrato para o ânodo. Melhorias na engenharia dos eléttodos e no design de mediadores redox podem otimizar este processo ([Dong, 2024](#); [Tayhas, G. et al., n.d.](#); [Davis, F. and Higson, S.P.J., 2007](#); [Srinithya Ravinuthala and Das, S.P., 2022](#)).

1.2.5. Componentes das Células de Biocombustível

O desempenho e a eficiência das células de biocombustível dependem diretamente da otimização dos seus componentes estruturais, nomeadamente o ânodo, o cátodo, o eletrólito e os materiais dos eléttodos. Cada um destes elementos desempenha um papel fundamental na facilitação das reações bioeletroquímicas, influenciando a densidade de potência, a estabilidade do sistema e a viabilidade da aplicação ([Inamuddin et al., n.d.](#)). A célula de biocombustível poderá ou não ser compartimentalizada dependendo da especificidade dos biocatalisadores. Células de biocombustível enzimáticas, normalmente não necessitam de separação entre bioânodo e biocátodo dado a alta especificidade pelos substratos enzimáticos presentes em solução, simplificando o sistema.

- **Ânodo**

O ânodo é o eléttodo onde ocorre a oxidação do substrato, permitindo a libertação de elétrões e prótões. Nas células de biocombustível enzimáticas, esta reação é catalisada por enzimas específicas, como oxidases e desidrogenases, enquanto nas células de biocombustível microbianas, os elétrões são transferidos por microrganismos eletroativos ([Chen et al., 2025](#); [Yamashita and Yokoyama, 2018](#)).

Para garantir um desempenho adequado, o material do ânodo deve apresentar:

- **Elevada condutividade elétrica**, permitindo a rápida transferência dos eletrões para o circuito externo.
- **Elevada área superficial**, aumentando a zona de contacto entre o substrato e a enzima/microrganismo.
- **Estabilidade química e biocompatibilidade**, evitando degradação e garantindo interações eficazes com os biocatalisadores.

Materiais utilizados no ânodo:

Os materiais mais comuns utilizados na construção do ânodo incluem:

- **Carbono poroso e carbono ativado** – apresentam elevada área superficial e boas propriedades eletroquímicas. Compostos maioritariamente por carbono, um elemento abundante e relativamente barato.
- **Nanotubos de carbono e grafeno** – Apresentam alta área de superfície, permitindo maior condutividade e facilitam a adsorção das enzimas. Também constituídos por carbono embora a sua síntese possa ser mais complexa/morosa.
- **Óxidos metálicos condutores (como óxido de titânio ou óxido de índio e estanho – ITO)** – utilizados em sistemas onde se pretende uma melhor interação entre as enzimas e o eléctrodo. Apresentam propriedades condutoras/semicondutoras.

O desempenho do ânodo também pode ser melhorado através da funcionalização da sua superfície, utilizando modificadores químicos ou polímeros condutores para otimizar a imobilização das enzimas e maximizar a transferência eletrónica ([Chen et al., 2025](#); [Yamashita and Yokoyama, 2018](#)).

- **Cátodo**

O cátodo é o eléctrodo onde ocorre a redução do oxidante, geralmente oxigénio molecular dissolvido, formando água ou peróxido de hidrogénio como produto final. A eficiência desta reação é fundamental para a densidade de potência da célula de biocombustível, pois qualquer limitação na redução do oxigénio pode comprometer o desempenho global do sistema.

Nas células de biocombustível enzimáticas, a redução do oxigênio é frequentemente catalisada por enzimas redox, como a lacase ou a bilirrubina oxidase, que possuem elevada seletividade e permitem a conversão direta do oxigênio em água ([Evans, et al., 2021](#); [Wang, Ma and Cheng, 2025](#)).

- **Materiais utilizados no cátodo**

Os materiais do cátodo devem permitir uma eficiente transferência de elétrons e otimizar a interação com o oxigênio. Alguns exemplos incluem:

- **Nanomateriais de carbono** – proporcionam uma boa área de superfície, ideal para imobilização das enzimas, possuindo as propriedades acima descritas.
- **Nanopartículas metálicas (como ouro ou platina)** – utilizadas em algumas configurações para aumentar a cinética da reação. Metais preciosos como platina são usuais por serem altamente eficientes na redução do oxigênio uma vez que esse potencial é alto (mais positivo). Normalmente as enzimas são bons substitutos da platina.
- **Polímeros condutores** – como a polianilina e o polipirrol, que ajudam na imobilização enzimática e na estabilidade do eletrodo.

Em algumas células de biocombustível microbianas, podem ser utilizados microrganismos eletroativos no cátodo, possibilitando a conversão de poluentes em eletricidade, tornando o sistema ainda mais sustentável água ([Evans, et al., 2021](#); [Wang, Ma and Cheng, 2025](#)).

- **Eletrólito**

O eletrólito é o meio condutor responsável pelo transporte de íões (normalmente H^+ ou OH^-) entre o ânodo e o cátodo, completando o circuito elétrico. A escolha do eletrólito é crucial para a estabilidade e eficiência da célula de biocombustível, influenciando a resistência interna do sistema.

Os eletrólitos podem ser classificados em dois tipos principais:

- **Soluções aquosas** – contendo tampões biológicos (como PBS -tampão fosfato ou tampão de McIlvaine), garantindo condições estáveis para a atividade enzimática.
- **Membranas de troca protónica** – semelhantes às utilizadas em células de combustível convencionais, permitem um transporte eficiente de iões H^+ enquanto evitam a mistura entre os reagentes do ânodo e do cátodo.

A otimização do eletrólito visa reduzir a resistência interna da célula de biocombustível, melhorando a migração dos iões e minimizando perdas de energia ([Montazersadgh et al., 2020](#); [Xie et al., 2022](#)).

Resumidamente, os componentes estruturais das células de biocombustível desempenham um papel crítico no seu desempenho e estabilidade. O ânodo e o cátodo são os locais onde ocorrem as reações de oxidação e redução, respetivamente, enquanto o eletrólito assegura a migração dos iões entre os elétrodos. A escolha dos materiais dos elétrodos é fundamental para garantir condutividade, biocompatibilidade e eficiência na transferência eletrónica ([Pandey, 2019](#); [Sharikova et al., 2023](#)).

Com o avanço da nanotecnologia e da bioengenharia, novas estratégias têm sido desenvolvidas para otimizar a performance das células de biocombustível, melhorando a imobilização dos biocatalisadores e reduzindo as limitações associadas à estabilidade enzimática e à resistência interna do sistema. Estes desenvolvimentos são cruciais para a viabilidade da tecnologia em aplicações biomédicas, ambientais e de geração de energia sustentável.

A Figura 5 ilustra a estrutura e o funcionamento de uma célula de biocombustível, destacando os seus principais componentes, incluindo o ânodo, o cátodo, o eletrólito e os processos bioeletroquímicos envolvidos na conversão da energia química em elétrica.

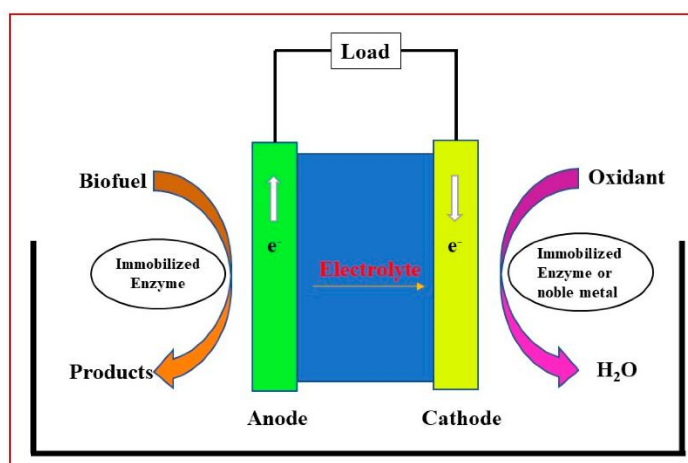


Figura 5. Esquema dos componentes de uma célula de biocombustível (Zhou et al., 2023).

1.2.6. Aplicações das Células de Biocombustível

A crescente procura por fontes de energia sustentáveis e de baixo impacto ambiental tem impulsionado o desenvolvimento e a aplicação de células de biocombustível enzimáticas e microbianas em diversas áreas. Estas células aproveitam substratos orgânicos, como glicose, lactato e outros biomarcadores, para gerar eletricidade de forma eficiente e com menor impacto ambiental. As aplicações destas células abrangem desde a alimentação de dispositivos biomédicos até a geração de energia a partir de resíduos, representando uma alternativa viável às tecnologias convencionais (Davis, F. and Higson, S.P.J., 2007; Inamuddin et al., 2021; Kazarinov and Meshcheryakova, 2021).

1.2.6.1. Aplicações Biomédicas

Uma das áreas mais promissoras para as células de biocombustível é o setor biomédico, especialmente no desenvolvimento de dispositivos médicos implantáveis e biossensores. A capacidade das EBFCs de operar com substratos presentes no organismo humano, como a glicose e o lactato, torna-as particularmente atrativas para sistemas autossustentáveis.

Dispositivos médicos implantáveis, como marca passos, neuro estimuladores e sensores de glicose (Figura 6), podem beneficiar da integração de células de biocombustível como fonte de energia. A utilização de glicose sanguínea como combustível elimina a necessidade de substituição frequente de baterias, prolongando a vida útil desses dispositivos e reduzindo o risco de intervenções cirúrgicas para a sua substituição.

Além dos dispositivos implantáveis, as células de biocombustível têm sido exploradas como sensores bioeletroquímicos para a detecção de biomarcadores, como glicose e lactato. Estes sensores oferecem medições contínuas e em tempo real, possibilitando um melhor acompanhamento de condições clínicas, como a diabetes e a acidose láctica.

Outra vertente inovadora no campo biomédico é a integração de células de biocombustível em dispositivos portáteis e vestíveis, permitindo a conversão de fluidos corporais, como suor e lágrimas, em eletricidade. Esta abordagem tem potencial para alimentar pequenos dispositivos eletrônicos de monitorização da saúde, promovendo soluções energéticas mais sustentáveis e menos invasivas ([Chakraborty et al., 2024](#); [Zhou et al., 2023](#); [Katz, 2015](#); [Sharifi et al., 2021](#); [Katz and Bollella, 2020](#)).

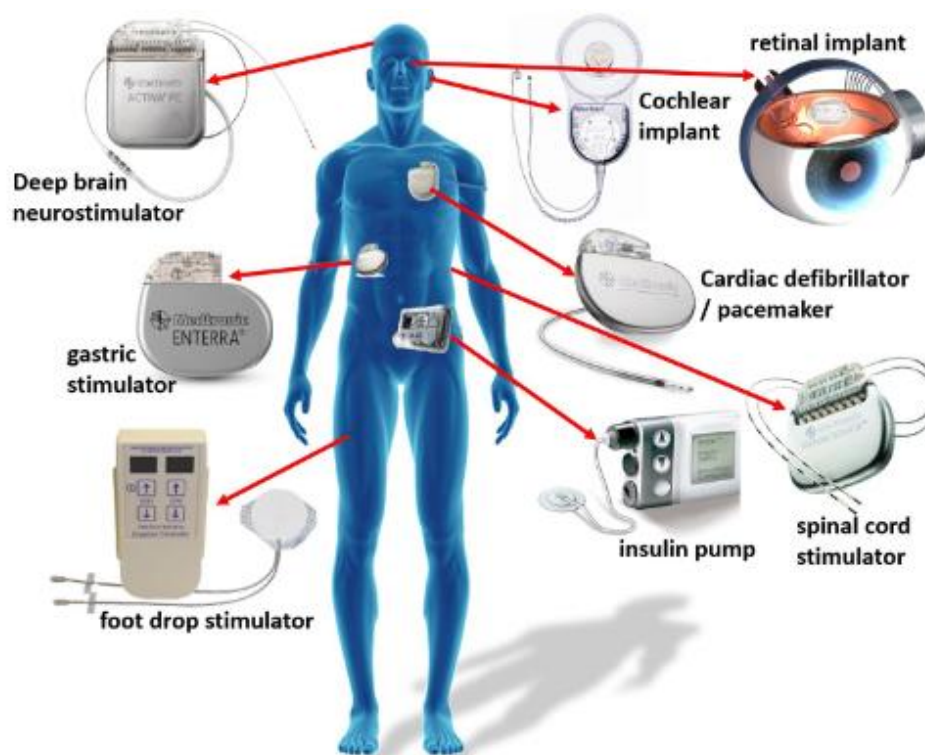


Figura 6. Exemplos de dispositivos médicos implantáveis e portáteis, incluindo neuro estimuladores, bombas de insulina, marca-passos e implantes sensoriais, que poderiam beneficiar da integração de células de biocombustível como fonte de energia sustentável ([Katz and Bollell, 2020](#)).

1.2.6.2. Geração de Energia a partir de Resíduos

A aplicação das células de biocombustível na conversão de resíduos orgânicos em eletricidade representa um avanço significativo na interseção entre a biorremediação e a produção sustentável de energia. As células de biocombustível microbianas têm sido

amplamente estudadas para o tratamento de efluentes industriais e urbanos, onde microrganismos eletroativos degradam matéria orgânica, ao mesmo tempo que geram corrente elétrica (Figura 7).

Embora a densidade de potência ainda seja baixa para aplicações em larga escala, estas células podem contribuir para a recuperação energética de efluentes e a redução da carga poluente. Estudos demonstram que as MFCs podem ser implementadas em processos industriais, como a recuperação energética em fábricas de processamento de alimentos e instalações de tratamento de esgoto. Além disso, estas células podem ser utilizadas para a monitorização da qualidade da água, funcionando como sensores biológicos para a detecção de poluentes, como metais pesados, compostos orgânicos, compostos orgânicos voláteis, entre outros (Rossi et al., 2024; Lee et al., 2019; Mahmoud, 2025; Hoang et al., 2022).

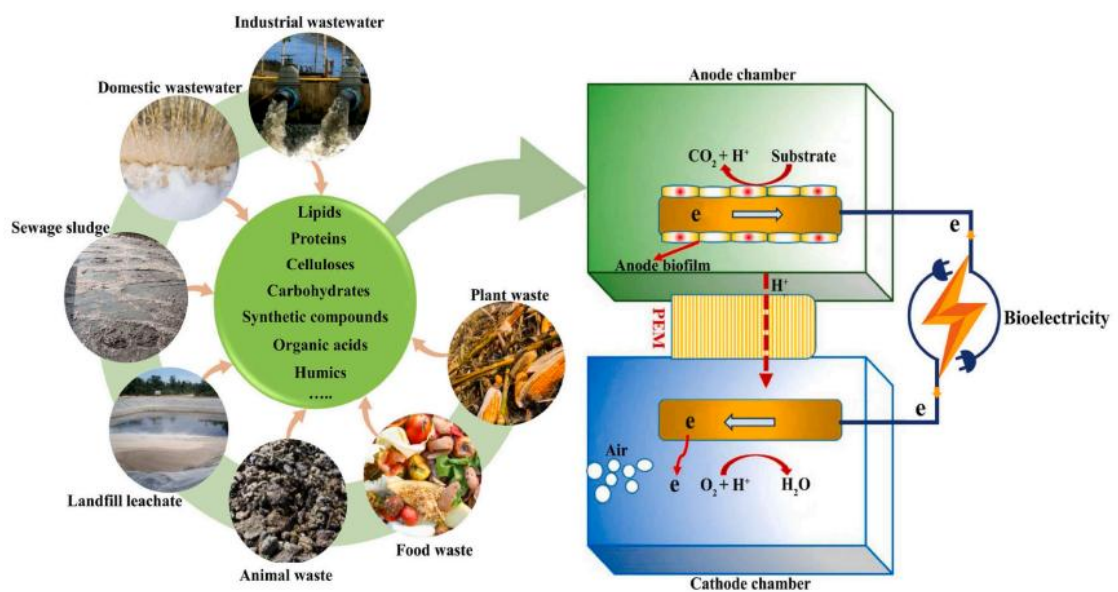


Figura 7. Célula de combustível microbiana para a produção de bioeletricidade a partir de diferentes fontes de resíduos (Hoang et al., 2022).

1.2.6.3. Dispositivos Portáteis e Eletrónica de Consumo

O avanço na miniaturização das células de biocombustível tem possibilitado a sua aplicação em dispositivos eletrónicos portáteis, como telemóveis, computadores portáteis e sensores ambientais (Figura 8). A possibilidade de substituir baterias convencionais por células de biocombustível enzimáticas apresenta vantagens significativas, incluindo a redução do impacto

ambiental associado ao descarte de metais pesados e a maior eficiência energética em comparação com baterias tradicionais.

Um dos desafios para a adoção destas células em eletrônica de consumo é a densidade de potência limitada e a estabilidade dos biocatalisadores utilizados no processo. Contudo, pesquisas recentes têm explorado novos materiais e estratégias para prolongar a vida útil das enzimas e aumentar a eficiência da conversão energética ([Wang, Ma and Cheng, 2025](#); [Jia et al., 2014](#); [Anne-Françoise Pelé, 2020](#)).

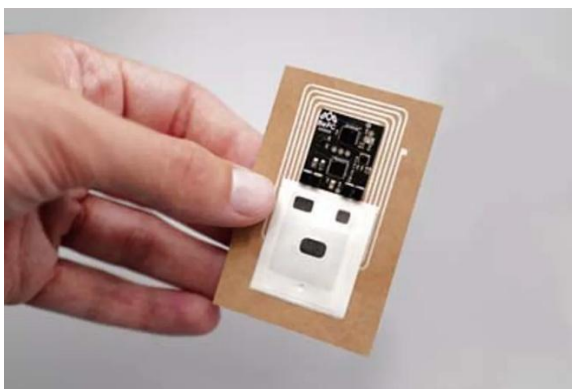


Figura 8. Dispositivo eletrônico portátil equipado com células de biocombustível miniaturizadas ([Ces.tech, 2025](#)).

1.2.6.4. Robótica e Sistemas Autônomos

A aplicação das células de biocombustível na robótica e em sistemas autônomos representa uma abordagem inovadora para a criação de dispositivos energeticamente autossuficientes. O conceito de "gastrobots" – robôs que obtêm energia a partir da digestão de substratos orgânicos (Figura 9) – tem sido estudado como uma alternativa para a exploração em ambientes remotos, como o espaço sideral ou zonas de difícil acesso na Terra ([Greenman et al., 2021](#); [Wilkinson, 2000](#); [Usf.edu, 2025](#)).

Dispositivos experimentais baseados em células de biocombustível demonstraram a viabilidade de sistemas autônomos capazes de captar energia do meio ambiente, utilizando matéria orgânica como substrato energético. Esta tecnologia abre caminho para o desenvolvimento de robôs de exploração de longo prazo, capazes de operar em ambientes inóspitos sem necessidade de recarga externa ([Gotovtsev et al., 2018](#); [Mukherjee, Ganguly and Dahiya, 2021](#)).

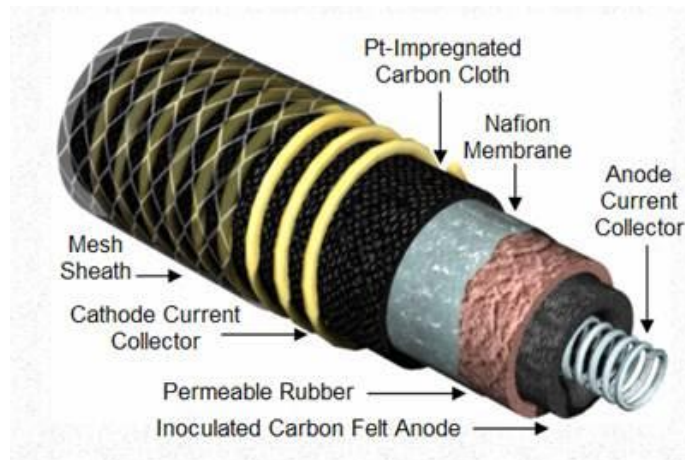


Figura 9. Representação esquemática de um “gastrobot” (Usf.edu, 2025).

A diversidade de aplicações das células de biocombustível demonstra o seu potencial como alternativa sustentável para diversas áreas da tecnologia e da ciência. Desde a alimentação de dispositivos médicos implantáveis até a produção descentralizada de energia a partir de resíduos, estas células representam uma solução inovadora para desafios energéticos contemporâneos.

Embora existam desafios técnicos, como a estabilidade dos biocatalisadores e a otimização da densidade de potência, os avanços contínuos na engenharia enzimática e no desenvolvimento de materiais promissores indicam um futuro promissor para a implementação prática das células de biocombustível em larga escala (Zhao et al., 2017; Kour et al., 2019).

1.3. Células de Biocombustível Enzimáticas

As células de biocombustível enzimáticas (EBFCs, do inglês *Enzymatic Biofuel Cells*) são uma classe de dispositivos bioeletroquímicos que utilizam enzimas como catalisadores para converter energia química em eletricidade. Ao contrário das células de biocombustível microbianas (MFCs), que dependem de microrganismos vivos, as EBFCs utilizam enzimas isoladas, permitindo uma maior seletividade e eficiência na conversão bioeletroquímica.

Estas células são particularmente atrativas devido à sua operação em condições fisiológicas suaves, elevada especificidade catalítica e possibilidade de miniaturização. Como resultado, têm sido amplamente investigadas para aplicações biomédicas, incluindo biossensores implantáveis, geração de energia a partir de fluidos biológicos e dispositivos descartáveis baseados em papel.

A estrutura básica de uma EBFC é composta por um bioânodo, onde ocorre a oxidação do combustível biológico, e um biocátodo, onde ocorre a redução do aceitador final de elétrons, geralmente oxigênio. A Figura 10 ilustra um esquema representativo deste processo.

Dentro deste contexto, um dos avanços recentes envolve o desenvolvimento de EBFCs flexíveis e biodegradáveis, como as baseadas em papel com elétrodos modificados por nanomateriais condutores. Um exemplo relevante é a célula de biocombustível de colesterol/O₂, que utiliza a enzima colesterol oxidase (ChOx) no bioânodo e a bilirrubina oxidase (BOx) no biocátodo, funcionando sobre elétrodos de ouro impresso em papel modificados com nanotubos de carbono e tionina como mediador redox (Xiao, 2021; Wang et al., 2021; Cai et al., 2024; Huang et al., 2023; Atanassov et al., 2007).

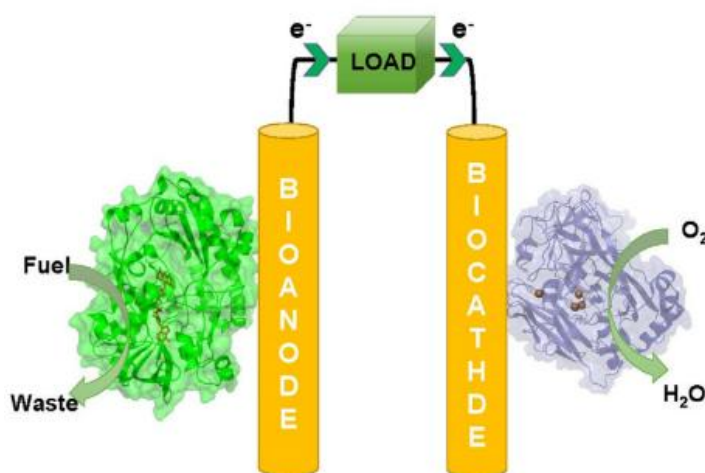


Figura 10. Exemplo esquemático de uma célula de biocombustível enzimática (Xiao, 2021).

1.3.1. Princípios de Funcionamento das Células de Biocombustível Enzimáticas

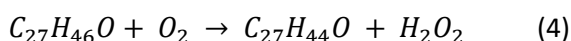
As EBFCs funcionam segundo o mesmo princípio eletroquímico das células de combustível convencionais, mas com diferenças fundamentais no mecanismo de catálise e na natureza dos substratos utilizados. O sistema básico de uma EBFC consiste em dois elétrodos – um ânodo e um cátodo – onde ocorrem, respetivamente, as reações de oxidação e redução (Xiao, 2021; Wang et al., 2021; Cai et al., 2024).

1.3.1.1. Reações no Bioânodo

O bioânodo contém uma enzima catalítica responsável pela oxidação do substrato. Dependendo da aplicação, diferentes substratos podem ser utilizados, incluindo ([Huang et al., 2023](#)):

- Glicose (em biossensores e dispositivos implantáveis)
- Lactato (em sensores metabólicos)
- Etanol e metanol (para eletrônica portátil)
- Colesterol (em sistemas de monitorização biomédica)

No caso das EBFCs baseadas em colesterol, a enzima colesterol oxidase (ChOx) catalisa a conversão do colesterol em colesteno, produzindo eletrões que são transferidos para o eléctrodo via um mediador redox como a tionina ([del Barrio et al., 2022](#); [Galindo-de-la-Rosa et al., 2019](#)).



A presença de mediadores melhora a eficiência da transferência eletrónica, reduzindo perdas energéticas.

A Figura 11 apresenta um esquema da célula de biocombustível enzimática baseada em colesterol.

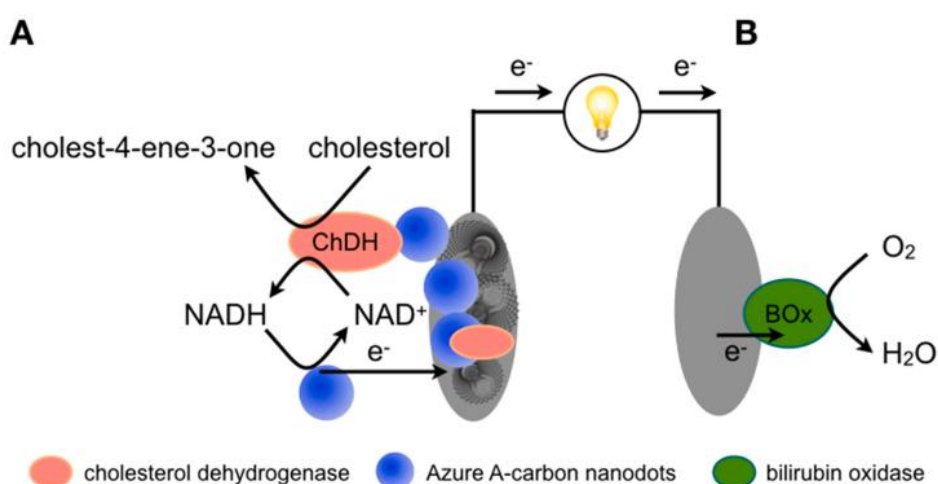


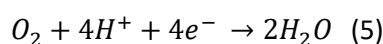
Figura 11. (A) Biossensor de colesterol (bioânodo) e (B) biocátodo redutor de O₂ acoplados numa configuração de célula de combustível enzimática. ([del Barrio et al., 2022](#)).

1.3.1.2. Reações no Biocátodo

O biocátodo é responsável pela redução do oxidante, geralmente oxigênio molecular. Para isso, são utilizadas enzimas multicobre como incluindo ([Huang et al., 2023](#)):

- Lacase
- Bilirrubina oxidase (BOx)

A bilirrubina oxidase é amplamente empregue devido à sua elevada eficiência na redução de oxigênio a água, sem necessidade de mediadores adicionais:



Este mecanismo é particularmente útil nas EBFCs implantáveis ou portáteis, uma vez que o oxigênio está naturalmente disponível em fluidos biológicos ou no ar.

O processo de oxidação ocorre no bioânodo, onde um substrato biológico, como a glicose, o etanol ou o colesterol, é oxidado pela enzima específica. No biocátodo, o oxigênio molecular presente no meio é reduzido, frequentemente pela ação de enzimas como a bilirrubina oxidase ou a lacase, promovendo a geração de corrente elétrica.

1.3.1.3. Transferência Eletrônica

A eficiência das EBFCs depende da forma como a transferência eletrônica ocorre entre a enzima e a superfície do eletrodo. Como ilustrado na Figura 12, existem dois mecanismos principais de transferência eletrônica nas EBFCs ([Falk, Blum and Sergey Shleev, 2012](#); [Eman Serag, Azza El-Maghraby and Nemr, 2021](#)):

1. **Transferência Eletrônica Direta (DET - Direct Electron Transfer)**

Neste mecanismo, os centros redox da enzima estão posicionados de forma a permitir a troca direta de elétrons com o eletrodo sem a necessidade de mediadores. O principal desafio deste tipo de transferência é a distância entre os centros redox da enzima e a superfície do eletrodo, que pode limitar a eficiência do processo ([Falk, Blum and Sergey Shleev, 2012](#)).

2. **Transferência Eletrônica Mediada (MET - Mediated Electron Transfer)**

Neste caso, mediadores redox são usados para facilitar a transferência eletrônica entre a enzima e o eletrodo. Substâncias como ferroceno, quinonas e azul da Prússia são

frequentemente utilizadas como mediadores, permitindo a comunicação eficiente entre as enzimas e os materiais condutores do eletrodo ([Eman Serag, Azza El-Maghraby and Nemr, 2021](#)).

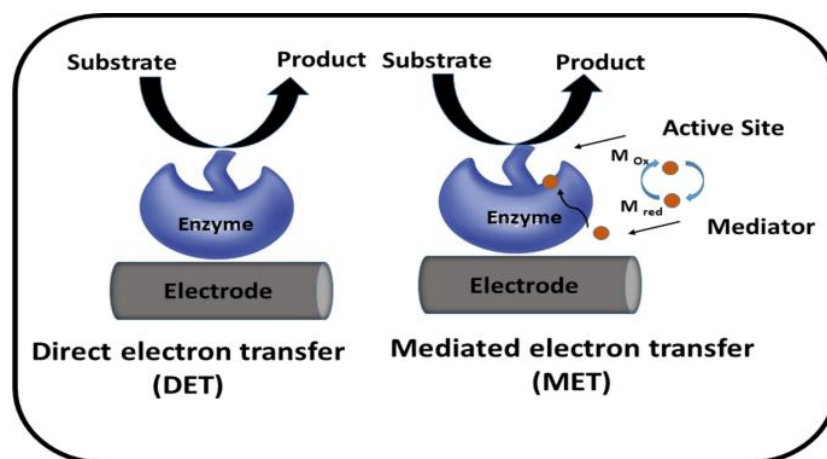


Figura 12. Representação esquemática dos dois mecanismos principais de transferência eletrônica nas EBFCs. À esquerda, a Transferência Eletrônica Direta (DET) e à direita a Transferência Eletrônica Mediada (MET) ([Eman Serag, Azza El-Maghraby and Nemr, 2021](#)).

1.3.2. Materiais Utilizados nas Células de Biocombustíveis Enzimáticas e Imobilização de enzimas

A escolha dos materiais utilizados nos eletrodos é fundamental para a performance das células de combustível baseadas em enzimas. Os materiais devem possuir características como elevada condutividade elétrica, estabilidade química e biocompatibilidade, além de promoverem uma eficiente imobilização das enzimas. Entre os materiais mais comuns e eficazes, destacam-se ([Xiao, 2021](#); [Wang et al., 2021](#); [Cai et al., 2024](#); [Huang et al., 2023](#); [Atanassov et al., 2007](#)):

- **Nanotubos de carbono e grafeno:** Possuem uma elevada área superficial e excelentes propriedades de condução elétrica, favorecendo a imobilização eficiente das enzimas e facilitando a transferência eletrônica.
- **Polímeros condutores,** como a polianilina e o polipirrol: Garantem a imobilização estável das enzimas e contribuem para a durabilidade do sistema a longo prazo.

- **Matriz híbrida de óxidos metálicos:** Podem atuar como amplificadores da atividade catalítica, aumentando a eficiência da EBFC.
- **Eléttodos baseados em papel e nanomateriais condutores:** O uso de papel como substrato tem ganhado destaque devido à sua flexibilidade, biodegradabilidade e baixo custo. Para melhorar a condutividade e a interface enzimática, os eléctodos podem ser modificados com:
 - **Ouro impresso em papel,** que garante boa condutividade elétrica e biocompatibilidade.
 - **Nanotubos de carbono (CNTs),** que aumentam a área superficial e facilitam a transferência de elétrões.
 - **Mediadores redox,** como tionina, que melhoram a comunicação entre a enzima e o eléctrodo, otimizando a eficiência da célula.

A imobilização eficiente das enzimas na superfície dos eléctodos é essencial para garantir a operação estável e prolongada da célula. Para isso, são utilizados métodos como a adsorção física, a reticulação química e a encapsulação em matrizes poliméricas, que ajudam a melhorar a fixação das enzimas e minimizar sua degradação ([Atanassov et al., 2007](#)).

1.3.2.1. Papel dos Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas na Modificação dos Eléttodos

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT – *Multi Walled Carbon Nanotubes*) têm-se destacado como materiais estratégicos na engenharia de eléctodos para células de biocombustível enzimáticas, especialmente naqueles projetados para a detecção seletiva de colesterol. Estes nanomateriais apresentam propriedades físico-químicas altamente vantajosas, como elevada área superficial específica, excelente condutividade elétrica, robustez mecânica e estabilidade química, que os tornam particularmente adequados para aplicações em dispositivos eletroquímicos miniaturizados, descartáveis ou vestíveis ([Nishizawa, 2018](#)).

Em comparação com os nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT – *Single Walled Carbon Nanotubes*), os MWCNT, representados na Figura 13, oferecem maior facilidade de produção, resistência estrutural superior e maior tolerância a variações de processamento, o que favorece sua integração em plataformas de baixo custo, como eléctodos baseados em papel.

A sua morfologia tubular tridimensional permite uma dispersão homogênea na matriz do eletrodo, promovendo zonas de imobilização enzimática mais estáveis e com maior acessibilidade eletroquímica ([Nishizawa, 2018](#); [Zhu et al., 2012](#); [Manjunatha et al., 2010](#)).

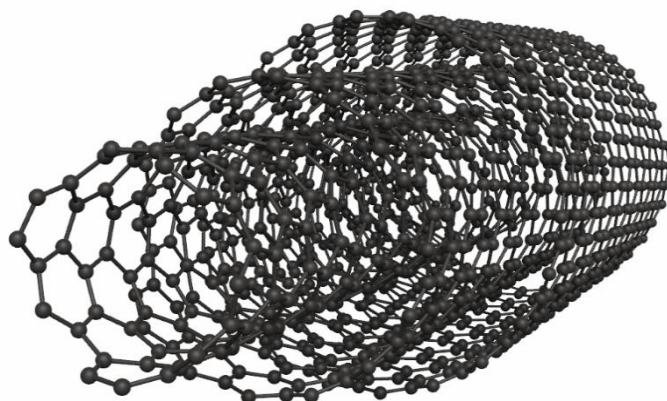


Figura 13. Representação de nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT) ([Ossila, n.d.](#)).

No contexto das EBFC de colesterol, os MWCNT atuam como facilitadores da transferência eletrônica entre a enzima colesterol oxidase (ChOx) e o eletrodo. Quando combinados com mediadores redox como a tionina, estes nanomateriais aumentam significativamente a eficiência da transferência de elétrons, reduzindo as perdas energéticas associadas à localização profunda dos centros redox na estrutura enzimática. Além disso, a condutividade aprimorada do eletrodo funcionalizado traduz-se numa densidade de corrente mais elevada, contribuindo para maior sensibilidade analítica do sistema. ([Nishizawa, 2018](#); [Zhu et al., 2012](#); [Manjunatha et al., 2010](#)).

Outro aspecto relevante é o papel dos MWCNT na estabilização conformacional da ChOx. A interação não covalente entre a enzima e a superfície hidrofóbica dos nanotubos proporciona um microambiente protetor que reduz a taxa de desnaturação enzimática, prolongando a vida útil e a repetibilidade do sistema bioeletroquímico. Esta característica é particularmente valiosa em aplicações de monitorização contínua de biomarcadores, como o colesterol, em fluidos biológicos.

Assim, a modificação eletroquímica de eletrodos com MWCNT configura-se como uma abordagem promissora para o desenvolvimento de EBFCs de alto desempenho, alinhada com

os princípios de sustentabilidade, miniaturização e viabilidade prática em dispositivos biomédicos avançados (Liu et al., 2018; Quan et al., 2014; Tavares et al., 2015).

1.3.3. Aplicações das Células de Biocombustível Enzimáticas

As EBFCs têm um vasto campo de aplicações, que incluem desde a monitorização de biomarcadores até a geração de energia sustentável (Xiao, 2021; Wang et al., 2021; Cai et al., 2024; Huang et al., 2023; Falk, Blum and Sergey Shleev, 2012; Suntisak Khumngern and Itthipon Jeerapan, 2024).

1.3.3.1. Biossensores e Monitorização Médica

A integração das EBFCs em biossensores eletroquímicos permite a monitorização de compostos fisiológicos, como glicose, lactato e colesterol. Como ilustrado na Figura 14, estes dispositivos podem ser projetados para aplicação direta na pele, utilizando uma estrutura composta por uma célula de biocombustível enzimática associada a um hidrogel contendo biocombustível e fármacos. No caso específico das EBFCs de colesterol/O₂, a conversão eletroquímica do colesterol pode ser explorada para o diagnóstico precoce de doenças cardiovasculares, permitindo medições contínuas sem necessidade de reagentes externos.

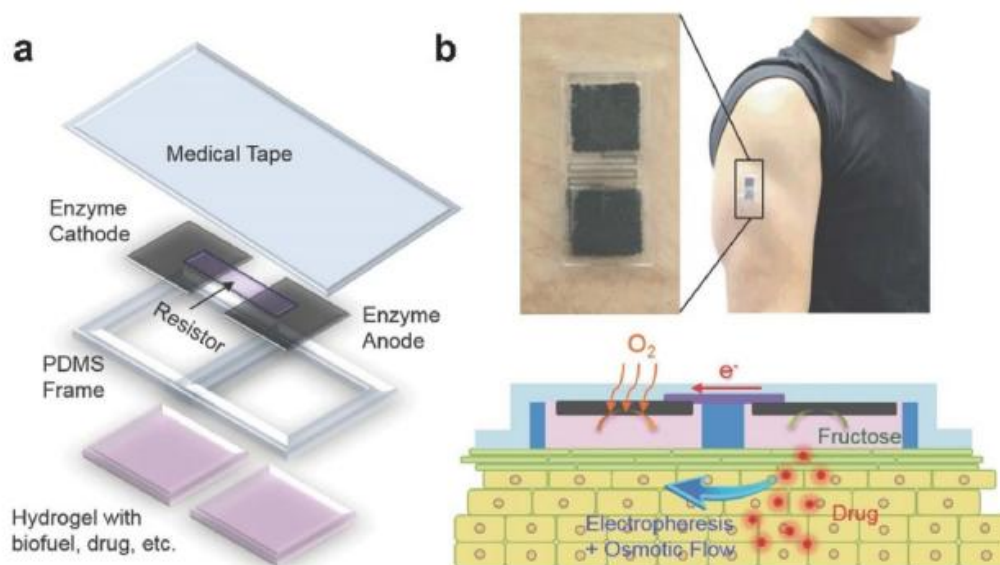


Figura 14. (a) Desenho esquemático da montagem de um *patch* de iontoforese transdérmica baseado num EBFC de frutose/O₂. (b) Foto digital do *patch* montado num ser humano e um esquema do mecanismo de administração do medicamento. (Xiao, 2021).

1.3.3.2. Geração de Energia a Partir de Fluidos Biológicos

As EBFCs implantáveis representam uma alternativa promissora para a alimentação de dispositivos biomédicos. Como ilustrado na Figura 15, estas células de biocombustível podem ser integradas em dispositivos vestíveis, como relógios, adesivos cutâneos e até lentes de contato, permitindo a monitorização contínua de parâmetros fisiológicos.

Uma célula de biocombustível que utiliza substratos biológicos (como colesterol ou glicose) pode alimentar sensores metabólicos, marca passos e neuro estimuladores sem necessidade de baterias convencionais.

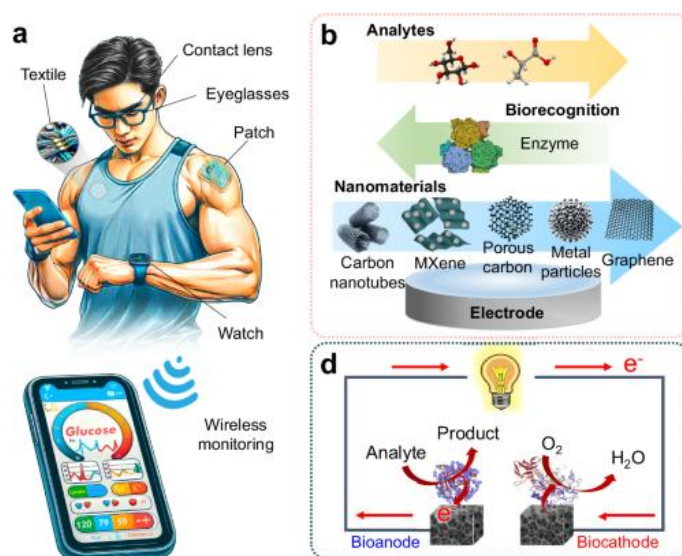


Figura 15. Biossensores de autopotência vestível capaz de detetar o lactato ou a glicose no suor. (Suntisak Khumngern and Itthipon Jeerapan, 2024).

1.3.3.3. Eletrónica Flexível e Sustentável

Os avanços nas EBFCs baseadas em papel abrem possibilidades para aplicações em dispositivos vestíveis e eletrónica descartável, reduzindo o impacto ambiental das baterias tradicionais, como se pode observar pela Figura 16.

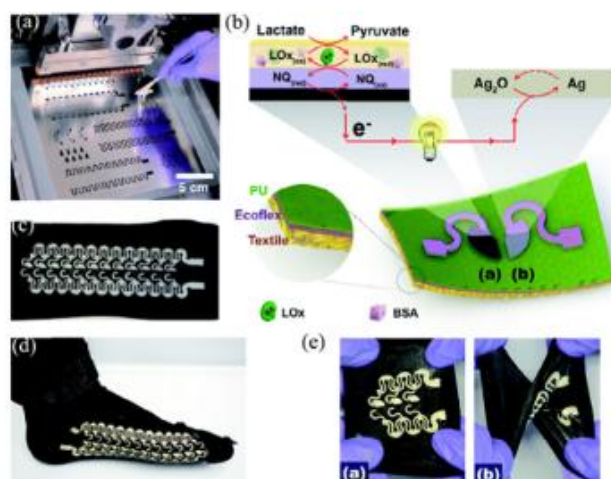


Figura 16. O primeiro protótipo de um biossensor autossustentável vestível (Wang et al., 2021).

1.3.4. Estado da Arte das Células de Biocombustível Enzimáticas para a Detecção de Colesterol

As células de biocombustível enzimáticas (EBFCs) têm sido amplamente investigadas para aplicações biomédicas, nomeadamente como plataformas autoalimentadas para biossensores. Entre as moléculas alvo com elevado interesse clínico, o colesterol destaca-se por estar associado a diversas condições cardiovasculares. A deteção eletroquímica do colesterol tem-se afirmado como uma vertente promissora no desenvolvimento de dispositivos de diagnóstico portáteis e autoalimentados, sobretudo no âmbito da medicina personalizada e da monitorização descentralizada.

A base de funcionamento destas EBFCs reside na oxidação enzimática do colesterol, catalisada sobretudo pela enzima colesterol oxidase (ChOx). Este processo gera eletrões e peróxido de hidrogénio (H_2O_2), podendo a corrente elétrica gerada ser colhida diretamente via transferência eletrónica direta (DET) ou mediada por compostos redox (MET), como a tionina ou azul da Prússia. Como alternativa à ChOx, a colesterol desidrogenase (ChDH) tem sido utilizada em configurações que evitam a formação de H_2O_2 , contribuindo para uma maior estabilidade e biocompatibilidade dos sistemas.

A Tabela 1 apresenta uma síntese dos estudos mais relevantes sobre EBFC desenvolvidas especificamente para a deteção seletiva de colesterol. São destacados os materiais utilizados, as enzimas aplicadas, as estratégias de imobilização e os resultados eletroquímicos obtidos

Tabela 1. Estudos sobre EBFC para Detecção de Colesterol.

Referência	Enzima(s) Utilizada(s)	Elétrodo/ Material	Configuração/ Aplicação	Desempenho/ Observações
(del Barrio et al., 2022)	ChOx / BOx	Papel com ouro impresso, CNT e tionina	EBFC portátil descartável	0.45 V; corrente máx. 50 μ A
(Xiao et al., 2025)	ChOx	CNT + mediador redox	<i>Patch</i> vestível	Estável durante 6 horas
(Galindo-de-la-Rosa et al., 2019)	ChOx	Elétrodos de carbono modificados	Biossensor autoalimentado	Gama até 1.7 mM
(Bui and Park, 2016)	ChDH / BOx	Carbono poroso com pontos de carbono	EBFC sem produção de H ₂ O ₂	Sensibilidade: 4.5 mA·cm ⁻² ·M ⁻¹
(Wang et al., 2023)	ChOx / Laccase	Bioânodo em Sigracet GDL 39	EBFC microfluídica	Miniaturização eficaz
(Kumar, Poddar and Sinha, 2022)	ChOx / BOx	Grafeno funcionalizado com nafiona e AuNPs	EBFC integrada em microfluídica	0.38 V; 42.6 μ A; aplicação biomédica
(Cavalcante et al., 2021)	ChOx	Papel com prata impressa + MWCNT	Sensor descartável de baixo custo	Resposta linear até 3.2 mM; produção de potência 11.2 μ W
(Suresh et al., 2021)	ChOx / BOx	Elétrodos <i>screen-printed</i> com polímero condutor	EBFC miniaturizada portátil	Estável até 10 ciclos de uso; aplicação em biossensores vestíveis

Nota:

ChOx– Colesterol oxidase

ChDH – Colesterol desidrogenase

BOx – Bilirrubina oxidase

CNT – Nanotubos de carbono

MWCNT – Nanotubos de carbono de paredes múltiplas

AuNPs – Nanopartículas de ouro

EBFC – Célula de biocombustível enzimática

GDL – Camada de difusão de gás

Os avanços recentes no design de células de biocombustível enzimáticas (EBFC) têm enfatizado a utilização de substratos flexíveis e sustentáveis, como o papel, aliado à funcionalização de elétrodos com nanomateriais condutores de alto desempenho, tais como os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT), o grafeno e os pontos quânticos de carbono. Estes materiais apresentam uma elevada área superficial, excelente condutividade elétrica e uma notável capacidade de promover a imobilização estável de enzimas, fatores que contribuem significativamente para a melhoria da transferência eletrónica e, conseqüentemente, da eficiência global do sistema.

A maioria dos dispositivos descritos na literatura recorre a mediadores redox, como a tionina e o azul da Prússia, os quais facilitam a transferência eletrónica entre os centros ativos das enzimas e os elétrodos. Este mecanismo mediado supera as limitações estruturais das enzimas, cujos centros redox se encontram, muitas vezes, em regiões inacessíveis ao elétrodo, inviabilizando uma transferência direta (DET).

Dentre as aplicações emergentes, destaca-se a crescente ênfase no desenvolvimento de dispositivos portáteis, descartáveis e de baixo custo, voltados para a monitorização não invasiva de biomarcadores em fluidos biológicos como soro, plasma e suor. Plataformas integradas em papel, sensores vestíveis e sistemas microfluídicos demonstram viabilidade funcional, compatível com os intervalos fisiológicos de deteção, oferecendo respostas rápidas e sensíveis sem a necessidade de fontes de energia externas.

Além da sensibilidade e seletividade, estudos mais recentes têm explorado aspetos cruciais como a estabilidade operativa a longo prazo, a resposta em tempo real e a integração com tecnologias digitais, no contexto da medicina personalizada. Neste sentido, destaca-se o uso de

enzimas mais estáveis, como a colesterol desidrogenase (ChDH), e a adoção de estratégias avançadas de imobilização enzimática, incluindo reticulação química e encapsulamento em matrizes híbridas, como soluções promissoras para aumentar a durabilidade e a reprodutibilidade dos biossensores.

O presente trabalho propõe o desenvolvimento de uma célula de biocombustível enzimática baseada em papel modificado com ouro e nanotubos de carbono e funcionalizada com mediadores redox e agentes ligante visando a detecção seletiva de colesterol através da incorporação da enzima (ChOx). Esta abordagem está alinhada com as tendências atuais da literatura, ao propor avanços tanto na sustentabilidade dos materiais quanto na otimização do desempenho eletroquímico do bioânodo, além de explorar o potencial de integração em sistemas biomédicos portáteis e escaláveis.

1.4. Técnicas Eletroquímicas

As células de biocombustível têm por base princípios da eletroquímica, sendo estas caracterizadas através de diferentes técnicas eletroquímicas. Estas técnicas fornecem informações detalhadas sobre os processos de transferência eletrônica, a estabilidade dos catalisadores e a eficiência das reações eletroquímicas. No desenvolvimento de células de biocombustível enzimáticas, estas técnicas permitem não apenas a compreensão dos mecanismos subjacentes à catálise enzimática, mas também a otimização das condições experimentais para maximizar a conversão de energia bioquímica em eletricidade.

Entre as diversas metodologias disponíveis, a voltametria cíclica e a amperometria destacam-se pela sua capacidade de fornecer informações qualitativas e quantitativas sobre os processos redox envolvidos. ([Farghaly, Hameed and Abu-Nawwas, 2023](#); [Gharbi et al., 2020](#); [Faulkner, 2020](#)).

1.4.1. Configuração Eletroquímica e Escolha dos Elétrodos

A maioria das experiências de voltametria cíclica é realizada numa célula eletroquímica composta por três elétrodos, como está representado na Figura 17:

- **Eléctrodo de Trabalho (ET):** responsável por promover a reacção de interesse. Materiais como carbono vítreo, platina e ouro são comumente utilizados devido à sua inércia química e ampla janela de potencial. A preparação da superfície do ET é um fator crítico, sendo necessário um rigoroso processo de polimento e limpeza para garantir a reprodutibilidade dos resultados.
- **Eléctrodo de Referência (ER):** fornece um potencial de referência estável, permitindo medições precisas. Exemplos comuns incluem o eléctrodo de calomelano saturado (SCE), eléctrodo de Prata/Cloreto de Prata (Ag/AgCl) e o eléctrodo de hidrogénio padrão (SHE). Em sistemas não aquosos, muitas vezes é necessário o uso de referências internas, como o ferroceno, para garantir a confiabilidade das medições.
- **Eléctrodo Auxiliar (EA):** serve para fechar o circuito eléctrico, garantindo que a corrente eléctrica necessária para a reacção ocorra sem que haja limitações cinéticas significativas. Normalmente, é confeccionado em platina ou carbono, devido à sua elevada condutividade e inércia química, para evitar interferências na reacção principal. Em certos casos, o EA pode ser separado do restante do sistema por uma membrana porosa para minimizar a contaminação do meio reacional. Este eléctrodo deve possuir uma área de superfície maior que a do eléctrodo de trabalho, de modo a evitar que processos secundários interfiram nos resultados ([Farghaly, Hameed and Abu-Nawwas, 2023](#); [Gharbi et al., 2020](#); [Elgrishi et al., 2017](#); [Chemistry LibreTexts, 2016](#); [Gugu Hlengiwe Mhlongo, et al. 2019](#)).

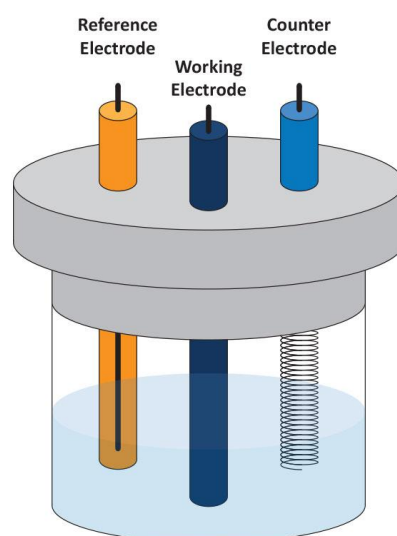


Figura 17. Representação de uma célula eletroquímica) ([Anon, n.d.](#)).

1.4.2. Voltametria Cíclica

A Voltametria Cíclica (VC) é uma técnica eletroquímica dinâmica que permite a investigação detalhada dos processos de oxidação e redução de espécies eletroativas, sendo amplamente utilizada na caracterização de sistemas enzimáticos e na análise da sua atividade catalítica.

Na VC, um potencial elétrico é aplicado ao eletrodo de trabalho e varia linearmente com o tempo, invertendo-se de forma cíclica entre dois limites predefinidos. Como resposta a essa variação, a corrente elétrica gerada pelas reações eletroquímicas é registada em função do potencial aplicado, resultando num gráfico característico denominado voltamograma ([Farghaly, Hameed and Abu-Nawwas, 2023](#); [Gharbi et al., 2020](#); [Elgrishi et al., 2017](#); [Chemistry LibreTexts, 2016](#); [Gugu Hlengiwe Mhlongo, et al. 2019](#)).

A análise do voltamograma permite obter informações cruciais, tais como:

- **Potencial de oxidação e/ou redução:** Determinação dos potenciais redox das espécies eletroativas envolvidas.
- **Reversibilidade do processo:** Identificação da natureza reversível, quase-reversível ou irreversível das reações eletroquímicas.
- **Cinética da transferência eletrónica:** Avaliação da velocidade da reação eletroquímica através da separação entre os picos anódico e catódico.
- **Coefficiente de difusão:** Determinação da difusividade das espécies eletroativas em solução.

Os voltamogramas apresentam uma forma característica, como pode ser observado para um exemplo de uma espécie capaz de se oxidar e reduzir (redox) na Figura 17 influenciada pela reversibilidade do processo eletroquímico e pela dinâmica de transporte de massa. O eixo horizontal representa o potencial aplicado (E), enquanto o eixo vertical corresponde à corrente elétrica (i) gerada. A direção da varredura é indicada por setas no gráfico, sendo que a primeira parte do ciclo é chamada de varredura catódica (quando o potencial se torna mais negativo) e a segunda de varredura anódica (quando retorna ao valor inicial) ([Farghaly, Hameed and Abu-Nawwas, 2023](#); [Gharbi et al., 2020](#); [Elgrishi et al., 2017](#); [Chemistry LibreTexts, 2016](#); [Gugu Hlengiwe Mhlongo, et al. 2019](#)). A redução de uma forma oxidada (Ox) no eletrodo pode ser descrita genericamente pela equação:



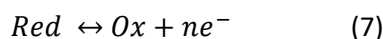
Onde:

n - Representa o número de elétrons envolvidos na reação;

Red - indica a forma reduzida da espécie.

Durante a varredura direta (redução), o potencial do eletrodo torna-se mais negativo, favorecendo a aceitação de elétrons pela espécie oxidada presente na solução.

A seta de dois sentidos indica que este processo pode ser reversível, ou seja, a forma oxidada pode ser regenerada posteriormente quando o potencial do eletrodo retorna a valores mais positivos. Este processo de oxidação reversa pode ser representado como:



No voltamograma resultante, essa reversibilidade traduz-se na presença de dois picos bem definidos:

- **Pico catódico**, correspondente à redução da espécie oxidada durante a varredura direta;
- **Pico anódico**, associado à reoxidação da espécie reduzida na varredura reversa.

Se o sistema for quimicamente e electroquimicamente reversível, o espaçamento entre os picos segue a relação teórica estabelecida pela equação de Nernst e sua posição é influenciada pelo potencial formal E'_0 .

Desta forma, a análise do voltamograma permite determinar não apenas a reversibilidade do sistema, mas também informações sobre a cinética da transferência eletrônica e as interações entre o analito e a superfície do eletrodo.

A Figura 18 apresenta um voltamograma cíclico característico de um sistema redox reversível. Durante a varredura catódica, observa-se a redução da espécie oxidada (Ox), enquanto na varredura anódica ocorre o processo inverso, regenerando a espécie oxidada a partir da forma reduzida (Red). O formato simétrico dos picos anódico e catódico, bem como a proximidade entre os potenciais de pico, são indicativos da natureza reversível da reação ([Farghaly, Hameed and Abu-Nawwas, 2023](#); [Gharbi et al., 2020](#); [Elgrishi et al., 2017](#); [Chemistry LibreTexts, 2016](#); [Gugu Hlengiwe Mhlongo, et al. 2019](#)).

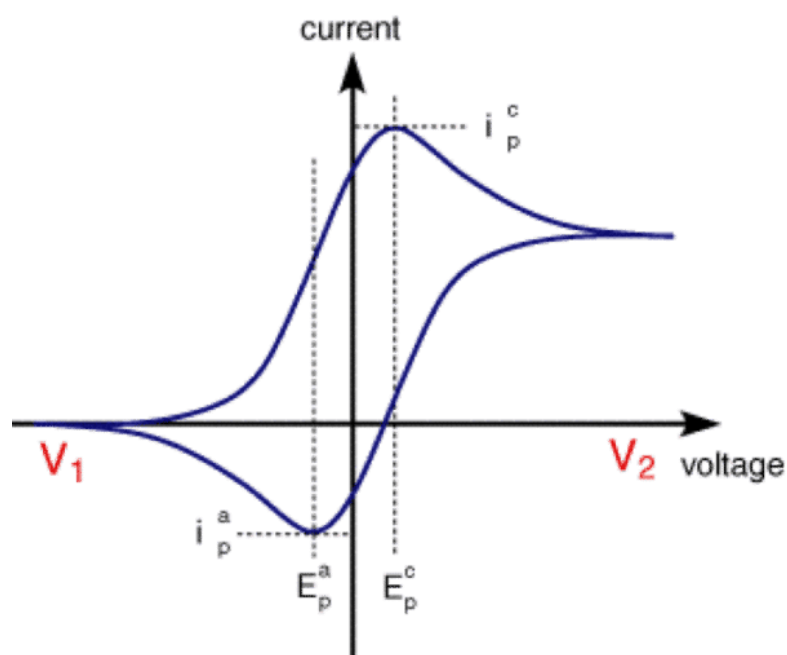


Figura 18. Exemplo de um voltamograma para uma espécie ([PalmSens, n.d.](#)).

1.4.2.1. Equação de Nernst e sua Relevância na Voltametria Cíclica

O comportamento eletroquímico de um sistema redox pode ser descrito pela Equação de Nernst, que relaciona o potencial eletroquímico (E) ao potencial padrão (E^0) da espécie em questão e às concentrações relativas da forma oxidada (Ox) e reduzida (Red):

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox]}{[Red]} \quad (8)$$

Onde:

R – Constante dos gases perfeitos ($J \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$);

T – Temperatura absoluta (K);

n – Número de elétrons envolvidos na reação;

F – Constante de Faraday ($C \text{ mol}^{-1}$).

Na prática, a equação de Nernst permite prever o comportamento eletroquímico do sistema e analisar a influência de variáveis experimentais, como concentração dos analitos e potencial aplicado ([Farghaly, Hameed and Abu-Nawwas, 2023](#); [Gharbi et al., 2020](#); [Elgrishi et al., 2017](#); [Chemistry LibreTexts, 2016](#); [Gugu Hlengiwe Mhlongo, et al. 2019](#)).

1.4.2.2. Influência da Velocidade de Varrimento na Resposta Voltamétrica

A velocidade de varrimento (v) representa a velocidade com que o potencial é alterado ao longo do tempo. Este parâmetro influencia diretamente a forma do voltamograma, sendo crucial para a caracterização dos processos de transferência eletrônica.

Quando a taxa de varrimento é elevada, a camada de difusão torna-se mais fina, resultando em picos de corrente mais acentuados. Para processos electroquimicamente reversíveis envolvendo espécies de difusão livre, a corrente de pico (i_p) segue a relação descrita pela Equação de Randles-Sevcik:

$$i_p = 0,446nF AC_0 \left(\frac{nF D_0}{RT} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (9)$$

Onde:

A – Área do elétrodo de trabalho (cm^2);

C_0 – Concentração do analito (mol cm^{-3});

D_0 – Coeficiente de difusão da espécie eletroativa ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$).

Esta relação permite estimar coeficientes de difusão e avaliar se a reação eletroquímica ocorre predominantemente por difusão ou se há adsorção de espécies no elétrodo ([Farghaly, Hameed and Abu-Nawwas, 2023](#); [Gharbi et al., 2020](#); [Elgrishi et al., 2017](#); [Chemistry LibreTexts, 2016](#); [Gugu Hlengiwe Mhlongo, et al. 2019](#)).

No contexto das células de biocombustível enzimáticas, a VC desempenha um papel fundamental na avaliação da eficiência da transferência de elétrons entre a enzima e o elétrodo.

Além disso, a VC é amplamente utilizada para investigar o impacto da modificação da superfície do elétrodo na atividade catalítica da enzima. Parâmetros como a escolha do material condutor, a funcionalização da superfície e a estrutura do elétrodo podem influenciar significativamente o desempenho do sistema bioeletroquímico ([Farghaly, Hameed and Abu-Nawwas, 2023](#); [Gharbi et al., 2020](#); [Elgrishi et al., 2017](#); [Chemistry LibreTexts, 2016](#); [Gugu Hlengiwe Mhlongo, et al. 2019](#)).

1.4.3. Amperometria

A amperometria é uma técnica eletroquímica essencial na análise da corrente gerada ao longo do tempo um potencial fixo.

Na amperometria, o potencial do eletrodo de trabalho é mantido constante num valor adequado para promover a oxidação ou redução da espécie eletroativa em estudo. Como resposta, a corrente elétrica gerada pela reação eletroquímica é registada ao longo do tempo, permitindo a obtenção de informações sobre a dinâmica da conversão bioeletroquímica.

Entre as principais vantagens da amperometria, destacam-se:

- **Elevada sensibilidade:** Permite a deteção de baixas concentrações de analitos com alta precisão.
- **Monitorização em tempo real:** Possibilita a análise contínua da resposta catalítica da enzima.
- **Compatibilidade com sistemas biológicos:** Pode ser aplicada a meios biológicos complexos, como fluidos fisiológicos ou sistemas enzimáticos *in vivo*.

No contexto das biocélulas de combustível enzimáticas, a amperometria desempenha um papel crucial na avaliação do desempenho do sistema, permitindo a monitorização da corrente gerada pela oxidação de substratos específicos. Esta técnica é amplamente utilizada para determinar a eficiência catalítica da enzima, analisar a estabilidade do sistema e investigar a influência de variáveis experimentais, como a concentração de substrato, o pH do meio reacional e a temperatura.

Além disso, a amperometria pode ser utilizada para estudar a estabilidade operacional da biocélula ao longo do tempo, permitindo identificar eventuais perdas de atividade enzimática devido a fenómenos como a desnaturação da enzima, inibição por produtos de reação ou adsorção irreversível de intermediários na superfície do eletrodo ([Chemistry LibreTexts, 2016](#); [Kausaite-Minkstimiene et al., 2024](#); [Barelli et al., 2021](#); [Liu et al., 2023](#)).

Para compreender melhor as diferenças e aplicações da voltametria cíclica e da amperometria, é fundamental compará-las em termos de princípios, modos operacionais e utilidade na análise eletroquímica. A voltametria cíclica é amplamente utilizada para

caracterizar processos redox e estudar a cinética de transferência de carga, enquanto a amperometria se destaca pela sua capacidade de monitoramento contínuo da corrente elétrica em função do tempo.

A Tabela 2 apresenta uma comparação entre estas duas técnicas, destacando as suas principais características:

Tabela 2. Comparação entre a voltametria cíclica e a amperometria.

Característica	Voltametria Cíclica	Amperometria
Modo de operação	Variação cíclica do potencial	Potencial constante
Informações obtidas	Potenciais redox, cinética de transferência eletrônica, reversibilidade da reação	Corrente elétrica em função do tempo, atividade catalítica em tempo real
Principais aplicações	Caracterização de reações redox, análise da interação enzima-substrato	Monitorização da atividade catalítica, detecção de biomarcadores
Sensibilidade	Moderada a elevada	Elevada
Compatibilidade à biocélula de combustível	Estudo fundamental da atividade eletrocatalítica	Monitorização contínua do desempenho do sistema

No desenvolvimento de células de biocombustível enzimáticas, a combinação de voltametria cíclica e amperometria é essencial para otimizar a eficiência do sistema. Enquanto a voltametria cíclica fornece informações detalhadas sobre a cinética da transferência eletrônica e os potenciais redox das espécies envolvidas, a amperometria permite monitorizar em tempo real a resposta eletroquímica do sistema sob condições operacionais relevantes.

A integração de técnicas eletroquímicas avançadas no estudo e desenvolvimento de células de biocombustível enzimáticas permite uma compreensão aprofundada dos processos redox envolvidos, contribuindo para a otimização do desempenho e da estabilidade dos dispositivos. A voltametria cíclica e a amperometria, ao fornecerem informações complementares,

desempenham um papel central na caracterização e melhoria destas tecnologias, sendo indispensáveis para avanços na conversão sustentável de energia a partir de biomarcadores ([Farghaly, Hameed and Abu-Nawwas, 2023](#); [Gharbi et al., 2020](#); [Elgrishi et al., 2017](#); [Chemistry LibreTexts, 2016](#); [Gugu Hlengiwe Mhlongo, et al. 2019](#)).

1.5. Organização da dissertação

Esta dissertação está estruturada em cinco capítulos. O Capítulo 1 introduz o tema, apresenta os fundamentos teóricos sobre células de biocombustível enzimáticas e descreve as técnicas eletroquímicas utilizadas. O Capítulo 2 define os objetivos da investigação. O Capítulo 3 detalha os materiais e métodos aplicados na preparação dos elétrodos e da célula. No Capítulo 4, são apresentados e discutidos os resultados obtidos. Por fim, o Capítulo 5 apresenta as conclusões e propostas para trabalhos futuros. No Anexo A encontra-se a Declaração de Integridade relativamente ao trabalho realizado.

2. Objetivos

O presente trabalho tem como principal objetivo a construção e caracterização de uma biocélula de combustível enzimática para potencial uso como biossensor autoalimentado para detecção de colesterol. Para tal, pretende-se desenvolver um sistema bioeletroquímico inovador baseado na oxidação de colesterol, no bioânodo e na redução de oxigénio, no biocátodo, utilizando eléctrodos de papel modificados com nanomateriais condutores, com e sem inclusão de mediadores redox.

Assim, os principais objetivos específicos deste estudo são:

- Construção e otimização do bioânodo, com e sem mediador redox, sendo caracterizado electroquimicamente como um biossensor para análise de colesterol.
- Desenvolvimento e otimização do biocátodo, sendo caracterizado eletroquimicamente como biossensor para análise de oxigénio.
- Conjugação do bioânodo e biocátodo e avaliação do desempenho da célula de biocombustível como fonte de energia para potencial determinação de colesterol de forma energeticamente autónoma.

Com este estudo, pretende-se contribuir para o avanço das células de biocombustível enzimáticas como alternativas sustentáveis e economicamente viáveis para a geração de bioenergia, explorando materiais acessíveis e metodologias inovadoras de construção.

3. Parte Experimental

3.1. Reagentes, Materiais, Soluções e Instrumentação

Os compostos químicos utilizados neste estudo incluíram: N,N-dimetilformamida (DMF), Triton X-100, fostato de potássio dibásico (K_2HPO_4) e fosfato monopotássico (KH_2PO_4), nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT), hexacianoferrato (II) de potássio tri-hidratado ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$), hexacianoferrato (III) de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$) e PBSE (éster succinimidil do ácido 1-pirenilbutanoico) — foram adquiridos junto à empresa Sigma-Aldrich (Alemanha). O solvente 2-Propanol (C_3H_8O) e o cloreto de potássio (KCl) foram obtidos à empresa Honeywell (Alemanha).

A tinta condutora baseada em carbono foi fornecida pela empresa SunChemical (Reino Unido), enquanto as tintas metálicas utilizadas nos conectores serigrafados (ouro e prata) foram obtidas da Novacentrix (Austin, EUA). Todos os reagentes utilizados nesta pesquisa apresentavam um grau analítico.

As enzimas colesterol oxidase (ChOx) e bilirrubina oxidase (BOx), também fornecidas pela Sigma-Aldrich, foram dissolvidas em tampão fosfato salino (PBS 0,01 M, pH 7,3) para a preparação das soluções enzimáticas, nas concentrações de 1 mg/mL para ChOx e 0,1 mg/mL para BOx, sendo estas armazenadas sob refrigeração a 4 °C até à sua utilização.

A dispersão dos nanomateriais de carbono foi realizada através da ultrassonicação dos pós de MWCNT em solução de DMF, durante 90 minutos, utilizando equipamento da JP Selecta (modelo Ultrasounds HD, Espanha), até atingir concentração final de 1 mg/mL. As dispersões foram mantidas à temperatura ambiente. A solução stock de colesterol, com concentrações de 5 mM ou 10 mM, foram preparadas em PBS 0,1 M (pH 7,3) contendo 7,5% de triton X-100 e 7,5% de propanol.

O eletrólito padrão utilizado ao longo do estudo consistiu em PBS 0,1 M (pH 7,3), preparado a partir da mistura das formas mono e dibásica do fosfato de potássio. Quando necessário, esta solução foi previamente desoxigenada por purga com gás nitrogénio (pureza de 99,99%) durante 15 minutos.

Adicionalmente, foi preparada uma solução aquosa equimolar de hexacianoferrato (II) de potássio ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$) e hexacianoferrato (III) de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$), ambos a 5 mM, contendo 0,1 M de KCl. Esta solução foi utilizada para avaliar e comparar o desempenho eletroquímico dos elétrodos desenvolvidos.

As medições eletroquímicas foram realizadas num potencióstato modelo PGSTAT12 (Metrohm), operado através do software GPES versão 4.9 (Herisau, Suíça). Foi utilizada uma célula eletroquímica de três elétrodos composta pelo biossensor como eletrodo de trabalho, eletrodo de platina como contra eletrodo e um eletrodo de referência Ag/AgCl (3 M KCl). No caso das células de biocombustível, a configuração aplicada foi de dois elétrodos, constituída pelo bioânodo e pelo biocátodo.

3.2. Preparação dos elétrodos

Os elétrodos de papel utilizados foram fabricados através de serigrafia, utilizando uma impressora a jato de tinta Fujifilm Dimatix DMP-2850, para a deposição de linhas condutoras de prata ou ouro sobre o papel impermeável. A zona eletroativa dos elétrodos foi feita em ouro também por serigrafia, sendo posteriormente modificados com um nanomaterial à base de carbono, nomeadamente nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT).

A deposição dos MWCNT (1 mg/mL dispersos em DMF) foi realizada através da deposição de 2 alíquotas de 20 μ L cada em cima do ouro, na parte eletroativa (quadrada), previamente delimitada com verniz para prevenir a dispersão dos MWCNT e DMF, formando uma área retangular com cerca de 0,6 \times 0,8 cm (Figura 19). A secagem da dispersão de MWCNT foi efetuada com o auxílio de uma lâmpada de aquecimento infravermelha, com o objetivo de assegurar a adesão e estabilização do material depositado (Figura 20).

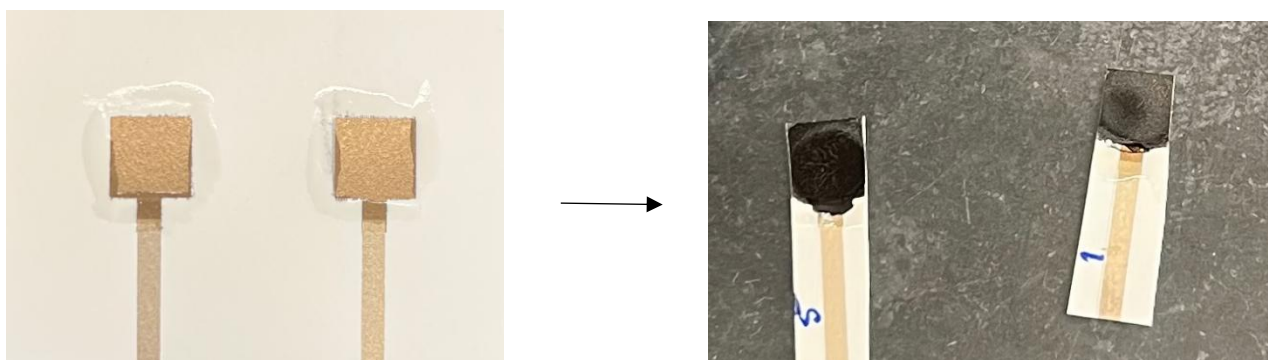


Figura 19. Elétrodos de papel serigrafados com ouro/prata antes (imagem da esquerda) e após deposição de MWCNT (imagem da direita).

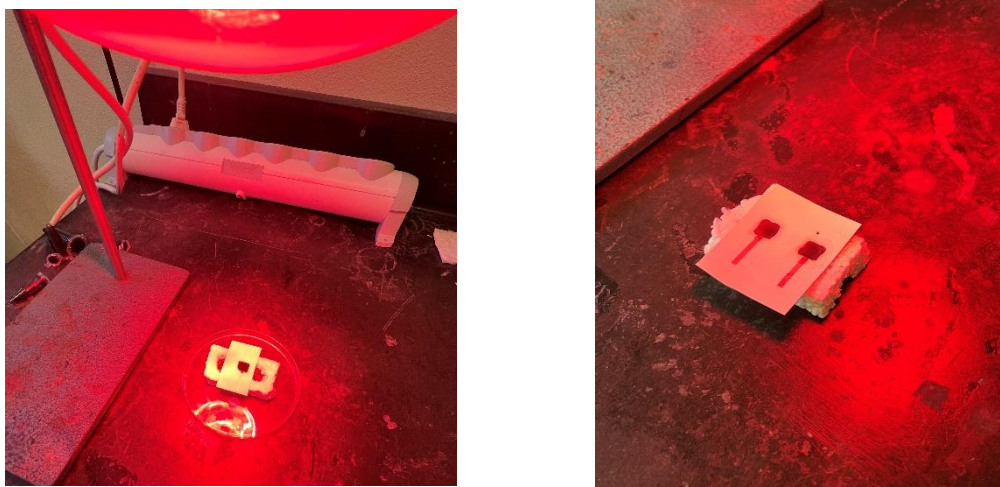


Figura 20. Eléttodos serigrafados durante o processo de secagem da dispersão de MWCNT (em DMF) sob lâmpada de aquecimento infravermelha.

3.3. Preparação do bioeléttodo ChOx

Bioeléttodos contendo a enzima colesterol oxidase (ChOx) foram preparados na presença e na ausência de um mediador redox. Como mediador, utilizou-se a tionina, sendo avaliadas duas concentrações: 1 mg/mL e 5 mg/mL. A tionina foi depositada (20 μ L) em cima dos eléttodos modificados com MWCNT com o objetivo de funcionalizar os eléttodos à base de papel.

Para a preparação da solução de tionina a 1 mg/mL, foram pesados 1 mg do composto para um *Eppendorf*, ao qual se adicionou 1 mL de *N,N*-dimetilformamida (DMF). De forma análoga, a solução a 5 mg/mL foi obtida pela dissolução de 5 mg de tionina em 1 mL de DMF. Ambas as soluções foram colocadas em banho de ultrassons durante 90 minutos, de forma a assegurar a dispersão uniforme da tionina no solvente.

A etapa final consistiu na imobilização da enzima ChOx (1 mg/mL), mediante deposição de 20 μ L sobre o eléttodo modificado. A incubação decorreu durante 2 horas, à temperatura ambiente e sob atmosfera húmida, na ausência de luz. Após esse período, os bioeléttodos foram armazenados a 4 °C, em tampão fosfato diluído (PBS 0,01 M, pH 7,3). A Figura 21 representa as condições experimentais adotadas durante o período de incubação dos bioeléttodos. Este bioeléttodo é designado como papel(Au)/MWCNT/tionina/ChOx.



Figura 21. Bioelétrodos modificados durante o período de incubação com a enzima *colesterol oxidase* (ChOx), sob atmosfera húmida e protegidos da luz.

Foi ainda preparado um bioelétrodo com a mesma configuração, mas sem a adição de tionina, de forma a avaliar o comportamento do sistema na ausência do mediador, designando-se de papel(Au)/MWCNT/ChOx. Adicionalmente, foram fabricados elétrodos contendo tionina (1 mg/mL e 5 mg/mL) e MWCNT, mas sem a imobilização da enzima ChOx, com o objetivo de avaliar o comportamento eletroquímico e a estabilidade do sistema redox.

Os bioelétrodos foram posteriormente caracterizados quanto à sua capacidade de deteção de colesterol, utilizando técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica e amperometria em tampão fosfato (PBS 0,1 M, pH 7,3), na presença de oxigénio dissolvido.

3.4. Preparação do bioelétrodo BOx

Para a imobilização da enzima bilirrubina oxidase (BOx) nos elétrodos anteriormente preparados (ver Secção 3.2), recorreu-se à utilização de um agente de ligação, éster succinimidil do ácido 1-pireno-butanoico (PBSE). Este composto foi preparado numa concentração de 3,85 mM em DMF. A zona eletroativa dos elétrodos, modificados com MWCNT, foi imersa nesta solução durante um período de 1 hora, à temperatura ambiente. Concluído este tempo de

incubação, a superfície dos elétrodos foi cuidadosamente lavada por imersão breve em água, de forma a remover o excesso de DMF.

Seguidamente, foram adicionados cerca de 20 μL de solução enzimática (BOx a 0,1 mg/mL) sobre os elétrodos previamente modificados. A incubação decorreu durante 90 minutos, à temperatura ambiente, sob atmosfera húmida e protegida da luz. Após esse período, os bioelétrodos foram armazenados a 4 °C em tampão fosfato diluído (PBS 0,01 M, pH 7,3). A Figura 22 apresenta os bioelétrodos durante o período de incubação com a enzima BOx. Este bioelétrodo é designado como papel(Au)/MWCNT/PBSE/BOx.



Figura 22. Bioelétrodos modificados durante o período de incubação com a enzima *bilirrubina oxidase* (BOx), sob atmosfera húmida e protegidos da luz.

Além dos elétrodos modificados com PBSE, também foi preparado um bioelétrodo de controlo sem a utilização do agente de ancoragem, no qual a enzima BOx foi diretamente aplicada sobre a superfície do elétrodo. Esta condição foi incluída para a comparação do desempenho eletroquímico, permitindo avaliar o efeito da presença do PBSE na imobilização e atividade da enzima.

A caracterização eletroquímica dos bioelétrodos foi realizada através de voltametria cíclica e amperometria, utilizando o eletrólito tamponado (PBS 0,1 M, pH 7,3), tanto na presença de oxigénio dissolvido como na sua ausência, sendo neste último caso obtida por purga com azoto durante 15 minutos.

3.5. Preparação da célula de biocombustível colesterol/O₂

A célula de biocombustível de colesterol/O₂ foi construída utilizando o bioelétrodo modificado com ChOx, descrito na Secção 3.3., como bioânodo e o bioelétrodo modificado com BOx, descrito na Secção 3.4., como biocátodo. A célula foi avaliada em meio tamponado (PBS 0,1 M pH 7,3), na presença e ausência de colesterol. A caracterização eletroquímica foi realizada por voltametria de varrimento linear (LSV) a 1 mV/s, recorrendo a um potencióstato.

A Figura 23 ilustra a configuração experimental da célula de biocombustível colesterol/O₂.



Figura 23. Representação esquemática da célula de biocombustível.

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização eletroquímica do eletrodo de papel

Para avaliar a eficiência eletroquímica dos eletrodos de papel com ouro (papel(Au)) e modificados com MWCNT (papel(Au)/MWCNT) foi realizada uma análise por voltametria cíclica (VC) utilizando como sonda eletroquímica o par redox hexacianoferrato(III/II), $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Esta técnica permite obter informação detalhada sobre os processos redox presentes na interface eletrodo/solução, nomeadamente o comportamento reversível ou irreversível das espécies envolvidas, bem como a eficiência da transferência eletrónica. A análise comparativa dos voltamogramas registados antes e após a modificação do eletrodo fornece evidências sobre a eficácia da funcionalização e a atividade eletroquímica do sistema.

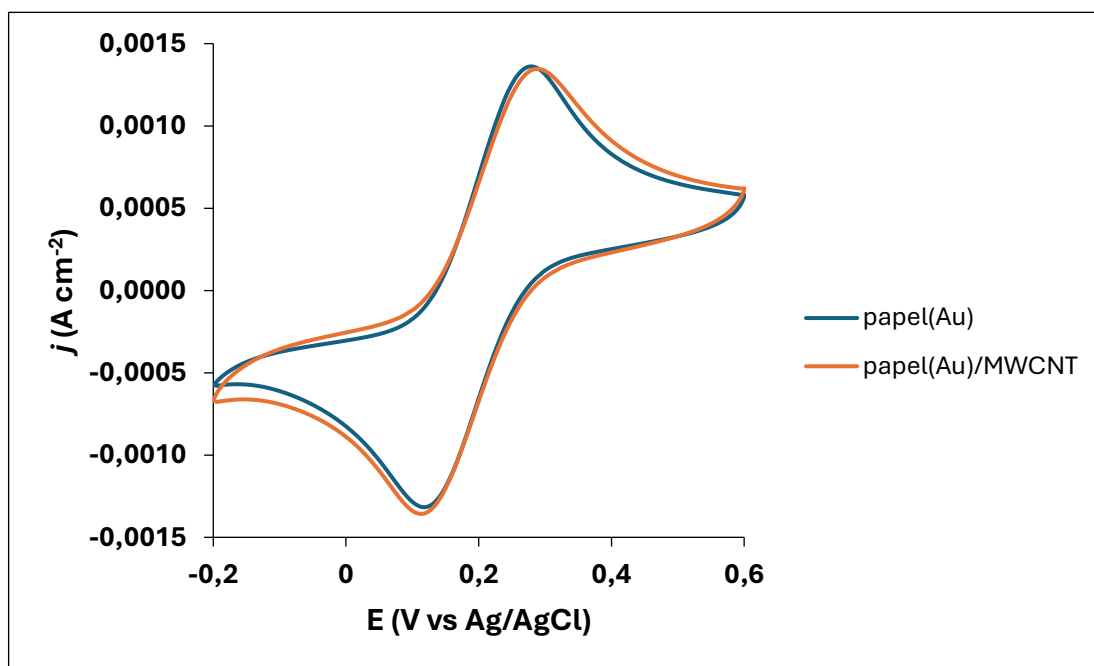


Figura 24. Voltamogramas cíclicos obtidos para os eletrodos de papel com ouro (papel(Au)) e modificados com MWCNT (papel(Au)/MWCNT), em 5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. A análise foi realizada a velocidade de varrimento de 50 mV/s.

Os voltamogramas obtidos, apresentados na Figura 24, revelaram picos bem definidos de oxidação ($\approx 0,28$ V) e redução ($\approx 0,12$ V) do ferro, com uma separação de pico (ΔE) de aproximadamente 0,16 V, evidenciando um comportamento eletroquímico reversível e eficiente para ambos os tipos de eletrodo. Estes resultados indicam que tanto o eletrodo base

em papel com ouro quanto aquele modificado com MWCNT apresentam boa condutividade e cinética de transferência eletrônica favorável, indicando uma boa eficiência eletroquímica.

Embora a diferença entre os perfis eletroquímicos seja mínima, a modificação com MWCNT desempenha um papel crucial na modificação dos biossensores enzimáticos. Esta modificação favorece uma melhor interação (mais estável) entre o eletrodo e as enzimas, nomeadamente através da formação de interações π - π entre os MWCNT e o agente de ligação PBSE, possibilitando subsequentemente a formação de ligações covalentes do tipo amida entre o PBSE e os grupos amina das enzimas ([Chen et al., 2001](#)). Este mecanismo assegura maior estabilidade e eficiência na imobilização enzimática, aspeto fundamental para o desempenho e reprodutibilidade dos dispositivos biossensores.

4.2. Caracterização do bioânodo como biossensor para o colesterol

No presente estudo, avaliou-se o desempenho do bioânodo como biossensor eletroquímico para a deteção de colesterol, comparando-se dois sistemas distintos: um que utilizou a tionina como mediador redox e outro que operou na ausência deste composto, ou seja, sem mediador. Para tal, foi realizada a caracterização da resposta do biossensor em resposta ao colesterol na presença e ausência do mediador.

4.2.1. Tionina como mediador

O bioeletrodo modificado com tionina (papel(Au)/MWCNT/tionina/ChOx) foi então caracterizado como um biossensor para colesterol.

Com o objetivo de caracterizar electroquimicamente a superfície modificada do eletrodo e confirmar a imobilização efetiva da enzima bem como a presença do mediador redox (tionina), foi realizada voltametria cíclica.

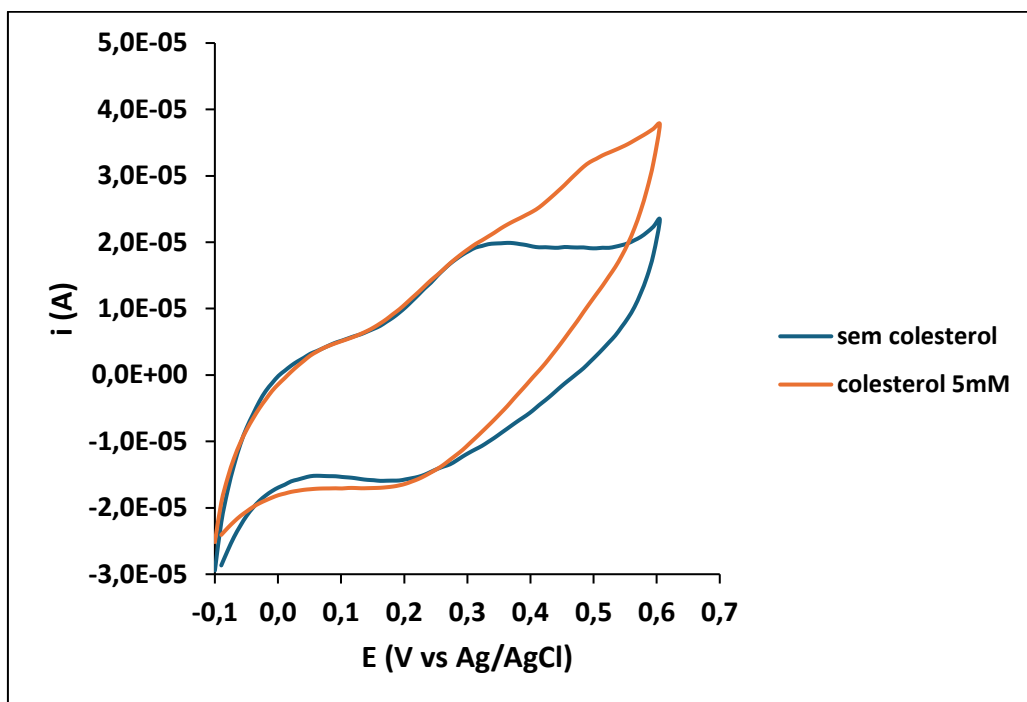


Figura 25. Voltamogramas cíclicos do bioelétrodo com tionina (papel(Au)/MWCNT/tionina/ChOx) registados na ausência (linha azul) e presença (linha laranja) de colesterol (5 mM) em PBS 0,1 M (pH 7,3).

A Figura 25 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos para o bioelétrodo modificado com tionina como mediador redox e a enzima ChOx, registados na ausência (linha azul) e na presença (linha laranja) de colesterol a 5 mM, em tampão PBS 0,1 M (pH 7,3), utilizando um elétrodo modificado com MWCNT.

Observa-se um aumento significativo da corrente de oxidação na presença do colesterol, particularmente no intervalo entre 0,3 V e 0,6 V. Esse comportamento pode ser atribuído à atividade catalítica da ChOx, que promove a oxidação do colesterol com a geração de peróxido de hidrogénio (H_2O_2). A tionina, na sua forma oxidada, atua como mediador redox, facilitando a transferência de eletrões entre o centro ativo da enzima e a superfície do elétrodo. Assim, o incremento da corrente de oxidação indica a ocorrência da reação enzimática mediada.

A técnica de amperometria foi seguidamente aplicada para se avaliar a eficiência do biossensor em concentrações crescentes de colesterol e assim se construir uma curva de calibração. Esta técnica foi escolhida por ser mais sensível que a VC permitindo registar, em tempo real, a resposta em corrente do sistema enzimático após adições sucessivas de solução

de colesterol, a um potencial constante, proporcionando uma análise quantitativa da sensibilidade do sistema em ambiente controlado. O potencial aplicado foi de +0.6 V o que de acordo com a VC da Figura 25, corresponde à oxidação máxima do colesterol. A análise do perfil amperométrico obtido permite aferir a estabilidade do sinal, bem como a capacidade de detecção e a sensibilidade do biossensor, fornecendo uma base sólida para a caracterização do seu comportamento analítico.

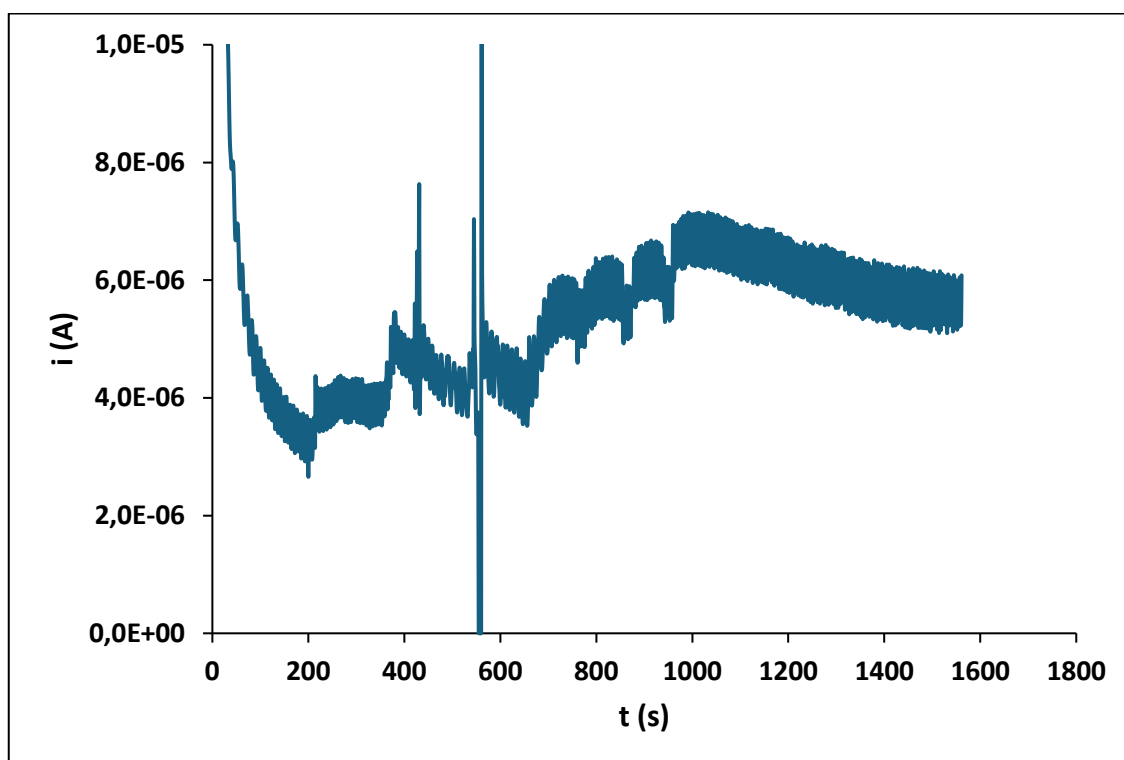


Figura 26. Resposta amperométrica do bioelétrodo papel(Au)/MWCNT/tionina/ChOx), após sucessivas adições de colesterol em 0,1 M PBS pH 7,3, sob potencial aplicado constante de +0,6V.

A Figura 26 ilustra a resposta amperométrica do bioelétrodo papel(Au)/MWCNT/tionina/ChOx para concentrações crescentes de colesterol. A adição e solução stock, bioânodo modificado, atuando como biossensor enzimático para o colesterol, com recurso à tionina como mediador redox. O ensaio amperométrico iniciou-se com eletrólito sem colesterol, e após a estabilização da corrente foram adicionadas tomas de solução stock de colesterol. A adição sequencial resultou em aumentos progressivos da corrente, demonstrando a atividade catalítica do sistema enzimático.

É evidente o estabelecimento de um perfil em patamar após cada adição, sugerindo a estabilização da corrente em regime estacionário e apontando para uma eventual saturação enzimática local. A resposta do biossensor revela uma elevada sensibilidade à presença de colesterol, observando-se um comportamento linear da corrente nas primeiras adições, compatível com uma cinética de primeira ordem em baixas concentrações de substrato. A utilização da tionina enquanto mediador parece favorecer a transferência eletrônica entre o centro redox da enzima e a superfície condutora do eletrodo, promovendo uma comunicação eletrônica eficiente e minimizando limitações difusivas.

A partir dos valores de corrente obtidos nos ensaios amperométricos, construiu-se uma curva de calibração relacionando a intensidade da corrente com as diferentes concentrações de colesterol adicionadas. Esta abordagem visa quantificar a sensibilidade do biossensor e avaliar a linearidade da sua resposta analítica, aspetos fundamentais para a sua eventual aplicação em contextos de análise quantitativa.

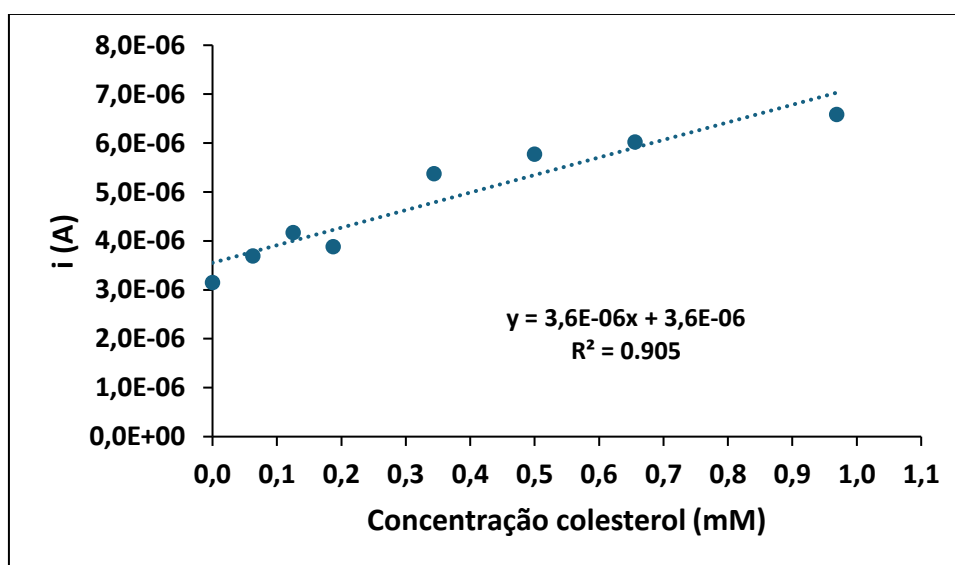


Figura 27. Curva de calibração do bioeletrodo papel(Au)/MWCNT/tionina/Chox para colesterol, obtida a partir da resposta amperométrica para diferentes concentrações de colesterol.

A Figura 27 ilustra a curva de calibração obtida a partir da resposta amperométrica do bioeletrodo, relativamente a diferentes concentrações de colesterol. Os dados revelam uma relação linear entre a intensidade da corrente (i) e a concentração de colesterol até 1 mM, com um coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,905. Esta correlação linear indica uma boa capacidade do biossensor para quantificar o analito dentro da gama de trabalho estudada.

A equação da reta de regressão ($i(A) = 3,6 \times 10^{-6} [\text{colesterol}] (mM) + 3,6 \times 10^{-6}$) permite obter a sensibilidade do sistema, correspondendo a $3,6 \times 10^{-6} A/mM$. O valor de R^2 , embora não próximo da unidade, é suficientemente elevado para validar a aplicação do modelo linear, especialmente tendo em conta a natureza biológica do sistema e as variações inerentes à resposta enzimática.

Contudo, apesar da resposta inicial ser favorável, resultados posteriores (ver Anexo B) indicaram que a tionina apresenta instabilidade ao longo de ciclos consecutivos de VC, através do decréscimo dos picos redox (Figura B1) comprometendo a reprodutibilidade da resposta do bioelétrodo. Este comportamento limitou a viabilidade do uso da tionina neste biossensor, tendo-se optado por uma configuração sem mediador redox, com imobilização direta da enzima sobre MWCNT.

4.2.2. Sem mediador

À semelhança do procedimento adotado para a configuração com mediador (tionina), a caracterização eletroquímica do bioelétrodo na ausência de mediador (papel(Au)/MWCNT/ChOx) foi realizada primeiro através de voltametria cíclica e depois por amperometria.

A voltametria cíclica foi então aplicada na mesma gama de potencial (entre -0,1 e 0,6 V) e velocidade de varrimento (10 mV/s) na presença e ausência de colesterol, estando os voltamogramas representados na Figura 28.

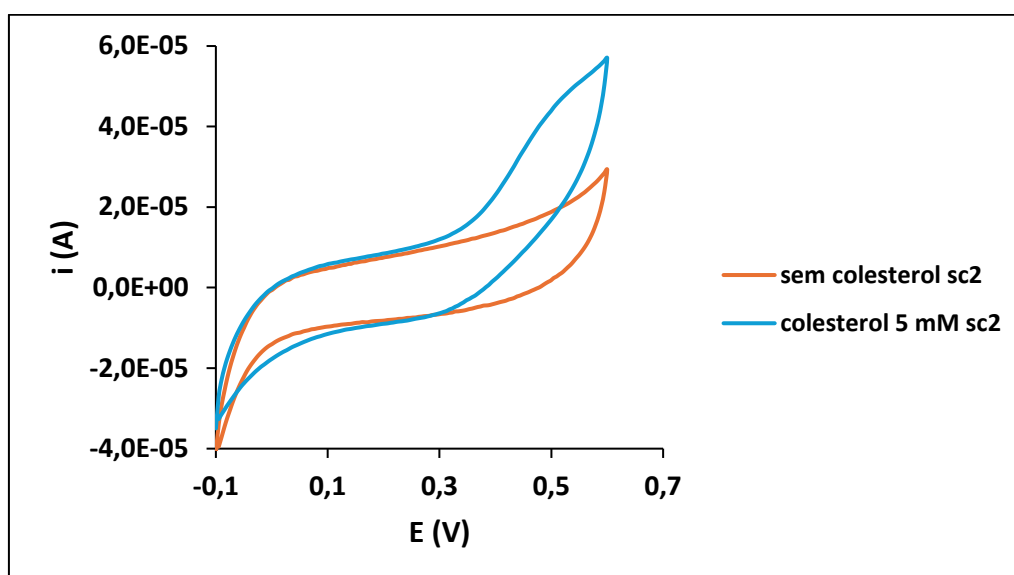


Figura 28. Voltamogramas cíclicos do bioelétrodo papel(Au)/MWCNT/ChOx registados na ausência (linha laranja) e presença de colesterol 5 mM (linha azul) em PBS 0,1 M (pH 7,3). Velocidade de varrimento: 10 mV/s.

Verificou-se que na presença de colesterol (linha azul), observa-se um aumento significativo da corrente anódica a partir de aproximadamente 0,3 V quando comparado com voltamograma na ausência de colesterol (linha laranja). Este incremento na corrente a um potencial baixo de 0,3 V poderá indicar a oxidação de colesterol através de um mecanismo de transferência direta de eletrões entre enzima e transdutor, uma vez que a deteção indireta de colesterol através do processamento de sinal do peróxido de hidrogénio (produto da reação da catálise enzimática entre oxigénio e colesterol) normalmente ocorre a potenciais mais positivos. Assim, é possível então a deteção de colesterol direta sem uso de mediadores, simplificando o sistema. Esta característica é particularmente relevante para o desenvolvimento de dispositivos bioeletroquímicos de baixo custo e elevada especificidade, uma vez que elimina a necessidade de mediadores artificiais, os quais podem introduzir instabilidade, toxicidade ou complexidade no sistema.

Em seguida procedeu-se à análise amperométrica de forma a se construir uma curva de calibração para o colesterol. Nos ensaios voltamétricos da Figura 28, verificou-se que diferença de corrente entre a ausência e presença de colesterol foi máxima para 0,6 V. Assim, este potencial foi selecionado para o ensaio amperométrico. A Figura 30 apresenta o perfil amperométrico obtido, correspondente à resposta do biossensor (papel(Au)/MWCNT/ChOx) a diferentes concentrações de colesterol.

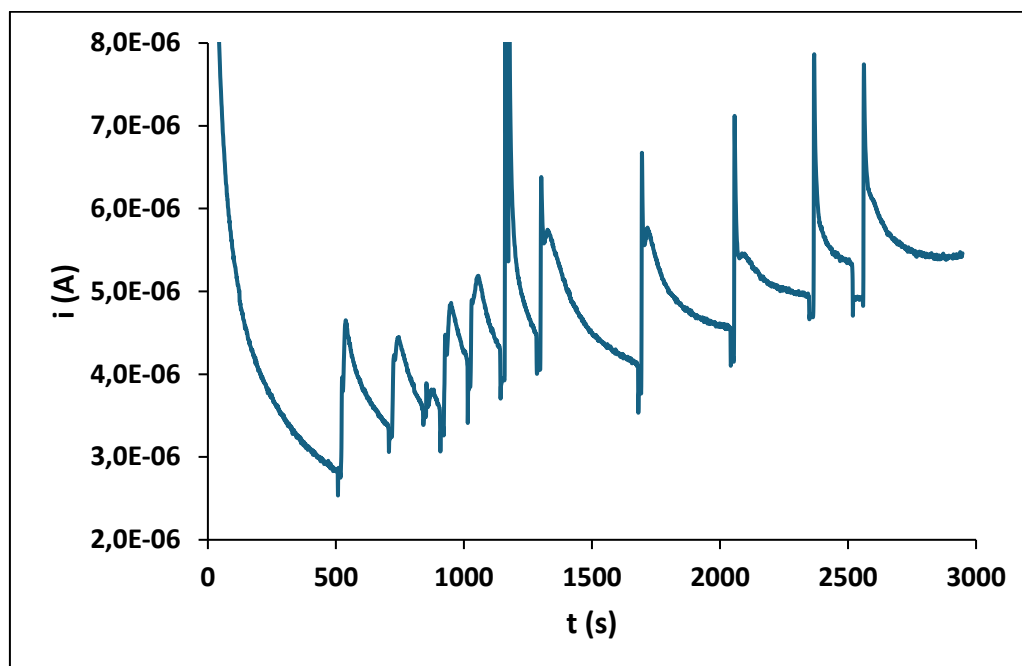


Figura 29. Resposta amperométrica do bioelétrodo papel(Au)/MWCNT/ChOx, após sucessivas adições de colesterol em PBS 0,1 M pH 7,3), sob potencial aplicado constante de +0,6V.

A partir da análise da Figura 29, observa-se que, após cada adição de colesterol, ocorre um aumento imediato da corrente, seguido por um retorno gradual a um patamar mais estável. Este comportamento é típico de sistemas de biossensores com resposta dependente da difusão do substrato, refletindo a atividade enzimática da ChOx imobilizada na superfície do elétrodo. A corrente de estado estacionário estabiliza-se, em cada degrau, num valor superior ao anterior, o que indica que o bioelétrodo responde ao aumento progressivo da concentração de colesterol em solução.

O facto de se observar uma resposta clara, progressiva e proporcional demonstra que o bioânodo é funcional mesmo sem mediadores artificiais, confirmando o bom desempenho do material eletrocatalítico utilizado e a eficiência da imobilização da enzima.

Com base nos dados obtidos por amperometria, foi construída a curva de calibração com o objetivo de quantificar a relação entre a concentração de colesterol em solução e a resposta eletroquímica do biossensor (Figura 30).

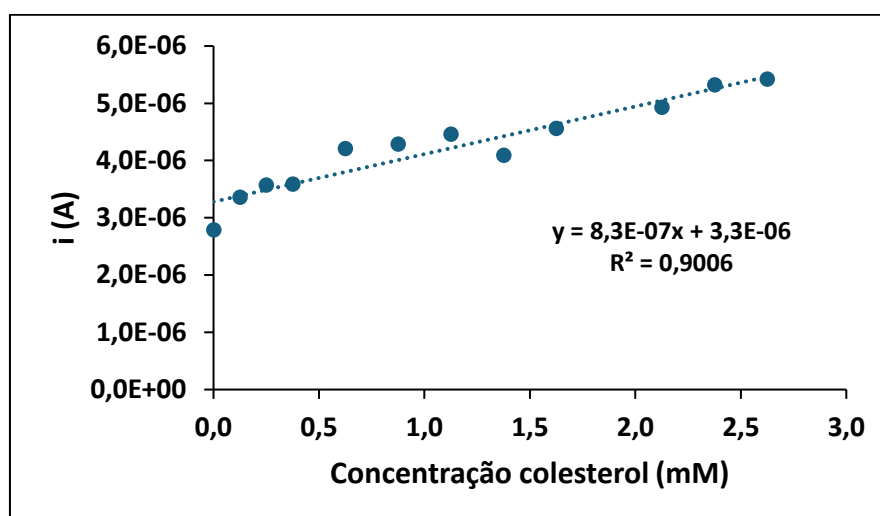


Figura 30. Curva de calibração do biossensor enzimático para colesterol obtida a partir da resposta amperométrica a diferentes concentrações de analito.

A Figura 30 ilustra a curva de calibração obtida a partir das respostas amperométricas do bioânodo operando na ausência de mediador, construídas com base nos valores de corrente registados após cada adição sucessiva de colesterol. Estes ensaios permitiram estabelecer uma relação quantitativa entre a concentração do analito e a intensidade da corrente gerada pelo sistema, viabilizando a avaliação da sensibilidade e do desempenho analítico do biossensor.

Os resultados evidenciam uma tendência linear no intervalo de concentrações analisado (0,1 a 2,8 mM) embora com um ajuste aceitável dado que o coeficiente de correlação (R^2) correspondeu a 0,9006. A equação da reta obtida, $i(A) = 8,3 \times 10^{-7} [\text{colesterol}](mM) + 3,3 \times 10^{-6}$, expressa a dependência da corrente em relação à concentração de colesterol, sendo o declive representativo da sensibilidade do sistema ($8,3 \times 10^{-7} A/mM$). Esta sensibilidade, embora baixa, revela-se adequada para aplicações de deteção eletroquímica direta.

O limite de deteção (LOD) foi calculado com base no desvio padrão da resposta do branco (ausência de analito) e no declive da curva de calibração, S , através da Equação 10:

$$LOD = \frac{\sigma_{branco}}{S} \quad (10)$$

O valor de LOD calculado correspondeu a 0,30 mM, valor que representa a menor concentração de colesterol que o sistema é capaz de detetar de forma fiável, nas condições experimentais adotadas.

Os dados obtidos validam o desempenho do bioelétrodo como biossensor para determinação de colesterol capaz de operar em condições simplificada, sem o recurso a mediadores redox. Perspetivam-se, contudo, margens para melhoria, nomeadamente ao nível da sensibilidade e do limite de deteção, que poderão ser otimizados através de avanços na arquitetura do elétrodo ou na eficiência do processo de imobilização enzimática.

4.3. Caracterização do biocátodo como biossensor para o oxigénio

Neste subcapítulo, é apresentada a caracterização do biocátodo como um biossensor para determinação de oxigénio. O sistema foi avaliado na presença e ausência de oxigénio, com recurso ao mediador PBSE para facilitar a estabilidade e orientação da enzima, facilitando assim a transferência de eletrões entre a enzima e o elétrodo. As análises foram realizadas por VCa e amperometria, permitindo avaliar a resposta eletroquímica do bioelétrodo papel(Au)/MWCNT/PBSE/BOx ao oxigénio.

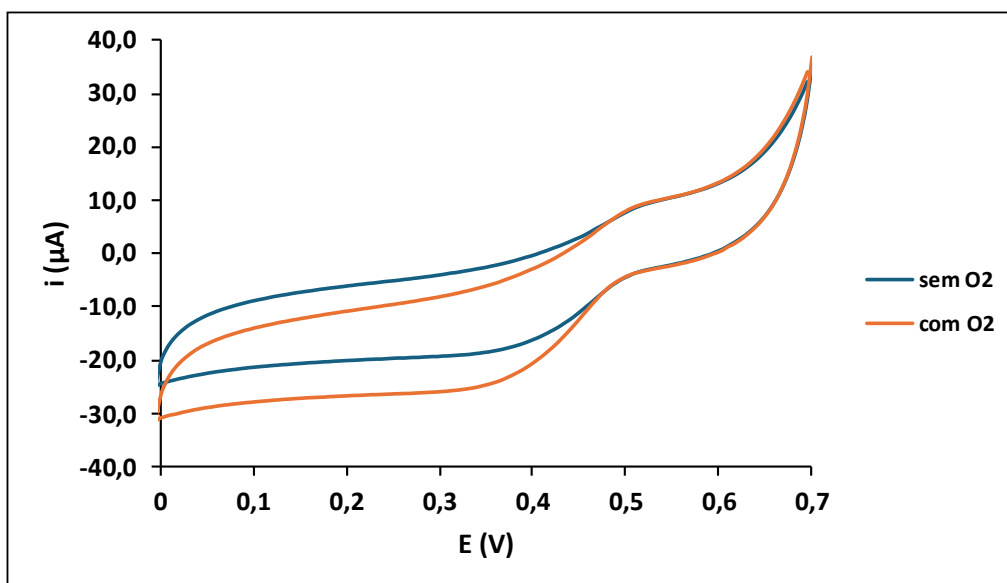
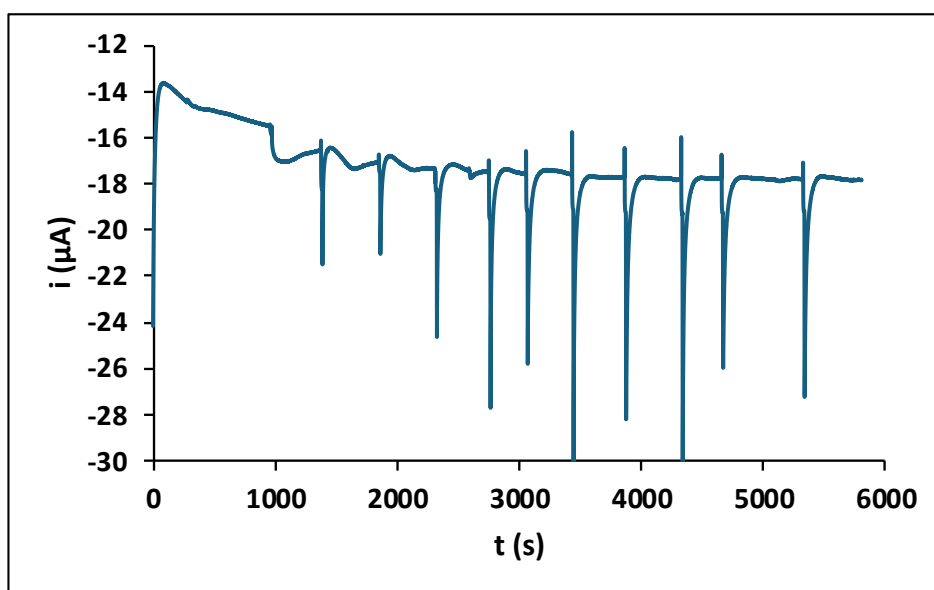


Figura 31. Voltamogramas cíclicos do bioelétrodo papel(Au)/MWCNT/PBSE/BOx registados na ausência (linha azul) e presença (linha laranja) de oxigénio em PBS 0,1 M (pH 7,3). Velocidade de varrimento: 10 mV/s.

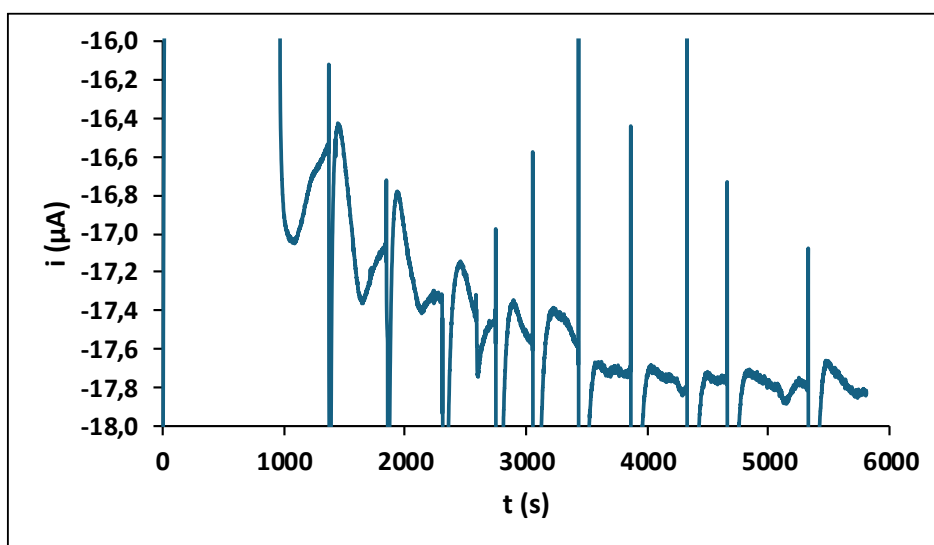
A Figura 31 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos para o bioelétrodo mediado por PBSE, registados na presença (linha laranja) e ausência (linha azul) de oxigénio dissolvido no eletrólito. As medições foram realizadas a uma velocidade de varrimento de $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Observa-se que, na condição com oxigénio, ocorre um aumento da corrente catódica (região negativa do eixo das correntes) em comparação com a condição sem oxigénio, verificando-se o deslocamento entre os voltamogramas a partir dos 0,45 V. Este comportamento indica uma maior atividade redutora, compatível com a atuação do oxigénio como substrato eletroativo no processo catalisado pela enzima BOx. A utilização de PBSE como mediador redox favorece a transferência eletrónica entre o centro ativo da enzima e o elétrodo, permitindo evidenciar as diferenças na resposta eletroquímica associadas à presença do analito.

Estes resultados confirmam o potencial do bioelétrodo papel(Au)/MWCNT/PBSE/BOx em ser usado como biossensor para determinação de oxigénio.

Em seguida foi realizada a análise amperométrica para diferentes concentrações de oxigénio a um potencial fixo de 0 V (potencial ao qual a diferença de correntes é máxima de acordo com a análise voltamétrica da Figura 31). A Figura 32 apresenta a resposta amperométrica do bioelétrodo papel(Au)/MWCNT/PBSE/BOx, evidenciando variações de corrente associadas à presença de oxigénio dissolvido na solução eletrolítica.



a)



b)

Figura 32. Resposta amperométrica do bioelétrodo papel(Au)/MWCNT/PBSE/BOx, após sucessivas adições de oxigénio, sob potencial aplicado constante de 0V, a) sem e b) com ajuste da escala da corrente.

De um modo geral, verifica-se um incremento da corrente catódica associado à presença crescente de oxigénio, o que é indicativo da atividade redutora da enzima imobilizada no elétrodo. Contudo, importa referir que os aumentos de corrente não se mostram estritamente proporcionais aos incrementos realizados, sendo visíveis algumas variações entre os patamares alcançados.

Esta ausência de proporcionalidade rigorosa poderá dever-se a fenômenos de difusão não homogênea do oxigênio no eletrólito ou a fatores experimentais como ligeiras discrepâncias no volume adicionado ou na agitação da solução. Apesar destas oscilações, a estabilidade relativa do sinal após cada adição, evidencia uma resposta coerente do sistema, compatível com o funcionamento de um biossensor enzimático. Tal característica é indicativa de um bom acoplamento entre a matriz enzimática e o mediador redox, bem como da integridade do filme imobilizado. Este comportamento é consistente com estudos prévios que apontam o PBSE como um mediador eficaz na imobilização de enzimas redox, devido à sua estrutura pi-conjugada que favorece a transferência eletrônica em interfaces bioeletroquímicas ([del Barrio et al., 2022](#); [Xiao et al., 2025](#); [Galindo-de-la-Rosa et al., 2019](#); [Bui and Park, 2016](#); [Wang et al., 2023](#); [Kumar, Poddar and Sinha, 2022](#); [Cavalcante et al., 2021](#); [Suresh et al., 2021](#)).

A partir da resposta amperométrica procedeu-se à construção de uma curva de calibração, relacionando a intensidade da corrente catódica registada com as concentrações conhecidas de oxigênio dissolvido (Figura 33). Através da análise dos dados obtidos, pretende-se verificar a adequação do biossensor para aplicações em que seja necessária a quantificação precisa do oxigênio em solução.

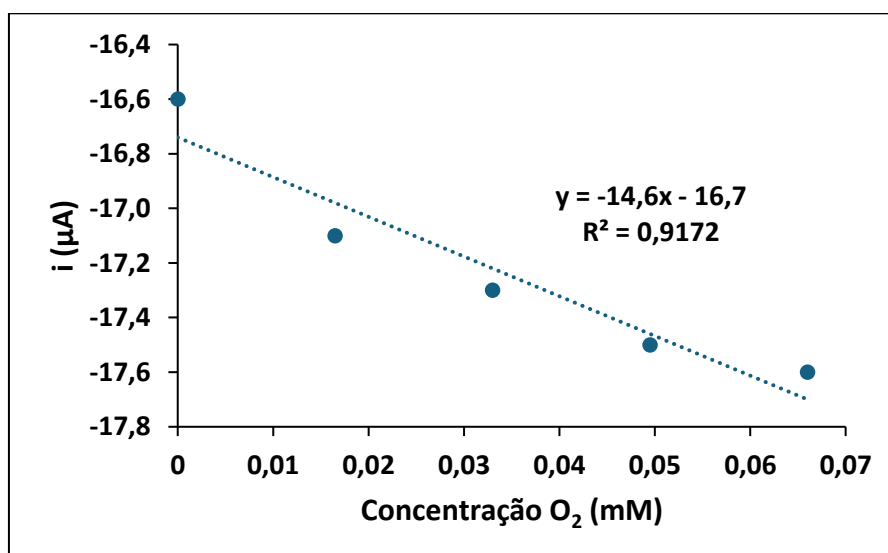


Figura 33. Curva de calibração do biossensor enzimático para o oxigênio, obtida a partir da resposta amperométrica a diferentes concentrações de analito.

De acordo com a Figura 33 a corrente catódica registada revelou uma relação linear com a concentração de O_2 , expressa pela equação $i (\mu A) = -14,6[O_2] (mM) - 16,7$, onde o declive negativo confirma o papel do oxigénio como aceitador final de eletrões no processo redox catalisado pela enzima imobilizada. Esta relação é compatível com o mecanismo de redução enzimática de O_2 , em que a geração de corrente resulta diretamente da atividade catalítica do biocátodo. Verificou-se uma linearidade de até 0.067 mM, sendo que o coeficiente de correlação obtido ($R^2 = 0,9172$) evidencia uma correlação aceitável entre as variáveis estudadas, embora se observe algum desvio da linearidade ideal. A sensibilidade do bioelétrodo equivale a 14,6 $\mu A/mM$ enquanto que o LOD determinado com base na equação 11 corresponde a 0,0131 mM, o que evidencia a capacidade do biossensor em detetar concentrações relativamente baixas de oxigénio em meio aquoso. Este parâmetro é particularmente relevante em contextos analíticos onde a monitorização de teores residuais de oxigénio é crítica.

De um modo geral a conjugação da enzima com o mediador PBSE revelou-se eficaz, demonstram a viabilidade funcional do biossensor proposto.

4.4. Caracterização da célula de biocombustível colesterol/ O_2

A caracterização eletroquímica constitui uma etapa crucial na avaliação do desempenho funcional de células de biocombustível enzimáticas, fornecendo parâmetros fundamentais sobre a conversão bioeletroquímica da energia. Neste subcapítulo, apresentam-se os resultados experimentais obtidos para o sistema colesterol/ O_2 formado pelo bioânodo papel(Au)/MWCNT/ChOx e pelo biocátodo papel(Au)/MWCNT/PBSE/Box, com base em dois perfis característicos: as curvas de polarização e as curvas de potência. A análise conjunta destes gráficos permite aferir a capacidade da célula em gerar energia de forma eficiente, bem como identificar o ponto de potência máxima e comportamentos eletroquímicos relevantes sob diferentes regimes de operação. Estes resultados fornecem suporte à compreensão dos processos redox envolvidos, contribuindo para a avaliação da viabilidade da célula de biocombustível enquanto plataforma para deteção de colesterol.

A Figura 34 representa as curvas polarização, relacionando o potencial de circuito aberto (OCP) com a densidade de corrente. Esta análise permite avaliar o comportamento

eletroquímico da célula de biocombustível em diferentes condições de carga, fornecendo informações sobre a estabilidade e a capacidade de geração de tensão do sistema colesterol/O₂. A evolução do OCP com o aumento da corrente fornece indícios sobre as limitações cinéticas e a eficiência global da conversão bioeletroquímica.

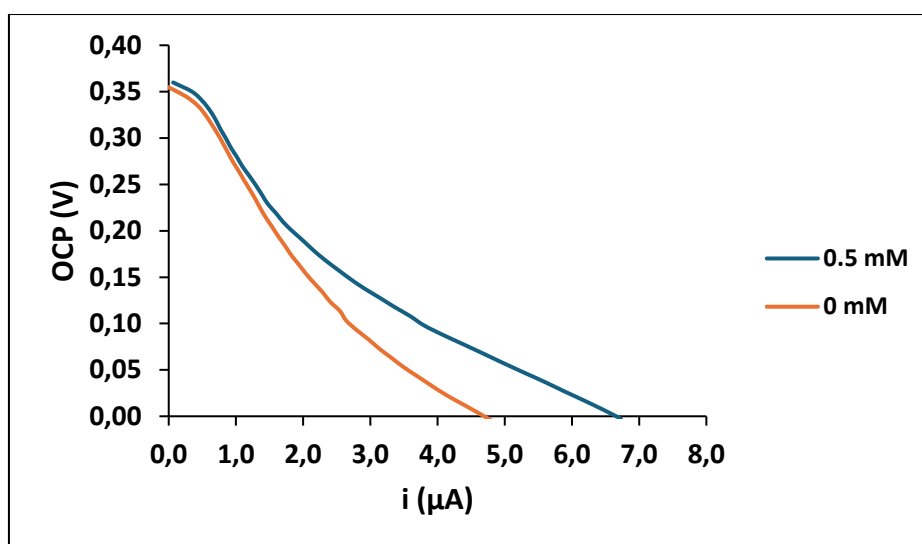


Figura 34. Curvas de polarização célula de biocombustível enzimática Colesterol/O₂, na ausência (0 mM) e na presença (0,5 mM) de colesterol e com oxigênio dissolvido naturalmente no eletrólito. Velocidade de varrimento: 1 mV/s.

Encontra-se apresentado na Figura 34 a relação entre o potencial de circuito aberto (OCP) e a corrente para o sistema Colesterol/O₂, em duas condições: sem colesterol (0 mM) e com 0,5 mM. Observa-se que na presença de colesterol a corrente gerada foi superior tal como esperado. O valor de OCP ($\approx 0,36$ V) encontra-se dentro da gama reportada na literatura para células de biocombustível baseadas em colesterol oxidase, como demonstrado por [del Barrio et al. \(2022\)](#), que relataram um OCP de 0,45 V para um sistema com papel e ouro impresso, e por [Kumar et al. \(2022\)](#), com 0,38 V para um sistema integrado com grafeno.

Este comportamento indica que o sistema proposto é eletroquimicamente ativo e responde de forma sensível à presença de colesterol, uma característica desejável para aplicações em biossensores autoalimentados.

Adicionalmente, observa-se que a curva com 0 mM de colesterol apresenta menor OCP e maior declínio com o aumento da corrente, sugerindo polarização anódica mais acentuada na

ausência do analito. Este comportamento é coerente com o observado por [Suresh et al. \(2021\)](#), que verificaram um declínio acentuado do OCP em sistemas com polímeros condutores na ausência de substrato.

Assim, os resultados aqui obtidos demonstram não só a viabilidade eletroquímica da célula Colesterol/O₂, mas também reforçam o seu potencial enquanto biossensor funcional alinhando-se com tendências recentes da literatura para biossensores vestíveis e descartáveis.

A curva de potência gerada em função da corrente fornece informações cruciais sobre o desempenho energético da célula de biocombustível enzimática. Para a construção da representação gráfica apresentado na Figura 35, a potência (P), expressa em watts (μW), foi calculada em cada ponto experimental a partir do produto entre o potencial registrado (E) e a corrente correspondente (i), de acordo com a Equação 11:

$$P = E \times i \quad (11)$$

Este procedimento permite a identificação do ponto de potência máxima, valor que representa o desempenho ótimo da célula sob condições específicas de carga. A análise desta curva complementa os dados já apresentados proporcionando uma visão mais completa sobre a capacidade de conversão energética do sistema colesterol/O₂.

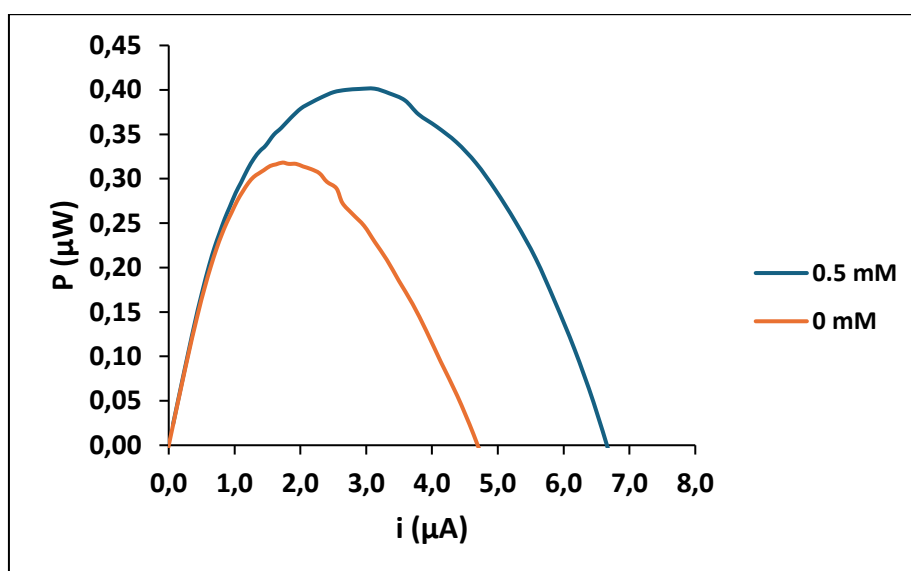


Figura 35. Curvas de potência (P) em função da corrente (i) para a célula de biocombustível Colesterol/O₂, na ausência (0 mM) e na presença de 0,5 mM de colesterol.

Observa-se na Figura 35, para ambas as condições, o comportamento típico de uma célula de biocombustível: um aumento inicial da potência com a corrente, seguido por um decréscimo acentuado após o ponto de potência máxima. Este ponto representa a condição de operação em que a célula converte a maior quantidade de energia bioquímica em energia elétrica de forma eficiente.

Na presença de 0,5 mM de colesterol, a potência máxima atingida foi de aproximadamente 0,41 μW , registrada por volta de 2,8 μA . Em contraste, na ausência de colesterol, a potência máxima observada foi inferior, cerca de 0,31 μW , e ocorreu em intensidade de corrente ligeiramente mais baixa ($\approx 2,1 \mu\text{A}$). Estes dados indicam que a presença do analito não só aumenta a energia gerada, como também alarga a gama de operação eficaz da célula.

Este comportamento é consistente com o esperado para sistemas baseados em oxidação enzimática, onde a presença do substrato induz maior atividade catalítica, favorecendo a geração de elétrons e, por conseguinte, a produção de potência. Resultados da literatura reportaram potências mais elevadas, por exemplo, [Cavalcante et al. \(2021\)](#) registou uma potência até 11,2 μW em presença de colesterol com um sensor descartável de baixo custo, enquanto que no estudo de [Kumar et al. \(2022\)](#), o sistema integrado atingiu 42,6 μW com 0,38 V de OCP, evidenciando o impacto da concentração e da arquitetura do sistema na performance energética.

Embora a potência máxima obtida neste estudo ($\approx 0,41 \mu\text{W}$) seja inferior à de alguns trabalhos reportados na literatura, existem várias razões que podem justificar este desempenho. Em primeiro lugar, o sistema desenvolvido não utilizou mediadores eletrônicos, o que pode limitar a transferência de elétrons entre a enzima e o eletrodo. Além disso, a configuração da célula e as condições experimentais, como a concentração enzimática, o pH e a temperatura, não foram alvo de otimização específica nesta fase. Mesmo assim, os resultados obtidos demonstram que o sistema responde à presença de colesterol e apresenta potencial para aplicações em biossensores autoalimentados.

5. Conclusão

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e a caracterização de uma célula de biocombustível enzimática baseada em papel, destinada à detecção seletiva de colesterol, utilizando colesterol oxidase (ChOx) e bilirrubina oxidase (BOx) como biocatalisadores no bioânodo e no biocátodo, respectivamente. A abordagem experimental adotada integrou materiais de baixo custo e elevada eficiência eletroquímica, como os MWCNT, combinados com mediadores redox ou agentes de ligação, num suporte flexível e biodegradável, compatível com aplicações portáteis e descartáveis.

Os resultados obtidos evidenciaram que a modificação dos elétrodos de papel com MWCNT por si só não melhoraram a condutividade eletrônica do transdutor, mas proporcionaram uma melhor imobilização das enzimas. A caracterização eletroquímica do bioânodo revelou uma resposta sensível e proporcional à presença de colesterol, tanto em sistemas com mediador (tionina) como em sistemas sem mediador, apresentando boa linearidade dentro da faixa de concentração estudada. Contudo a tionina revelou pouca estabilidade sendo assim optado pelo uso de um sistema sem mediação e baseado na transferência direta de elétrões.

O biocátodo, funcionalizado com a enzima BOx, demonstrou atividade catalítica satisfatória na redução de oxigênio, essencial para o funcionamento eficiente da célula de biocombustível. A resposta amperométrica obtida para o biocátodo indicou boa afinidade pelo oxigênio dissolvido, refletida em correntes estáveis em condições operacionais suaves.

Ao conjugar os dois bioelétrodos, a célula de biocombustível colesterol/O₂ gerou corrente e potência elétrica a partir da oxidação do colesterol, com um potencial de circuito aberto (OCP) de cerca de 0,36 V. Apesar de a potência gerada ser baixa ($P_{\max} = 0.41 \mu\text{W}$), o sistema revela potencial para ser aplicado como biossensor para determinação de colesterol de uma forma autoalimentada (sem fornecimento de energia), independentemente do nível de energia gerado.

Em conjunto, os dados confirmam a viabilidade do conceito proposto e apontam para o desenvolvimento de dispositivos analíticos sustentáveis, com possíveis aplicações na monitorização descentralizada de biomarcadores clínicos. No entanto, a estabilidade a longo prazo das enzimas e a miniaturização do sistema para aplicações vestíveis permanecem como desafios a serem superados. Ainda assim, o sistema desenvolvido representa uma abordagem inovadora, ecológica e economicamente viável para a detecção seletiva de colesterol, alinhando-se com os princípios da bioengenharia sustentável.

Referências

Grubler, A. (2012). Energy transitions research: Insights and cautionary tales. *Energy Policy*, [online] 50, pp.8–16. doi:<https://doi.org/10.1016/j.enpol.2012.02.070>.

Araújo, K. (2014). The emerging field of energy transitions: Progress, challenges, and opportunities. *Energy Research & Social Science*, [online] 1, pp.112–121. doi:<https://doi.org/10.1016/j.erss.2014.03.002>.

Gatto, A. (2022). The energy futures we want: A research and policy agenda for energy transitions. *Energy Research & Social Science*, 89, p.102639. doi:<https://doi.org/10.1016/j.erss.2022.102639>.

Sovacool, B.K. (2016). How long will it take? Conceptualizing the temporal dynamics of energy transitions. *Energy Research & Social Science*, [online] 13, pp.202–215. doi:<https://doi.org/10.1016/j.erss.2015.12.020>.

Berkhout, F., Marcotullio, P. and Hanaoka, T. (2012). Understanding energy transitions. *Sustainability Science*, 7(2), pp.109–111. doi:<https://doi.org/10.1007/s11625-012-0173-5>.

Blog. (2024). *AI in Energy Management: Revolutionizing the Sector*. [online] Available at: <https://tech-stack.com/blog/ai-in-energy-sector/> [Accessed 10 Mar. 2025].

Mexicana De Física, S. and México Cano-Castillo, A. (n.d.). Available at: <https://www.redalyc.org/pdf/570/57030971011.pdf> [Accessed 10 Mar. 2025].

Leech, D., Kavanagh, P. and Schuhmann, W. (2012). Enzymatic fuel cells: Recent progress. *Electrochimica Acta*, 84, pp.223–234. doi:<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.02.087>.

Hart, D. (2000). Sustainable energy conversion: fuel cells — the competitive option? *Journal of Power Sources*, 86(1-2), pp.23–27. doi:[https://doi.org/10.1016/s0378-7753\(99\)00455-3](https://doi.org/10.1016/s0378-7753(99)00455-3).

Google Books. (2024). *Biofuel Cells*. [online] Available at: https://books.google.pt/books/about/Biofuel_Cells.html?id=LEj9EAAAQBAJ&redir_esc=y [Accessed 28 Mar. 2025].

Tayhas, G., Palmore, R. and Whitesides, G. (n.d.). *Microbial and Enzymatic Biofuel Cells*. [online] Available at: <https://projects.iq.harvard.edu/files/gmwgroup/files/402.pdf>.

Davis, F. and Higson, S.P.J. (2007). Biofuel cells—Recent advances and applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(7), pp.1224–1235. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.04.029>.

Bullen, R.A., Arnot, T.C., Lakeman, J.B. and Walsh, F.C. (2006). Biofuel cells and their development. *Biosensors and Bioelectronics*, [online] 21(11), pp.2015–2045. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.01.030>.

Song, Y. and Wang, C. (2019). High-power biofuel cells based on three-dimensional reduced graphene oxide/carbon nanotube micro-arrays. *Microsystems & Nanoengineering*, [online] 5, 46. doi:<https://doi.org/10.1038/s41378-019-0081-2>.

Kižys, K., Zinovičius, A., Jakštys, B., Bružaitė, I., Balčiūnas, E., Petrulevičienė, M., Ramanavičius, A. and Morkvėnaitė-Vilkončienė, I. (2023). Microbial Biofuel Cells: Fundamental Principles, Development and Recent Obstacles. *Biosensors*, [online] 13(2), p.221. doi:<https://doi.org/10.3390/bios13020221>.

Srinithya Ravinuthala and Das, S.P. (2022). Biocatalysis of Biofuel Cells: Exploring the Intrinsic Bioelectrochemistry. *Clean Energy Production Technologies*, pp.177–200. doi:https://doi.org/10.1007/978-981-16-4509-9_9.

Chakraborty, I., Olsson, R.T., Andersson, R.L. and Pandey, A. (2024). Glucose-based biofuel cells and their applications in medical implants: A review. *Heliyon*, [online] 10(13), pp.e33615–e33615. doi:<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e33615>.

Nasar, A. and Perveen, R. (2019). Applications of enzymatic biofuel cells in bioelectronic devices – A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, [online] 44(29), pp.15287–15312. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.04.182>.

Yamashita, T. and Yokoyama, H. (2018). Molybdenum anode: a novel electrode for enhanced power generation in microbial fuel cells, identified via extensive screening of metal electrodes. *Biotechnology for biofuels*, 11, Artigo 39 doi:<https://doi.org/10.1186/s13068-018-1046-7>.

Xie, R., Wang, S., Wang, K., Wang, M., Chen, B., Wang, Z. and Tan, T. (2022). Improved energy efficiency in microbial fuel cells by bioethanol and electricity co-generation. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 15, 84. doi:<https://doi.org/10.1186/s13068-022-02180-4>.

Gamachis Korsas, Bekele, G.K., Beyene, A., Alemu, D., Meka, A.F., Tibebu, S., Beamlak Teshome Gutema and Ayele, A. (2025). Microbial Fuel Cells for Sustainable Biofuel Production: Cutting-edge Technology. *Green Energy and Environmental Technology*, Vol. 4. doi:<https://doi.org/10.5772/geet.20240082>.

Inamuddin, Ahamed, M.I., Boddula, R. and Rezakazemi, M. eds., (2021). Biofuel Cells. doi:<https://doi.org/10.1002/9781119725008>.

Chen, C.Y., Bojang, A.A., Damayanti Damayanti and Wu, H.S. (2025). Immobilization of Enzymes on Electrodes and Electrode Design in Biofuel Cells. *Catalysts*, [online] 15(3), pp.253–253. doi:<https://doi.org/10.3390/catal15030253>.

Evans, J.P., Gervasio, D.F. and Pryor, B.M. (2021). A Hybrid Microbial–Enzymatic Fuel Cell Cathode Overcomes Enzyme Inactivation Limits in Biological Fuel Cells. *Catalysts*, [online] 11(2), pp.242–242. doi:<https://doi.org/10.3390/catal11020242>.

Wang, J., Ma, J. and Cheng, H. (2025). Nanomaterials-based enzymatic biofuel cells for wearable and implantable bioelectronics. *Frontiers in Energy*, Vol. 19 pp. 123-134. doi:<https://doi.org/10.1007/s11708-025-0992-6>.

Montazersadgh, F., Zhang, H., Alkayal, A., Buckley, B., Kolosz, B.W., Xu, B. and Xuan, J. (2020). Electrolytic cell engineering and device optimization for electrosynthesis of e-biofuels via covalorisation of bio-feedstocks and captured CO₂. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*. 15, pp. 208-219 doi:<https://doi.org/10.1007/s11705-020-1945-6>.

Xie, R., Wang, S., Wang, K., Wang, M., Chen, B., Wang, Z. and Tan, T. (2022). Improved energy efficiency in microbial fuel cells by bioethanol and electricity co-generation. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 15, 84. doi:<https://doi.org/10.1186/s13068-022-02180-4>.

Pandey, G. (2019). Biomass based bio-electro fuel cells based on carbon electrodes: an alternative source of renewable energy. *SN Applied Sciences*, 1, pp. 408. doi:<https://doi.org/10.1007/s42452-019-0409-4>.

Sharikova, N.A., Lukanina, K.I., Krashennnikov, S.V., A. Yu. Vdovichenko, Sharikov, R.V., Malakhov, S.N., Parunova, Y.M. and Grigoriev, T.E. (2023). On a Promising Electrode Material for Microbial Biofuel Cells Based on Natural Polymers. *Nanobiotechnology Reports*, 18(1), pp.73–79. doi:<https://doi.org/10.1134/s2635167623010147>.

Zhou, J., Liu, C., Yu, H., Tang, N. and Lei, C. (2023). Research Progresses and Application of Biofuel Cells Based on Immobilized Enzymes. *Applied Sciences*, [online] 13(10), p.5917. doi:<https://doi.org/10.3390/app13105917>.

Google Books. (2021). *Biofuel Cells*. [online] Available at: https://books.google.pt/books?id=YwU7EAAAQBAJ&pg=PA61&hl=pt-PT&source=gbs_selected_pages&cad=1#v=onepage&q&f=false [Accessed 28 Mar. 2025].

Kazarinov, I.A. and Meshcheryakova, M.O. (2021). Biological Fuel Cells: Applications in Health and Ecology. *Macro, Micro, and Nano-Biosensors*, pp.327–356. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-030-55490-3_17.

Zhou, J., Liu, C., Yu, H., Tang, N. and Lei, C. (2023). Research Progresses and Application of Biofuel Cells Based on Immobilized Enzymes. *Applied Sciences*, [online] 13(10), p.5917. doi:<https://doi.org/10.3390/app13105917>.

Katz, E. (2015). Implantable Biofuel Cells Operating In Vivo—Potential Power Sources for Bioelectronic Devices. *Bioelectronic Medicine*, 2(1), pp.1–12. doi:<https://doi.org/10.15424/bioelectronmed.2014.00011>.

Sharifi, M., Pothu, R., Boddula, R. and Bardajee, G.R. (2021). Trends of biofuel cells for smart biomedical devices. *International Journal of Hydrogen Energy*, [online] 46(4), pp.3220–3229. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.05.111>.

Katz, E. and Bollella, P. (2020). Fuel Cells and Biofuel Cells: From Past to Perspectives. *Israel Journal of Chemistry*, 61(1-2), pp.68–84. doi:<https://doi.org/10.1002/ijch.202000039>.

Rossi, E., Cespi, D., Maggiore, I., Setti, L. and Passarini, F. (2024). Energy from waste biomass: an LCA study on a biofuel cell at early design stage. *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 31. doi:<https://doi.org/10.1007/s11356-024-34068-1>.

Lee, S.Y., Sankaran, R., Chew, K.W., Tan, C.H., Krishnamoorthy, R., Chu, D.-T. and Show, P.-L. (2019). Waste to bioenergy: a review on the recent conversion technologies. *BMC Energy*, 1, vol. 4. doi:<https://doi.org/10.1186/s42500-019-0004-7>.

Mahmoud, M.S. (2025). *Biofuel Cells and Energy Generation*. [online] Available at: https://www.researchgate.net/publication/389626183_Biofuel_Cells_and_E

Hoang, A.T., Nižetić, S., Ng, K.H., Papadopoulos, A.M., Le, A.T., Kumar, S., Hadiyanto, H. and Pham, V.V. (2022). Microbial fuel cells for bioelectricity production from waste as sustainable prospect of future energy sector. *Chemosphere*, 287, p.132285. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132285>.

Jia, W., Wang, X., Imani, S., Bandodkar, A.J., Ramírez, J., Mercier, P.P. and Wang, J. (2014). Wearable textile biofuel cells for powering electronics. *J. Mater. Chem. A*, 2(43), pp.18184–18189. doi:<https://doi.org/10.1039/c4ta04796f>.

Anne-Françoise Pelé and Anne-Françoise Pelé (2020). *Paper-Based Biofuel Cells Power Disposable Electronics - EE Times Europe*. [online] EE Times Europe. Available at: <https://www.eetimes.eu/paper-based-biofuel-cells-power-disposable-electronics/> [Accessed 28 Mar. 2025].

Ces.tech. (2025). *BeFC printed biofuel cell & ecological Active Sensor Tag*. [online] Available at: <https://www.ces.tech/ces-innovation-awards/2023/befc-printed-biofuel-cell-ecological-active-sensor-tag/> [Accessed 28 Mar. 2025].

Greenman, J., Mendis, A., You, J., Gajda, I., Horsfield, I. and Ieropoulos, I. (2021). Microbial Fuel Cell Based Thermosensor for Robotic Applications. *Frontiers in Robotics and AI*, vol. 8. doi:<https://doi.org/10.3389/frobt.2021.558953>.

Wilkinson, S. (2000). *Autonomous Robots*, 9(2), pp.99–111. doi:<https://doi.org/10.1023/a:1008984516499>.

Usf.edu. (2025). *GASTROBOTS Research*. [online] Available at: http://www.eng.usf.edu/~wilkinso/gastrobotics/index_files/page0002.htm [Accessed 28 Mar. 2025].

Gotovtsev, P., Vorobiev, V., Migalev, A., Badranova, G., Gorin, K., Dyakov, A. and Reshetilov, A. (2018). Bioenergy Based Power Sources for Mobile Autonomous Robots. *Robotics*, 7(1), p.2. doi:<https://doi.org/10.3390/robotics7010002>.

Mukherjee, R., Ganguly, P. and Dahiya, R. (2021). Bioinspired Distributed Energy in Robotics and Enabling Technologies. *Advanced Intelligent Systems*, Vol. 5, Issue 4. doi:<https://doi.org/10.1002/aisy.202100036>.

Zhao, C., Gai, P., Song, R., Chen, Y., Zhang, J. and Zhu, J.-J. (2017). Nanostructured material-based biofuel cells: recent advances and future prospects. *Chemical Society Reviews*, 46(5), pp.1545–1564. doi:<https://doi.org/10.1039/c6cs00044d>.

Kour, D., Rana, K.L., Yadav, N., Yadav, A.N., Rastegari, A.A., Singh, C., Negi, P., Singh, K. and Saxena, A.K. (2019). Technologies for Biofuel Production: Current Development, Challenges, and Future Prospects. *Biofuel and Biorefinery Technologies*, pp.1–50. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-030-14463-0_1.

Xiao, X. (2021). The direct use of enzymatic biofuel cells as functional bioelectronics. *eScience*, Vol. 2, Issue 1 pp.1-9. doi:<https://doi.org/10.1016/j.esci.2021.12.005>.

Wang, L., Wu, X., Su, B.-H., Song, R., Zhang, J. and Zhu, J. (2021). Enzymatic Biofuel Cell: Opportunities and Intrinsic Challenges in Futuristic Applications. *Advanced energy and sustainability research*, Vol. 2, Edição 8. doi:<https://doi.org/10.1002/aesr.202100031>.

Cai, J., Shen, F., Zhao, J. and Xiao, X. (2024). Enzymatic biofuel cell: A potential power source for self-sustained smart textiles. *iScience*, [online] 27(2), p.108998. doi:<https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.108998>.

Huang, W., Muhammad, Chai, M., Lin, R., Wang, J., Chen, Y., Chen, V. and Hou, J. (2023). Recent advances in enzymatic biofuel cells enabled by innovative materials and techniques. *Exploration*, Vol. 3, edição 4. doi:<https://doi.org/10.1002/exp.20220145>.

Atanassov, P., Banta, S., Barton, S.C., Cooney, M., Liaw, B.Y., Mukerjee, S. and Apblett, C. (2007). Enzymatic Biofuel Cells. *The Electrochemical Society Interface*, 16(2), pp.28–31. doi:<https://doi.org/10.1149/2.f04072if>.

del Barrio, M., Martínez-Periñán, E., Gutiérrez-Sánchez, C., Mateo-Martí, E., Pita, M., De Lacey, A.L., Pariente, F. and Lorenzo, E. (2022). Carbon nanodots modified-electrode for peroxide-free cholesterol biosensing and biofuel cell design. *Sensors and Actuators B: Chemical*, [online] 375, p.132895. doi:<https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.132895>.

Galindo-de-la-Rosa, J., Ortiz-Ortega, E., López-González, B., Arriaga, L.G. and Ledesma-García, J. (2019). Microfluidic biofuel cell based on cholesterol oxidase/laccase enzymes. *Journal of Physics: Conference Series*, 1407(1), p.012096. doi:<https://doi.org/10.1088/1742-6596/1407/1/012096>.

Falk, M., Blum, Z. and Sergey Shleev (2012). Direct electron transfer based enzymatic fuel cells. 82, pp.191–202. doi:<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.12.133>.

Eman Serag, Azza El-Maghraby and Nemr, A.E. (2021). Recent developments in the application of carbon-based nanomaterials in implantable and wearable enzyme-biofuel cells. *Carbon letters*, 32(2), pp.395–412. doi:<https://doi.org/10.1007/s42823-021-00299-2>.

Suntisak Khumngern and Itthipon Jeerapan (2024). Synergistic convergence of materials and enzymes for biosensing and self-sustaining energy devices towards on-body health monitoring. *Communications Materials*, [online] 5(1). doi:<https://doi.org/10.1038/s43246-024-00557-6>.

Farghaly, O.A., Hameed, R.S.Abdel. and Abu-Nawwas, A.-A.H. (2023). Analytical Application Using Modern Electrochemical Techniques. *International Journal of Electrochemical Science*, [online] 9(6), pp.3287–3318. doi:[https://doi.org/10.1016/S1452-3981\(23\)08010-0](https://doi.org/10.1016/S1452-3981(23)08010-0).

Gharbi, O., Tran, M.T.T., Tribollet, B., Turmine, M. and Vivier, V. (2020). Revisiting cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy analysis for capacitance measurements. *Electrochimica Acta*, 343, p.136109. doi:<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.136109>.

Faulkner, A.J. (2020). *ELECTROCHEMICAL METHODS : fundamentals and applications*. S.L.: John Wiley.

Elgrishi, N., Rountree, K.J., McCarthy, B.D., Rountree, E.S., Eisenhart, T.T. and Dempsey, J.L. (2017). A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*, [online] 95(2), pp.197–206. doi:<https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361>.

Chemistry LibreTexts. (2016). *Analytical Electrochemistry: The Basic Concepts*. [online] Available at:

[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Analytical_Sciences_Digital_Library/Courseware/Analytical_Electrochemistry%3A_The_Basic_Concepts](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Analytical_Sciences_Digital_Library/Courseware/Analytical_Electrochemistry%3A_The_Basic_Concepts) [Accessed 1 Apr. 2025].

Gugu Hlengiwe Mhlongo, Nobanathi Wendy Maxakato and Sandile Surprise Gwebu (2019). *Voltammetry*, pp. 116-118. ISBN: 978-1789853230.

PalmSens. (n.d.). *Voltammogram*. [online] Available at: <https://www.palmsens.com/knowledgebase-article/voltammogram/>.

Anon, (n.d.). *Electrochemistry | Nanoscience Instruments*. [online] Available at: <https://www.nanoscience.com/techniques/electrochemistry/>.

Kausaite-Minkstimiene, A., Kaminskas, A., Gayda, G. and Ramanaviciene, A. (2024). Towards a Self-Powered Amperometric Glucose Biosensor Based on a Single-Enzyme Biofuel Cell. *Biosensors*, [online] 14(3), p.138. doi:<https://doi.org/10.3390/bios14030138>.

Barelli, L., Bidini, G., Pelosi, D. and Sisani, E. (2021). Enzymatic Biofuel Cells: A Review on Flow Designs. *Energies*, 14(4), p.910. doi:<https://doi.org/10.3390/en14040910>.

Liu, T., Wu, L., Su, E., Li, Y. and Gu, N. (2023). Recent Advances in the Application of Nanozymes in Amperometric Sensors: A Review. *Chemosensors*, 11(4), pp.233–233. doi:<https://doi.org/10.3390/chemosensors11040233>.

Nishizawa, M. (2018). Carbon Nanotube-Based Enzymatic Biofuel Cells. *Nanostructure science and technology*, pp.351–370. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-319-92917-0_15.

Zhu, L., Xu, L., Tan, L., Tan, H., Yang, S. and Yao, S. (2012). Direct electrochemistry of cholesterol oxidase immobilized on gold nanoparticles-decorated multiwalled carbon nanotubes and cholesterol sensing. *Talanta*, [online] 106, pp.192–199. doi:<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.12.036>.

Manjunatha, R., Nagaraju, D.H., Suresh, G.S., Melo, J.S., D'Souza, S.F. and Venkatesha, T.V. (2010). Direct electrochemistry of cholesterol oxidase on MWCNTs. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, [online] 651(1), pp.24–29. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2010.11.009>.

Ossila. (n.d.). *Multi-Walled Carbon Nanotubes*. [online] Available at: <https://www.ossila.com/products/multi-walled-carbon-nanotubes>.

Liu, X., Chen, W., Lian, M., Chen, X., Lu, Y. and Yang, W. (2018). Enzyme immobilization on ZIF-67/MWCNT composite engenders high sensitivity electrochemical sensing. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, [online] 833, pp.505–511. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.12.027>.

Quan, J., Liu, Z., Branford-White, C., Nie, H. and Zhu, L. (2014). Fabrication of glycopolymer/MWCNTs composite nanofibers and its enzyme immobilization applications. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, [online] 121, pp.417–424. doi:<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.06.030>.

Tavares, A.P.M., Silva, C.G., Dražić, G., Silva, A.M.T., Loureiro, J.M. and Faria, J.L. (2015). Laccase immobilization over multi-walled carbon nanotubes: Kinetic, thermodynamic and stability studies. *Journal of Colloid and Interface Science*, 454, pp.52–60. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.04.054>.

Xiao, N., Li, H., Fan, Z., Luo, F., Lu, D., Sun, W., Li, Z., Wang, Z., Han, Y. and Zhu, Z. (2025). An electrochromism-equipped enzymatic biofuel cell system combined with hollow microneedle array for self-powered glucose sensing in interstitial fluid. *Microchimica Acta*, 192(4). doi:<https://doi.org/10.1007/s00604-025-07096-y>.

Galindo-de-la-Rosa, J., Ortiz-Ortega, E., López-González, B., Arriaga, L.G. and Ledesma-García, J. (2019). Microfluidic biofuel cell based on cholesterol oxidase/laccase enzymes. *Journal of Physics: Conference Series*, 1407(1), p.012096. doi:<https://doi.org/10.1088/1742-6596/1407/1/012096>.

Bui, T.T. and Park, S.-Y. (2016). A carbon dot–hemoglobin complex-based biosensor for cholesterol detection. *Green Chemistry*, 18(15), pp.4245–4253. doi:<https://doi.org/10.1039/c6gc00507a>.

Wang, L., Zhu, W., Zhang, J. and Zhu, J. (2023). Miniaturized Microfluidic Electrochemical Biosensors Powered by Enzymatic Biofuel Cell. *Biosensors*, 13(2), pp.175–175. doi:<https://doi.org/10.3390/bios13020175>.

Cavalcante, F.T.T., de A. Falcão, I.R., da S. Souza, J.E., Rocha, T.G., de Sousa, I.G., Cavalcante, A.L.G., de Oliveira, A.L.B., de Sousa, M.C.M. and dos Santos, J.C.S. (2021). Designing of Nanomaterials-Based Enzymatic Biosensors: Synthesis, Properties, and Applications. *Electrochem*, 2(1), pp.149–184. doi:<https://doi.org/10.3390/electrochem2010012>.

Wang, L., Zhu, W., Zhang, J. and Zhu, J. (2023). Miniaturized Microfluidic Electrochemical Biosensors Powered by Enzymatic Biofuel Cell. *Biosensors*, 13(2), pp.175–175. doi:<https://doi.org/10.3390/bios13020175>.

Kumar, B., Poddar, S. and Sinha, S.K. (2022). Electrochemical cholesterol sensors based on nanostructured metal oxides: Current progress and future perspectives. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 19(10), pp.4093–4116. doi:<https://doi.org/10.1007/s13738-022-02605-9>.

Suresh, R., Muthaiyan Lakshmanakumar, J. B. B. Arockia Jayalatha, Rajan, K.S., Sethuraman, S., Uma Maheswari Krishnan and Bosco, J. (2021). Fabrication of screen-printed electrodes: opportunities and challenges. *Journal of Materials Science*, 56(15), pp.8951–9006. doi:<https://doi.org/10.1007/s10853-020-05499-1>.

Chen, R.J., Zhang, Y., Wang, D. and Dai, H. (2001). Noncovalent Sidewall Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes for Protein Immobilization. *Journal of the American Chemical Society*, 123(16), pp.3838–3839. doi:<https://doi.org/10.1021/ja010172b>.

Anexo A

Declaro ter conduzido este trabalho académico com integridade. Não plagiei ou apliquei qualquer forma de uso indevido de informações ou falsificação de resultados ao longo do processo que levou à sua elaboração.

Declaro que o trabalho apresentado neste documento é original e de minha autoria, não tendo sido utilizado anteriormente para nenhum outro fim.

Declaro ainda que tenho pleno conhecimento do Código de Conduta Ética do P.PORTO.

ISEP, Porto, 1 de julho de 2025

Anexo B

Com o objetivo de avaliar a estabilidade eletroquímica da tionina immobilizada na superfície do eletrodo, foi realizada uma série de voltametrias cíclicas consecutivas. Este procedimento permite observar, ao longo de múltiplos ciclos de varrimento potencial, eventuais variações na resposta redox do sistema, fornecendo informações relevantes sobre a reversibilidade do processo e a integridade da película modificadora. A análise comparativa dos voltamogramas registados ao longo dos ciclos permite avaliar de forma eficiente a manutenção da atividade redox da tionina sob varrimentos sucessivos, sendo esta abordagem especialmente pertinente na caracterização de sistemas modificados com potencial aplicação em sensores e dispositivos eletroquímicos.

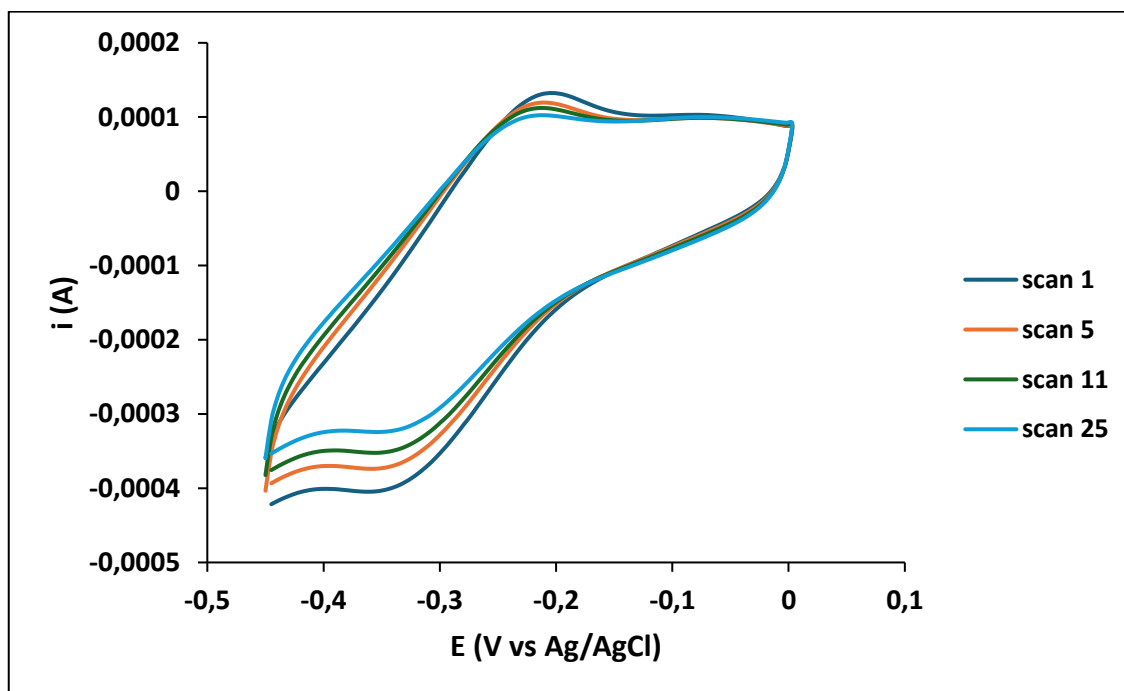


Figura B1. Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo modificado com tionina ao longo de 25 ciclos sucessivos.

A Figura B1 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos para um eletrodo modificado com tionina, submetido a múltiplos ciclos de varrimento potencial. Observa-se uma redução progressiva da intensidade da corrente nos picos de oxidação e redução ao longo dos ciclos sucessivos. Esta tendência evidencia uma perda gradual da atividade eletroquímica do sistema, indicativa de instabilidade da camada de tionina immobilizada na superfície do eletrodo. Este comportamento é característico da degradação ou dessorção do filme de tionina no eletrodo,

sugerindo que o material não apresenta estabilidade eletroquímica satisfatória sob as condições experimentais utilizadas. A diminuição acentuada da corrente com o número de ciclos reforça a hipótese de que a tionina sofre reações irreversíveis ou perde aderência ao substrato condutor com o tempo, limitando sua aplicação em dispositivos eletroquímicos que exigem repetibilidade e durabilidade.