



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

Desarrollo de un biocátodo basado en la enzima lacasa con aplicación en microceldas de combustible.

Opción de titulación
Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental


Presenta:
Q.F.B. Berenice López González

Dirigido por:
Dra. Janet Ledesma García


Dra. Janet Ledesma García
Presidente


Firma

Dra. Minerva Guerra Balcázar
Secretario


Firma


Dr. Rufino Nava Mendoza
Vocal



Firma

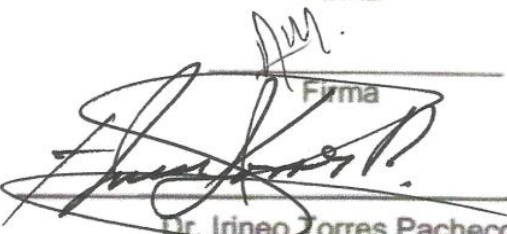
Dra. Ainhoa Arana Cuenca
Suplente


Firma

Dr. Andrés Cruz Hernández
Suplente


Firma


MSP. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad


Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se realizó la construcción de un biocátodo basado en la inmovilización por adsorción sobre carbón Vulcan XC-72[®] del mediador ABTS y la enzima lacasa comercial de *Trametes versicolor*, se optó por este método ya que es sencillo y no compromete directamente la actividad de la enzima. El biocátodo se caracterizó por medio de técnicas como Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier con Accesorio de Reflectancia Total Atenuada, (FTIR-ATR), esto con el fin de observar la presencia de los grupos funcionales del mediador y de la enzima adsorbida sobre el soporte, Voltamperometría Cíclica para evaluar el material en la reacción de reducción de oxígeno (ORR) y Potencial zeta para evaluar el efecto de la adsorción de cada elemento del biocátodo, mediador y enzima, sobre la superficie del soporte. Se evaluó el biocátodo en una celda de combustible microfluídica utilizando un material de AuAg previamente reportado por el grupo de la Dra. Janet Ledesma obteniendo como resultados un voltaje de 1.21V, una densidad de corriente de 1.7 mAcm⁻² y una potencia de 0.45 mWcm⁻², estos resultados fueron comparados con otros obtenidos para celdas híbridas en bibliografía. A la par se realizó el crecimiento de la cepa 44 de *C. polyzona* (*Trametes polyzona*, de la Huasteca Hidalguense) para la obtención de un extracto crudo con actividad lacasa, se realizó la caracterización bioquímica del extracto en solución, se realizó la adsorción del extracto sobre carbón Vulcan XC-72[®] con ABTS. El desempeño como biocátodo para la ORR se realizó mediante voltamperometría cíclica y se incorporó en la celda construida anteriormente bajo las mismas condiciones que el biocátodo construido mediante enzima comercial obteniendo como resultados un voltaje de 1.21V, una densidad de corriente de 1.96 mAcm⁻² y una potencia de 0.51 mWcm⁻² comparado con el resultado obtenido con el biocátodo de enzima comercial encontramos que el uso de un extracto crudo incrementó la potencia de la celda en un 10%, mientras que los demás parámetros como el voltaje y la densidad de corriente fueron muy similares, permitiendo encontrar una alternativa de bajo costo al uso de enzima comercial en el biocátodo.

(Palabras clave: Vulcan XC-72, método de adsorción, celdas de combustible microfluídicas)

SUMMARY

In the present work building a biocathode based on immobilization by adsorption on carbon Vulcan XC -72[®] ABTS mediator and a *Trametes versicolor* commercial laccase was performed, we chose this method because it is simple and does not compromise directly the activity of the enzyme. The biocathode was characterized by techniques such as Infrared Spectroscopy Fourier Transform Attenuated Total Reflectance Accessory (FTIR -ATR), this in order to observe the presence of the functional groups of the mediator and the enzyme adsorbed on support, Cyclic voltammetry to evaluate the material in the oxygen reduction reaction (ORR) and zeta potential to observe the effect of adsorption of each biocathode element, mediator and enzyme on the surface of the support. The biocathode was evaluated in a microfluidic fuel cell using AuAg material previously reported by the group of Dr. Janet Ledesma obtaining as results a voltage of 1.21V, a current density of 1.7 mAcm⁻² and a power density of 0.45 mWcm⁻², these results were compared with others obtained in literature for hybrid cells. Along with the growth of the strain of *C. polyzona* 44 (*Trametes polyzona*, endemic of Huasteca Hidalguense) to obtain a crude extract with laccase activity, biochemical characterization of the extract solution and the adsorption was performed extract on Vulcan XC -72[®] with ABTS. Performed as biocátodo for ORR was performed by cyclic voltammetry and incorporated into the cell constructed above under the same conditions as the commercial enzyme biocátodo constructed by obtaining as results a voltage of 1.21V , a current density of 1.96 mAcm⁻² and 0.51 mWcm⁻² compared with the result obtained with the commercial enzyme biocathode found that the use of a crude extract increased the cell power by 10% , while the other parameters such as voltage and current density were very similar, allowing to find a low-cost alternative to using commercial enzyme in a biocathode.

(Key words: Vulcan XC-72, adsorption method, microfluidic fuel cell)

A Dios por ponerme siempre en el camino a seguir.

A mis padres y hermanos por todo su cariño y apoyo desde lejos.

A Francisco por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Janet Ledesma García y a la Dra. Minerva Guerra Balcázar, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo en la UAQ y llevar a cabo este maravilloso proyecto de investigación.

Al Dr. Luis Gerardo Arriaga Hurtado por permitirme desarrollar parte del trabajo experimental en el CIDETEQ, por orientarme y darme mi “jalón de orejas” cuando lo necesitaba.

A la Dra. Ainhoa Arana Cuenca y al Dr. Alejandro Téllez Jurado por permitirme trabajar en su laboratorio de la Universidad Politécnica de Pachuca y enseñarme los procedimientos para obtener el extracto crudo con actividad lacasa.

Al Dr. Rufino Nava Mendoza y al Dr. Andrés Cruz Hernández por sus observaciones para el enriquecimiento de este trabajo de investigación.

Al Dr. Francisco Cuevas Muñiz por sus observaciones y enseñanzas en el laboratorio.

Al M.E. Walter Noé Arjona por su apoyo con las pruebas de potencial zeta y al M.C. Andrés Déctor Espinosa por su apoyo con las pruebas en la celda con PPF.

A Coral Cruz Madrid por el apoyo en la obtención de extracto crudo y la preparación de películas de alginato.

A los chicos del laboratorio de la UPP por hacerme sentir como en casa.

A la M.C. Beatriz Verduzco Cuéllar por todo su apoyo como coordinadora del programa y como maestra de las materias de Seminario.

A mis compañeros de la MCTA: Malú, Ricardo y Olga quienes enriquecieron este trabajo con sus comentarios desde Seminario I.

AGRADECIMIENTO AL CONACYT Y PROYECTOS

Hago extensivo mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico prestado a mi persona con el número de convenio 302740.

Así como a los diferentes proyectos que apoyaron la presente investigación: FOMIX QRO-2011-C01-165372, ANR-CONACYT 2012 (163114) y Redes Temáticas (193974).

ÍNDICE

RESUMEN	3
SUMMARY	4
ÍNDICE	8
ÍNDICE DE CUADROS	12
ÍNDICE DE FIGURAS	13
I. INTRODUCCIÓN	17
II. REVISIÓN DE LITERATURA	18
2.1 Celdas de combustible	18
2.2 Desarrollo de ánodos inorgánicos	21
2.3 Inmovilización de enzimas en superficies	21
2.4 Vulcan XC-72 como soporte	23
2.5 Lacasas	23
2.5.1 Mecanismo de reducción de oxígeno de la lacasa	25
2.5.2 ABTS como mediador	26
2.6 Hipótesis y objetivos	27
2.6.1 Hipótesis	27
2.6.2 Objetivo general	27
2.6.3 Objetivos particulares	28
III. METODOLOGIA	28
3.1 Preparación del soporte	28
3.2 Caracterización del soporte	28
3.2.1 Determinación del área superficial, sitios ácidos y básicos del Vulcan XC-72 [®] tratado térmicamente	28
3.2.2 Caracterización por FTIR-ATR	29
3.2.3 Potencial zeta	29

3.2.3.1 Preparación de la tinta	29
3.2.3.2 Determinación del potencial zeta	29
3.3 Preparación del biocátodo	30
3.3.1 Caracterización por FTIR-ATR	30
3.3.2 Potencial zeta	30
3.4 Pruebas en media celda	30
3.4.1 Preparación de la tinta	30
3.4.2 Preparación de la media celda	31
3.5 Evaluación del biocátodo en la celda microfluídica	31
3.5.1 Construcción de la celda microfluídica	31
3.5.2 Pruebas en la celda microfluídica	32
3.6 Obtención del extracto crudo con actividad lacasa	32
3.6.1 Crecimiento del hongo <i>C. polyzona</i>	32
3.6.2 Determinación de proteína por el Método de Bradford	33
3.6.3 Determinación de actividad lacasa	33
3.7 Variación de la concentración del mediador	33
3.7.1 Estudios de media celda en medio neutro	33
3.7.2 Comparación de los biocátodos con respecto al platino comercial	33
3.7.3 Evaluación del biocátodo en un dispositivo microfluídico en medio neutro	34
3.7.4 Evaluación del biocátodo en un dispositivo air-breathing	34
3.8 Estudio de películas de extracto crudo con actividad lacasa inmovilizado sobre alginato como biocátodo	35
3.8.1 Caracterización de las películas por SEM	35
3.8.2 Estudios de media celda en ausencia y presencia de mediador	35
3.8.3 Evaluación del biocátodo en un dispositivo microfluídico en ausencia y presencia de mediador	35
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
4.1 Caracterización de las superficies de carbón	36

4.1.1 Área superficial y concentración de sitios ácidos y básicos	36
4.2 Caracterización por FTIR-ATR	37
4.3 Pruebas de Potencial Zeta	38
4.4 Preparación de los compósitos Vulcan XC-72/ABTS- Lacasa (Lac-ABTS/C)	38
4.5 Caracterización por FTIR-ATR	39
4.6 Pruebas de Potencial Zeta	40
4.7 Pruebas en media celda	41
4.7.1 Pruebas de media celda con solución de lacasa	41
4.7.2 Caracterización electroquímica de la lacasa a diferentes velocidades	41
4.7.3 Evaluación electroquímica de la reacción de reducción de oxígeno	42
4.8 Evaluación en la celda microfluídica con chip PPF	43
4.9 Evaluación en la celda microfluídica modificada con chip de aluminio	46
4.10 Selección de la cepa	47
4.10.1 Crecimiento de las cepas 44 y 46 del hongo <i>Trametes sp.</i>	47
4.10.2 Zimograma	48
4.11 Evaluación en celda del extracto de lacasa	49
4.12 Variación de la cantidad de mediador	51
4.12.1 Pruebas en media celda en medio neutro	51
4.12.2 Voltamperometría lineal de los biocátodos contra platino comercial	51
4.12.3 Pruebas en dispositivo microfluídico	52
4.12.4 Pruebas en dispositivo air-breathing	55
4.13 Estudio de películas de extracto crudo con actividad lacasa inmovilizado sobre alginato como biocátodo	56
4.13.1 Caracterización por SEM	57
4.13.2 Pruebas en media celda en presencia y ausencia de mediador	58
4.13.3 Pruebas con dispositivo en presencia y ausencia de mediador	58
CONCLUSIONES	60

LITERATURA CITADA	61
APÉNDICE	66
Apéndice I. Tabla resumen de los experimentos realizados durante la presente tesis	
Apéndice II. Producción	
- Artículo científico publicado	
- Congresos	

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
4-1	Resumen de la caracterización del Vulcan XC-72 tratado térmicamente	36
4-2	Resumen de los resultados obtenidos de las pruebas en la celda PPF	45
4-3	Comparación de los parámetros voltaje y potencia máxima de celdas de combustible híbridas reportadas en la bibliografía y las construidas durante la presente tesis	50
4-4	Experimentos realizados en el dispositivo microfluídico en medio neutro	53
4-5	Resumen de los parámetros obtenidos para los dispositivos microfluídicos en medio neutro	55
4-6	Resumen de los parámetros obtenidos para los dispositivos microfluídicos con biocátodos de alginato en ausencia y presencia de mediador	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
2.1	Esquema general de una celda de combustible	18
2.2	Inmovilización de enzimas en superficies. a) adsorción física; b) atrapamiento físico por membrana; c) entrecruzamiento; d) unión covalente	22
2.3	Presentación del carbón Vulcan XC-72 marca Cabot	23
2.4	Estructura y Centros de Cu de la lacasa (Solomon y cols., 1996). Los átomos de cobre se encuentran coordinados a histidinas (His), cistaminas (Cys) o hidroxilos (OH). El camino electrónico que une el centro T1 con el cluster T2/T3 se muestra detallado. (Vaz Dominguez, 2009)	24
2.5	a) Reacción catalítica de la lacasa. b) Ciclo catalítico de la lacasa. Se representa una molécula de sustrato en su forma reducida	26
2.6	Especies redox del ABTS	27
3.1	Diagrama de armado del dispositivo microfluídico	32
4.1	FTIR – ATR Vulcan XC-72, el experimento fue realizado a temperatura ambiente con una resolución de 4 cm^{-1}	37
4.2	Gráfica de potencial Z para el soporte de vulcan XC-72	38

4.3	FTIR-ATR del Vulcan XC-72 Lacasa y Vulcan XC-72 ABTS Lacasa, ambos experimentos se realizaron bajo mismas condiciones de temperatura y humedad. La resolución es fue de 4cm^{-1}	39
4.4	Gráfica de potencial Z para cada uno de los arreglos del biocátodo (soporte, soporte + mediador, soporte + mediador + enzima)	40
4.5	a) Evaluación electroquímica de los diferentes soportes en presencia de la enzima lacasa en solución (Vulcan XC-72 con tratamiento y sin tratamiento térmico, carbón vítreo y grafito espectroscópico), b) Efecto de la concentración de enzima en la solución	41
4.6	Efecto de la velocidad de barrido en la caracterización electroquímica de la enzima lacasa	42
4.7	Evaluación electroquímica del biocátodo en ausencia y presencia de oxígeno	43
4.8	Curvas de polarización a) Comparación de condiciones SBF (anolito: Glucosa 5 mM en SBF N_2 , catolito: SBF O_2 , 2 flujos $25\mu\text{L min}^{-1}$) y Soluciones Ideales (anolito: Glucosa 5 mM en KOH 0.3M N_2 , catolito: PBS pH 5 O_2 , 2 flujos $25\mu\text{L min}^{-1}$); b) Comparación de condiciones SBF 2 flujos y 1 flujo (anolito: Glucosa 5mM en SBF N_2 , catolito: SBF O_2 $25\mu\text{L min}^{-1}$)	45
4.9	Prueba de estabilidad: Se realizaron curvas de polarización del	46

dispositivo por día

- 4.10** Actividad lacasa y pH del medio de cultivo durante el crecimiento del *Trametes sp.* cepa 44 **47**
- 4.11** Zimograma realizado a los extractos crudos enzimáticos de la cepa 44 de *Trametes sp.* y una representación del mismo (se realizó porque en la imagen no se observa con claridad) **48**
- 4.12** Comparación del biocátodo construido a partir de lacasa comercial vs el construido a partir de Extracto Lacasa-ABTS/C: Se compararon curvas de polarización de cada dispositivo **49**
- 4.13** Voltamperogramas de los biocátodos en medio neutro en presencia de oxígeno: a) Voltamperogramas de los biocátodos en presencia de O₂ en PBS pH 7.4, b) Voltamperogramas de los biocátodos en presencia de O₂ en SBF pH 7.4 **51**
- 4.14** a) Voltamperogramas de los biocátodos comparados con platino en presencia de O₂ en PBS pH 7.4, b) Voltamperogramas de los biocátodos en presencia de O₂ y variando la concentración de glucosa (5, 10 y 50mM) en PBS pH 7.4 **52**
- 4.15** Curvas de polarización del biocátodo construido a partir de Extracto Lacasa- ABTS/C: a) Comparación de curvas de polarización del desempeño del biocátodo en el dispositivo microfluídico en medio PBS pH 7.4 y SBF para el material **54**

ExLac-ABTS5mM/C, b) Curva de polarización del dispositivo microfluídico con biocátodo ExLac-ABTS10mM/C

- 4.16** Comparación de curvas de polarización para el biocátodo depositado sobre tela y carbon toray en medio neutro para el cátodo, a la izquierda se muestra una fotografía del dispositivo air- breathing **56**
- 4.17** Micrografías electrónicas para las diferentes películas de Alginato a) sin extracto y con ABTS a 500x. b) con extracto y ABTS a 500x. c) sin extracto y con ABTS a 2000x. d) con extracto y ABTS a 2000x **57**
- 4.18** Voltamperogramas de los biocátodos de extracto lacasa en alginato en ABTS 5mM en buffer fosfato pH5: a) Voltamperogramas de los materiales alginate sin extracto y con extracto en presencia de O₂ en ABTS 5mM en PBS pH 5, b) Voltamperogramas de los biocátodos en presencia y ausencia de O₂ en ABTS5mM en ausencia y presencia de oxígeno. **58**

Introducción

Una celda de combustible es un dispositivo electroquímico que transforma la energía química en energía eléctrica. Está formada por dos electrodos, un ánodo donde ocurre la oxidación de un combustible y un cátodo donde un agente oxidante se reduce (comúnmente oxígeno).

La reacción de reducción de oxígeno en celdas de combustible es muy importante, ya que limita la reacción de la celda de combustible y por lo tanto la obtención de energía a partir del mismo. Además, la estabilidad del material usado como catalizador es un parámetro importante a considerar. Se han utilizado materiales inorgánicos como el platino pero su costo es alto y su uso en condiciones fisiológicas se ve limitado, ya que pierde capacidad electrocatalítica.

En este sentido, la enzima lacasa ofrece una alternativa con respecto al platino para ser usada en la reacción de reducción de oxígeno en condiciones fisiológicas, presentando aplicación en la construcción de cátodos enzimático.

El uso de enzimas aisladas de microorganismos, en especial de hongos, representa una ventaja con respecto a los materiales inorgánicos, ya que difícilmente se inactivan en condiciones cercanas a las fisiológicas y se pueden producir a gran escala.

Para resolver la problemática de la pérdida de actividad del material catódico en condiciones de pH fisiológico, se planteó la inmovilización de la enzima lacasa sobre superficies de carbono mediante el método de adsorción ya que no altera la estructura de la enzima pero su estabilidad es limitada con respecto a otros métodos como la unión covalente. En este método puede ocurrir que la inmovilización de la proteínas sea reversible ya que la enzima puede ser desorbida del soporte recuperando el soporte una vez se haya inactivado la enzima.

En el presente trabajo se propone el uso de un extracto crudo con actividad lacasa producido por un hongo *Trametes sp.* nativo de la Huasteca Hidalguense, el cual consume la madera de árboles vivos o muertos a condiciones de temperatura de alrededor de los 37°C inmovilizado sobre superficies de carbón para ser utilizado como biocátodo en una microcelda combustible.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Celdas de combustible

Actualmente, la obtención de energía es uno de los grandes retos que enfrenta la humanidad, por esta razón se dedican grandes esfuerzos a la búsqueda de fuentes de energía que puedan reemplazar a los combustibles fósiles.

Dentro de las alternativas que existen se encuentra la utilización de celdas de combustibles, que produzcan energía eléctrica a partir de combustibles renovables como el etanol, etilenglicol, glucosa, entre otros (Almeida y cols., 2012; Cuevas-Muñiz y cols., 2012; Guerra-Balcázar y cols., 2012; Morales-Acosta y cols., 2009 y 2011).

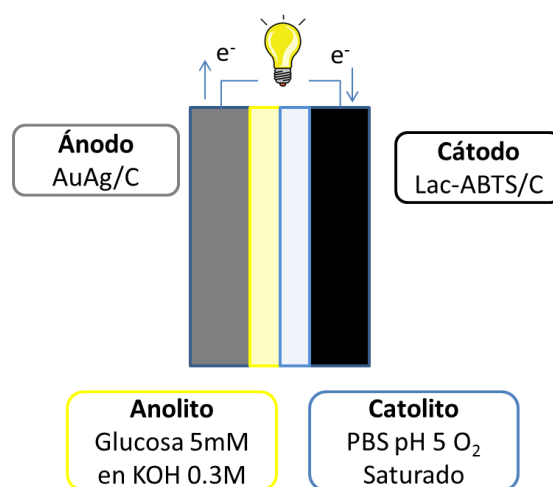


Figura 2.1 Esquema de una celda de combustible

Una celda de combustible (figura 2.1) es un dispositivo electroquímico que transforma la energía química en energía eléctrica. Está formada por dos electrodos, un ánodo donde ocurre la oxidación de un combustible y un cátodo donde un agente oxidante se reduce (comúnmente oxígeno). (Winter y Brodd, 2004)

La reacción de reducción de oxígeno en celdas de combustible es muy importante, ya que limita la reacción de la celda de combustible y por lo tanto la obtención de energía a partir del mismo. Además, la estabilidad del material usado como catalizador es un parámetro importante a considerar. Se han utilizado materiales inorgánicos como el platino pero su costo es alto y su uso en condiciones fisiológicas se ve limitado ya que pierde capacidad electrocatalítica. (Gewirth y Thorum, 2010)

En este sentido, la enzima lacasa, utilizada en bioceldas enzimáticas, ofrece una alternativa con respecto al platino para ser usada en la reacción de reducción de oxígeno en condiciones fisiológicas. (Tortolini y cols., 2012)

Las bioceldas pueden clasificarse principalmente en dos tipos: microbiológicas y enzimáticas, las primeras utilizan microorganismos que catalizan las reacciones de oxidación y reducción, principalmente tienen posible aplicación en dispositivos donde no existan limitaciones de tamaño y se requiera poca corriente. Mientras que las enzimáticas, principalmente utilizan enzimas óxidoreductasas, pueden emplearse como fuentes de poder recargables y en dispositivos pequeños. (Barton y cols., 2004)

Las bioceldas enzimáticas contienen un mediador que puede estar en la disolución o sobre una matriz polimérica en la superficie del electrodo,

actualmente lo que se busca es que la transferencia electrónica sea directa entre la enzima y el electrodo.(Jones y cols., 2002)

Durante los últimos años se han desarrollado numerosos trabajos en el que se construyen biocátodos para bioceldas, en donde se utilizan enzimas como la bilirrubina oxidasa y la lacasa comercial para la reacción de reducción de oxígeno en condiciones fisiológicas, a continuación se presentan algunos de ellos:

Mano y colaboradores (2002 y 2003) han trabajado en celdas de tamaño micrométrico las cuales han llegado a trabajar hasta por 6 días, empleando 2 fibras recubiertas con enzimas (bilirubina oxidasa y glucosa oxidasa) para la oxidación de glucosa en una celda sin membrana. Reportan la obtención de 4.3 mW mm^{-2} y voltajes de hasta 520 mV, para electrodos de 7mm de longitud y proponen su uso en sensores CMOS y en dispositivos fisiológicos.

Stoica y colaboradores en 2009 usaron de complejos de osmio polimerizados en la modificación de una superficie de carbón. Emplearon lacasa y celobiosa deshidrogenasa para la reducción del oxígeno y de la lactosa respectivamente. Reportan que la densidad de potencia máxima obtenida es de 1.8 mWcm^{-2} .

Wang y colaboradores en 2009 recubrieron sustratos de silicio con nanotubos de carbón de una sola pared, empleado dos métodos (deposición química con vapor y electroforesis). Posteriormente estos sustratos fueron nuevamente modificados con glucosa oxidasa y lacasa, en el ánodo y cátodo, respectivamente. Los resultados muestran una potencia máxima de 1.38 mWcm^{-2} , la cual se pudo mantener durante 24 h.

Recientemente se han utilizado extracto crudo sin tratamientos adicionales de purificación para ser usado en el cátodo de una combustible, demostrándose que no hay una diferencia significativa en el rendimiento del cátodo al usar el extracto

crudo o la lacasa purificada, manteniendo actividad reductora por 120 días siendo reabastecimiento periódico del cultivo. (Sané y cols., 2013)

2.2 Desarrollo de ánodos inorgánicos

Las celdas de combustible basadas en glucosa tienen la ventaja de que los productos que se forman en la reacción de oxidación de la glucosa son no tóxicos (H_2O y CO_2). Sin embargo, en la práctica, la reacción es incompleta porque se produce ácido glucónico el cual reduce el rendimiento de la celda de combustible. Otra desventaja que presentan es el bajo rendimiento debido al envenenamiento por productos de reacción en la superficie del electrodo. (Cuevas-Muñiz y cols, 2011)

Algunos estudios han demostrado, que los catalizadores basados en oro tienen una mayor actividad para la reacción de oxidación de glucosa con la desventaja de que su costo es alto. Cuevas-Muñiz y cols. (2011) reportaron el uso de AuAg en celdas de combustible que son selectivas a glucosa en presencia de oxígeno y exhiben buena actividad electroquímica para la oxidación de la glucosa, esto con la finalidad de aumentar el rendimiento de la celda de combustible y reducir los costos de catalizador.

2.3 Inmovilización de enzimas

La inmovilización de una enzima se define como su fijación a un soporte insoluble (Arica y cols., 2009). Los métodos de inmovilización se clasifican dependiendo si el enlace enzima-soporte se lleva a cabo por medios físicos o químicos. Métodos de acoplamiento físicos incluyen el atrapamiento de la enzima en una matriz tridimensional o su encapsulación en un polímero orgánico o inorgánico (membranas) (Matijošyte et al., 2010), mientras que el acoplamiento químico puede ocurrir a través de adsorción y unión covalente.

Existen diferentes métodos para inmovilizar enzimas sobre superficies electrónicas, siendo los más comunes: adsorción física, atrapamiento físico, entrecruzamiento y enlace covalente directo.

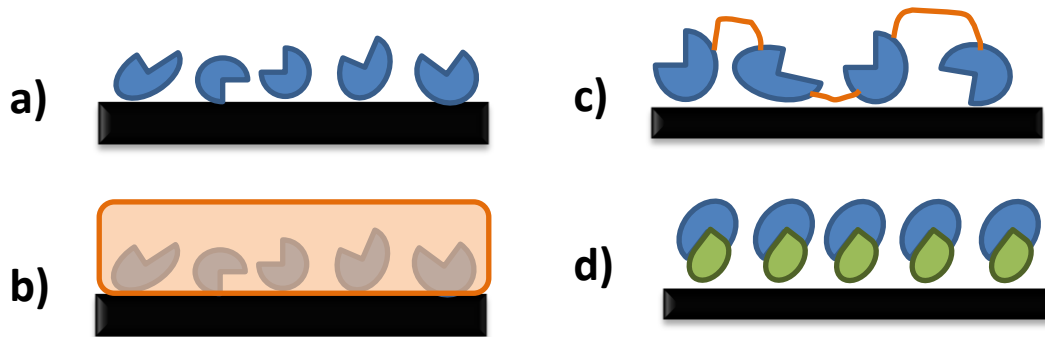


Figura 2.2 Inmovilización de enzimas en superficies. a) adsorción física; b) atrapamiento físico por membrana; c) entrecruzamiento; d) unión covalente.

Adsorción física

La adsorción es relativamente método simple y de bajo costo para la inmovilización de la lacasa y mayo por lo tanto tienen un potencial comercial más alto que otras metodologías. Es un método relativamente sencillo y de bajo costo, la enzima se retiene en la superficie por fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas o interacciones electrostáticas. El pH, la fuerza iónica del medio y la hidrofobicidad de la superficie debe tenerse en cuenta durante la inmovilización. (Bayramoglu y Arica, 2009; Brady y Jordaan, 2009).

Atrapamiento físico

El atrapamiento se define como la retención física de las enzimas en una matriz sólida porosa, como poliacrilamida, colágeno, alginato o gelatina (Dayaram y Dasgupta, 2008;. Lu y cols, 2007; Moeder y cols, 2004; Niladevi y Prema, 2008; Phetsom y cols, 2009; Timur y cols, 2004). La enzima se suspende primero en la

solución de monómero, y un proceso de polimerización posterior mantiene la enzima atrapada, evitando contacto directo con el medio ambiente (figura 2.2 b).

2.4 Vulcan XC-72 como soporte

El carbón Vulcan XC-72[®] de Cabot es un tipo de negro de carbón, que es esencialmente un nombre para cualquier tipo de polvos finos de carbono; se utiliza como soporte ya que presenta una alta área superficial ($254 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) y conductividad eléctrica. En este material se pueden llevar a cabo reacciones electroquímicas que tienen lugar en una interfase sólido-líquido (esencialmente actúa como una estructura de soporte conductor o sustrato). (Basu, S., 2007)



Figura 2.3 Presentación del carbón Vulcan XC-72 marca Cabot

2.5 Lacasas

Las lacasas son enzimas polifenol oxidasas, que pertenecen a la familia de las oxidasas azul multicobre. Estas enzimas catalizan la oxidación de un electrón relacionadas con la reducción de cuatro electrones de oxígeno molecular a agua. (Piontek, 2002)

Las lacasas son proteínas N-glicosiladas con un contenido en carbohidratos que representa entre el 10% y el 45% de la masa de la molécula. Generalmente,

aparecen en forma monomérica, con una masa molecular entre 36 kDa y 80 kDa, aunque la mayoría se encuentra entre 50-70 kDa.

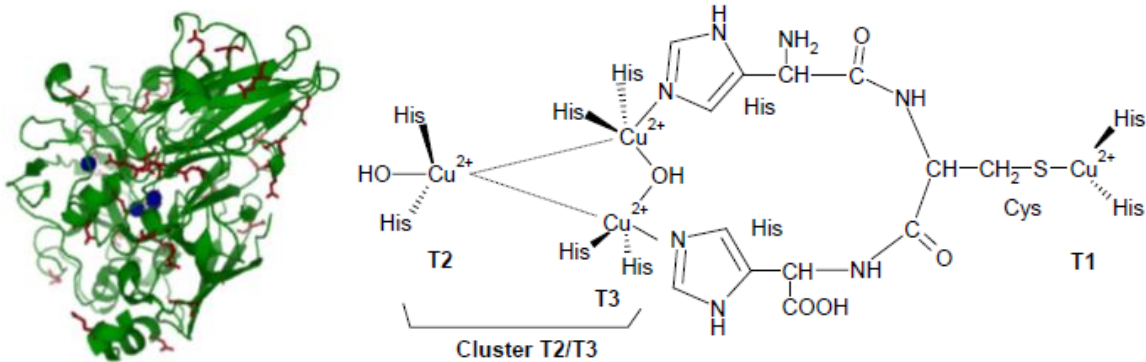


Figura 2.4 Estructura y Centros de Cu de la lacasa (Solomon y cols., 1996). Los átomos de cobre se encuentran coordinados a histidinas (His), cistaminas (Cys) o hidroxilos (OH). El camino electrónico que une el centro T1 con el cluster T2/T3 se muestra detallado. (Vaz Domínguez, 2009)

Las lacasas son proteínas muy estables. Presentan un pI (punto isoeléctrico) entre 2.6 y 4.5 y su máxima actividad varía en un amplio rango de pH , entre 2.0 y 8.5 (Rodríguez, 2006)

Las oxidasas multicobre se caracterizan por la presencia de varios átomos de cobre en su estructura, en estado Cu^{2+} de oxidación. Estos átomos de cobre se agrupan en tres tipos diferentes de centros de cobre: tipo 1, tipo 2 y tipo 3. Las lacasas son el miembro más sencillo dentro de las oxidasas multicobre, presentando un único centro de cobre de cada tipo, figura 2.4. (Rodríguez, 2006)

El ión de cobre T1 (sitio mononuclear) es caracterizado por su banda de absorción con un máximo de 610nm y son responsables del color azul en soluciones concentradas de estas proteínas.

El ión de cobre T2 (cobre no azul/ EPR cobre activo) muestra una absorción de del 330nm. El ión T3 (EPR-cobre inactivo) existe como un binuclear integrado de dos antiferromagnético pareja de átomos cobre.

Los residuos de amino ácidos enlazan los iones de cobre T1, T2 y T3 que son estrictamente conservados en todas las representaciones mononucleares de oxidasas que contienen cobre (Lyashenko y cols. ,2006)

2.5.1 Mecanismo de reducción de oxígeno de la lacasa

El mecanismo por el que se reduce oxígeno en las lacasas involucra la transferencia de cuatro electrones, el cual involucra un sitio activo formado por 4 átomos de cobre distribuido en 3 sitios (1 átomo de cobre para los sitios T1 y T2, mientras que 2 átomos de cobre se encuentran en el sitio T3). El sitio T1 es donde el sustrato se une al sitio activo para ser oxidado mientras que el electrón resultante de esta oxidación es transferido al clúster formado por los 3 átomos de cobre que forman los sitios T2 y T3 donde el oxígeno es reducido a agua. (Giroud y Minter, 2013)

Aunque no hay una idea definitiva acerca del camino electrónico dentro de la proteína, ni del mecanismo por el que se produce la reducción del oxígeno, se sabe que implica la formación de un intermedio peróxido. Un esquema del ciclo catalítico de reducción de oxígeno, basado en estudios espectroscópicos y cristalográficos, puede verse en la figura 2.5 (Vaz Domínguez, 2009)

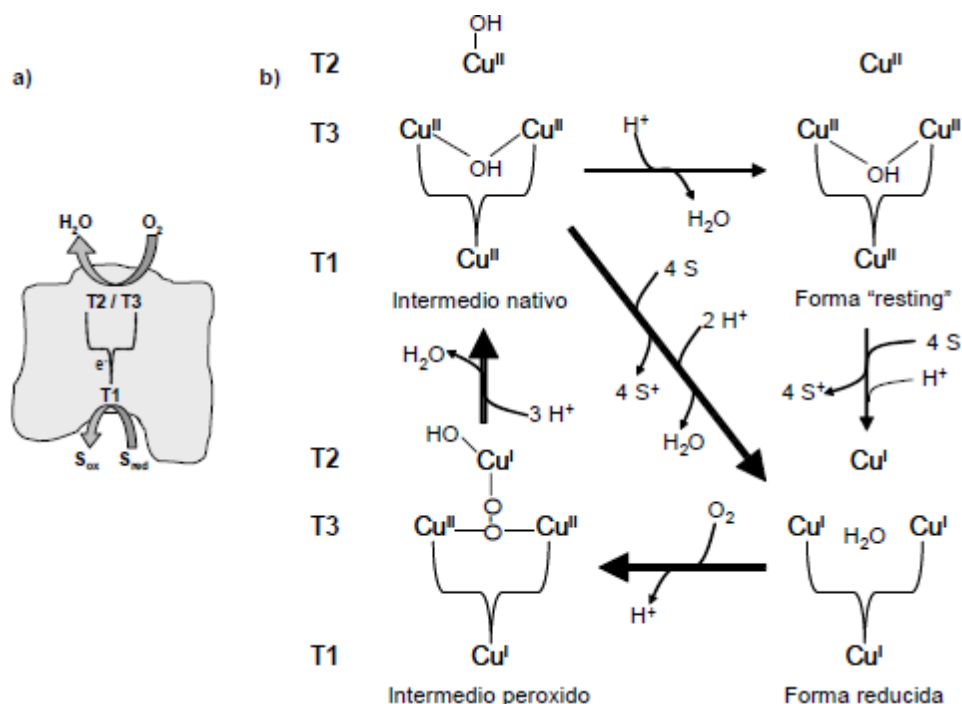


Figura 2.5 a) Reacción catalítica de la lacasa. b) Ciclo catalítico de la lacasa. Se representa una molécula de sustrato en su forma reducida.

2.5.2 ABTS como mediador (2,2'-azidobis(3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfónico))

El amplio espectro de sustratos susceptibles de ser oxidados por las lacasas hace que la presencia de datos respecto a su cinética sea enorme, aunque solo unos pocos sustratos han sido tomados como modelos de oxidación por estas enzimas. Entre estos se encuentran el ABTS, la siringaldizina o el 2,6-dimetoxifenol. (Rodríguez, 2006)

Bourbonnais y Paice (1997), que explican que el ABTS funciona como un agente de oxidación de la lignina, ya que por su tamaño puede difundir mejor entre las fibras de la lignina que la lacasa. (Solís, 2005)

El ABTS presenta una banda de absorción a 340 nm y se oxida dando un catión radical (ABTS^{•+}) con un máximo de absorción a 414 nm, ambas formas con

un coeficiente de adsorción molar $\epsilon = 3.6 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. El catión radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ no es estable, y desproporciona lentamente en ABTS y un azodicación (ABTS^{2+}) (figura 2.6). (Vaz Domínguez, 2009)

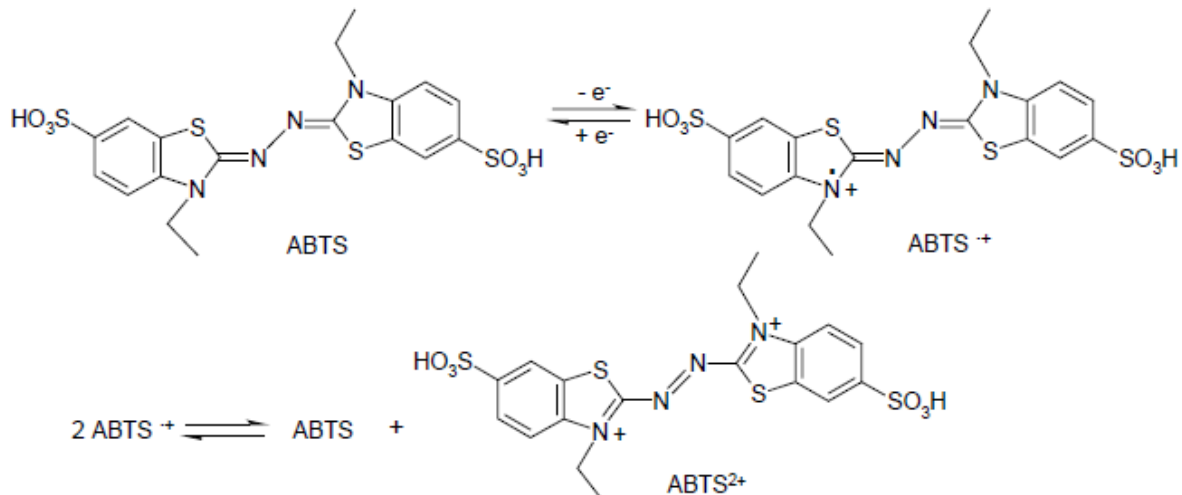


Figura 2.6 Especies redox del ABTS.

2.6 Hipótesis y objetivos

2.6.1 Hipótesis

El desarrollo de un biocátodo basado en la enzima lacasa mediante inmovilización física o covalentemente sobre superficies de carbono favorecerá la reducción de oxígeno en una celda de combustible microfluídica operada en condiciones fisiológicas.

2.6.2 Objetivo General

Desarrollar y caracterizar un biocátodo para microceldas de combustible basado en la enzima lacasa inmovilizada física o covalentemente sobre superficies de carbono.

2.6.3 Objetivos Particulares

- Caracterizar y comparar la actividad enzimática de la lacasa de *Trametes sp.* comercial y aislada del *Trametes sp.* Termotolerante en solución.
- Evaluar la actividad enzimática de la lacasa inmovilizada física o covalentemente.
- Comparar la actividad catalítica de la lacasa inmovilizada sobre superficies de carbono en la reacción de reducción de oxígeno.
- Evaluar el desempeño del biocátodo en una celda de combustible microfluídica bajo condiciones fisiológicas.

III. METODOLOGÍA

3.1 Preparación del soporte

Se pesó 1g Vulcan XC-72[®] Cabot y se sometió a tratamiento térmico una temperatura de 350°C por 3 horas, esto con el fin de remover los sulfuros e impurezas que pueda contener el carbón.

3.2 Caracterización del soporte

3.2.1 Determinación del área superficial, sitios ácidos y básicos del Vulcan XC-72[®] tratado térmicamente

La medición del área superficial del carbón Vulcan XC-72[®] tratado térmicamente fue realizado en un equipo Autosorb iQ-AG marca Quantachrome Instruments utilizando el método de BET (Brunauer y cols., 1938), los sitios activos se determinaron por el método de titulación ácido-base propuesto por Boehm (Boehm, 1970). Los sitios ácidos se neutralizaron con una solución patrón 0.1 N de NaOH y los sitios básicos con una solución patrón 0.1N de HCl.

Los sitios activos se determinaron aforando un matraz volumétrico de 50 mL con solución neutralizante 0.1 N y agregando aproximadamente 0.25 g de Vulcan XC-72® tratado térmicamente. Los matraces se guardaron a temperatura constante a 25°C y se dejó por 5 días. El matraz se agitó manualmente 2 veces al día. Una vez transcurrido este tiempo, se tomó una alícuota de 10 mL y se tituló potenciométricamente (mediante un potenciómetro Orion 3 Star, Marca Thermo Scientific) con soluciones 0.1 N de HCl o NaOH con respecto a los sitios.

3.2.2 Caracterización por FTIR-ATR

Se tomaron 10mg de carbón Vulcan XC-72 tratado térmicamente y se realizó un análisis por FTIR-ATR en el equipo Spectrum 100, Marca Perkin Elmer a temperatura ambiente, resolución de 4cm^{-1} y 16 barridos. Con la finalidad de observar los grupos funcionales que presenta la superficie.

3.2.3 Potencial zeta

3.2.3.1 Preparación de la tinta

Se pesaron 3mg de carbón Vulcan XC-72 tratado térmicamente y se le añadieron 189 μL de isopropanol, llevándose a sonicar por 30 minutos. Posteriormente a la mezcla se le añade 21 μL de nafión® y se lleva a sonicar por 30 minutos.

3.2.3.2 Determinación del potencial zeta

Los estudios de potencial zeta se realizaron en un Analizador Electrocinético para el análisis de superficies sólidas, modelo SurPASS, marca Anton-Paar. Se tomaron 800 μL de la tinta de vulcan y se depositó sobre una placa de carbón vítreo de 20 x 10mm dentro de una celda de ancho de canal ajustable, la presión del fluido fue de 400mbar con una separación de $100\pm 1\mu\text{m}$.

3.3 Preparación del biocátodo

Se pesaron 80mg de carbón Vulcan XC-72® tratado térmicamente y se adsorbieron 800µL de la solución de ABTS 5mM dejándose secar a temperatura ambiente por 24hrs. Posteriormente al material ABTS/Carbón se le adsorbieron 800µL de una solución enzimática de Lacasa 1U/mL y se dejó secar a temperatura ambiente.

3.3.1 Caracterización por FTIR-ATR

Se tomaron 10mg de los compósitos de Lacasa- ABTS/Vulcan XC-72® y Lacasa/ Vulcan XC-72® (Lac-ABTS/C y Lac/C) y se realizó un análisis por FTIR-ATR a temperatura ambiente, resolución de 4cm⁻¹ y 16 barridos.

3.3.2 Potencial zeta

Se tomaron 800µL de una solución de ABTS 5mM y se depositaron sobre la placa de carbón vítreo con tinta de vulcan tratado térmicamente para observar el efecto de la adsorción de ABTS sobre el carbón Vulcan. Posteriormente se tomaron 800µL de solución de Lacasa 1U/mL y se adsorbieron sobre la placa de carbón vítro con Vulcan XC-72® modificado con ABTS para observar el efecto de la adsorción de Lacasa sobre el potencial zeta del compósito.

3.4 Pruebas en media celda

3.4.1 Preparación de la tinta

Se pesaron 3mg del compósito de carbón Vulcan XC-72 tratado térmicamente y se le añadieron 168µL de agua desionizada, llevándose a agitación por vórtex por 20 minutos. Posteriormente a la mezcla se le añade 15 µL de nafión ® y se lleva nuevamente a agitar por vórtex por 10 minutos.

3.4.2 Preparación de la media celda

Se realizaron voltamperometría cíclicas del compuesto de lacasa en presencia de oxígeno y en ausencia de este (nitrógeno) a una velocidad de 200 mV s^{-1} teniendo como electrodos: electrodo de carbón vítreo (trabajo), Calomel (referencia) y Grafito (contraelectrodo). El electrodo de carbón vítreo fue modificado con 1.5 μL de la tinta del compuesto a evaluar. Para observar el efecto de la concentración se prepararon soluciones de lacasa 1, 3, 5 U/mL; las mismas soluciones fueron utilizadas para evaluar el efecto de la velocidad.

3.5 Evaluación del biocátodo en la celda microfluídica

3.5.1 Construcción de la celda microfluídica

La celda de combustible se construyó usando dos chips: un chip de película fotorresistente pirolizada (PPF) y otro de PVC con colectores de aluminio. Además de varias hojas de materiales poliméricos, como se muestra en la figura 3.1. En primer lugar, un polímero de ciclo-olefina de 188 micras de espesor (COP) Zeonofilm® (ZF16-188) y cuatro capas de 80 micras gruesas capas adhesivas de doble cara (PET Arcare® 8725) se redujeron en un plotter de corte Silhouette y alineado para formar el marco de chip (25 x 50 mm) con una ventana de 20 x 20 mm (figura 3.1a). Siguiendo, un chip de PVC que contiene 500 μm adhesivas colectores de electrodos de aluminio se montó dentro de la ventana (Figura 3.1b). Entonces, el canal de corte está hecha de Silastic® que era 3 mm de ancho, 5 mm de altura y 20 mm de largo (Figura 3.1c). Por último, la parte superior se construye de dos capas CP (ZF16-188) y 80 micras de doble lado adhesivo de PET (AR8725) capa (Figura 3.1d).

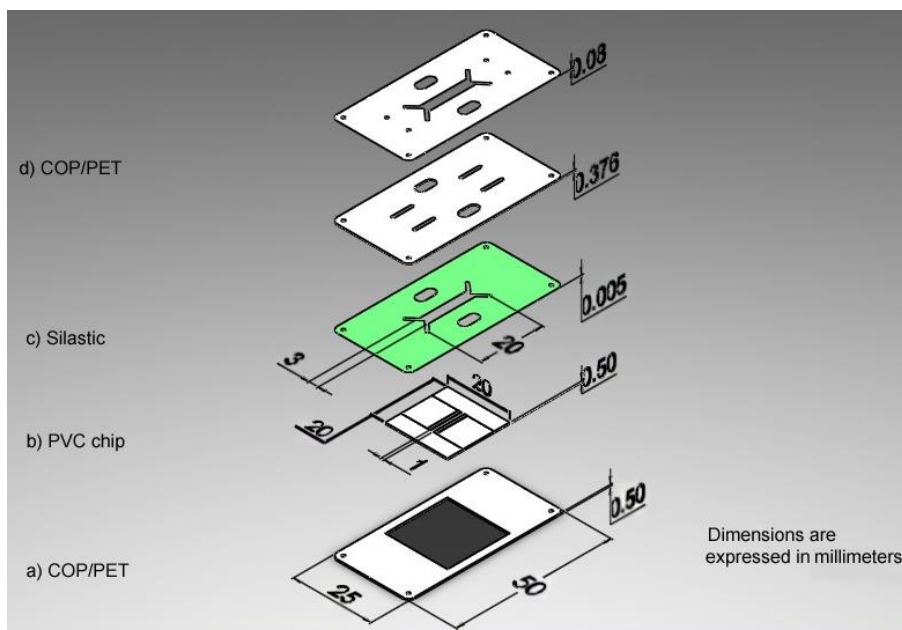


Figura 3.1 Diagrama de armado del dispositivo microfluídico

3.5.2 Pruebas en la celda microfluídica

Para la evaluación en una celda de combustible microfluídica, se utilizó un material anódico de AuAg (80.2% Au y 19.8% Ag) previamente reportado por el grupo de trabajo para probar el biocátodo, como anolito se utilizó glucosa 5 mM en KOH 0.3 M y como catolito Buffer fosfato pH 5 saturado con oxígeno. Se realizaron curvas de polarización por cuatro días consecutivos para observar la estabilidad del biocátodo a temperatura ambiente. En algunos casos se utilizó el SBF (simulated body fluid) como electrolito para observar el efecto de la carga iónica sobre la respuesta del biocátodo.

3.6 Obtención del extracto crudo con actividad lacasa

3.6.1 Crecimiento del hongo *C. polyzona*

Se realizó el crecimiento de la cepa 44 en medio agar PDA y se llevó a incubación a 37°C por 4 días.

3.6.2 Determinación de proteína por el Método de Bradford

Se tomaron 200 μ L de extracto crudo enzimático y se agregaron en un vial con 300 μ L de agua desionizada y 500 μ L del reactivo de Bradford se agitó vigorosamente y se dejó reposar por 5min para leer absorbancia a una longitud de onda de 595nm (Bradford, 1976).

3.6.3 Determinación de actividad lacasa

Se tomaron 100 μ L de extracto crudo enzimático y se agregaron a un vial con 800 μ L de agua desionizada y 100 μ L de ABTS 10mM en buffer de acetatos pH5.5. Se tomó la absorbancia cada 15 segundos por 2 minutos a una longitud de onda de 420nm.

3.7 Variación de la concentración del mediador

3.7.1 Estudios de media celda en medio neutro

Se prepararon materiales por el mismo método para observar el efecto de la variación de mediador sobre la actividad del biocátodo. Estos materiales tenían una concentración de 1, 5 y 10mM de ABTS y fueron evaluados para la reacción de reducción de oxígeno en medio neutro mediante voltamperometría cíclica.

Los perfiles de los materiales en medio neutro se realizaron en una celda con un arreglo de 3 electrodos: como electrodo de trabajo se utilizó un electrodo de carbón vítreo con 1.5 μ L de tinta del material a evaluar, un electrodo de calomel como electrodo de referencia y un contraelectrodo de platino. Como medios se usaron soluciones a un pH de 7.4 de buffer fosfato y de un fluido corporal simulado SBF (Simulated Body Fluid; Kokubo y Takadama, 2006).

3.7.2 Comparación de los biocátodos con respecto al platino comercial

Las pruebas de voltamperometría lineal de los biocátodos en medio neutro se realizaron en una celda con un arreglo de 3 electrodos: como electrodo

de trabajo se utilizó un electrodo de carbón vítreo con 1.5 μ L de tinta del material a evaluar, un electrodo de calomel como electrodo de referencia y un contraelectrodo de platino. Como medio se usó una solución de buffer fosfato a pH 7.4, posteriormente se realizaron adiciones de glucosa hasta tener una concentración de 5, 10 y 50 mM para observar la selectividad del biocátodo hacia la reacción de oxígeno en presencia de glucosa y compararla con respecto al platino y un material a base de lacasa comercial.

3.7.3 Evaluación del biocátodo en un dispositivo microfluídico en medio neutro

Los experimentos fueron realizados en el dispositivo microfluídico con chip de aluminio, utilizando como ánodo Au/C y el biocátodo basados en extracto crudo con actividad lacasa con 5mM de ABTS y otro con 10mM de ABTS con dos flujos, manteniendo el anolito ideal (Glucosa 5mM en KOH 0.3M) y variando el catolito entre Buffer fosfato pH 7.4 y SBF, ambos a 25 μ L/min para evaluar el desempeño de los biocátodos en medio neutro.

3.7.4 Evaluación del biocátodo en un dispositivo air-breathing

Los experimentos fueron realizados en el dispositivo microfluídico previamente reportado por Moreno-Zuria y cols. (2014), el cual presenta una ventana para que el cátodo pueda tomar el oxígeno del aire. El biocátodo se depositó sobre electrodos de papel toray y tela de carbon para evaluar su desempeño, utilizando como ánodo Au/C y el biocátodo basados en extracto crudo con actividad lacasa con 10mM de ABTS con dos flujos, manteniendo el anolito ideal (Glucosa 5mM en KOH 0.3M) y el catolito entre Buffer fosfato pH 7.4, ambos a 25 μ L/min.

3.8 Estudio de películas de extracto crudo con actividad lacasa inmovilizado sobre alginato como biocátodo

3.8.1 Caracterización de las películas por SEM

Antes de realizar la caracterización por SEM las películas de alginato sin y con extracto fueron sometidas a un tratamiento que consistió en sumergir las películas dentro de una solución de ABTS 5mM por 72 horas, con la finalidad de inmovilizar el mediador en la red de alginato.

3.8.2 Estudios de media celda en ausencia y presencia de mediador

Los perfiles de las películas de alginato se realizaron en una celda con un arreglo de 3 electrodos: como electrodo de trabajo se utilizó un electrodo de carbón vítreo con la película a evaluar, un electrodo de calomel como electrodo de referencia y un contraelectrodo de platino. Como medios se utilizaron el buffer fosfato a pH 5 y ABTS 5mM en buffer fosfato pH 5.

3.8.3 Evaluación del biocátodo en un dispositivo microfluídico en ausencia y presencia de mediador

Los experimentos fueron realizados en el dispositivo microfluídico con chip de aluminio, utilizando como ánodo AuAg/C y el biocátodo basados en extracto crudo con actividad lacasa con 5mM de ABTS y otro con 10mM de ABTS con dos flujos, manteniendo el anolito ideal (Glucosa 5mM en KOH 0.3M) y como el catolito el Buffer fosfato pH 5, ambos a 25 μ L/min para evaluar el desempeño de los biocátodos en presencia y ausencia de mediador.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de las superficies de carbón

4.1.1 Área superficial y concentración de sitios ácidos y básicos

En el cuadro 4-1 se presenta un resumen de la caracterización obtenida del Vulcan XC-72. El resultado del área superficial nos indica que tenemos una mayor área de contacto para la adsorción de la enzima lacasa sobre la superficie del Vulcan XC-72. Además de poseer una mayor área superficial posee una mayor cantidad de concentración de sitios ácidos que básicos en su superficie con lo que podemos predecir que la interacción se dará entre los grupos ácidos del carbón Vulcan XC-72 y los grupos amino de la enzima lacasa.

Cuadro 4-1 Resumen de la caracterización del Vulcan XC-72 tratado térmicamente.

Material	Área superficial ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	Concentración de sitios ácidos (meq g^{-1})	Concentración de sitios básicos (meq g^{-1})
Vulcan XC-72 con tratamiento térmico	142.35	0.92	0.63

4.2 Caracterización por FTIR-ATR

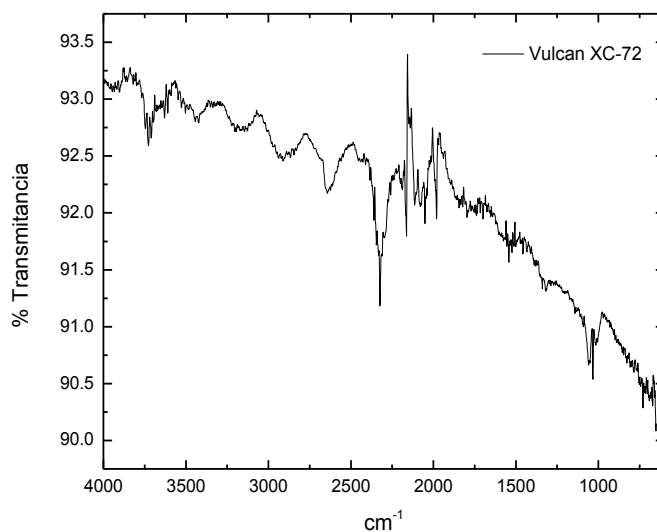


Figura 4.1 FTIR – ATR Vulcan XC-72, el experimento fue realizado a temperatura ambiente con una resolución de 4 cm⁻¹.

En la figura 4.1 se presenta el FTIR del carbón Vulcan XC-72, podemos observar bandas atribuibles a enlaces C-C y C-O en su mayoría, resultado comparable con la presencia de grupos ácidos.

4.3 Pruebas de Potencial Zeta

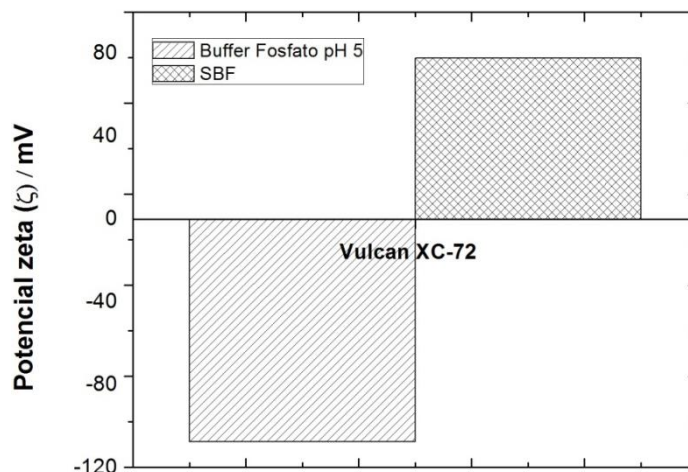


Figura 4.2 Gráfica de potencial Z para el soporte de vulcan XC-72.

En la figura 4.2 Se observa que el Vulcan XC-72 muestra un potencial zeta negativo debido a la presencia de contraiones H_2PO_4^- and HPO_4^{2-} cuando es expuesto al buffer fosfatos de pH 5 mientras que en el SBF presenta un valor positivo ya que se observa la presencia de co-iones.

4.4 Preparación de los compósitos Vulcan XC-72/ ABTS- Lacasa (Lac-ABTS/C)

Se prepara una solución de ABTS 5mM en Buffer Fosfato pH 5, se toman 800 μL de la misma y se deja adsorber sobre 80mg de Carbón Vulcan XC-72, el material se deja secar a temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente se toman 800 μL de una solución de lacasa 1 U mL^{-1} (Sigma Aldrich) y se dejan adsorber sobre el compósito ABTS/C por 24horas a temperatura ambiente.

4.5 Caracterización por FTIR-ATR

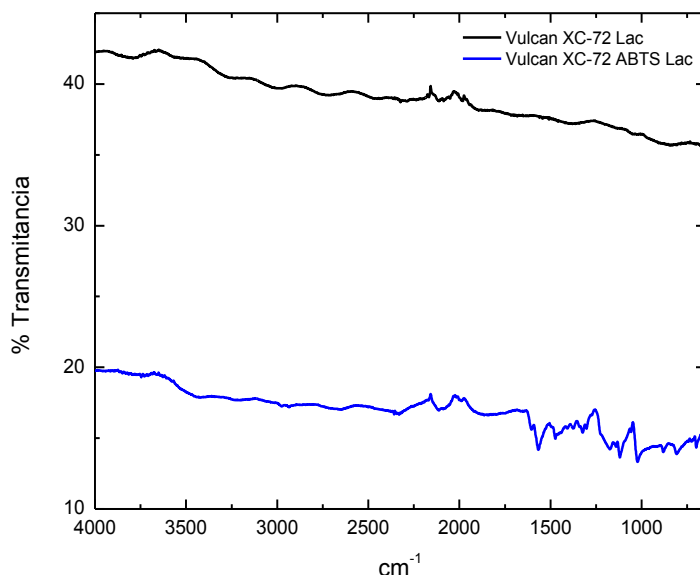


Figura 4.3 FTIR-ATR del Vulcan XC-72 Lacasa y Vulcan XC-72 ABTS Lacasa, ambos experimentos se realizaron bajo mismas condiciones de temperatura y humedad. La resolución es fue de 4cm^{-1}

En el FTIR del compuesto de Lacasa (figura 4.3) podemos observar los picos característicos de los grupos Amida I ($1600\text{--}1690\text{cm}^{-1}$), Amida II ($1480\text{--}1575\text{cm}^{-1}$) y Amida A (3300cm^{-1}) de los enlaces peptídicos con corrimiento y atenuados al estar soportados sobre carbón. Para el compuesto Vulcan XC-72 – ABTS – Lacasa presenta corrimiento de los picos característicos de enlaces peptídicos Amida I, Amida II y Amida A atribuidos a la enzima lacasa; además de corrimientos en picos atribuidos al ABTS: Alargamiento simétrico del SO_2 , (1176cm^{-1}), $\text{C} = \text{N}$ ($2260\text{--}2240\text{cm}^{-1}$) and C-H aromático ($3050\text{--}3150\text{cm}^{-1}$).

4.6 Pruebas de Potencial Zeta

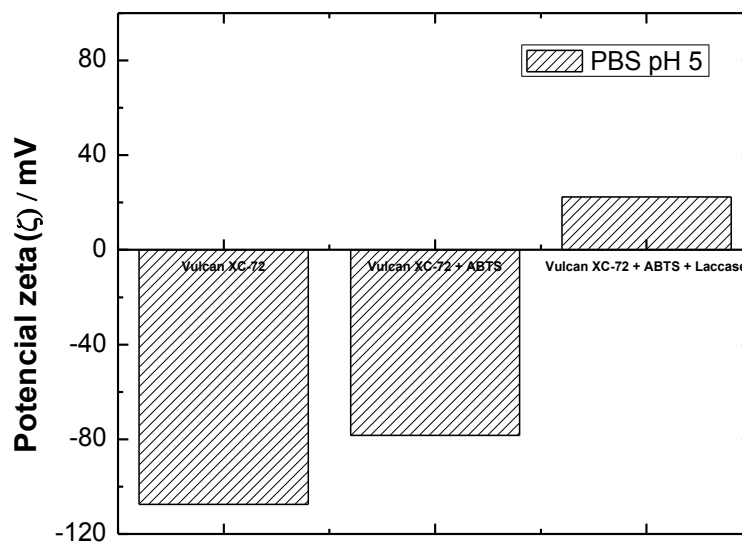


Figura 4.4 Gráfica de potencial Z para cada uno de los arreglos del biocátodo (soporte, soporte + mediador, soporte + mediador + enzima).

En la figura 4.4 Se observa que el Vulcan XC-72 muestra un potencial zeta negativo debido a la presencia de contraiones H_2PO_4^- and HPO_4^{2-} , cuando es incorporado el ABTS el valor negativo de potencial zeta de la superficie se ve disminuido, lo cual puede ser atribuido a la interacción del vulcan XC-72 y los contraiones con los grupos funcionales del ABTS (N^+ , OH^-). Cuando se le agrega la enzima lacasa al material de Vulcan XC-72 con ABTS se presenta un potencial zeta positivo ya que los grupos N^+ en el ABTS interaccionan con los COOH^- y OH^- , exponiendo los co-iones Cu^{2+} de la lacasa. Permitiendo que se vea favorecida la reacción de reducción de oxígeno.

4.7 Pruebas en media celda

4.7.1 Pruebas de media celda con solución de lacasa

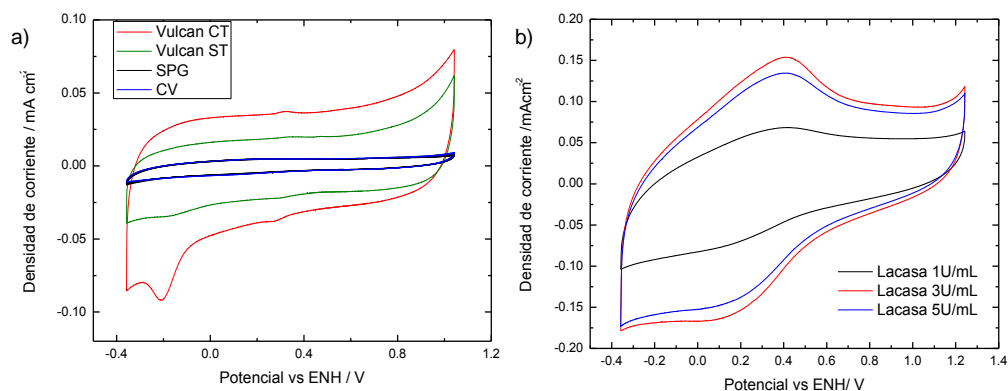


Figura 4.5 a) Evaluación electroquímica de los diferentes soportes en presencia de la enzima lacasa en solución (Vulcan XC-72 con tratamiento y sin tratamiento térmico, carbón vítreo y grafito espectroscópico), b) Efecto de la concentración de enzima en la solución.

En la Figura 4.5-a se observa que el carbón Vulcan XC-72[®] con tratamiento térmico interacciona con la enzima lacasa que se encuentra en la solución mientras que en los voltamperogramas de los demás materiales no existen picos de oxidación o reducción. En la figura 4.5-b se observan picos de oxidación y reducción atribuidos a la lacasa encontrando que se definen mejor en el rango de concentración de enzima de 1 a 3 U mL⁻¹, al alcanzar una mayor concentración (5 U mL⁻¹) la intensidad de los picos de la lacasa se ven disminuídos.

4.7.2 Caracterización electroquímica de la lacasa a diferentes velocidades

En la Figura 4.6 se observa que a mayor velocidad de barrido se define el pico atribuído a la lacasa, además de que los procesos donde la solución de lacasa 3 U

mL^{-1} interacciona con el electrodo de carbón vítreo se observan a mayores velocidades.

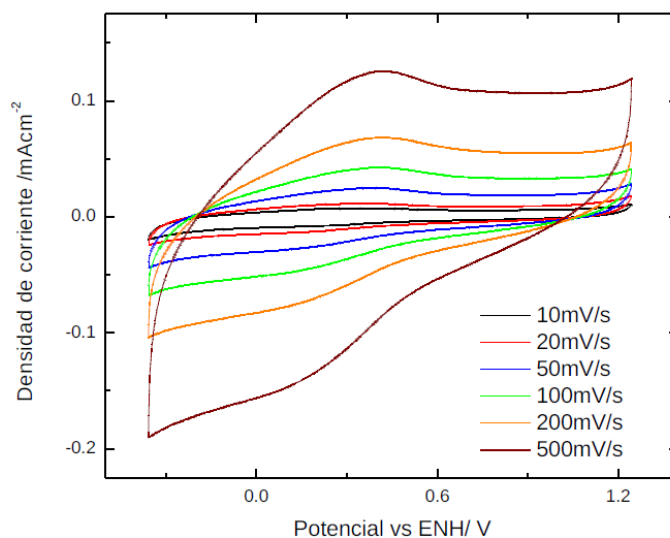


Figura 4.6 Efecto de la velocidad de barrido en la caracterización electroquímica de la enzima lacasa.

4.7.3 Evaluación electroquímica de la reacción de reducción de oxígeno

Las pruebas electroquímicas se realizaron en buffer de fosfatos pH 5 teniendo el electrodo de calomel como referencia, una barra de grafito como contraelectrodo y electrodo de trabajo de carbón vítreo al cual se le depositaba $1.5\mu\text{L}$ de tinta del material a evaluar.

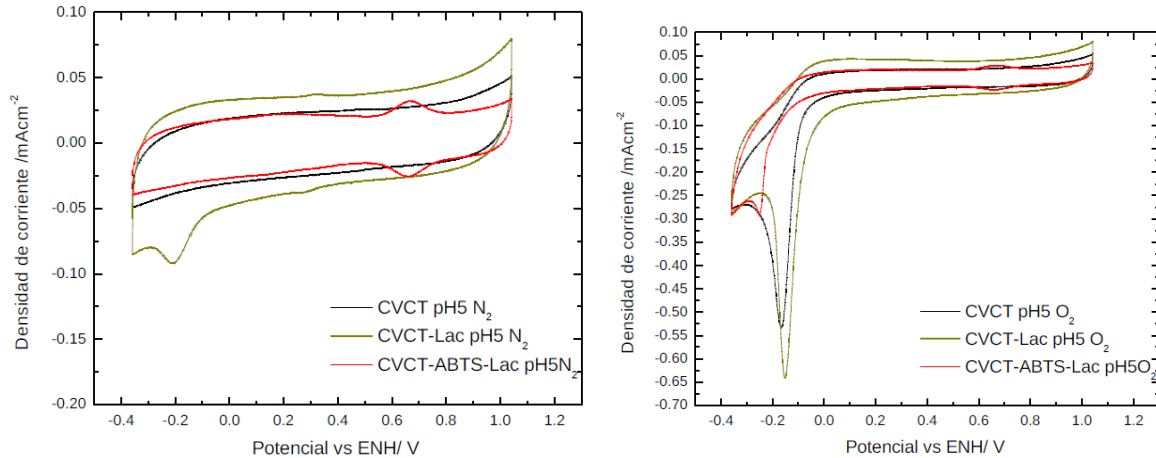


Figura 4.7 Evaluación electroquímica del biocátodo en ausencia y presencia de oxígeno.

En la evaluación electroquímica de la lacasa y el mediador inmovilizados por adsorción (figura 4.7) podemos observar los picos de oxidación y reducción del ABTS que muestran indirectamente la reacción de reducción de oxígeno (0.78V, muy cercano al reportado para la RRO alrededor de 0.8V).

4.8 Evaluación en la celda microfluídica con chip PPF

La celda de combustible está constituida por un material anódico de AuAg (80.2% Au y 19.8% Ag) previamente reportado por el grupo de trabajo para probar el biocátodo, como anolito se utilizó glucosa 5 mM en KOH 0.3 M y como catolito Buffer fosfato pH 5 saturado con oxígeno. Se realizaron curvas de polarización para observar el desempeño del biocátodo a temperatura ambiente.

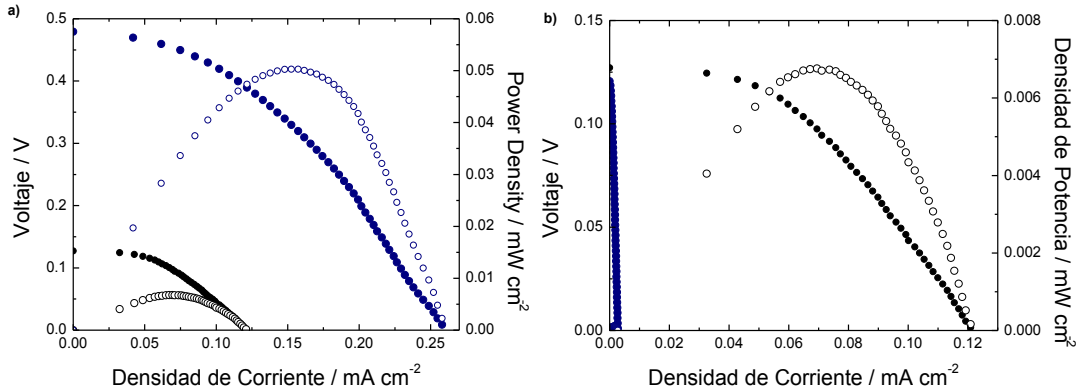


Figura 4.8 Curvas de polarización a) Comparación de condiciones SBF (anolito: Glucosa 5 mM en SBF N₂, catolito: SBF O₂, 2 flujos 25μL min⁻¹) y Soluciones Ideales (anolito: Glucosa 5 mM en KOH 0.3M N₂, catolito: PBS pH 5 O₂, 2 flujos 25 μL min⁻¹); b) Comparación de condiciones SBF 2 flujos y 1 flujo (anolito: Glucosa 5mM en SBF N₂, catolito: SBF O₂ 25μL min⁻¹).

En la figura 4.8 se muestran las curvas de polarización de las celdas de combustible en medio ideal para el ánodo y cátodo sobre electrodos de PPF se observa que en condiciones ideales el rendimiento de la celda es menor que el voltaje que podría obtener con respecto al teórico calculado a partir de las medias celdas (1.23V). El rendimiento de las celdas donde se tenía el medio SBF fue muy pobre, esto puede deberse a la carga iónica del medio, además de que no es el pH adecuado para que el ánodo lleve a cabo la reacción de oxidación de glucosa.

En el cuadro 4-2 se muestra un resumen de los resultados obtenidos de las curvas de polarización para cada arreglo de celda PPF, comparando con la bibliografía reportada para celdas híbridas su rendimiento, aún en condiciones ideales, es pobre, este bajo rendimiento puede ser atribuido a los problemas que se tuvieron

por el desprendimiento del PPF con el depósito al estar realizando la evaluación de la celda.

Cuadro 4-2 Resumen de los resultados obtenidos de las pruebas en la celda PPF.

Experimento	ánodo/cátodo	OCV/V	Densidad de potencia máxima / mW cm⁻²
Condiciones Ideales	AuAg/Vulcan	0.479	0.0503
Anolito: Glucosa 5 mM en KOH 0.3 M	XC-72 ABTS Lac		
Catolito: Buffer fosfato pH5 O₂			
SBF 2 Flujos		0.127	0.00679
Anolito: Glucosa 5mM en SBF			
Catolito: SBF O₂			
SBF 1 Flujo		0.120	0.00001
Solución: Glucosa 5 mM en SBF O₂			

4.9 Evaluación en la celda microfluídica modificada con chip de aluminio

La celda de combustible está constituida por un material anódico de AuAg (80.2% Au y 19.8% Ag) previamente reportado por el grupo de trabajo para probar el biocátodo, como anolito se utilizó glucosa 5 mM en KOH 0.3 M y como catolito Buffer fosfato pH 5 saturado con oxígeno. Se realizaron curvas de polarización por cuatro días consecutivos para observar la estabilidad del biocátodo a temperatura ambiente.

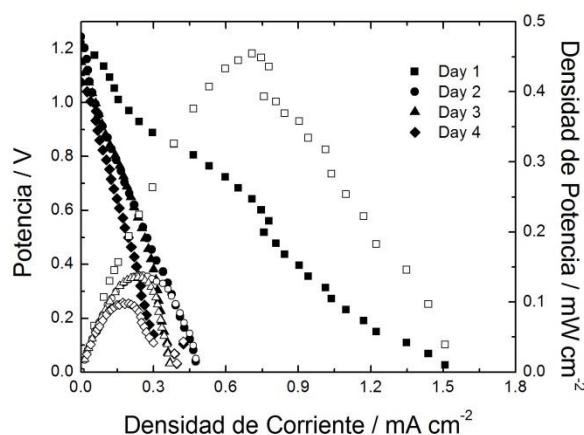


Figura 4.9 Prueba de estabilidad: Se realizaron curvas de polarización del dispositivo por día.

En la figura 4.9 se muestran las diferentes curvas de polarización de la celda de combustible en medio ideal para el ánodo y cátodo sobre electrodos de aluminio se observa que en condiciones ideales el rendimiento de la celda para el primer día (1.21V) es muy cercano al voltaje que podría obtener con respecto al teórico calculado a partir de las medias celdas (1.23V). Entre el segundo y cuarto día se logra estabilizar el dispositivo microfluídico, pero se disminuye su potencia y densidad de corriente lo cual puede ser atribuido a la pérdida enzimática por el flujo al que es sometido el material.

4.10 Selección de la cepa

4.10.1 Crecimiento de las cepas 44 y 46 del hongo *Trametes sp.*

Al realizar la cinética en la fermentación líquida con los medios Kirk y medio PDB, para cada cepa, se observó que para la cepa 44 se produjo una mayor actividad enzimática en el medio Kirk entre el sexto y séptimo día lo cual se puede observar en la Figura 4.10

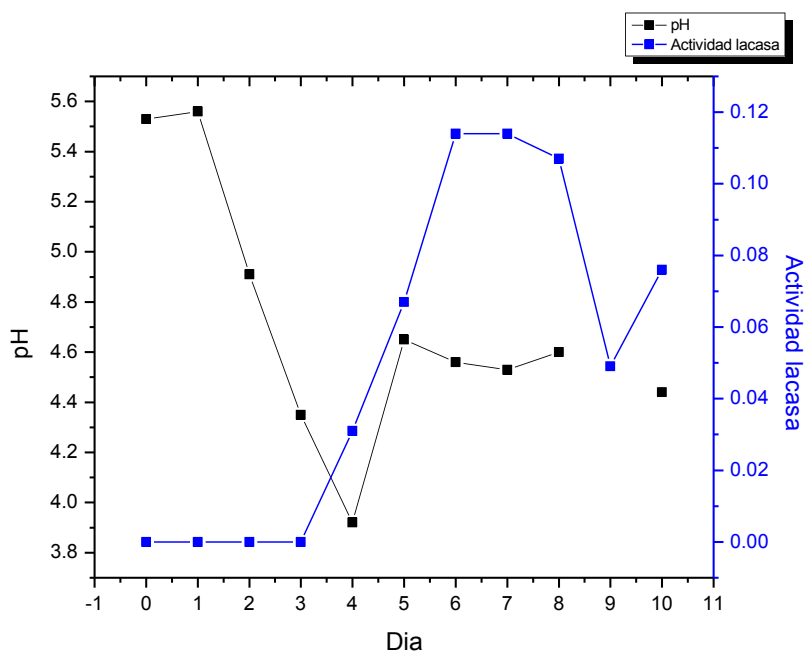


Figura 4.10 Actividad lacasa y pH del medio de cultivo durante el crecimiento del *Trametes sp.* cepa 44.

En la Figura 4.10 se muestra la correlación de la cantidad proteína en el medio y el pH (ácido) en el que se obtiene actividad lacasa durante la cinética de crecimiento.

Se realizó la selección de extractos con mayor actividad lacasa para posteriormente obtener el Zimograma.

4.10.2 Zimograma

Se realizaron los geles de poliacrilamida al 12% en condiciones no desnaturizantes como se menciona en la metodología para los extractos crudos enzimáticos con mayor actividad lacasa los resultados obtenidos después de la realización de los zimogramas se muestran en la Figura 4.11.

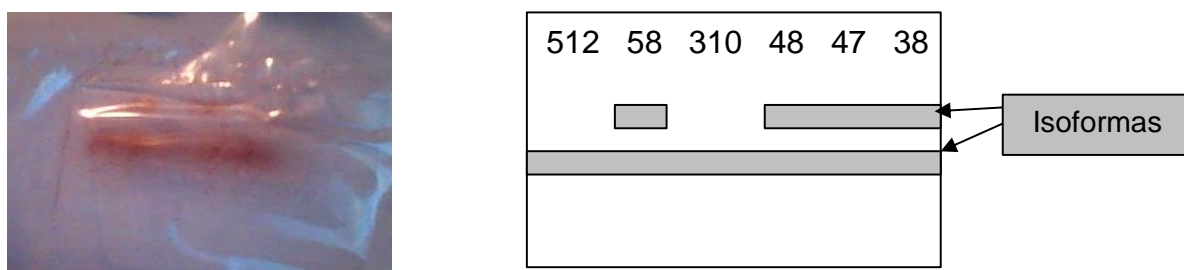


Figura 4.11 Zimograma realizado a los extractos crudos enzimáticos de la cepa 44 de *Trametes sp.* y una representación del mismo (se realizó porque en la imagen no se observa con claridad)

Los resultados mostraron que el hongo *Trametes sp. cepa 44* produce al menos dos isoformas de la enzima lacasa en medio Kirk mientras que en el medio PDB puede darse el caso que solo sea una forma de la enzima lacasa o que al presentarse un manchón en el zimograma sean varias isoformas en el mismo orden de peso molecular.

4.11 Evaluación en celda del extracto de lacasa

Se preparó un material con extracto de lacasa bajo la misma preparación que el de la comercial y se evaluó con la misma celda que la lacasa comercial, obteniéndose una mayor entrega de potencia (mayor al 10%) de la celda con el extracto enzimático en comparación con la enzima comercial, además de una mayor corriente de corto circuito, 2 mA cm^{-2} vs. 1.6 mA cm^{-2} .

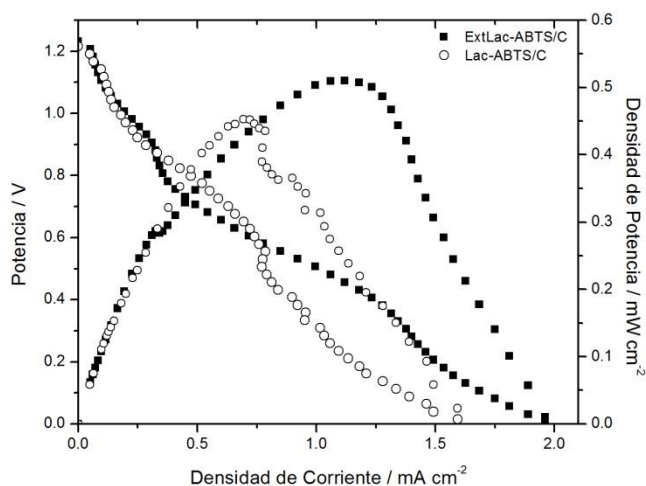


Figura 4.12 Comparación del biocátodo construido a partir de lacasa comercial vs el construido a partir de Extracto Lacasa- ABTS/C: Se compararon curvas de polarización de cada dispositivo.

En la figura 4.12 se muestran las curvas de polarización de la celda de combustible para los biocátodos a partir de lacasa comercial y el basado en extracto crudo con actividad lacasa en medio ideal para el ánodo y cátodo sobre electrodos de aluminio, se observa que en condiciones ideales el rendimiento de la celda para las celdas de los dos biocátodos (1.21V) es muy cercano al voltaje que podría obtener con respecto al teórico calculado a partir de las medias celdas (1.23V). Sin embargo, la potencia máxima y densidad de corriente a corto circuito es mucho mayor para el biocátodo a partir del extracto, lo cual puede ser atribuido

a que algún componente del extracto logra mantener estable a la enzima y por lo tanto más activa a la reacción de reducción de oxígeno.

Cuadro 4-3 Comparación de los parámetros voltaje y potencia máxima de celdas de combustible híbridas reportadas en la bibliografía y las construidas durante la presente tesis.

Ánodo	Cátodo	Anolito	Catolito	OCV / V	J max/ mAcm ⁻²	Pmax/ mWcm ⁻²	Tipo	Referencia
Gox TTF - TCNQ Acero Inoxidable	Pt	Glucosa 5mM	O ₂ gas	0.99	0.4	0.12	PEM	Ivanov <i>et al.</i> 2011
Au ₇₀ Pt ₃₀	BOD-ABTS Vulcan XC-72	Glucosa 300mM en Buffer fosfato pH 7.4	Buffer fosfato pH 7.4 O ₂	0.81	0.45	0.17	con Membrana	Habrioux <i>et al.</i> 2010
Diaforasa y GDH	Pt	Glucosa 5mM NAD+ 1mM	O ₂	0.55	0.13	0.03	Microfluídica	Togo <i>et al.</i> 2007
GOx / γ-Fe ₂ O ₃	Pt	Glucosa 10 mM PBS pH 7.4	O ₂ in PBS pH 7.4	0.3	0.26	0.03	Microfluídica	Galindo <i>et al.</i> 2012
Au ₈₀ Ag ₂₀ /C	Vulcan XC-72 ABTS Lacasa Vulcan XC-72 ABTS	Glucosa 5mM en KOH 0.3M N ₂	Buffer fosfato pH 5 O ₂	1.21	1.7	0.45	Microfluídica	El presente trabajo
	Extracto Lacasa			1.23	1.96	0.51	Microfluídica	

* V= Voltaje, J= Densidad de corriente , Pmáx= Potencia máxima

En el cuadro 4-3 se muestra la comparación de los resultados obtenidos con respecto a la bibliografía reportada para celdas híbridas con electrodos de aluminio, mostrando un mayor desempeño en los parámetros de potencial de

circuito abierto alcanzado, potencia máxima y densidad de corriente a corto circuito que los anteriormente reportados.

4.12 Variación de la cantidad de mediador

4.12.1 Pruebas en media celda en medio neutro

En los estudios de voltamperometría cíclica (Figura 4.13) se observó el pico de reducción de ABTS en 0.78V en el buffer fosfato pH 7.4, lográndose definir mejor a una concentración de mediador de 10mM en ambos medios.

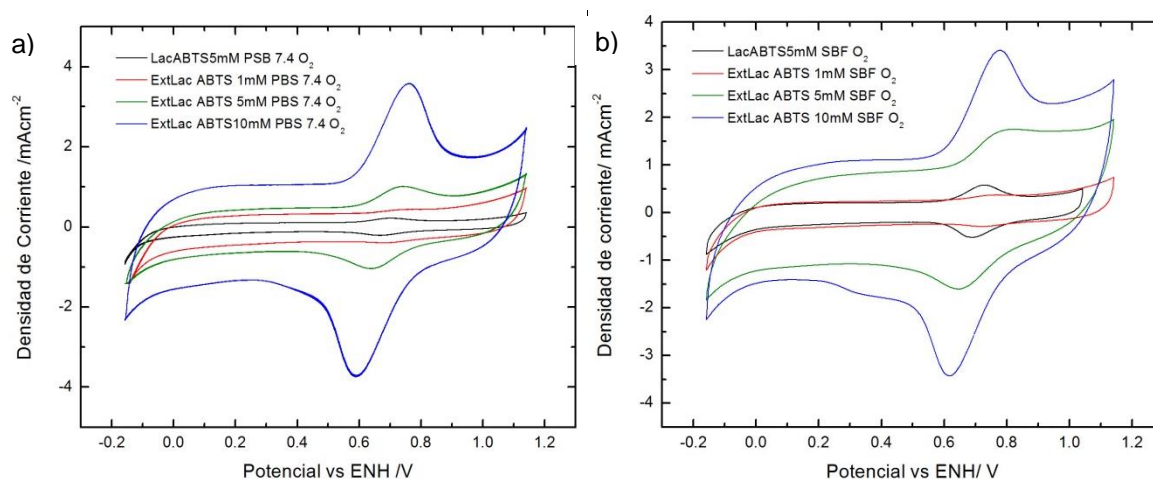


Figura 4.13 Voltamperogramas de los biocátodos en medio neutro en presencia de oxígeno: a) Voltamperogramas de los biocátodos en presencia de O₂ en PBS pH 7.4, b) Voltamperogramas de los biocátodos en presencia de O₂ en SBF pH 7.4

4.12.2 Voltamperometría lineal de los biocátodos contra platino comercial

En los estudios de voltamperometría lineal para los biocátodos (Figura 4.14 a) se observó el pico de reducción de ABTS en 0.78V en el buffer fosfato pH 7.4, con respecto a platino el potencial de reducción del biocátodo se encuentra corrido hacia la derecha lo cual indica que es mejor catalizador que el platino para la

reacción de reducción de oxígeno en medio neutro. En la figura 4.14b se puede observar que el biocátodo es tolerante a glucosa, ya que a pesar de que se aumenta la concentración de glucosa continúa reduciendo oxígeno aunque en menor cantidad.

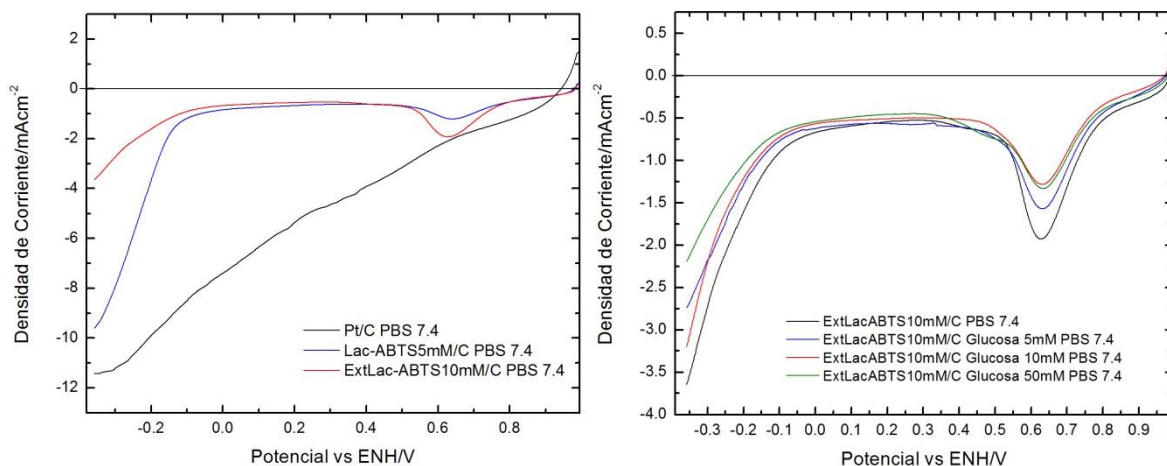


Figura 4.14 a) Voltamperogramas de los biocátodos comparados con platino en presencia de O_2 en PBS pH 7.4, b) Voltamperogramas de los biocátodos en presencia de O_2 y variando la concentración de glucosa (5, 10 y 50mM) en PBS pH 7.4.

4.12.3 Pruebas en dispositivo microfluídico

Se realizaron los experimentos en el dispositivo microfluídico con chip de aluminio con dos flujos descritos en el cuadro 4-4, ambos a $25\mu\text{L}/\text{min}$ para evaluar el desempeño del biocátodo en medio neutro.

Cuadro 4-4 Experimentos realizados en el dispositivo microfluídico en medio neutro

Experimento	Anodo	Cátodo	Anolito	Catolito
1	Au/C	Vulcan XC-72 ABTS 5mM Extracto Lacasa sobre Aluminio	Glucosa 5mM en KOH 0.3M N ₂	PBS pH 7.4 O ₂
2	Au/C	Vulcan XC-72 ABTS 5mM Extracto Lacasa sobre Aluminio	Glucosa 5mM en KOH 0.3M N ₂	SBF
3	Au/C	Vulcan XC-72 ABTS10mM Extracto Lacasa sobre Aluminio	Glucosa 5mM en KOH 0.3M N ₂	PBS pH 7.4 O ₂

En la figura 4.15 se muestran las curvas de polarización de la celda de combustible para el biocátodo basado en extracto crudo con actividad lacasa en medio ideal para el ánodo y medio neutro para el cátodo sobre electrodos de aluminio, se observa que el rendimiento de la celda para las celdas de los dos biocátodos con ABTS 5mM y 10mM (0.98V PBS pH7.4 y 0.93V SBF; 1.07V PBS pH7.4 para el de ABTS10mM) no es muy cercano al voltaje que podría obtener con respecto al teórico calculado a partir de las medias celdas (1.2V). Esto puede ser debido a que la actividad de la enzima se ve disminuída en medio neutro. El aumento en la densidad de corriente y por consiguiente la potencia máxima puede ser atribuída a la incorporación del Au/C como ánodo, ya que este aumenta la conductividad.

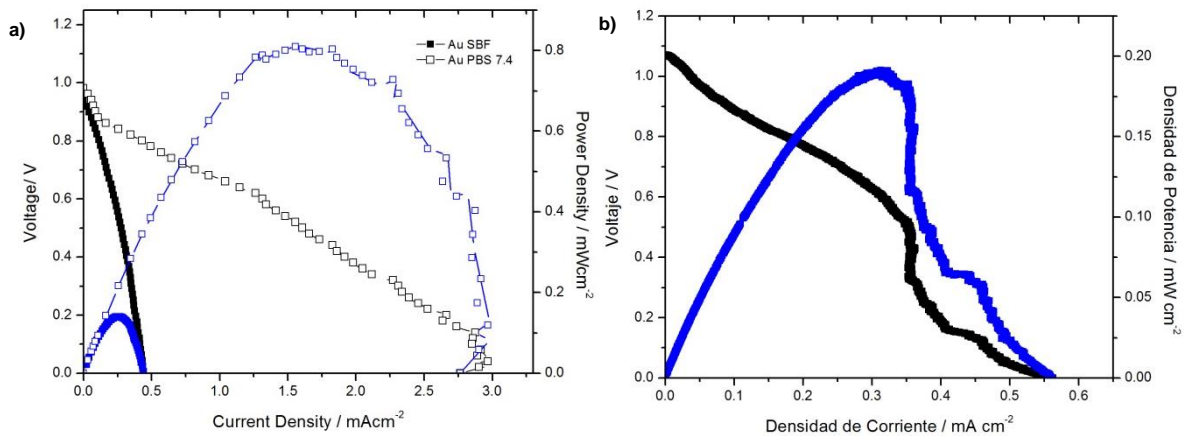


Figura 4.15 Curvas de polarización del biocátodo construido a partir de Extracto Lacasa- ABTS/C: a) Comparación de curvas de polarización del desempeño del biocátodo en el dispositivo microfluídico en medio PBS pH 7.4 y SBF para el material ExLac-ABTS5mM/C, b) Curva de polarización del dispositivo microfluídico con biocátodo ExLac-ABTS10mM/C.

El cuadro 4-5 resume los parámetros obtenidos en los experimentos en medio neutro, en el cual se puede observar que la densidad de corriente y potencia máxima es mucho mayor que las reportadas anteriormente e incluso en la literature para celdas híbridas.

Cuadro 4-5 Resumen de los parámetros obtenidos para los dispositivos microfluídicos en medio neutro.

Experimento	Ánodo	Cátodo	Anolito	Catolito	OCV / V	J max/ mAcm ⁻²	Pmax/ mWcm ⁻²
1	Au/C	Vulcan XC-72 ABTS Extracto Lacasa sobre Aluminio	Glucosa 5mM en KOH 0.3M N ₂	PBS pH 7.4 O ₂	0.98	2.93	0.81
2	Au/C	Vulcan XC-72 ABTS Extracto Lacasa sobre Aluminio	Glucosa 5mM en KOH 0.3M N ₂	SBF	0.93	0.44	0.14
3	Au/C	Vulcan XC-72 ABTS10mM Extracto Lacasa sobre Aluminio	Glucosa 5mM en KOH 0.3M N ₂	PBS pH 7.4 O ₂	1.07	0.55	0.19

4.12.4 Pruebas en dispositivo air-breathing

En la figura 4.16 se muestran las curvas de polarización de la celda de combustible para el biocátodo basado en extracto crudo con actividad lacasa en medio ideal para el ánodo y cátodo en medio neutro sobre papel toray y tela de carbón, se observa que el mejor rendimiento se obtiene cuando el biocátodo fue depositado sobre papel toray. Aunque no se obtenga un voltaje mayor que los reportados para las celdas cerradas de AuAg/C como ánodo, la potencia máxima y densidad de corriente a corto circuito es mucho mayor en ambos (tela y carbon toray), lo cual puede ser atribuído a que se obtiene un mejor desempeño al dejar que el oxígeno sea tomado del aire y no inyectado a la solución del catolito.

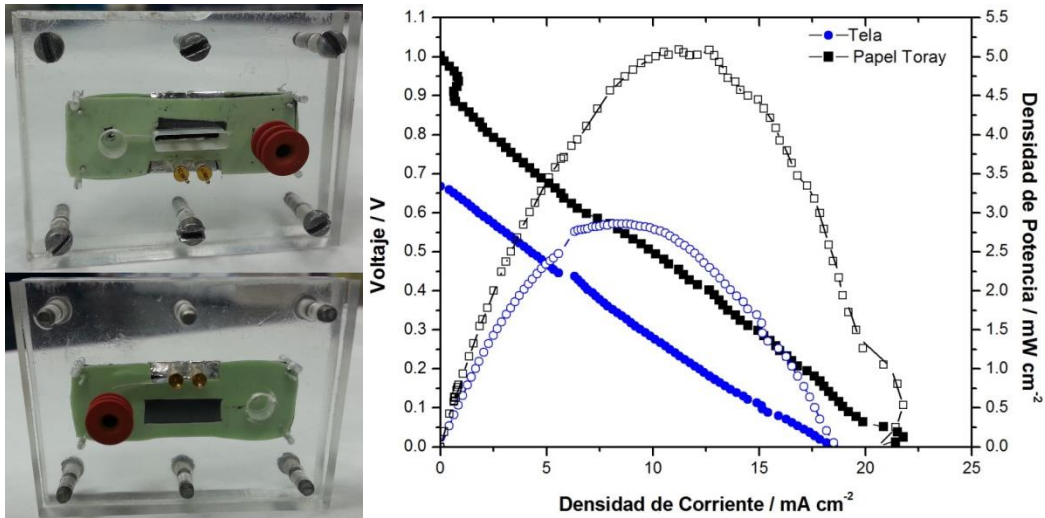


Figura 4.16 Comparación de curvas de polarización para el biocátodo depositado sobre tela y carbon toray en medio neutro para el cátodo, a la izquierda se muestra una fotografía del dispositivo air- breathing.

4.13 Estudio de películas de extracto crudo con actividad lacasa inmovilizado sobre alginato como biocátodo

Se analizaron películas proporcionadas por el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Politécnica de Pachuca las cuales contenían 2UA de extracto con actividad lacasa inmovilizada por atrapamiento con el fin de usarlas como biocátodos.

4.13.1 Caracterización por SEM

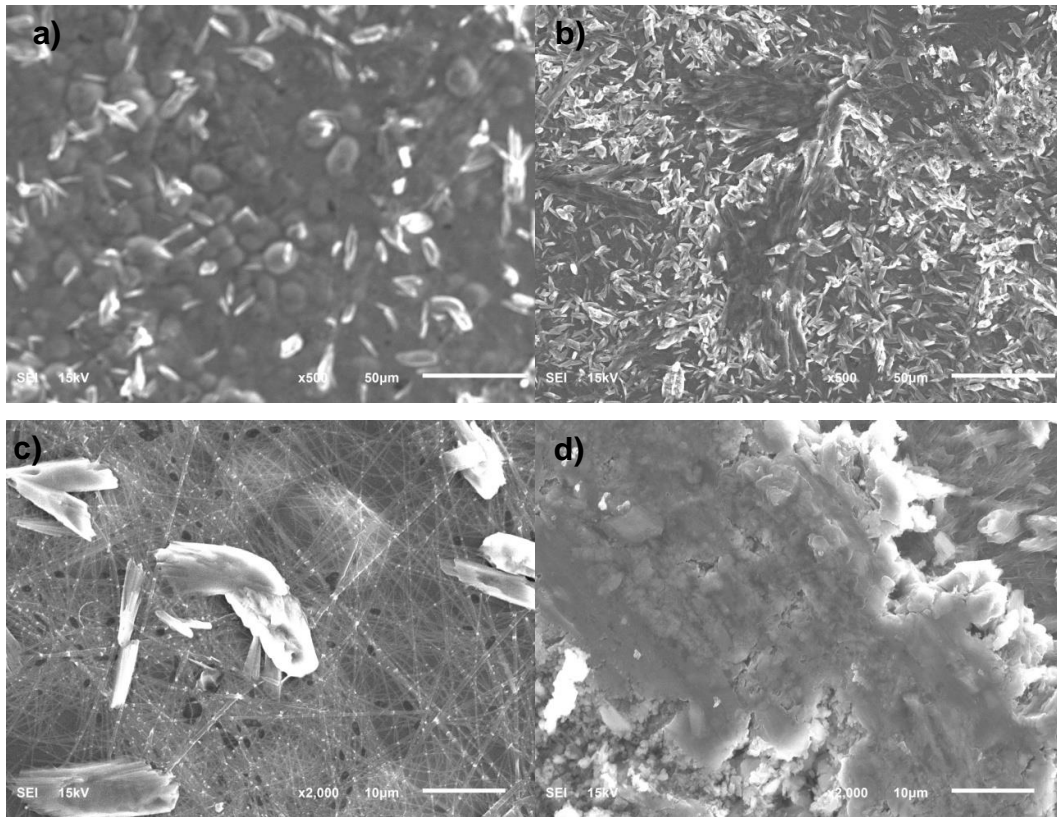


Figura 4.17 Micrografías electrónicas para las diferentes películas de Alginato a) sin extracto y con ABTS a 500x. b) con extracto y ABTS a 500x. c) sin extracto y con ABTS a 2000x. d) con extracto y ABTS a 2000x.

En las figuras 4.17 a y c representan la película de Alginato sin extracto vista a 500x y 2000x se observan claramente los cristales que posiblemente son de Ca y la red del alginato en donde es posible atrapar a la enzima. La figura 4.17 b y d éstas pertenecen a la película con el extracto visto a 500x y 2000x, aquí se observa la misma estructura anterior pero con mayor abundancia de cristales y

con ciertas aglomeraciones que pueden ser proteínas y medio correspondiente al extracto.

4.13.2 Pruebas en media celda en presencia y ausencia de mediador

En los estudios de voltamperometría cíclica (Figura 4.18) se observaron los picos de reducción de ABTS en 0.78V y 1.08V en la solución de ABTS 5mM en buffer fosfato pH 5, estos picos solo se observan en el material que contiene extracto crudo con actividad lacasa inmovilizado. Lo cual indirectamente nos indica que se lleva a cabo la reacción de reducción de oxígeno.

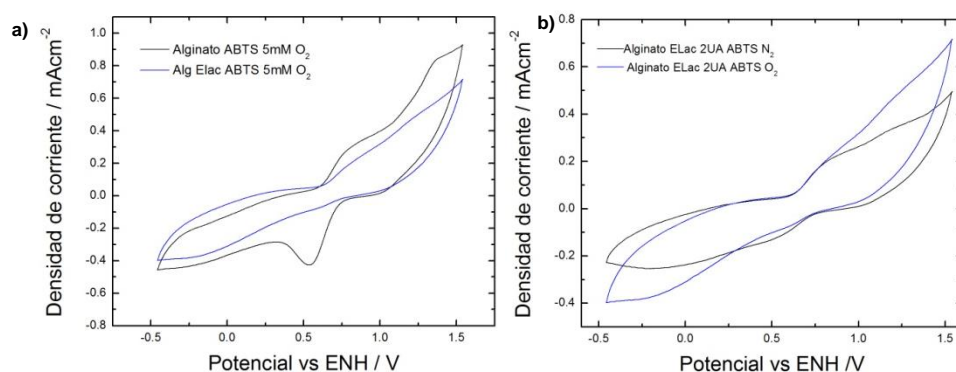


Figura 4.18 Voltamperogramas de los biocátodos de extracto lacasa en alginato en ABTS 5mM en buffer fosfato pH5: a) Voltamperogramas de los materiales alginate sin extracto y con extracto en presencia de O₂ en ABTS 5mM en PBS pH 5, b) Voltamperogramas de los biocátodos en presencia y ausencia de O₂ en ABTS5mM en ausencia y presencia de oxígeno.

4.13.3 Pruebas con dispositivo en presencia y ausencia de mediador

El cuadro 4-6 se muestran los parámetros obtenidos las curvas de polarización de la celda de combustible para el biocátodo basado en extracto crudo con actividad lacasa en alginato en medio ideal para el ánodo y medios buffer pH5 y ABTS 5mM en buffer pH 5 para el cátodo sobre electrodos de aluminio, si bien observamos

que el rendimiento de las celdas son mucho menores que los reportados anteriormente para las celdas de AuAg, se logró inmovilizar el mediador en el alginato con extracto crudo. Además de obtener una transferencia electrónica directa por parte del alginato con extracto crudo.

Cuadro 4-6 Resumen de los parámetros obtenidos para los dispositivos microfluídicos con biocátodos de alginato en ausencia y presencia de mediador.

Celda	Anodo	Cátodo	Anolito	Catolito	OCV / V	J max/ mAcm ⁻²	Pmax/ mWcm ⁻²	Transferencia Electrónica
1	Au ₈₀ Ag ₂₀ /C	Alginato Extracto Lacasa 2UA	Glucosa 5mM en KOH 0.3M N ₂	ABTS 5mM en PBS pH 5 O ₂	0.81	1.240	0.095	Mediada
2	Au ₈₀ Ag ₂₀ /C	Alginato Extracto Lacasa 2UA ABTS 5mM	Glucosa 5mM en KOH 0.3M N ₂	PBS pH 5 O ₂	0.81	0.85	0.067	Mediada
3	Au ₈₀ Ag ₂₀ /C	Alginato Extracto Lacasa 2UA	Glucosa 5mM en KOH 0.3M N ₂	PBS pH 5 O ₂	0.62	0.010	0.0012 1.2x10 ⁻³	Directa

CONCLUSIONES

El carbón vulcan XC-72 se eligió como mejor soporte para la adsorción por su alta área superficial y los sitios ácidos del mismo, los cuales favorecen una interacción electrostática entre el soporte y las moléculas adsorbidas.

Se logró la inmovilización por adsorción tanto del mediador y la enzima lacasa tanto comercial como el extracto sobre el soporte de vulcan XC-72 con tratamiento térmico.

Los estudios de FTIR – ATR de manera conjunta con los estudios de potencial zeta comprueban la adsorción tanto de la enzima lacasa como del ABTS.

En los estudios de media celda en presencia de oxígeno se observaron los picos de oxidación y reducción del complejo ABTS – lacasa, los cuales nos indican indirectamente la reducción de oxígeno.

El dispositivo microfluídico con un biocátodo a partir de lacasa comercial alcanzó un voltaje de 1.21V el cual corresponde al valor estimado a partir de los resultados de media celda, entregó su potencia máxima el primer día y se logró estabilizar del 2° al 4° día. Una disminución de la densidad de corriente y de la potencia máxima ocurre debido a que existe una desorción de la enzima a causa del flujo con el que los fluídos recorren el electrodo.

El dispositivo microfluídico con un biocátodo a partir de extracto de lacasa alcanzó un voltaje de 1.21V el cual corresponde al valor obtenido para el dispositivo con el biocátodo a partir de lacasa comercial.

Como trabajo a futuro se recomienda trabajar con el extracto adsorbido sobre carbón vulcan ya que presenta buena actividad electroquímica para la reducción de oxígeno en medio neutro tanto en celdas cerradas como en celdas air-breathing.

LITERATURA CITADA

Almeida T.S., L.M. Palma, P.H. Leonello, C. Morais, K.B. Kokoh, A.R. De Andrade, 2012, An optimization study of PtSn/C catalysts applied to direct ethanol fuel cell: Effect of the preparation method on the electrocatalytic activity of the catalysts, *J. Power Sources*, 215, 53-62.

Arica MY, Altintas B, Bayramoglu G. Immobilization of laccase onto spacer-arm attached non-porous poly(GMA/EGDMA) beads: application for textile dye degradation. *Bioresour Technol* 2009;100:665–9.

Barton,S.C., J. Gallaway, y P. Atanassov, Enzymatic biofuel cells for Implantable and microscale devices, *Chemical Reviews* 104:4867 (2004).

Basu, S. 2007. *Recent Trends in Fuel Cell Science and Technology*. Springer, New York, USA. 191 p.

Bayramoglu G, Arica MY. Immobilization of laccase onto poly(glycidylmethacrylate) brush grafted poly(hydroxyethylmethacrylate) films: enzymatic oxidation of phenolic compounds. *Mater Sci Eng C* 2009;29:1990–7.

Boehm, H.P., *Chemical Identification of Surface Groups*. Heidelberg, Germany, 1970

Bradford, M.M., Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72:248 (1976).

Brady D, Jordaan J. Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnol Lett* 2009;31: 1639–50.

Brunauer, S., P. H. Emmett, E. Teller; Adsorption of Gases in Multimolecular Layers, *J. Am. Chem. Soc.*, 1938, 60 (2), pp 309–319.

Cuevas-Muñiz, F.M., M. Guerra-Balcázar, F. Castaneda, J. Ledesma-García, L.G. Arriaga, Performance of Au and AuAg nanoparticles supported on Vulcan in a glucose laminar membraneless microfuel cell 2011, *J. Power Sources* 196, 5853.

Cuevas-Muñiz, F.M., M. Guerra-Balcázar, J.P. Esquivel, N. Sabaté, L.G. Arriaga, J. Ledesma-García, 2012, Glucose microfluidic fuel cell base don silver metallic selective catalysts for on-chip applications, *J. Power Sources*, 216, 297-303.

Dayaram P, Dasgupta D. Decolorisation of synthetic dyes and textile wastewater using *Polyporus rubidus*. *J Environ Biol* 2008;29:831–6.

Galindo, R., A. Dector, L.G. Arriaga, S. Gutiérrez, P. Herrasti, J. Electroanal. Chem., 671 (2012) 38-43.

Gewirth, A.A., M.S. Thorum, *Inorg. Chem.*, 49 (2010) 3557- 3566.

Giroud, F.,Minteer,S.D.,2013.*Electrochem.Commun.*34,157.

Guerra-Balcázar, M., F.M. Cuevas-Muñiz, L. Álvarez-Contreras, L.G. Arriaga, J. Ledesma-García, 2012, Evaluation of bimetallic catalysts PtAg/C as a glucose-tolerant oxygen reduction cathode, *J.Power Sources*, 197, 121-124.

Habrioux, A., T. Napporn, K. Servat, S. Tingry, K.B. Kokoh, *Electrochimica Acta* 55 (2010), pp. 7701–7705.

Ivanov, I., T. Vidakovic-Koch, K. Sundmacher, *J. Power Sources*, 196 (2011), pp. 9260– 9269.

Jones, A.K., E. Sillery, S.P.J. Albracht, y F.A. Armstrong, Direct comparison of the electrocatalytic oxidation of hydrogen by an enzyme and a platinum catalyst, Chemical Communications 866 (2002).

Kokubo, T., H. Takadama (2006), How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, Biomaterials 27: pp. 2907-2915.

Lu L, Zhao M, Wang Y. Immobilization of laccase by alginate–chitosan microcapsules and its use in dye decolorization. World J Microbiol Biotechnol 2007;23:159–66.

Lyashenko, A. et al.(2006).Three-Dimensional Structure of Laccase from Coriolus zonatus at 2.6 Å Resolution.Vol.51.p-817.

Mano N., H-H. Kim, G. Binyamin, Y. Zhang and A. Heller, J. Am. Chem. Soc., 2002, 124, 6480-6486.

Mano N., F. Mao, A. Heller, 2003, J. Am. Chem. Soc., Characteristics of a Miniature Compartment-less Glucose- O₂ Biofuel cell and Its Operation in a Living Plant, 125, 6588-6594.

Matijošyte I, Arends IWCE, de Vries S, Sheldon RA. Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. J Molec Catal B 2010;62:142–8.

Moeder M, Martin C, Koeller G. Degradation of hydroxylated compounds using laccase and horseradish peroxidase immobilized on microporous polypropylene hollow fiber membranes. J Membr Sci 2004;245:183–90.

Morales-Acosta D., L.G. Arriaga, L. Álvarez-Contreras, S. Fraire Luna, F.J. Rodríguez Varela, 2009, Electrochem. Comm., 11, 1414-1417.

Morales-Acosta D., M.D. Morales-Acosta, L.A. Godínez, L. Álvarez-Contreras, S. M. Duron-Torres, J. Ledesma-García, L.G. Arriaga, 2011, *J.Power Sources*, 196, 9270-9275.

A. Moreno-Zuria, A. Dector, F.M. Cuevas-Muñiz, J.P. Esquivel, N. Sabaté, J. Ledesma-García, L.G. Arriaga, A.U. Chávez-Ramírez, Direct formic acid microfluidic fuel cell design and performance evolution, *Journal of Power Sources* 269 (2014) 783-788.

Niladevi, K.N., Prema P. Immobilization of laccase from *Streptomyces psammoticus* and its application in phenol removal using packed bed reactor. *World J Microbiol Biotechnol* 2008;24:1215–22.

Phetsom, J., Khammuang S, Suwannawong P, Sarnthima R. Copper–alginate encapsulation of crude laccase from *Lentinus polychrous* lev. and their effectiveness in synthetic dyes decolorizations. *J Biol Sci* 2009;9:573–83.

Piontek, K., M. Antorini, y T. Choinowski, Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-angstrom resolution containing a full complement of coppers, *Journal of Biological Chemistry* 277:37663 (2002).

Rodríguez Sánchez.(2006). Caracterización molecular de lacasas de *Pleurotus eryngii*: expresión heteróloga de estas enzimas y aplicaciones en la degradación de contaminantes aromáticos.p-24,25g.

Sané, S., Jolivalt, C., Mittler, G., Nielsen, P.J., Rubenwolf,S., Zengerle, R., Kerzenmacher, S., *ChemSusChem* 2013, 6, 1209 – 1215

Silverstein, R.M., G.C. Bassler, T.C. Morrill, O. Moreno, 1981, Identificación espectrométrica de compuestos orgánicos, Ed. Diana, Mexico.

Solis Oba, M.(2005).Estudio del mecanismo de acción de ABTS y la lacasa para la oxidación de compuestos orgánicos.p-15,16,17.

Stoica L., N. Dimcheva, Y. Ackermann, K. Karnicka, D. A.Guschin, P. J. Kulesza, J. Rogalski, D. Haltrich, R. Ludwig, L.Gorton and W. Schuhmann, Fuel Cells, 2009, 9, 53–62.

Timur S., Pazarlo lu N, Pilloton R, Telefoncu A. Thick film sensors based on laccases from different sources immobilized in polyaniline matrix. Sens Actuators B 2004;97: 132–6.

Togo, M., A. Takamura, T. Asai, H. Kaji, M. Nishizawa, Electrochimica Acta, 52 (2007), pp. 4669–4674.

Tortolini, C., S. Rea, E. Carota, S. Cannistraro, F. Mazzei, Microchem. J., 100 (2012) 8–13.

Vaz Domínguez, C., (2009), Inmovilización covalente y orientada de enzima lacasa sobre distintas superficies para su uso como cátodo en pilas de combustible.

Winter, M., R.J. Brodd, Chem. Rev. 104 (2004) 4245-4269.

Wang S. C., F. Yang, M. Silva, A. Zarow, Y. Wang and Z. Iqbal, Electrochem. Comm., 2009, 11, 34–37.

APÉNDICE

Apéndice 1. Cuadro resumen de las evaluaciones de los biocátodos en dispositivos microfluídicos realizados durante la presente tesis

Experimento	Anodo	Cátodo	Anolito	Catolito	OCV / V	J max/ mAcm ⁻²	Pmax/ mWcm ⁻²	Tipo	Transferencia Electrónica
1	Au ₈₀ Ag ₂₀ /C sobre PPF	Vulcan XC- 72 ABTS Lacasa sobre PPF	Glucosa 5mM KOH 0.3M N ₂	PBS pH5 O ₂	0.479	0.260	0.0503 5.03x10 ⁻²	Cerrada	Mediada
2	Au ₈₀ Ag ₂₀ /C sobre PPF	Vulcan XC- 72 ABTS Lacasa sobre PPF	Glucosa 5mM SBF N ₂	SBF O ₂	0.127	0.120	0.00679 6.79x10 ⁻³	Cerrada	Mediada
3	Au ₈₀ Ag ₂₀ /C sobre PPF	Vulcan XC- 72 ABTS Lacasa sobre PPF	Glucosa 5mM SBF O ₂	Glucosa 5mM SBF O ₂	0.120	0.003 3x10 ⁻³	0.00001 1x10 ⁻⁵	Cerrada	Mediada
4	Au ₈₀ Ag ₂₀ /C	Vulcan XC- 72 ABTS Lacasa sobre Aluminio	Glucosa 5mM KOH 0.3M N ₂	PBS pH5 O ₂	1.08	1.01	0.31	Cerrada	Mediada
5	Au ₈₀ Ag ₂₀ /C	Vulcan XC- 72 ABTS Lacasa	Glucosa 5mM KOH	SBF O ₂	0.51	0.50	0.10	Cerrada	Mediada

		sobre Aluminio	0.3M N ₂						
6	Au ₈₀ Ag ₂₀ /C	Vulcan XC- 72 ABTS Lacasa sobre Aluminio	Glucosa 5mM SBF N ₂	SBF O ₂	0.06	1.54x10 ⁻⁴	2.46x10 ⁻⁵	Cerrada	Mediada
7	Au ₈₀ Ag ₂₀ /C	Vulcan XC- 72 ABTS Lacasa sobre Aluminio	Glucosa 5mM en KOH 0.3M N ₂	PBS pH 5 O ₂	1.21	1.70	0.45	Cerrada	Mediada
8		Vulcan XC- 72 ABTS Extracto Lacasa sobre Aluminio			1.23	1.96	0.51		Mediada

Experimento	Ánodo	Cátodo	Anólito	Catolito	OCV / V	J max/ mAcm ⁻²	Pmax/ mWcm ⁻²	Tipo	Transferencia Electrónica
9	Au ₈₀ Ag ₂₀ /C	Alginato Extracto Lacasa 2UA	Glucosa 5mM en KOH 0.3M N ₂	ABTS 5mM en PBS pH 5 O ₂	0.81	1.240	0.095	Cerrada	Mediada
10	Au ₈₀ Ag ₂₀ /C	Alginato Extracto Lacasa 2UA ABTS 5mM	Glucosa 5mM en KOH 0.3M N ₂	PBS pH 5 O ₂	0.81	0.85	0.067	Cerrada	Mediada
11	Au ₈₀ Ag ₂₀ /C	Alginato Extracto Lacasa 2UA	Glucosa 5mM en KOH 0.3M N ₂	PBS pH 5 O ₂	0.62	0.010	0.0012 1.2x10 ⁻³	Cerrada	Directa
12	Au/C	Vulcan XC- 72 ABTS Extracto Lacasa sobre Aluminio	Glucosa 5mM en KOH 0.3M N ₂	PBS pH 7.4 O ₂	0.98	2.93	0.81	Cerrada	Mediada

13	Au/C	Vulcan XC-72 ABTS Extracto Lacasa sobre Aluminio	Glucosa 5mM en KOH 0.3M N ₂	SBF	0.93	0.44	0.14	Cerrada	Mediada
14	Au/C	Vulcan XC-72 ABTS10mM Extracto Lacasa sobre Aluminio	Glucosa 5mM en KOH 0.3M N ₂	PBS pH 7.4 O ₂	1.07	0.55	0.19	Cerrada	Mediada
15	Au/C	Vulcan XC-72 ABTS10mM Extracto Lacasa sobre Tela	Glucosa 5mM en KOH 0.3M N ₂	PBS pH 7.4	0.67	18.18	2.86	Breathing	Mediada

Experimento	Ánodo	Cátodo	Anolito	Catolito	OCV / V	J max/ mAcm ⁻²	Pmax/ mWcm ⁻²	Tipo	Transferencia Electrónica
16	Au/C	Vulcan XC-72 ABTS10mM Extracto Lacasa sobre Toray	Glucosa 5mM en KOH 0.3M N ₂	PBS pH 7.4	1.00	20.59	5.08	Breathing	Mediada