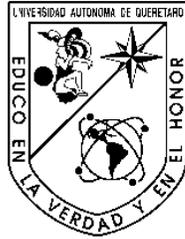


Portada Externa de Tesis

**Autor: Julio César
Espinosa Ángeles**

*Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa en estructuras de carbono
tridimensional micro/nano porosas para su aplicación en bioceldas de
combustible micro/nanofluídicas*

2015



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

Nombre de la tesis

*Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa en
estructuras de carbono tridimensional micro/nano
porosas para su aplicación en bioceldas de
combustible micro/nanofluídicas*

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA

Presenta:

Julio César Espinosa Ángeles

Centro Universitario, agosto 2015



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Ingeniería en Nanotecnología



Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa en estructuras de carbono tridimensional micro/nano porosas para su aplicación en bioceldas de combustible micro/nanofluídicas

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA

Presenta:

Julio César Espinosa Ángeles

Dirigido por:

Dra. Janet Ledesma García

Co-dirigido por:

M. en C. Euth Ortíz Ortega

Santiago de Querétaro, Querétaro, agosto 2015



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Ingeniería en Nanotecnología



Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa en estructuras de carbono tridimensional micro/nano porosas para su aplicación en bioceldas de combustible micro/nanofluídicas

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA

Presenta:

C. Julio César Espinosa Ángeles

Dirigido por:

Dra. Janet Ledesma García

Co-dirigido por:

M. en C. Euth Ortíz Ortega

Dra. Janet Ledesma García
Presidente

Firma

M. en C. Euth Ortiz Ortega
Secretario

Firma

Dra. Minerva Guerra Balcázar
Vocal

Firma

M. en C. Ricardo Antonio Escalona Villalpando
Vocal

Firma

Centro Universitario
Santiago de Querétaro, Querétaro
Agosto 2015

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el método de inmovilización adsorción física/entrecruzamiento de la enzima glucosa oxidasa (GOx) con glutaraldehído (GA) y nanotubos de carbono (NTC) en dos diferentes estructuras de carbono tridimensional, nanoespuma y Toray, para su aplicación en bioceldas de combustible nano y microfluídicas. La inmovilización de la GOx fuera caracterizada por voltametría de pulso diferencial encontrando los picos de oxidación y reducción característicos del cofactor FAD/FADH₂ en -0.63 V, y -0.55 V (vs Electrodo de Calomel Saturado ECS) respectivamente. Se encontró que la cantidad de enzima inmovilizada aumenta un 67% cuando se agrega GA y NTC. Posteriormente la bioelectroactividad de cada bioánodo fue evaluada con el uso de un mediador en solución (ferrocianuro de potasio) para lograr captar en una señal la reacción de oxidación de glucosa dada por la enzima. Este estudio demostró que al aumentar la concentración de glucosa en solución aumenta la corriente producida por la enzima inmovilizada comprobando así la efectividad de la misma. Por otro lado los bioánodos de NEC y de Toray fueron evaluados separadamente con sus respectivas BCCnF y BCC μ F encontrando que los mejores valores de VCA los aporta la celda microfluídica, hasta de 1.2 V, mientras que los mejores valores de densidad de corriente así como de densidad de potencia son contribuidos por la celda nanofluídica, hasta 40 mA cm⁻² aproximadamente. Dichas diferencias se atribuyen a las características intrínsecas de cada material así como a las interacciones resultantes entre las estructuras de carbono, el glutaraldehído, los NTC y la enzima. Dentro de los mismos estudios realizados de bioelectroactividad así como de celda completa se corrobora la contribución de los NTC para favorecer la transferencia directa de electrones desde el sitio activo de la enzima hacia la superficie del electrodo, aumentando en todos los caso la intensidad de corriente producida por estos bioánodos.

Palabras clave: glucosa oxidasa, biocelda de combustible nanofluídica, nanoespuma de carbono, Toray y transferencia directa de electrones.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a la Universidad Autónoma de Querétaro que desde que me encontraba en la escuela de bachilleres nunca dejo de alentarme en continuar con mis estudios. Gracias UAQ por darme la oportunidad de estudiar la Ingeniería en Nanotecnología que no sólo me trajo gran conocimiento sino también grandes amigos, grandes profesores, grandes experiencias y grandes aventuras.

Gracias a todos los profesores que tuve en Nano. De todos y cada uno de ellos me llevo alguna lección. Gracias a aquellos profesores que me dejaron formar parte de sus proyectos y a todos aquellos que me apoyaron en los míos. Gracias a todos aquellos profesores que alguna vez me escucharon en uno que otro dilema que tenía, gracias.

Gracias a todos mis grandes amigos de generación. No es fácil ser la primera generación de una carrea nueva y fresca como la nuestra, pero lo hemos logrado. No solamente se convirtieron en mis amigos sino en parte de mí, los recordaré siempre a donde quiera que vaya y les deseo el más grande éxito persiguiendo sus sueños e ideales. Dentro de estos amigos he de mencionar a Guillermo, Luis Adrián y Porfirio que persiguiendo mis locos aires de acrecentar la comunidad estudiantil de Nanotecnología estuvieron ahí para apoyarme incondicionalmente, siempre estaré inmensamente agradecido ya que lo que logramos lo hicimos todos y siempre seremos recordados por tan grandes iniciativas y proyectos.

Agradecer a mis amigos de toda la vida, Chuy, Titi y Adriana, que tanto me conocen, saben quién soy y cómo soy, y me han acompañado desde siempre. Estoy seguro lo seguirán haciendo.

Especial agradecimiento a la Dra. Janet Ledesma por permitirme colaborar con todo su grupo de trabajo, SEQE, Sistemas Electroquímicos de Energía. Estoy consciente del alcance e impacto que tiene su área de investigación y con ello me he dado cuenta de qué es lo que en verdad quiero seguir haciendo. Gracias a Ricardo Escalona por su gran dedicación y asesoría a lo largo de este proyecto, aprendí mucho de un área que apenas se estaba construyendo. A mi casi compañera de tesis Ana Cristina, gracias por acompañarme en esas largas tardes lluviosas de verano donde no había nadie más en el laboratorio y teníamos que arreglárnosla para salir de ahí secos. A todos los

demás integrantes de SEQE que alguna vez consulte y que sus ideas me ayudaron a aclarar esas dudas, gracias.

Por último pero no menos importante gracias a mi familia. A mis padres, a mis hermanas y a mi pequeño sobrino que si bien no lo expresaron explícitamente siempre me alentaron en continuar adelante respetando mis ideas, mi gusto por la ciencia, dejándome decidir por mí mismo, equivocarme y aprender de ello.

¡Gracias a todos!

Tabla de Contenidos

RESUMEN	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
Tabla de Contenidos	vi
Índice de figuras.....	x
Índice de tablas	xiii
Índice de ecuaciones	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Celdas de combustible.....	3
2.1.1 Estructura de una celda de combustible.....	4
2.1.2 Ecuación de Nernst y pérdidas eléctricas.....	5
2.2 Bioceldas de combustible.....	6
2.2.1 Características principales de las BCC	6
2.3 Enzimas como catalizadores biológicos.....	9
2.3.1 Glucosa Oxidasa	9
2.3.2 Estructura	10
2.3.3 Aplicaciones de la glucosa oxidasa.....	11
2.4 Inmovilización enzimática	14
2.4.1 Métodos de Inmovilización enzimática	15
2.4.1.1 Retención Física	15
2.4.1.2 Unión química.....	16
2.4.2 Estructuras y materiales para la inmovilización enzimática.....	19
2.4.3 Estructuras de carbono 3-D.....	20

2.4.3.1	Nanoespuma de carbono (NEC).....	21
2.5	Transferencia directa de electrones vs Transferencia mediada de electrones	22
2.6	Celdas de combustible microfluídicas.....	23
2.6.1	Contribuciones sobresalientes en una celda de combustible microfluídica.....	24
2.6.2.	Celda de combustible microfluídica vs Celda de combustible nanofluídica	27
3.	HIPÓTESIS.....	28
4.	OBJETIVOS	28
4.1	Objetivo general	28
4.2	Objetivos particulares.....	28
5.	METODOLOGÍA	30
5.1	Materiales.....	30
5.2	Reactivos y soluciones	30
5.3	Equipo	30
5.4	Inmovilización de GOx, GOx-GA en un electrodo de nanoespuma de carbono (NEC) 31	
5.5	GOx-GA-NTC en un electrodo de nanoespuma de carbono (NEC).....	31
5.6	Inmovilización de GOx-GA-NTC en un electrodo de papel de carbono (Toray).....	32
5.7	Caracterización electroquímica	32
5.8	Caracterización por Voltametría Cíclica (VC).....	32
5.9	Caracterización por Voltametría de Pulso Diferencial (VDP).....	33
5.10	Evaluación electrocatalítica de GOx-GA-NTC/NEC y GOx-GA-NTC/Toray	33
5.11	Evaluación de una Biocelda de Combustible Nanofluídica (BCCnF)	33
5.11.1	Diseño y armado de una Celda de Combustible Nanofluídica (CCnF)	33
5.11.2	Evaluación de una biocelda de combustible nanofluídica hibrida (BCCnFH) tipo air-breathing.....	35
5.11.3	Evaluación de una biocelda de combustible nanofluídica enzimática (BCCnFE) tipo air-breathing.....	35

6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
6.1	Inmovilización de GOx y GOx-GA en un electrodo de nanoespuma de carbono	36
6.1.1	GOx/NEC.....	36
6.1.2	GOx-GA/NEC.....	39
6.1.3	FAD-GA/NEC	40
6.2	Inmovilización de GOx-GA-NTC en un electrodo de nanoespuma de carbono.....	42
6.2.1	Nanotubos de carbono y la transferencia directa de electrones	42
6.2.2.	GOx-GA-NTC/NEC	43
6.3	GOx/NEC vs GOx-GA/NEC vs GOx-GA-NTC/NEC.....	45
6.4	Inmovilización de GOx-GA-NTC en un electrodo de papel de carbono (Toray).....	48
6.5	Evaluación bioelectrocatalítica de la enzima GOx	50
6.5.1	Evaluación bioelectrocatalítica de la enzima GOx en un electrodo de nanoespuma de carbono (NEC)	50
6.5.2	Evaluación bioelectrocatalítica de la enzima GOx en un electrodo de papel de carbono (Toray)	52
6.5.3	Bioelectroactividad GOx-GA-NTC/NEC vs GOx-GA-NTC/Toray	53
6.6	Mecanismo de reacción de la reacción de oxidación de glucosa por GOx	55
6.7	Celdas de combustible micro/nanofluídicas.....	57
6.7.1	Evaluación del bioánodo GOx-GA/NEC en una biocelda de combustible nanofluídica híbrida (BCCnFH)	57
6.7.2	Evaluación del bioánodo GOx-GA-NTC/NEC en una biocelda de combustible nanofluídica híbrida (BCCnFH)	58
6.7.3	BCCnFH: GOx-GA/NEC vs GOx-GA-NTC/NEC	60
6.7.4	Estudio de la BCCnFH con electrodos sin modificar en presencia de glucosa y electrodos modificados sin glucosa	62
6.7.5	Estabilidad de la BCCnFH.....	64

6.7.6	Evaluación del bioánodo GO _x -GA-NTC/Toray en una biocelda de combustible microfluídica híbrida (BCC _μ FH).....	67
6.7.7	Estudio de la BCC _μ FH con electrodos sin modificar en presencia de glucosa y electrodos modificados sin glucosa	69
6.7.8	Estabilidad de la BCC _μ FH	70
6.7.9	Bioceldas de combustible micro/nanofluídicas híbridas.....	72
6.7.10	Biocelda de combustible micro/nanofluídica enzimática	73
7.	Conclusiones	81
8.	Referencias.....	83
9.	Anexos	90
9.1	Abreviaturas	90
9.2	Productividad	91

Índice de figuras

Figura 1. Celda de combustible de hidrógeno.	4
Figura 2. Pérdidas por polarización en una celda de combustible	6
Figura 3. Biocelda de combustible	7
Figura 4. Dispositivos biomédicos implantables que pueden emplear una biocelda de combustible enzimática para su alimentación (ZHOU & DONG, 2011).	8
Figura 5. Bioceldas de combustible donde se usó jugo de fruta como combustible (ZHOU & DONG, 2011).	9
Figura 6. Oxidación de β -D-glucosa a ácido glucónico por GOx	9
Figura 7. Estructura terciaria de la glucosa oxidasa (Wong, Wong, & Chen, 2008).	10
Figura 8. Sitio activo de la glucosa oxidasa libre de sustrato y con glucosa, formando un nuevo complejo (Leskovac, Trivic, Wohlfahrt, Kandrac, & Pericina, 2005).	11
Figura 9. Principio de operación de biosensores de glucosa de primera, segunda y tercera generación.	13
Figura 10. Nanomateriales de carbono para la inmovilización enzimática (Poulpiquet, Ciaccafava, & Lojou, 2014).	20
Figura 11. Celda de combustible microfluídica sin membrana.	24
Figura 12. Celda de combustible microfluídica con electrodos porosos y flujo transversal. (a) Esquema de la celda, (b-d) imágenes del flujo transversal a través de los electrodos cuando la celda se encuentra en operación.	26
Figura 13. Celda de combustible nanofluídica	34
Figura 14. Voltamperogramas cíclicos de un electrodo de NEC sin modificar y de GOx/NEC.	37
Figura 15. Voltamperogramas de pulso diferencial donde se muestra el pico de reducción FADH ₂ del cofactor de la GOx dado para los métodos de inmersión y sonificado.	38
Figura 16. Comparación pico de reducción FADH ₂ . Método de inmersión vs método de sonificado GOx/NEC.	39
Figura 17. Voltamperogramas de pulso diferencial de FAD/FADH ₂ para los métodos de inmersión y sonificado de GOx-GA/NEC.	40

Figura 18. FAD-GA/NEC mostrando los picos características de su forma reducida (FADH ₂) y oxidada (FAD).	41
Figura 19. Reacción electroquímica del FAD	41
Figura 20. VDP GO _x -GA-NTC/NEC inmovilizado por inmersión y sonificado usando la dispersión de NTC No.1	43
Figura 21. VDP GO _x -GA-NTC/NEC inmovilizado por inmersión y sonificado usando la dispersión de NTC No.2.	44
Figura 22. Comparación inmovilización por inmersión de GO _x /NEC, GO _x -GA/NEC y GO _x -GA-NTC/NEC	46
Figura 23. VC de GO _x -GA-NTC/Toray inmovilizado por inmersión y usando la dispersión de NTC No.2.	49
Figura 24. VPD de GO _x -GA-NTC/Toray por inmersión y usando la dispersión de NTC No.2.	49
Figura 25. A) VC del electrodo de GO _x -GA-NTC/NEC en BF 0.1 M pH 7.1 con 50 mM de FCN y glucosa a varias concentraciones con velocidad de barrido de 50 mV/s. B) Corriente (mA) en función de la concentración de glucosa adicionada (mM).	51
Figura 26. Reacciones para la transferencia electrónica desde la oxidación de la glucosa hacia el mediador FCN.	52
Figura 27. A) VC del electrodo de GO _x -GA-NTC/Toray en BF 0.1 M pH 7.1 con 50 mM de FCN y glucosa a varias concentraciones con velocidad de barrido de 50 mV/s. B) Corriente (mA) en función de la concentración de glucosa adicionada (mM).	53
Figura 28. Estructura química del FAD (Villalpando, 2014)	55
Figura 29. Mecanismo de reacción de GO _x en la oxidación de glucosa en ausencia de oxígeno (Villalpando, 2014)	56
Figura 30. Hidrólisis de la gluconolactona para la formación del ácido glucónico.	57
Figura 31. Curvas de polarización y densidad de potencia en 5mM de Glucosa para un bioánodo de GO _x -GA/NEC y 0.3 M KOH para un cátodo de Pt/C	58
Figura 32. Curvas de polarización y densidad de potencia en 5mM de Glucosa para los bioánodo de GO _x -GA-NTC/NEC por M1 y M2 y 0.3 M KOH para el cátodo de Pt/C.	60
Figura 33. Curvas de polarización y densidad de potencia en 5mM de Glucosa para los bioánodos de GO _x -GA/NEC vs GO _x -GA-NTC/NEC por M1y 0.3 M KOH para el cátodo de Pt/C.	61

Figura 34. Curvas de polarización y densidad de potencia. A) Prueba 1: Cátodo inorgánico Pt/C/NEC KOH 0.3 M O ₂ y ánodo NEC en glucosa 5 mM/BF N ₂ . B) Prueba 2: Cátodo inorgánico Pt/C/NEC KOH 0.3 M O ₂ y bioánodo de GOx-GA-NTC/NEC en BF N ₂	63
Figura 35. Curvas de estabilidad de la BCCnFH usando como bioánodo GOx-GA-NTC/NEC y cátodo Pt/C/NEC. Las polarizaciones se realizaron cada 10 min.	65
Figura 36. Curvas de polarización y densidad de potencia en 5mM de Glucosa para un bioánodo de GOx-GA-NTC/Toray y 0.3 M KOH para un cátodo de Pt/C	68
Figura 37. Curvas de polarización y densidad de potencia. A) Prueba 1: Cátodo inorgánico Pt/C/Toray KOH 0.3 M O ₂ y ánodo Toray en glucosa 5 mM/BF N ₂ . B) Prueba 2: Cátodo inorgánico Pt/C/Toray KOH 0.3 M O ₂ y bioánodo de GOx-GA-NTC/Toray en BF N ₂	70
Figura 38. Curvas de estabilidad de la BCC μ FH usando como bioánodo GOx-GA-NTC/Toray y cátodo Pt/C/Toray. Las polarizaciones se realizaron cada 10 min.	71
Figura 39. Curvas de polarización y densidad de potencia en 5mM de Glucosa para A) un bioánodo de GOx-GA-NTC/NEC y 0.3 M KOH para un cátodo de Pt/C/Toray y B) bioánodo de GOx-GA-NTC/Toray y cátodo de Pt/C/NEC.	73
Figura 40. Bioceldas de combustible enzimáticas A) GOx y Lc / NEC y B) GOx y Lc / Toray	74
Figura 41. Curvas de estabilidad de la biocelda de combustible nanofluídica enzimática durante 4 días de operación.....	75
Figura 42. Curvas de polarización y densidad de potencia en 5mM de Glucosa para A) un bioánodo de GOx-GA-NTC/NEC y biocátodo de Lc-GA-NTC/Toray en BA pH 5 y B) bioánodo de GOx-GA-NTC/Toray y Lc-GA-NTC/Toray en BA pH 5.	77

Índice de tablas

Tabla 1. Comparación de ΔE_p , I_{pc} y E°_p de los métodos de dispersión de NTC utilizados en la inmovilización de GO _x -GA-NTC/NEC por inmersión y sonicado.....	45
Tabla 2. Comparación sensibilidad y coeficiente de correlación electrodos de GO _x -GA-NTC/NEC vs GO _x -GA-NTC/Toray.....	54
Tabla 3. Velocidades de flujo y VCA para el anolito y catolito en una BCCnFH con bioánodo de GO _x -GA-NTC/NEC M1.....	59
Tabla 4. Valores de VCA (V), densidad de corriente, a la potencia máxima (J), y potencia máxima (W), de las curvas de polarización realizadas cada 10 min.	66
Tabla 5. Valores de VCA (V), densidad de corriente, a la potencia máxima (J), y potencia máxima (W), de las curvas de polarización realizadas cada 10 min.	71
Tabla 6 Valores de VCA (V), densidad de corriente, a la potencia máxima (J), y potencia máxima (W), de estabilidad de la BCCnE,.....	76
Tabla 7. Bioceldas de combustible elaboradas	77
Tabla 8. Tabla comparativa de las Bioceldas de Combustible Híbridas y Enzimáticas más sobresalientes reportadas en la literatura.	79

Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Ecuación de Nernst	5
Ecuación 2. Modelo de Brown y Anson para especies redox electroquímicamente activas.	47
Ecuación 3. Potencial de la celda.....	69

1. INTRODUCCIÓN

Las bioceldas de combustible enzimáticas (BCCE) son aquellos dispositivos electroquímicos capaces de transformar la energía química de una reacción en energía eléctrica usando enzimas como catalizadores (Meredith & Minteer, 2012). La principal ventaja del uso de enzimas sobre los catalizadores inorgánicos convencionales, como el platino, el oro y el paladio en celdas de combustible, es la alta especificidad hacia el sustrato o el combustible y oxidante. Asimismo, el pH de operación de las enzimas es cercano al neutro, contrario al de operación necesario para el Pt o el Au donde su mayor actividad se efectúa a un pH básico o ácido (Meredith & Minteer, 2012) (Bullen, Arnot, Lakeman, & Walsh, Biofuel cells and their development, 2006). Finalmente la aplicación de las celdas de combustible enzimáticas se dirige a un área donde las condiciones de operación sean las más parecidas a las fisiológicas del cuerpo humano y así logren producir energía suficiente para alimentar dispositivos biomédicos implantables (Halámková, y otros, 2012).

Para mejorar la eficiencia de las BCCE, el uso de electrodos de carbono tridimensionales ha resultado ser una excelente alternativa sobre electrodos uni- y bidimensionales para la inmovilización de enzimas debido a su alta área superficial e interconectividad de poros, reflejándose en una mayor densidad de corriente debido al aumento en el área de contacto entre la enzima y el electrodo (Flexer, Brun, Destribats, Backov, & Mano, 2013) (Holzinger, Goff, & Cosnier, 2012).

Aunado a lo mencionado en el párrafo anterior, se ha implementado el uso de nanotubos de carbono para optimización de la transferencia electrónica directa (Agüi, Yáñez-Sedeño, & Pingarrón, 2008) y de polímeros entrecruzantes para fijar la enzima adecuadamente (Xiao-Yu Yang, Tian, Jiang, & Su, 2012). Estos tres parámetros permiten que el combustible elegido pueda entrar libremente por los poros y reaccionar con las enzimas inmovilizadas mejorando así la eficiencia del dispositivo. Las publicaciones dentro del área de BCCE con electrodos tridimensionales han sido pocas, además de que los valores de densidad de potencia no estoy de acuerdo, cambia tu opinión de ello (Minteer, Liaw, & Cooney, 2007).

En este trabajo se elaborarán electrodos enzimáticos (bioánodos) basados en glucosa oxidasa (GOx) inmovilizada en dos estructuras de carbón tridimensional, nanoespuma y papel de carbono Toray, unidos con un polímero entrecruzante, glutaraldehído al 1% (GA 1%) y nanotubos de carbono de multipared (NTC). Dichos bioánodos se evaluaron mediante técnicas electroquímicas (media celda) como voltametría cíclica (VC) y voltametría de pulso diferencial (VPD). Posteriormente, los bioánodos se evaluaron en bioceldas de combustible micro y nanofluídicas híbridas empleando una concentración de glucosa 5 mmol L^{-1} en buffer de fosfatos como combustible y como cátodo un electrodo de Pt/C comercial (ETEK, 30% pp) depositado por spray también en un electrodo de carbono tridimensional.

2. ANTECEDENTES

2.1 Celdas de combustible

Las tecnologías actuales de producción de energía que se basan en procesos de combustión resultan ser muy dañinas para el medio ambiente y contribuyen principalmente a grandes problemas globales, como el cambio climático, la disminución en la capa de ozono, así como la lluvia ácida, entre otros. Por otro lado, las celdas de combustible (CC) proveen un mecanismo limpio y eficiente de conversión de energía de manera continua. Una CC se define como aquel dispositivo electroquímico capaz de convertir directamente la energía química de una reacción en energía eléctrica (Sharaf & Orhan, 2014).

Las CC pertenecen a un área multidisciplinaria de la ciencia en donde la electroquímica, la termodinámica, la economía, ingeniería, ciencia de materiales, e ingeniería eléctrica interactúan mutuamente para mejorar su desarrollo y su aplicación como sustitutos de los combustibles fósiles (Sharaf & Orhan, 2014).

Una de las principales ventajas de las CC es la alta conversión a energía eléctrica ($\geq 40\%$) comparadas con los sistemas convencionales de generación de energía como los motores de combustión interna ($\approx 35\%$), turbinas generadoras (30-40%), paneles fotovoltaicos (6-20%) y turbinas eólicas ($\approx 25\%$) (Hussein, 2015) (Mahapatra & Singh, 2014). Las CC no están limitadas por restricciones termodinámicas de los motores de calor como la eficiencia de Carnot. Adicionalmente, debido a que no hay combustión, las celdas de combustible producen energía con el mínimo de contaminantes (EG&G Technical Services, 2004). Otra ventaja es la flexibilidad respecto al combustible a usar, ya sea hidrógeno o algún otro tipo de hidrocarburo como la glucosa, alcoholes, ácido fórmico, etc, (Mahapatra & Singh, 2014).

2.1.1 Estructura de una celda de combustible

La estructura básica de una celda de combustible consiste de una capa de electrolito en contacto con un ánodo y un cátodo en el lado contrario (Figura 1). El combustible siempre alimenta al ánodo (electrodo negativo) y el oxidante (normalmente oxígeno) alimenta al cátodo (electrodo positivo). Las reacciones electroquímicas toman lugar en los electrodos para producir una corriente eléctrica a través del electrolito, mientras se conduce otra corriente eléctrica complementaria que realiza trabajo sobre una carga. Aunque una celda de combustible es muy parecida a una batería en varias maneras difieren entre sí en muchos aspectos. Una batería es un dispositivo de almacenamiento de energía en donde toda la energía disponible es almacenada dentro de la misma batería. La batería dejará de producir energía eléctrica cuando los reactantes químicos sean consumidos (se descargue). Mientras que una celda de combustible es un dispositivo convertidor de energía contante siempre y cuando el combustible y el oxidante sean suministrados (EG&G Technical Services, 2004).

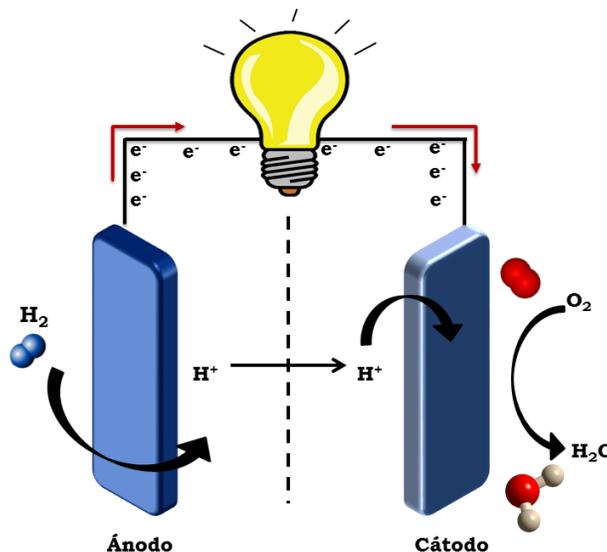


Figura 1. Celda de combustible de hidrógeno.

2.1.2 Ecuación de Nernst y pérdidas eléctricas

La ecuación de Nernst sirve como un principio fundamental para el funcionamiento de una celda de combustible.

$$E = E^{\circ} - \frac{RT}{nF} \ln(Q)$$

Ecuación 1. Ecuación de Nernst

En la práctica el voltaje verdadero de una celda de combustible es menor que el potencial de Nernst debido a las pérdidas eléctricas. Las pérdidas en la conversión de energía química a energía eléctrica, denominadas, polarización o sobrepotenciales, están divididas en la polarización de la activación, polarización óhmica y polarización por concentración. Las reacciones lentas sobre la superficie del electrodo llevan a cabo la polarización de la activación y dependen de la densidad de corriente. El origen de la polarización óhmica se debe a la resistencia al flujo de iones en el electrolito y el flujo de electrones en los electrodos. La polarización por concentración se relaciona con la difusión y el transporte de masa de las especies reactantes a través de los electrodos, inherentes al material del electrodo y a su microestructura. La polarización óhmica incrementa con el ancho del electrodo y con la formación de compuestos intermedios en las interfaces del electrolito y el electrodo. La polarización por concentración disminuye con el incremento de la densidad de corriente hasta un valor límite por encima del cual aumenta de nuevo. La polarización por concentración es normalmente más alta en el cátodo que en el ánodo. Una gráfica representativa de las pérdidas por polarización con la densidad de corriente es mostrada en la Figura 2. El voltaje real V_{cell} de una celda de combustible en operación con una cierta densidad de corriente está dado por (Mahapatra & Singh, 2014):

$$V_{celda} = V_{Nernst} - \text{pérdidas óhmicas} - \text{pérdidas por polarización}$$

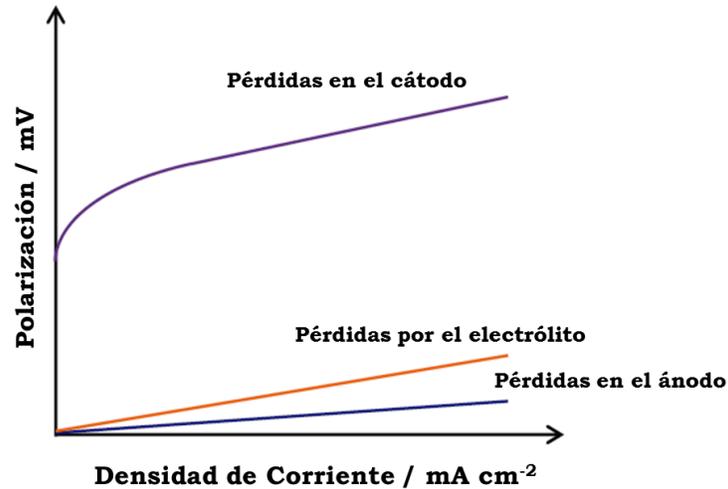


Figura 2. Pérdidas por polarización en una celda de combustible

2.2 Bioceldas de combustible

2.2.1 Características principales de las BCC

Las celdas de combustible biológicas o bioceldas de combustible (Figura 3) pueden definirse como aquellos dispositivos capaces de transformar directamente energía química en energía eléctrica a través de rutas bioquímicas (Bullen, Arnot, Lakeman, & Walsh, Biofuel cells and their development, 2006). Las bioceldas de combustible usan enzimas como catalizadores (solas o dentro de microorganismos) y operan bajo condiciones suaves (20-40 °C y cerca de un pH neutro). Una de las aplicaciones más deseadas de las bioceldas de combustible es en estudios in vivo donde el combustible pueda ser tomado directamente desde los vasos sanguíneos para proveer abastecimiento de energía a largo plazo o incluso permanentemente para alimentar dispositivos como marcapasos, sensores de glucosa o pequeñas válvulas para el control de la vejiga. Los sistemas catalizados enzimáticamente usan enzimas aisladas y purificadas para llevar a cabo reacciones específicas. Esto, generalmente resulta en un sistema mejor definido y varias enzimas pueden ser combinadas para lograr la completa oxidación del sustrato, aunque el estructurar las enzimas de manera que las reacciones ocurran en orden aun es problemático (Ramanavicius,

Kausaite, & Ramanaviciene, 2005) (Bullen, Arnot, Lakeman, & Walsh, Biofuel cells and their development, 2006).

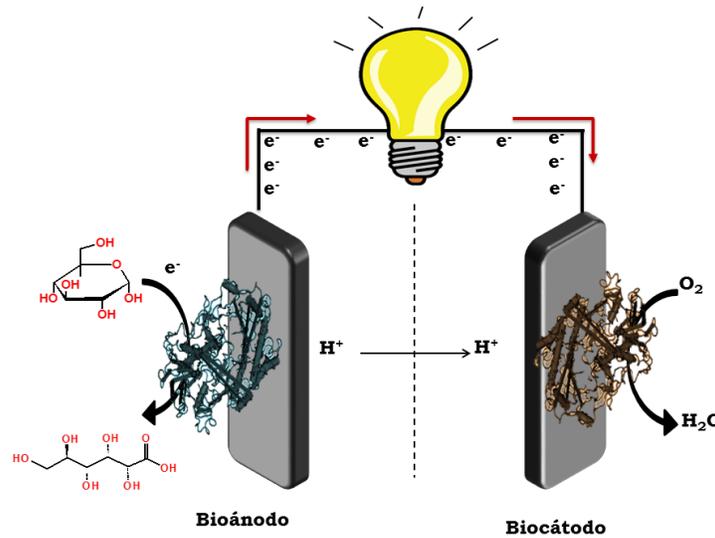


Figura 3. Biocelda de combustible

Con las celdas de combustible enzimáticas es necesario aumentar el tiempo de vida útil del biocatalizador, siendo actualmente de un mes en la mayoría de los casos, a por lo menos un año para que de esta manera pueda ser comercial. Para los sistemas basados en enzimas el área de los electrodos es usualmente pequeña y por ello la potencia de salida no es suficientemente alta para muchas aplicaciones. Para alcanzar corrientes más altas la cantidad de enzima en el electrodo debe de aumentar y la mejor manera de lograrlo es usando electrodos con un área superficial alto como estructuras porosas o 3-D (ZHOU & DONG, 2011) (Bullen, Arnot, Lakeman, & Walsh, Biofuel cells and their development, 2006).

Una de las mayores actividades en el campo de la bioelectrónica está relacionada con los biosensores por sus grandes aplicaciones en análisis clínicos, química forense, control de calidad alimentario etc. Sobre estas diversas aplicaciones analíticas, la electroquímica es siempre una de las técnicas más populares debido a que combina las ventajas de alta sensibilidad, el requisito de bajos volúmenes, bajos costos, y la posibilidad de producción en masa vía la industria

microelectrónica, en la Figura 4 se presentan algunos dispositivos biomédicos implantables donde las bioceldas de combustible tienen una potencial aplicación para su alimentación (ZHOU & DONG, 2011)



Figura 4. Dispositivos biomédicos implantables que pueden emplear una biocelda de combustible enzimática para su alimentación (ZHOU & DONG, 2011).

Otro aspecto importante en bioelectrónica es que utiliza la función biocatalítica de transferencia electrónica de las enzimas o microorganismos para el ensamble de bioceldas de combustible. El uso de biomasa como la glucosa, que se encuentra endógenamente en sistemas biológicos, sugiere las importantes aplicaciones potenciales de las BCE como un tipo de fuentes de energía implantables para dispositivos biomédicos (ZHOU & DONG, 2011).

Se han construido bioceldas de combustible de glucosa/O₂ a partir de jugo de frutas. Además del uso de la glucosa como combustible las BCE's pueden obtener energía a partir del jugo que se encuentra dentro de las frutas naturales. Estas pruebas se han llevado a cabo con jugo de naranja, uva, plátano y un blanco con glucosa utilizando electrodos a base de glucosa oxidasa y glucosa deshidrogenas, para el ánodo, y lacasa para el cátodo. Dichas enzimas son inmovilizadas en estructuras mesoporosas de carbono 3-D así como en NTC para mejorar la transferencia electrónica directa Los valores más altos de VCA y de P_{máx} fueron los reportados con jugo de naranja, en la Figura 5 se presentan los resultados obtenidos por este estudio (ZHOU & DONG, 2011).

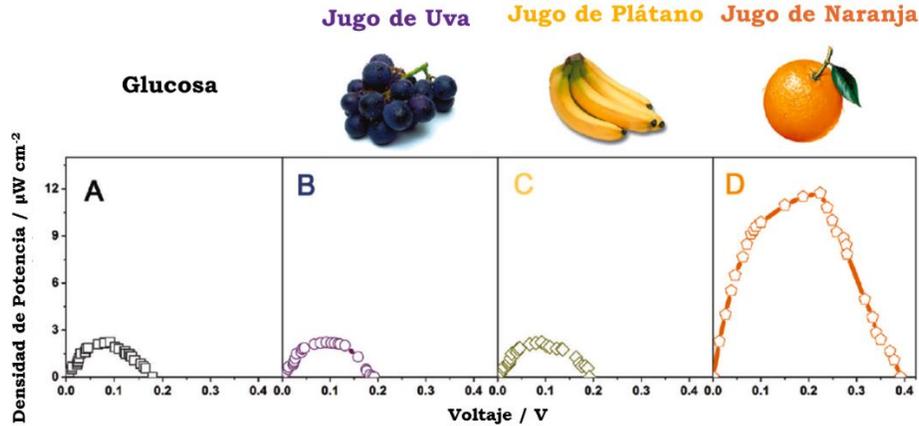


Figura 5. Bioceldas de combustible donde se usó jugo de fruta como combustible (ZHOU & DONG, 2011).

2.3 Enzimas como catalizadores biológicos

2.3.1 Glucosa Oxidasa

La enzima glucosa oxidasa (GOx) ha sido purificada a partir un gran número de fuentes de hongos, principalmente del género *Aspergillus* y *Penicillium*. *Aspergillus Niger* es el más utilizado para la producción de GOx. La GOx (β -D-glucosa: oxígeno 1-oxidorreductasa) cataliza la oxidación de a β -D-glucosa a ácido glucónico utilizando oxígeno molecular como aceptor de electrones con la producción simultánea de peróxido de hidrógeno (Figura 6) (Bankar, Bule, Singhal, & Ananthanarayan, 2009).

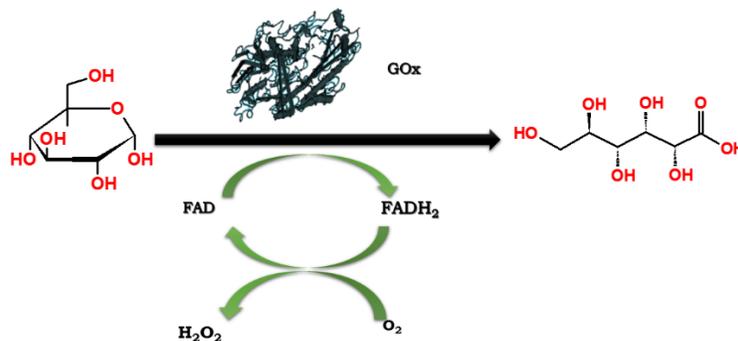


Figura 6. Oxidación de β -D-glucosa a ácido glucónico por GOx

2.3.2 Estructura

La GOx es un homodímero hecho de dos subunidades idénticas de peso molecular aproximadamente de 80, 000 Dalton cada una. La disociación de las subunidades sólo es posible bajo condiciones de desnaturalización acompañada por la pérdida de la coenzima FAD. Contiene una alta cantidad de manosa del 10-16% de su peso molecular total (Leskovac, Trivic, Wohlfahrt, Kandrac, & Pericina, 2005).

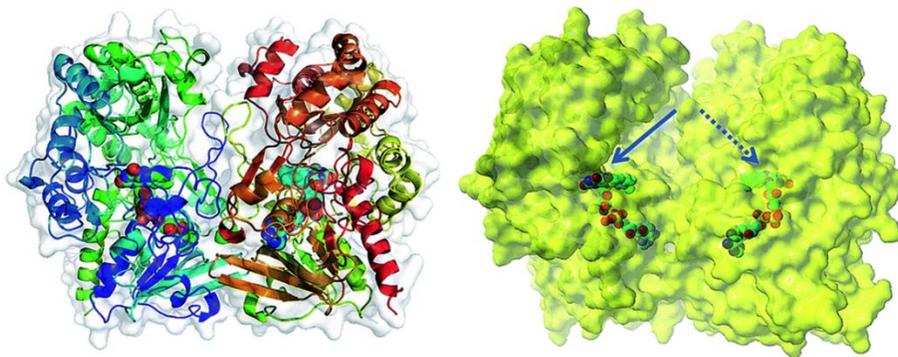


Figura 7. Estructura terciaria de la glucosa oxidasa (Wong, Wong, & Chen, 2008).

La glucosa oxidasa se compone de dos subunidades; cada una lleva una molécula de la coenzima FAD unida no covalentemente, la cual actúa como un portador redox en catálisis. La estructura primaria de la glucosa oxidasa se compone de una cadena sencilla de polipéptidos con 583 aminoácidos. Investigaciones cristalográficas de la estructura terciaria de la GOx indican que el acceso al sistema flavín en el sitio activo es dado por un hueco profundo; la coenzima, FAD, se encuentra al fondo de este hueco (Figura 7). El centro de la reacción catalítica es la posición N5 del anillo de la isoaloxacina del FAD. Hay sólo tres cadenas laterales de aminoácidos dentro de las proximidades de este centro de reacción, la cadena lateral de ácido glutámico Glu412, y las cadenas laterales de dos residuos de histidina, His516 y His559 (Figura 8) (Leskovac, Trivic, Wohlfahrt, Kandrac, & Pericina, 2005) (Bankar, Bule, Singhal, & Ananthanarayan, 2009).

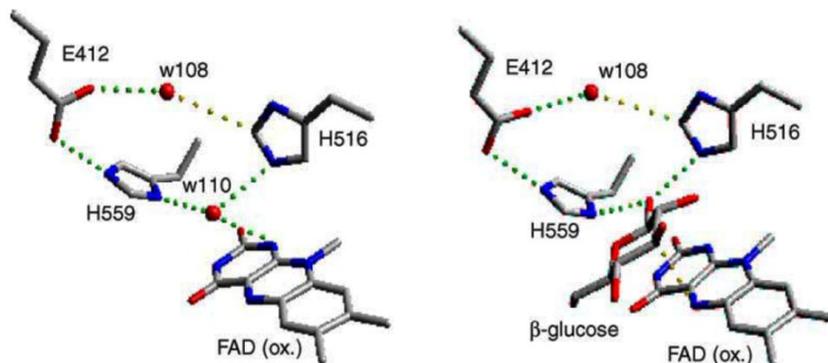


Figura 8. Sitio activo de la glucosa oxidasa libre de sustrato y con glucosa, formando un nuevo complejo (Leskovac, Trivic, Wohlfahrt, Kandrak, & Pericina, 2005).

2.3.3 Aplicaciones de la glucosa oxidasa

- Antioxidante/conservador (eliminador de oxígeno)

La GOx puede ser utilizada como un eliminador de oxígeno activo, antioxidante y conservador en diversas aplicaciones alimenticias. Esto se combina con la demanda de los consumidores para reemplazar antioxidantes químicos con compuestos naturales por lo cual hacen a la GOx un candidato idea en la conservación de alimentos (Wong, Wong, & Chen, 2008).

- Reducción de alcohol en vino

La GOx puede ser usada para reducir la cantidad de glucosa disponible en el jugo utilizado para la fermentación del vino, de esta manera, puede resultar en un contenido menor de alcohol. Para ello se añade GOx antes de la fermentación. La GOx consume parte de la glucosa presente haciendo que no esté disponible para la fermentación (Wong, Wong, & Chen, 2008).

- Producción de ácido glucónico

El ácido glucónico y sus sales derivadas son GRAS y se pueden utilizar en una amplia gama de industrias que incluyen la textil, limpieza de superficies en metales, aditivos en alimentos, detergentes, hormigón, cosméticos y productos farmacéuticos. Como aditivo alimentario puede ser utilizado como regulador de acidez, estabilizador de color, antioxidante y agente quelante en pan. Industrialmente el ácido glucónico se produce a partir de la fermentación (Wong, Wong, & Chen, 2008).

- Sensores de Glucosa

Newman y Turner recientemente estimaron el valor del mercado mundial de biosensores en aproximadamente \$5 mil millones de dólares siendo el 85% atribuido a biosensores de glucosa. Muchos sensores de glucosa disponibles en el mercado se basan en GOx inmovilizada (Wong, Wong, & Chen, 2008).

La GOx se utiliza para la construcción de biosensores amperométricos para aplicaciones médicas y también para la industria alimentaria. Un potencial eléctrico constante es aplicado entre el electrodo de trabajo y el de referencia, promoviendo así la reacción catalítica, que impulsa el flujo de corriente que es proporcional a la concentración de la molécula diana. Dichos sensores de glucosa basados en la GOx se pueden dividir en tres generaciones de acuerdo a su principio de funcionamiento y desarrollo histórico (Figura 9) (Wong, Wong, & Chen, 2008).

En la primera generación, la concentración oxígeno o peróxido de hidrógeno, medida por un electrodo adecuado, se utiliza como un indicador de la concentración de glucosa. El agotamiento de oxígeno o la producción de peróxido de hidrógeno se producen cuando la glucosa está presente y es oxidada por la GOx. La interferencia de otras especies redox son un problema en este tipo de diseño.

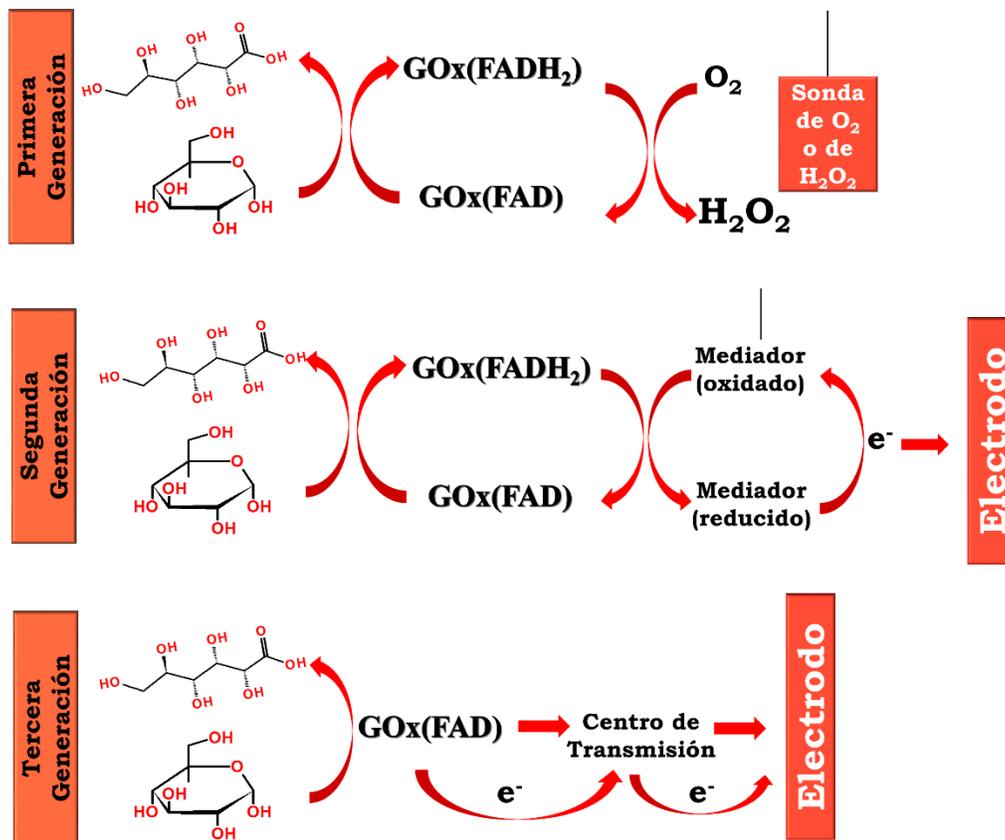


Figura 9. Principio de operación de biosensores de glucosa de primera, segunda y tercera generación.

En la segunda generación, se utilizan mediadores de enlace de ida y vuelta entre la enzima y el electrodo. El mediador reemplaza al oxígeno, que es necesario y a menudo es limitado en la primera generación. Sin embargo, el mediador debe de estar en las proximidades del electrodo, es decir, insoluble. Desafortunadamente, todavía se sufre en grado menor que en la primera generación de interferencias debidas a otras especies redox como el oxígeno. Por lo tanto, para eliminar dicha interferencia, en la tercera generación de biosensores se emplea la transferencia directa de electrones para transferir directamente los electrones desde la enzima al electrodo a través de una serie de centros de enlace o cables. Las tres generaciones de biosensores se ilustran claramente en la Figura 9. Recientemente también hay investigaciones sobre la inmovilización de GOx en nanotubos de carbono o nanofibras, y como estos soporte son eléctricamente conductores están actuando como un transductor/electrodo (Wong, Wong, & Chen, 2008).

2.4 Inmovilización enzimática

Las enzimas pueden catalizar reacciones en diferentes estados: como moléculas individuales en solución, en agregados con otras moléculas, y atadas a superficies. El estado donde se encuentra “atadas” o “inmovilizadas” ha sido de bastante interés para aquellos con interés de explotar las enzimas para fines técnicos. El término “inmovilización de enzimas” hace referencia a la enzima confinada físicamente o localizada en cierta región de espacio definida con retención de su actividad catalítica que puede ser usada continua y repetidamente. La introducción de catalizadores inmovilizados ha mejorado el desempeño técnico de procesos industriales y su economía (Brena & Batista-Viera, 2010) .

La inmovilización de estructuras biológicas confiere una alta estabilidad y extiende la vida útil o la actividad ya que la matriz proporciona a dichas estructuras biológicas un microambiente que puede proteger las bio-entidades de las duras condiciones ambientales tales como el pH, fluctuaciones de la temperatura, disolventes orgánicos y toxinas. Además, la inmovilización se puede permitir al sistema una alta densidad de la bio-entidad (Yang, Tian, Jiang, & Su, 2012).

Ventajas de la inmovilización enzimática

1. Aumento de la estabilidad de la enzima
2. La posible reutilización del derivado, por lo que disminuyen los costos del proceso.
3. La posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada. Dichos reactores permiten el empleo de cargas elevadas de enzima, la cual mantendrá su actividad durante más tiempo. Estos sistemas pueden incluir el reciclado, lo que permite la obtención de productos con mayor pureza.

Desventajas de la inmovilización enzimática

1. La alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo.
2. La gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte.
3. Siempre suele haber una pérdida de actividad de la enzima durante la inmovilización.
4. El biocatalizador es más caro que la enzima nativa.

2.4.1 Métodos de Inmovilización enzimática

2.4.1.1 Retención Física

2.4.1.1.1 Atrapamiento

Consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa construida generalmente por polímeros. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero. Seguidamente se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico. El atrapamiento es de gran sencillez desde el punto de vista experimental, requiere de poca cantidad de enzima para obtener derivados activos. Como ventaja adicional la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura (Arroyo, 1998).

2.4.1.1.2 Inclusión en membranas

- 1) **Microencapsulación:** En esta técnica, las enzimas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de enzima. Estas membranas semipermeables pueden ser permanentes (originadas por polimerización interfacial) o no permanentes (generadas por surfactantes, también llamadas “micelas reversas”). Las microcápsulas obtenidas son de forma esférica, con

tamaños comprendidos entre 1 y 100 mm de diámetro. Mediante este método se pueden encapsular simultáneamente una gran variedad de enzimas, células o biomoléculas, permitiendo que se lleven a cabo determinadas reacciones que suceden en múltiples pasos (Brena & Batista-Viera, 2010).

- 2) **Reactores de membrana:** El desarrollo de reactores o sistemas que contengan enzimas atrapadas ha despertado gran interés en la industria. Estos reactores emplean membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato inicial y obviamente impermeables a la enzima. Mediante una bomba se establece un flujo líquido de sustrato que atraviesa el reactor (Arroyo, 1998).

2.4.1.2 Unión química

2.4.1.2.1 Unión a soportes

Son los métodos de inmovilización más utilizados y de los que se dispone de una mayor información. La elección del soporte y del tipo de enlace resultan determinantes en el comportamiento posterior del biocatalizador. Se debe procurar que la inmovilización incremente la afinidad por el sustrato, disminuya la inhibición, amplíe el intervalo de pH óptimo y reduzca las posibles contaminaciones microbianas. Además el soporte debe tener resistencia mecánica adecuada a las condiciones de operación del reactor y ser fácilmente separable del medio líquido para que pueda ser reutilizado. Se han utilizado una gran variedad de materiales como soportes para la inmovilización de numerosas enzimas. Estos materiales difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma, aunque generalmente nos los encontramos en forma de cilindro, hojas, fibras y más corrientemente en forma de esferas (Arroyo, 1998).

2.4.1.2.2 Adsorción

En la adsorción, la enzima se une a un soporte sin funcionalizar mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno. Los principales factores que influyen en la adsorción, son (Arroyo, 1998):

- el pH del medio: controla el número y la naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la proteína y del sólido;
- la fuerza iónica: al aumentar la fuerza iónica se produce la desorción de la enzima, ya que los iones inorgánicos se unen con más fuerza al soporte que la proteína;
- el diámetro de poro: debe ser aproximadamente dos veces el tamaño del eje mayor de la enzima;
- la presencia de iones que actúen como cofactores de la enzima, ya que pueden incrementar la carga enzimática del derivado.

Como principales ventajas de este método destacan:

- su preparación es sencilla,
- su bajo costo,
- no hay cambios de especificidad enzimática,
- los derivados son estables en medios de trabajo con bajo contenido en agua.

Los inconvenientes de la adsorción son principalmente:

- la optimización de las variables que controlan la adsorción,
- los derivados obtenidos son poco estables desde el punto de vista mecánico,
- la unión al soporte es débil.

2.4.1.2.3 *Unión covalente*

La unión covalente de una enzima a un soporte es quizá el método de inmovilización más interesante desde el punto de vista industrial. La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas. De entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los más

empleados para la formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina y el ácido aspártico y glutámico. El resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, y no pueden intervenir en la unión covalente. Este método presenta las siguientes ventajas (Arroyo, 1998) (Yang, Tian, Jiang, & Su, 2012):

- La manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla;
- La carga de enzima permanece constante después de la inmovilización;
- Los derivados pueden utilizarse en reactores en continuo, empaquetados, de lecho fluidizado o tanque agitado.
- Una mayor resistencia a la desactivación por el efecto de la temperatura, de los disolventes orgánicos o del pH, al tener estabilizada su estructura terciaria.

En cambio la inmovilización por enlace covalente también presenta una serie de inconvenientes:

- Es necesario conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie, ya que condiciona el número de uniones enzima-soporte y su geometría, que puede ser distorsionante y conducir a derivados inactivos.
- El proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo. Para evitar esta posible alteración, se realiza la inmovilización en presencia de un inhibidor que bloquee el centro activo.
- La inmovilización covalente no es aconsejable en aquellas enzimas muy sensibles a cambios de pH, fuerza iónica, etc.

2.4.1.2.4 Reticulado (*crosslinking*)

También denominado entrecruzamiento o cross-linking, es una técnica que ha sido ampliamente utilizada en la estabilización de muchas enzimas (7). El método del reticulado consiste en uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima. Como reactivos bifuncionales se pueden emplear dialdehídos,

diiminoésteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio e, incluso, diaminas si están activadas con carbodiimida. El resultado del reticulado son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura (Yang, Tian, Jiang, & Su, 2012) (Arroyo, 1998).

2.4.2 Estructuras y materiales para la inmovilización enzimática

En muchos casos las modificaciones de los electrodos con nanomateriales conductores, han demostrado ser herramientas valiosas para la mejora en el desempeño de bioelectrodos enzimáticos. Usando nanoestructuras para elabora los electrodos permitirá aumentar el área superficial de éste sin modificar sus dimensiones geométricas, ya sea desarrollando una red volumétrica donde una gran cantidad de enzima puede ser atrapada o por la creación de poros que permiten una mejor adsorción de la misma. Las propiedades importantes de materiales para su uso general en bioelectroquímica son una alta área superficial en relación al volumen o una alta porosidad, una alta conductividad eléctrica y la presencia de sitios reactivos para permitir el atrapamiento eficiente de las enzimas (Poulpiquet, Ciaccafava, & Lojou, 2014).

Los materiales a base de carbono son los más ampliamente utilizados debido a sus propiedades invaluable como su fácil adaptación, sus precios bajos en comparación con la mayoría de otras materias primas y una buena biocompatibilidad. Diferentes tipos de carbono nanoestructurado se presentan en la Figura 10. Entre los más citados se encuentra los nanotubos de carbono de una sola pared o de pared múltiple (NTCPS y NTCMP, respectivamente), carbón vulcan, nanopartículas de carbono, esferas huecas de carbono, grafeno y espumas de carbono mesoporoso. La mayoría de las características de los materiales a base de carbono se deben a su arquitectura y a sus condiciones de síntesis (Poulpiquet, Ciaccafava, & Lojou, 2014).

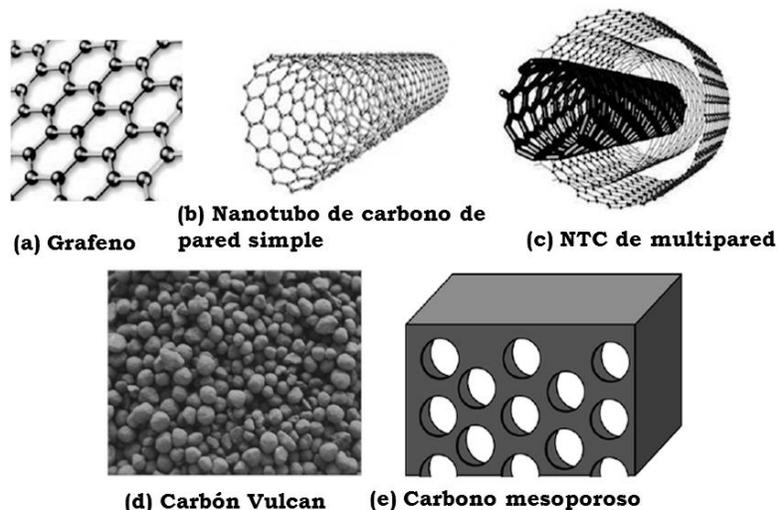


Figura 10. *Nanomateriales de carbono para la inmovilización enzimática (Poulpiquet, Ciaccafava, & Lojou, 2014).*

Los nanomateriales pueden servir como excelentes materiales de inmovilización ya que ofrecen las características ideales para el equilibrio de los factores clave que determinan la eficiencia de los biocatalizadores, incluyendo el área superficial, resistencia a la transferencia de masa y la carga de enzima efectiva. Entre los diversos materiales nanoestructurados como nanopartículas, nanofibras y nanotubos, los nanotubos de carbono (NTC) han sido el foco de mucha atención. Los NTC son producidos por diferentes métodos como arco eléctrico, ablación láser y deposición química de vapor. Los NTC consisten en hojas de grafito que se enrollan en una forma cilíndrica con longitudes de micras y diámetros de hasta 100 nm. Los NTC presentan propiedades mecánicas, eléctricas y térmicas extraordinarias, así como una buena biocompatibilidad (Feng & Ji, 2011).

2.4.3 Estructuras de carbono 3-D

Hoy en día, las densidades de corriente bajas producidas por las celdas de combustibles son uno de los principales retos a solucionar. La conductividad eléctrica, la porosidad y la dureza

se encuentran entre las características deseadas al seleccionar materiales para el electrodo. En este contexto, electrodos con arquitecturas tridimensionales resultan ser prometedores ya que aumentarían en gran medida el área superficial reactiva y por lo tanto la carga enzimática, permitiendo mejorar la corriente. Sin embargo, una mayor carga de enzima significa un mayor consumo de sustrato, los materiales de los electrodos deben ser diseñados para permitir simultáneamente gran área superficial y transporte rápido de masa de combustible. Idealmente, los electrodos deben de tener una porosidad interconectada jerárquicamente, se necesitan poros de diámetro ligeramente mayor al de la enzima para que ésta pueda ser confinada eficientemente. Será una ventaja adicional, si estos poros, a su vez posean paredes porosas (con porosidad en un orden de Å), que sirvan como varios sitios de anclaje. Más allá, son necesarios macroporos para optimizar el transporte de masa del combustible y eludir una baja trayectoria de difusión cinética. Eventualmente, una configuración porosa intermedia tiene que ser lograda ya que las propiedades mecánicas y la conductividad eléctrica dependen en gran medida de la distribución de la porosidad (Flexer, Brun, Destribats, Backov, & Mano, 2013).

2.4.3.1 Nanoespuma de carbono (NEC)

Este tipo de materiales de carbono, nanoporosos y conductores, están basados en aerogeles de carbono los cuales son sintetizados por policondensación en sol-gel de resorcinol y formaldehído seguida de un secado supercrítico y una pirolisis en atmósfera inerte. Dicho proceso de síntesis logra obtener nanoespumas de carbono (NEC) únicas que se caracterizan por su porosidad, alta área superficial y tamaño de poros ultrafinos, menores a 50 nm (Flexer, Brun, Backov, & Mano, 2013) (Lee & Kjeang, 2013). La ventaja principal del uso de NEC's como electrodos en dispositivos electroquímicos sobre el papel de carbono convencional es su gran área superficial entre $400\text{-}800\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$, que es aproximadamente 2000 veces más grande que la del papel de carbono que tiene un área de $190 \times 10^{-3}\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$ (Lee & Kjeang, 2013).

La resistividad que se ha determinado para la NEC y para el papel de carbono (Toray) es $(2.4 \pm 0.6) \times 10^{-2}\ \Omega\text{ cm}$ y $(6.1 \pm 0.1) \times 10^{-3}\ \Omega\text{ cm}$ respectivamente, por lo que la resistividad de la NEC es cuatro veces más grande que la del papel carbono (Lee & Kjeang, 2013). La NEC utilizada

en este trabajo posee un diámetro de poro promedio aproximadamente de 90 nm con un espesor de 100 μm (Lee & Kjeang, 2013).

2.5 Transferencia directa de electrones vs Transferencia mediada de electrones

La mayoría de las enzimas oxido-reductasas que han sido empleadas comúnmente en bioceldas de combustible no han demostrado promover la transferencia directa de electrones entre la enzima y la superficie del electrodo. En este caso, muchos compuestos redox activos de bajo peso molecular y polímeros redox han sido incorporados para mediar dicha transferencia. A este enfoque se le conoce como transferencia mediada de electrones (TME) y requiere que el mediador participe directamente en la reacción catalítica reaccionando directamente con la enzima o su cofactor para ser oxidada o reducida y así transferir los electrones hacia y desde la superficie del electrodo. Los mediadores son especies redox con reversibilidad electroquímica que pueden transferir electrones entre la coenzima/cofactor de una enzima oxido-reductasa y el electrodo (colector de corriente) (Cooney, Svoboda, Lau, Martin, & Minteer, 2008).

La transferencia directa de electrones es un mecanismo de tunelaje que depende de la estructura de la enzima, específicamente de la localización del centro redox dentro de la proteína, la orientación de la enzima, y finalmente, de manera exponencial de la distancia de la transferencia de electrones. Un flujo eficiente de electrones entre una proteína redox y el electrodo sólo puede ser alcanzada si (i) el centro activo se encuentra cerca de la superficie de la proteína, (ii) la enzima es orientada con su sitio activo hacia el electrodo, (iii) la enzima se deforma sin perder su actividad y (iv) una vía de electrones es introducida por un segundo centro redox o por modificaciones (Cooney, Svoboda, Lau, Martin, & Minteer, 2008).

Algunas enzimas son capaces de interactuar directamente con el electrodo debido a la corta distancia de tunelaje de electrones. La mayoría de estas son proteínas redox pequeñas que contienen metales en sus centros activos, cerca de la superficie. Hasta ahora sólo hay un pequeño número de proteínas con transferencia directa de electrones conocidas por tener un cofactor orgánico (FAD o PQQ), debido a que el sitio activo se encuentra enterrado profundamente y la

estructura de la proteína ocasiona impedimentos estéricos para la TDE (Cooney, Svoboda, Lau, Martin, & Minteer, 2008).

En el caso de la glucosa oxidasa la TDE es más difícil de lograrse, debido a que el centro redox de la GOx se encuentra dentro de la estructura de la enzima y lejos de cualquier unión que pueda darse hacia el electrodo. Para alcanzar una transferencia electrónica directa, el uso de la GOx ha sido combinado con diferentes compuestos mediadores de los cuales el ferroceno es el más común. (Toit & Lorenzo, 2014)

En años recientes se ha reportado un progreso importante en la transferencia electrónica directa cuando se usan electrodos nanoestructurados, como con nanotubos de carbono, como aceptores de electrones. Debido a su tamaño y forma, estos electrodos son capaces de intervenir en la enzima y colocarse muy de cerca del centro FAD de la misma. Una TDE exitosa de GOx inmovilizada en CNT ha sido reportada (Toit & Lorenzo, 2014). Asimismo, electrodos de oro nanoporoso (electrodos de oro con una distribución de tamaño de poro limitada a una escala nanométrica) son considerados como una prometedora alternativa para el desarrollo de nuevos dispositivos bioelectroquímicos con la capacidad de implantarse ya que promueven la TDE de manera eficaz. Estos electrodos son no tóxicos y cuentan con propiedades notables como una alta conductividad, gran área superficial, porosidad abierta en tres dimensiones y biocompatibilidad (Toit & Lorenzo, 2014).

2.6 Celdas de combustible microfluídicas

Para la próxima generación de fuentes de energía para dispositivos portátiles se consideran pequeñas celdas de combustible. La gran demanda en energía para dispositivos portátiles ya está comprometida en tamaño, peso y fiabilidad en la tecnología de baterías. Aun así, pequeños sistemas de celdas de combustible permiten una mayor obtención de energía que los sistemas de baterías (Kjeang, Djilali, & Sinton, *Advances in Microfluidic Fuel Cells*, 2009).

Las celdas de combustible microfluídicas son parte de una nueva clasificación de tecnología de celdas de combustible capaces de operar en el marco de los microfluidos. En las celdas de combustible microfluídicas todos sus componentes y funciones como el suministro de

fluidos, sitios de reacción y electrodos, se encuentran confinados a canales microfluídicos. Este tipo de celdas operan típicamente en una configuración de flujo co-laminar sin una barrera física, membrana, que separe al ánodo del cátodo. Un diagrama esquemático de una celda de combustible microfluídica se muestra en la Figura 11 (Kjeang, Djilali, & Sinton, *Advances in Microfluidic Fuel Cells* , 2009).

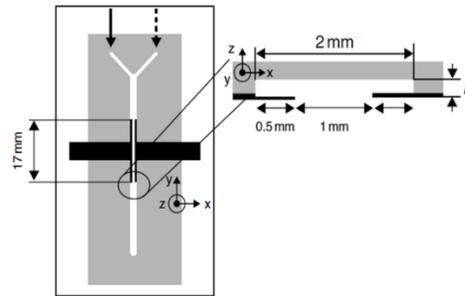


Figura 11. Celda de combustible microfluídica sin membrana.

2.6.1 Contribuciones sobresalientes en una celda de combustible microfluídica

Cátodos tipo air-breathing: Una manera de abordar la limitada solubilidad de oxígeno es integrar una estructura de cátodo poroso tipo air-breathing que permita el transporte de oxígeno gaseoso del aire del ambiente, una fuente de oxígeno que tiene una difusividad cuatro órdenes de magnitud ($0.2 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) y una concentración más alta (10mM) que el oxígeno disuelto en medio acuoso (Kjeang, Djilali, & Sinton, *Advances in Microfluidic Fuel Cells* , 2009).

La arquitectura de celda tipo air-breathing requiere un flujo de electrolito catódico en blanco para proporcionar suficiente separación en la zona de inter-difusión y el cátodo y para facilitar el transporte iónico a los sitios de reacción catódica (Kjeang, Djilali, & Sinton, *Microfluidic fuel cells: A review*, 2009).

Las celdas tipo air-breathing, sin embargo, pueden complicar la ampliación de estos sistemas, y además, dichas celdas requerirían un sistema de recirculación para lograr una alta

utilización de combustible y alta eficiencia en conversión de energía (Kjeang, Djilali, & Sintona, *Microfluidic fuel cells: A review*, 2009).

Oxidante líquidos: El uso de oxidantes alternativos solubles a concentraciones más altas que las del oxígeno disuelto proporciona otra vía para mejorar los resultados de las celdas de combustible microfluídicas que se ven limitados normalmente por la transferencia de masa. Respecto a la selección de combustible y oxidante, hay muchos combustibles líquidos disponibles con una alta densidad de energía específica, incluyendo el borohidruro de sodio, metanol, ácido fórmico y otros hidrocarburos líquidos. Las celdas de combustible convencionales basadas en estos combustibles normalmente se acoplan con oxígeno o con cátodos al aire (Kjeang, Djilali, & Sinton, *Advances in Microfluidic Fuel Cells*, 2009).

Transporte de masa: El transporte desde el bulk hasta los sitios activos tiene lugar principalmente por convección/difusión, el cual se puede mejorar mediante el aumento de las concentraciones de los reactivos y la media de la velocidad de flujo o la reducción de la distancia media transversal de la corriente que una molécula de reactivo tiene que viajar para alcanzar el sitio activo; o escoger especies reaccionantes con una mayor difusividad (Kjeang, Djilali, & Sinton, *Advances in Microfluidic Fuel Cells*, 2009).

Cinética Electroquímica: Las limitaciones electroquímicas en los electrodos de las celdas de combustible son causadas por sobre potenciales de activación y una velocidad de reacción lenta. La elección de electrocatalizadores apropiadas y el aumento del área superficial activa global de los electrodos son métodos clave para reducir dichas limitaciones. La elección del electrolito soporte así como del pH también pueden incluirse en la cinética electroquímica. Además, la cinética pudiera mejorarse con el aumento de la temperatura de operación, que normalmente no es práctica para las celdas de combustible microfluídicas. Sin embargo, utilizando un intercambiador de calor o un sistema de recirculación del electrolito que sea calentado por la reacción dentro de la celda pudiera proporcionar una vía hacia una mayor temperatura de funcionamiento (Kjeang, Djilali, & Sinton, *Advances in Microfluidic Fuel Cells*, 2009).

Resistencia óhmica: La resistencia óhmica combinada de una celda de combustible microfluídica incluye la resistencia de transferencia de carga iónica en el electrolito y la resistencia eléctrica en los electrodos, contactos y cables; todos los cuales deben de ser minimizados para lograr un sistema de celda de combustible eficiente. Las pérdidas óhmicas totales son directamente

proporcionales a la corriente de la celda. Los efectos perjudiciales de la resistencia óhmica se vuelven cada vez más importantes para los dispositivos con alta densidad de potencia. La resistencia de la solución puede ser reducida mediante el empleo de un electrolito soporte fuerte con alta concentración y con la minimización de la distancia media de transferencia de carga entre los electrodos (Kjeang, Djilali, & Sinton, *Advances in Microfluidic Fuel Cells* , 2009).

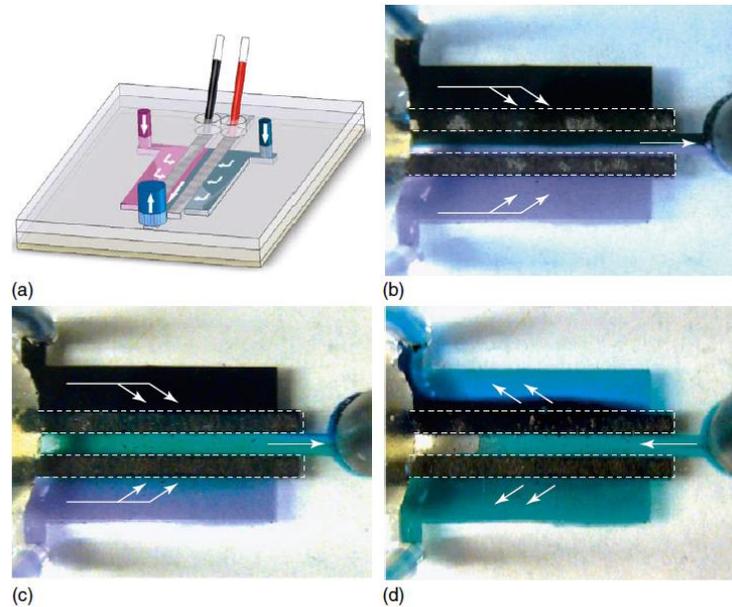


Figura 12. Celda de combustible microfluídica con electrodos porosos y flujo transversal. (a) Esquema de la celda, (b-d) imágenes del flujo transversal a través de los electrodos cuando la celda se encuentra en operación.

En la Figura 12, las dos corrientes de reactivos se reúnen en un canal central ortogonalmente dispuestas en el que se dirigen hacia la salida en un flujo co-laminar. Debido a la disparidad en la resistencia al flujo entre el canal y el electrodo, la distribución de flujo es muy uniforme a través de todo el electrodo poroso. Este aspecto permite utilizar la profundidad total del medio poroso que se encuentra asociado con el área activa y proporciona un mejor transporte de especies desde el núcleo de la solución hacia los sitios activos (Kjeang, Djilali, & Sinton, *Advances in Microfluidic Fuel Cells* , 2009).

2.6.2. Celda de combustible microfluídica vs Celda de combustible nanofluídica

La gran diferencia entre las CC μ F y las CCnF es el tamaño de los electrodos con los cuales son elaboradas. Ambas celdas presentan un régimen laminar que evita el entrecruzamiento entre el catolito y el anolito. Ambas pueden tener el mismo material en el electrodo, carbono por ejemplo, la diferencia se debería a la estructura interna de estos materiales. En un material formado por una microestructura se deberá acuñar entonces el término microfluídica dejando entonces el término nanofluídica para aquellos materiales nanoestructurados, como es el caso de la nanoespuma de carbono (NEC). Es así como se reportan en Nanofluidic Fuel Cell (Lee & Kjeang, 2013).

3. HIPÓTESIS

La inmovilización de la enzima glucosa oxidasa junto con nanotubos de carbono y glutaraldehído (GOx- NTC GA) en dos estructuras de carbono tridimensional incrementará la actividad catalítica como bioánodos en una biocelda de combustible nanofluídica híbrida y en una biocelda de combustible nanofluídica enzimática.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Inmovilizar la enzima glucosa oxidasa (GOx) en dos diferentes estructuras de carbono tridimensional micro/nanoporosas para su aplicación en una biocelda de combustible micro/nanofluídica híbrida y en una biocelda de combustible micro/nanofluídica enzimática.

4.2 Objetivos particulares

- Inmovilizar la enzima GOx por adsorción física/entrecruzamiento combinada con el polímero glutaraldehído (GA) y nanotubos de carbono multipared (NTCMP) en dos diferentes estructuras de carbono tridimensional.
- Determinar la presencia de la enzima GOx en las estructuras de carbono tridimensional por medio de las señales características del cofactor de la enzima.
- Evaluar la actividad electrocatalítica de los bioánodos preparados por medio de la oxidación de la glucosa a través del uso de mediadores en solución.

- Evaluar el bioánodo GOx-GA-NTC en una biocelda de combustible nanofluídica híbrida (BCCnFH) y microfluídica híbrida (BCC μ FH) usando un cátodo inorgánico de carbono tridimensional
- Evaluar el bioánodo GOx-GA-NTC en una biocelda de combustible nanofluídica enzimática usando como biocátodo la enzima lacasa *Trametes versicolor* (Lc-NTC-GA).

5. METODOLOGÍA

Los experimentos que se llevaron a cabo para la elaboración de esta tesis de licenciatura fueron realizados en los laboratorios de investigación de Ingeniería en Nanotecnología en el Centro Académico Multidisciplinario ubicado en el Campus Aeropuerto de la Universidad Autónoma de Querétaro, bajo el cargo de la Dra. Janet Ledesma García. Todos los experimentos realizaron a temperatura ambiente, 25° C aproximadamente.

5.1 Materiales

El material de cristalería de laboratorio como matraces, vasos de precipitados y pipetas son de la marca pyrex. Antes de ser utilizados fueron lavados exhaustivamente con jabón y con abundante agua. Posteriormente enjugados con agua desionizada.

5.2 Reactivos y soluciones

La Glucosa Oxidasa (GOx) de *Aspergillus Niger* (E.C.1.1.3.4) con $\geq 100,000$ unidades/g, el cofactor flavín adenin dinucleótido (FAD), el glutaraldehído (50% en agua V/V) y la β -d-glucosa fueron adquiridos de Sigma Aldrich. El hidróxido de sodio (NaOH) 99% de pureza, el ferrocianuro de potasio $[K_4Fe(CN)_6]$ y el alcohol isopropílico fueron adquiridos de J. T. Baker. El fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) y el fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) son grado reactivo marca Merck.

5.3 Equipo

El equipo utilizado fue el perteneciente al laboratorio de investigación de Ingeniería en Nanotecnología propiedad de la Universidad Autónoma de Querétaro. Potenciostato/galvanostato

BioLogic Science Instruments modelo VMP3, un ultrasonido Branson 1510, horno de secado, balanza Analítica y un potenciómetro (pH-metro)

5.4 Inmovilización de GOx, GOx-GA en un electrodo de nanoespuma de carbono (NEC)

La inmovilización de la enzima GOx dentro de la nanoespuma de carbono (NEC) se llevó a cabo utilizando una solución de enzima 5 mg mL^{-1} en una solución de BF 0.1 M pH 7.1 . Posteriormente, se evaluaron dos formas de inmovilización: a) inmersión, que consistió en utilizar pequeñas placas de NEC de $1 \times 0.5 \text{ cm}$ que fueron cubiertas con cinta adhesiva dejando expuesto únicamente el espesor, $100 \text{ }\mu\text{m}$. Posteriormente fueron sumergidas repetidas veces dentro de la solución de GOx durante 30 min y se dejaron secar a temperatura ambiente y b) sonicado, el cual se llevó cabo dejando la placa de NEC, previamente cubierta con cinta adhesiva, dentro de la solución de GOx y sometiénola durante 15 min a ultrasonido. Después del tiempo mencionado se dejó secar a temperatura ambiente. En el caso de GOx con glutaraldehído (GA) la solución se preparó en una relación de $9:1 \text{ v/v}$ de GOx 5 mg mL^{-1} y GA 1% . Para la inmovilización de GOx-GA dentro de NEC se utilizaron las mismas dos formas de inmovilización con respecto a GOx/NEC.

5.5 GOx-GA-NTC en un electrodo de nanoespuma de carbono (NEC)

La inmovilización de GOx-GA con los NTC (multipared) se llevó a cabo utilizando dos técnicas de dispersión de los nanotubos de carbono:

Dispersión de NTC 1 (M.1): Una placa de NEC fue sumergida en una solución de GOx 5 mg mL^{-1} con EtOH:H₂O en relación $1:1 \text{ V/V}$ y posteriormente se le agregó el GA 1% en relación $9:1 \text{ V/V}$ junto con 1 mg de NTC, la mezcla fue sonicado durante 15 min .

Dispersión NTC 2 (M.2): Para este caso, se preparó una solución de NTC 1 mg mL^{-1} en Iso-OH sonicando durante 3 h. Posteriormente, se tomó una alícuota de los NTC dispersos evaporando el Iso-OH a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se añadió a una solución de GOx-GA en una relación 1:2 V/V.

Para ambos casos de dispersión de NTC fueron usados los métodos de inmovilización a) inmersión y b) sonicado.

5.6 Inmovilización de GOx-GA-NTC en un electrodo de papel de carbono (Toray)

En el caso de la inmovilización de GOx-GA-NTC en electrodos de papel de carbono (Toray) se empleó la metodología seguida en el apartado anterior.

5.7 Caracterización electroquímica

La evaluación electroquímica se realizó en un potenciostato/galvanostato BioLogic Science Instruments modelo VMP3. En todos los estudios electroquímicos fue empleada una celda de vidrio de 10 mL usando un electrodo de calomel saturado (ECS) como referencia, una barra de grafito como contra-electrodo y los electrodos de nanoespuma de carbono o de papel de carbono como electrodos de trabajo.

5.8 Caracterización por Voltametría Cíclica (VC)

La evaluación de GOx en los electrodos de nanoespuma de carbono (NEC) y de papel de carbono (Toray) por los diferentes de métodos de inmovilización se llevó a cabo en un rango de potencial de -0.9 V a 0 V a una velocidad de barrido de 50 mV s^{-1} . Todas las mediciones se llevaron a cabo en BF 0.1 M pH 7.1 a temperatura ambiente en saturación o ausencia de oxígeno según sea el caso.

5.9 Caracterización por Voltametría de Pulso Diferencial (VDP)

La técnica de VPD fue empleada para la evaluación aislada del efecto producido por el cofactor FAD/FADH₂ de la GOx. Fueron evaluadas separadamente las reacciones de oxidación y reducción de dicha molécula. Para la reacción de reducción se aplicó un potencial de inicio de -0.350 V y un potencial final de -1 V (vs ECS) a una velocidad de barrido de 10 mV s⁻¹. Para la reacción de oxidación se aplicó un potencial inicial de -1 V y un potencial final de -0.350 (vs ECS) a una velocidad de barrido de 10 mV s⁻¹

5.10 Evaluación electrocatalítica de GOx-GA-NTC/NEC y GOx-GA-NTC/Toray

Los electrodos de NEC y Toray donde fue inmovilizado el conjunto GOx-GA-NTC fueron sometidos a una evaluación electrocatalítica llevada a cabo por la técnica electroquímica de voltametría cíclica con un barrido de potencial de -0.5 a 0.8 V. Dichos electrodos fueron sumergidos separadamente en una solución de 5 mL de K₄Fe(CN)₆ 0.05 M a la cual se le realizaron adiciones de 10 µL de una solución de β-d-glucosa 0.5 M hasta llegar a la saturación de la solución. Después de cada adición de glucosa y antes de la medición se sometieron a agitación por 1 min para favorecer la difusión de ésta.

5.11 Evaluación de una Biocelda de Combustible Nanofluídica (BCCnF)

5.11.1 Diseño y armado de una Celda de Combustible Nanofluídica (CCnF)

El tipo de celda de combustible nanofluídica utilizado fue el reportado por Ortiz-Ortega y otros en la revista Lab on a Chip en 2014 (Ortiz-Ortega, y otros, 2014). Este diseño de celda característico está elaborado a base de acrílico con un CNC (Control Numerical Computer).

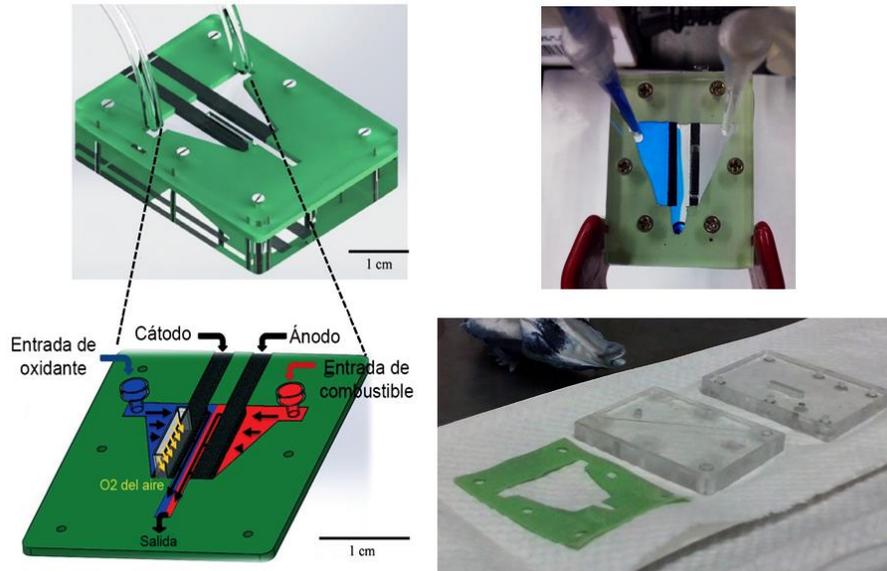


Figura 13. Celda de combustible nanofluídica

La celda de combustible nanofluídica está conformada por dos tapas de acrílico de área 3.75 cm^2 . En su interior el canal de flujo se define gracias a una pieza delgada de sylvastic de $120 \mu\text{m}$ de grosor que tiene forma de Y. Los electrodos son colocados en esta pieza con una separación entre ellos de 2 mm y se sostienen en su lugar con tiras de aluminio que rodean el extremo sobresaliente para así realizar contacto eléctrico. En la tapa superior de acrílico se encuentra una ventana (respiradero) donde deberá de ser colocado el cátodo. En esta misma se encuentran además dos entradas más pequeñas por donde se hacen pasar el combustible y el electrolito. En la tapa inferior se localiza una salida para los residuos de la reacción. En la Figura 13 se muestra el esquema representativo de la CCnF.

5.11.2 Evaluación de una biocelda de combustible nanofluídica híbrida (BCCnFH) tipo air-breathing

La evaluación de la BCCnFH se llevó a cabo utilizando como bioánodo los electrodos elaborados a base de GOx-GA-NTC/NEC y GOx-GA-NTC/Toray y como cátodo electrodos a base de Pt/C (30 %), disperso en Nafión® (5 % H₂O) e Iso-OH, depositándolo con ayuda de un aerógrafo. El anolito fue preparado de una solución de glucosa 10 mM L⁻¹ en BF pH 7.1 saturada con nitrógeno y el catolito fue una solución de KOH (0.3 M) saturada con oxígeno.

5.11.3 Evaluación de una biocelda de combustible nanofluídica enzimática (BCCnFE) tipo air-breathing

La evaluación de la BCCnFE se llevó a cabo utilizando como bioánodo los electrodos elaborados a base de GOx-GA-NTC/NEC y GOx-GA-NTC/Toray y como cátodo electrodos a base de la enzima Lacasa Lc-GA-NTC/NEC y Lc-GA-NTC/Toray. El anolito fue preparado de una solución de glucosa 10 mM L⁻¹ en BF pH 7.1 saturada con nitrógeno y el catolito fue una solución amortiguadora de acetatos (BA) saturada con oxígeno.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la primera sección de este capítulo serán presentados los resultados obtenidos por una caracterización electroquímica de la inmovilización de la glucosa oxidasa (GOx) en una nanoespuma de carbono (NEC) mediante dos métodos, inmersión y sonicado. Se presentarán los tipos de inmovilización llevados a cabo con GOx/NEC, con glutaraldehído (GA), GOx-GA/NEC, nanotubos de carbono multipared (NTC), GOx-GA-NTC/NEC y la comparación entre los mismo.

Se continuará con los resultados de la inmovilización de GOx-GA-NTC en papel de carbono (Toray). Posteriormente serán presentadas las evaluaciones bioelectrocatalíticas de cada electrodo. Finalmente, serán incluidos los resultados de los diferentes electrodos preparados en una celda de combustible nanofluídica híbrida y en una biocelda de combustible nanofluídica enzimática.

6.1 Inmovilización de GOx y GOx-GA en un electrodo de nanoespuma de carbono

6.1.1 GOx/NEC

La evaluación de la GOx en el electrodo de NEC se realizó por voltametría cíclica (VC) con un rango de potencial de -0.9 a 0 V. en una celda electroquímica de tres electrodos con una solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.1 previamente burbujeada con nitrógeno. En la Figura 14 se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos en un electrodo con y sin la presencia de GOx inmovilizada.

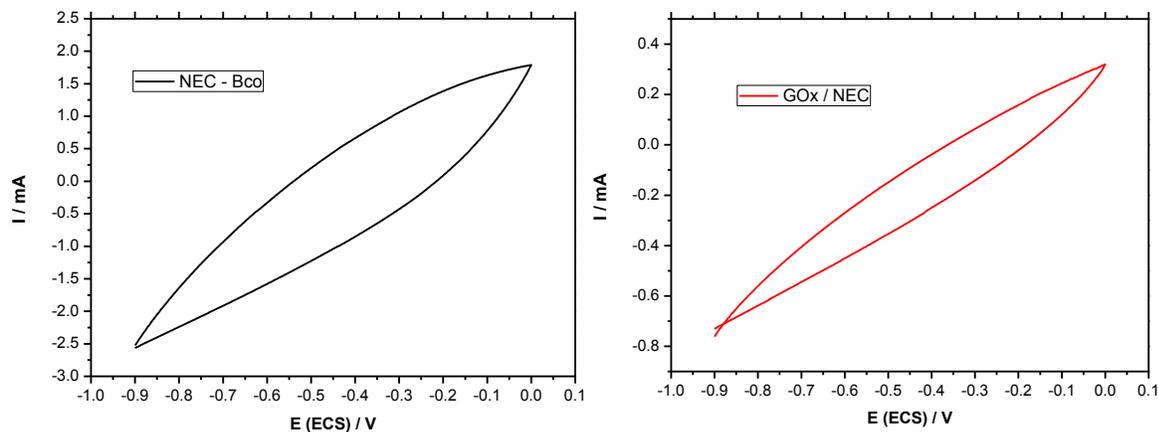


Figura 14. Voltamperogramas cíclicos de un electrodo de NEC sin modificar y de GOx/NEC.

En la Figura 14 (izquierda) se observa el perfil característico de la NEC en BF mostrando un voltamperograma resistivo y una alta corriente capacitiva. Comparándola con el electrodo con GOx inmovilizada se observó la misma tendencia. La evaluación directa de la enzima dentro de la estructura tridimensional de carbono (NEC) es evaluada a través de la presencia de la molécula redox flavín adenín dinucleótido (FAD). El FAD se muestra en su forma oxidada FAD y su forma reducida FADH₂ en los potenciales -0.4 a -0.5 V y -0.5 a -0.6V (vs ECS) respectivamente (Ivnitski, Branch, Atanassov, & Apblett, 2006).

Las señales del par FAD/FADH₂ no se lograron observar debido a la gran área superficial de la NEC y la cantidad de poros dentro de la estructura. Se ha reportado que las estructuras de carbono con estas características tienden a generar una alta capacitancia lo cual impide visualizar señales débiles en la superficie del electrodo (Xu, y otros, 2009) (Chen, y otros, 2012).

La VC no fue lo suficiente sensible para determinar las señales del par FAD/FADH₂. Debido a ello, se optó por utilizar la técnica de voltametría de pulso diferencial (VPD) que se fundamenta en utilizar un tren de pulsos para captar la corriente producida de manera más perceptiva así como reducir la contribución no farádica y efectos de caída óhmica (Molina, y otros, 2009).

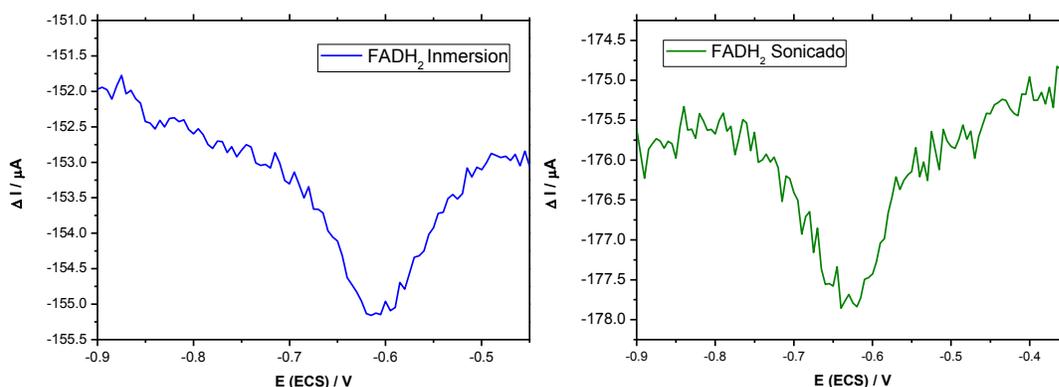


Figura 15. Voltamperogramas de pulso diferencial donde se muestra el pico de reducción $FADH_2$ del cofactor de la GOx dado para los métodos de inmersión y sonicado.

En la Figura 15 **Figura 15.** Voltamperogramas de pulso diferencial donde se muestra el pico de reducción $FADH_2$ del cofactor de la GOx dado para los métodos de inmersión y sonicado. se muestran los DPV comparativos, para los métodos de inmovilización de GOx por inmersión y sonicado, observando el pico de reducción del cofactor $FADH_2$ a un potencial de -0.614 V (vs ECS) y una corriente de pico de $2 \mu A$ para el método de inmersión y de -0.639 V (vs ECS) con $2.25 \mu A$ para el método de sonicado. Aunque el VPD no se realizó para ver el pico de oxidación (FAD), la información obtenida por la señal de $FADH_2$ indica ciertamente la presencia de GOx en ambos electrodos de NEC.

En la Figura 16 se muestra los VPD comparativos de ambos métodos de inmovilización (inmersión y sonicado) para GOx dentro de la NEC por medio del pico de reducción. Para llevarse a cabo, se tuvo que realizar un tratamiento a ambas gráficas para tener la misma línea base ya que la escala en la intensidad de corriente es diferente en este tipo de técnica. Se observa que el método de inmersión tiene ligeramente mayor intensidad de corriente que el método de sonicado. Cabe destacar que fue posible la identificación de la enzima sin otro tipo de intermediarios, lo cual indica que la estructura NEC es eficiente para la inmovilización de enzimas teniendo una buena interacción con el sitio activo de la enzima.

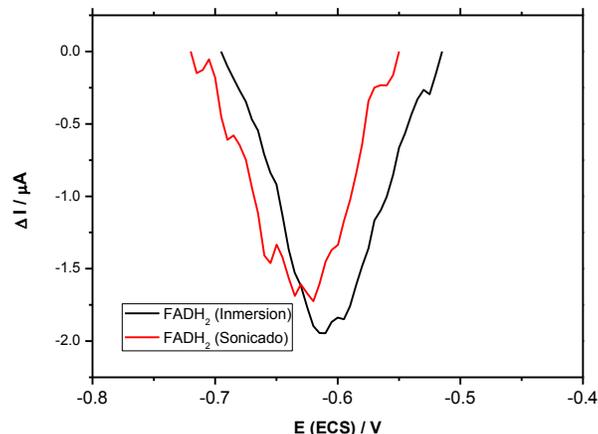


Figura 16. Comparación pico de reducción FADH₂. Método de inmersión vs método de sonicado GOx/NEC.

6.1.2 GOx-GA/NEC

Posteriormente, se prosiguió en evaluar la inmovilización de la GOx por los métodos de inmersión y sonicado en la nanoespuma de carbono agregando el polímero entrecruzante glutaraldehído al 1% (GA). Este polímero ha sido usado ampliamente en las técnicas de inmovilización enzimática ya que incrementa la estabilidad de la enzima reteniéndola en una red que éste mismo forma. Así, la enzima además de colocarse en la estructura tridimensional de la

NEC y mantenerse ahí por diferentes fuerzas electrostáticas, el GA ayudará a retenerla y mejorar su estabilidad, este tipo de técnica se conoce como entrecruzamiento o cross-linking (Arroyo, 1998) (Cooney, Svoboda, Lau, Martin, & Minteer, 2008) (Tamaki & Yamaguchi, 2006).

En la Figura 17 se muestran los VPD de la GOx-GA/NEC por los métodos de inmersión y sonicado encontrando en ambos el par redox FAD/FADH₂. Para el método de inmersión las señales del cofactor se localizan en -0.735 V y -0.63 V, FAD y FADH₂ respectivamente con una separación de pico (ΔE_p) de 105 mV, considerablemente muy separados. Mientras que para el método de sonicado la señal de FAD se localizó en -0.765 V y la señal FADH₂ en -0.8 V a una ΔE_p de 165 mV muy por encima que el método anterior y por lo reportado por otros autores. Cabe

destacar que la señal correspondiente al FAD se encuentra desplazada hacia potenciales anódicos para ambos métodos.

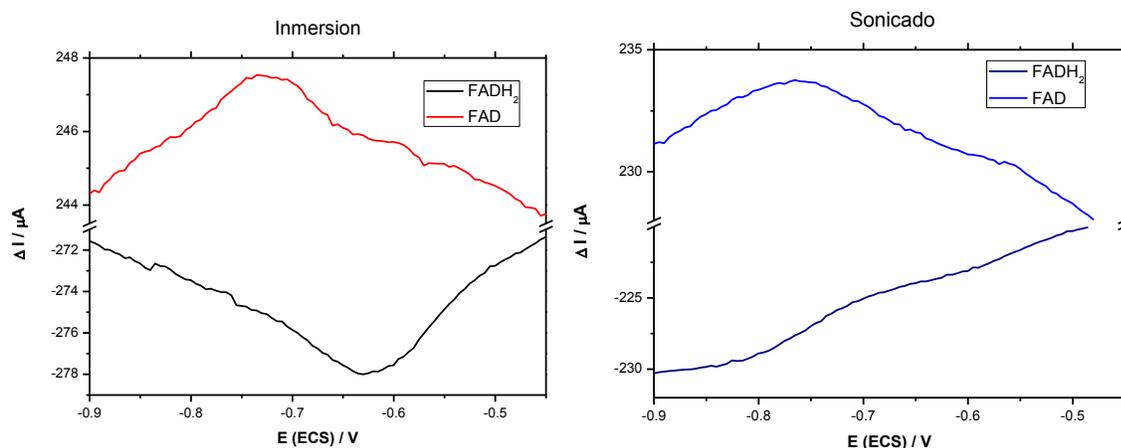


Figura 17. Voltamperogramas de pulso diferencial de FAD/FADH₂ para los métodos de inmersión y sonicado de GOx-GA/NEC.

6.1.3 FAD-GA/NEC

Para corroborar que las señales encontradas en los VPD pertenecen al cofactor de la enzima GOx, FAD fue inmovilizado directamente en la NEC con GA al 1% por el método de inmersión. En la Figura 18 se muestran las señales características del FAD encontrando el pico de oxidación en un potencial de -0.495 V mientras que su forma reducida aparece en -0.575 V (vs ECS) y un ΔE_p de 80 mV menor a lo observado con GOx y GOx-GA, aun así la separación es considerable amplia para suponer que la transferencia de electrones se efectúa rápida y eficiente. La intensidad de corriente alrededor de 20 μA para los picos anódicos y catódicos es alta con respecto a GOx y GOx-GA ya que el FAD es una molécula pequeña y la señal redox solo se presenta de forma electroquímica, mientras que la estructura completa de la enzima limita la transferencia directa de electrones desde el sitio activo de la enzima con la superficie del electrodo. En la Figura 19 se presenta la reacción electroquímica reversible que ocurre con el par FAD/FADH₂.

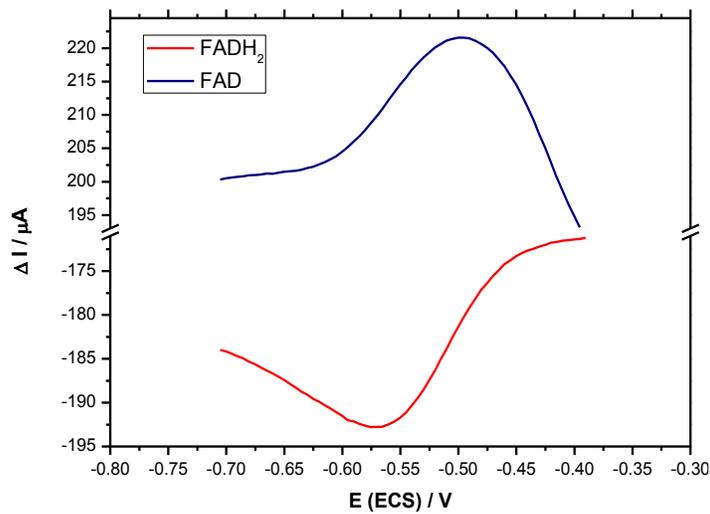


Figura 18. FAD-GA/NEC mostrando los picos características de su forma reducida (FADH₂) y oxidada (FAD).

De esta manera se logró corroborar que las señales encontradas en los VPD para las muestras GOx/NEC y GOx-GA/NEC pertenecen al par redox FAD/FADH₂ y pudiera sugerir que la enzima se encuentra dentro de la nanoespuma de carbono, ya que las superficies, superior e inferior, de la NEC fueron aisladas dejando expuestos sólo sus lados laterales para que así pudiera difundir la proteína. Esto es posible ya que la enzima posee un tamaño de 6 nm × 5.2 nm × 7.8 nm (Khan, Noronha, & Bandyopadhyaya, 2014), menor respecto al tamaño promedio de los poros de la NEC que es de 90 nm.



Figura 19. Reacción electroquímica del FAD

6.2 Inmovilización de GOx-GA-NTC en un electrodo de nanoespuma de carbono

6.2.1 Nanotubos de carbono y la transferencia directa de electrones

Para que la transferencia directa de electrones (TDE) pueda llevarse a cabo eficientemente entre la enzima GOx y los electrodos de nanoespuma de carbono debe de existir una interacción estrecha y continua entre ambos. Debido a la conformación estructural de la GOx, donde el sitio activo se encuentra enterrado dentro de ésta, es difícil obtener la interacción deseada entre esta y el electrodo principalmente debido a la distancia que se tiene que vencer, 13 Å, para que el electrón pueda ser transferido todo esto traduciéndose en una TDE ineficiente (Wang, y otros, 2009).

Para poder llevar a cabo una transferencia directa de electrones fácil y eficiente la GOx fue inmovilizada con un nuevo elemento. Al conjunto GOx-GA/NEC fueron agregados nanotubos de carbono de multipared (NTC) para obtener así GOx-GA-NTC/NEC. Debido a las propiedades intrínsecas de estas nanoestructuras, como su alta conductividad electrónica y sus buenas propiedades mecánicas, logran incrementar la corriente producida en el electrodo (Rao & Govindaraj, 2011).

Los nanotubos de carbono actúan como “cables moleculares” que conectan al sitio activo de la enzima con la superficie del electrodo (Jose, Marx, Murata, Koepsel, & Russell, 2012). Dado que el tamaño de la GOx se encuentra entre 5-10 nm en diámetro puede acoplarse a los nanotubos de carbono con tamaños de diámetro de 10-25 nm (Strack & Johnson, 2014). Ha sido propuesto que la GOx puede sufrir cierto arreglo conformacional durante la transferencia electrónica en la presencia de los NTC. De esta manera los NTC pueden acoplarse directamente en el sitio activo de la enzima y llevar a cabo una eficiente transferencia directa electrónica (Zhao, Sun, Song, & Yang, 2010).

6.2.2. GOx-GA-NTC/NEC

Conociendo las características principales de los NTC y de cómo estos pueden mejorar la transferencia electrónica desde el sitio activo de enzima hacia la superficie del electrodo, mediante TDE y no por TME, se presentan los resultados sobre la inmovilización del conjunto GOx-GA-NTC/NEC por ambos métodos de inmovilización así como por ambos métodos de dispersión de los NTC.

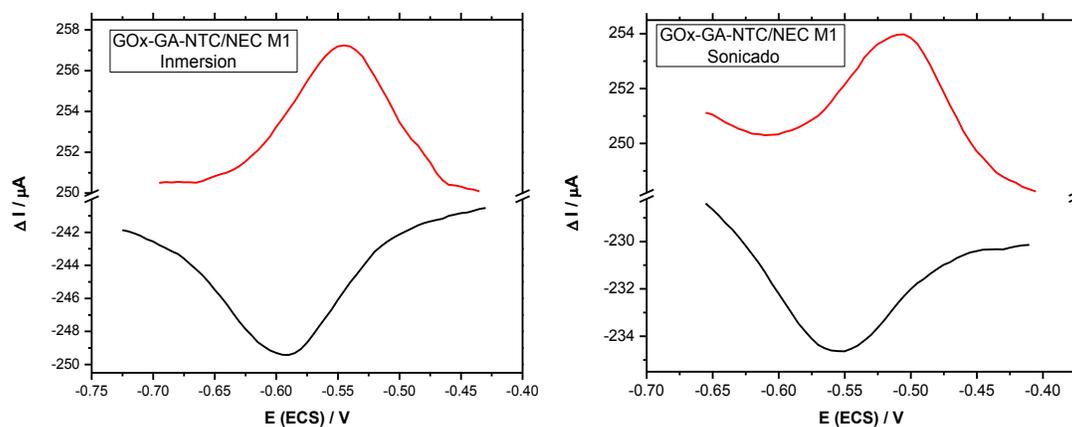


Figura 20. VDP GOx-GA-NTC/NEC inmovilizado por inmersión y sonicado usando la dispersión de NTC No.1

En la Figura 20 se muestran los VPD del conjunto inmovilizado GOx-GA-NTC/NEC usando la dispersión No.1 e inmovilizando por inmersión y sonicado. En ambos casos se detecta la presencia de la enzima debido a la señal del par redox FAD/FADH₂. Para el método de inmersión las señales se localizan en -0.59 V y -0.545 V, para los picos catódico y anódico respectivamente, con un ΔE_p de 45 mV. Mientras que para el método de sonicado las señales se localizaron en -0.55 V y -0.505 V, para la reducción y oxidación de FAD respectivamente, con un ΔE_p de 45 mV, al igual que el método anterior. Con ambos métodos de inmovilización la señal del cofactor se logró observar claramente con una buena separación de pico lo cual habla de una eficiente transferencia electrónica así como de la espontaneidad de las reacciones que se lleva a cabo. Asimismo se

encontró una intensidad de pico catódico (I_{Pc}) de 7.58 y 4.52 μA para los métodos de inmersión y sonicado respectivamente. Se nota que la señal con mayor intensidad de corriente corresponde entonces al método de inmersión.

La inmovilización de GO_x-GA-NTC/NEC se continuó con el método de dispersión de NTC No. 2. La Figura 21 ilustra claramente estos resultados. Se encontró los picos representativos de la GO_x en -0.63 V y -0.55, E_{Pc} y E_{Pa} , para el método de inmersión y -0.6 V y -0.58 V, E_{Pc} y E_{Pa} , para el método de sonicado. El ΔE_p fue de 75 mV y 20 mV respectivamente. Con este método de dispersión de NTC la transferencia electrónica fue mejorada con el método de inmovilización de sonicado comparando con el método de dispersión anterior donde la diferencia no es considerable. La I_{Pc} fue de 4.15 y 3.97 μA , observando que para ambos métodos de dispersión de NTC la intensidad de corriente se ve disminuida cuando el conjunto enzimático es inmovilizado por sonicado.

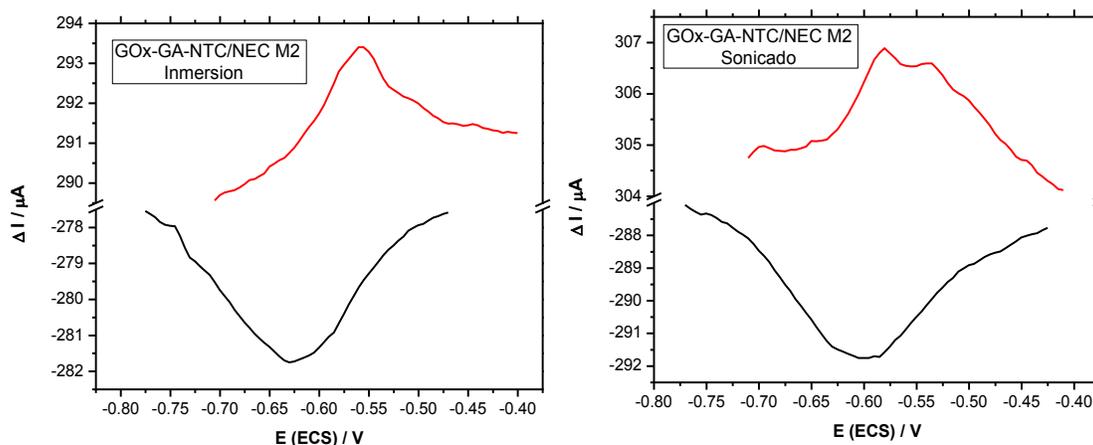


Figura 21. VDP GO_x-GA-NTC/NEC inmovilizado por inmersión y sonicado usando la dispersión de NTC No.2.

En la Tabla 1 **Tabla 1.** Comparación de ΔE_p , I_{Pc} y E_p° de los métodos de dispersión de NTC utilizados en la inmovilización de GO_x-GA-NTC/NEC por inmersión y sonicado. se observa una comparación directa de los métodos de dispersión de NTC empleados en los dos tipos de inmovilización, inmersión y sonicado, de GO_x-GA-NTC/NEC. Se comparó la separación de pico

ΔE_P , la intensidad de pico catódico I_{Pc} y el potencial promedio E°_P . En la Tabla 1 se indica que la separación de pico no es diferente para el caso del método de dispersión M1 comparada con el M2 donde se ve disminuida para el método de sonicado. Se observa que el método en el cual se logra obtener más corriente es con el método de inmersión, asimismo la dispersión de NTC que favorece este incremento es la M1.

Tabla 1. Comparación de ΔE_P , I_{Pc} y E°_P de los métodos de dispersión de NTC utilizados en la inmovilización de GOx-GA-NTC/NEC por inmersión y sonicado.

Método de Dispersión	Método de Inmovilización	ΔE_P (mV)	I_{Pc} (μA)	E°_P (V)
M1	Inmersión	45	7.5868	-0.5675
	Sonicado	45	4.5209	-0.5277
M2	Inmersión	75	4.1501	-0.5877
	Sonicado	20	3.9753	-0.5903

6.3 GOx/NEC vs GOx-GA/NEC vs GOx-GA-NTC/NEC

Finalmente, en esta primera parte de resultados sobre la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa en una nanoespuma de carbono (NEC) junto con el agente entrecruzante glutaraldehído (GA) y nanotubos de carbono (NTC), se presenta una gráfica (Figura 22) **Figura 22.** Comparación inmovilización por inmersión de GOx/NEC, GOx-GA/NEC y GOx-GA-NTC/NEC comparativa donde se observa claramente el aumento en la intensidad de corriente, en μA , de cada inmovilización de acuerdo a la modificación realizada.

Primeramente se inmovilizó GOx sólo por el método de atrapamiento/adsorción física en la NEC. En dicha inmovilización fue encontrada la señal del cofactor FAD indicando la presencia de la enzima en el electrodo de NEC. La transferencia electrónica con este método tiene varios

problemas principalmente a la gran distribución de tamaño de poro que contiene la NEC. La enzima pudo haberse colocado de manera aleatoria en diversos sitios dentro de la NEC, pero al no haber una conformación adecuada de la enzima para con los poros de la estructura de carbono la transferencia de electrones se veía afectada observándose directamente en la corriente obtenida por este electrodo.

Al incorporar el glutaraldehído como un agente entrecruzante la inmovilización paso a combinar el método de atrapamiento/adsorción física con el método de cross-linking. Esto quiere decir que ahora la enzima podrá ser retenida dentro de la estructura de carbono tridimensional, no sólo por simples interacciones electrostáticas sino también por una red polimérica que le permitirá fijarse de manera más adecuada. El GA logrará mantener un mayor número de enzimas inmovilizadas en un solo sitio de la NEC y no sólo pocas de manera aleatoria. Esto contribuirá a que un mayor número de enzimas puedan transferir sus electrones hacia la superficie del electrodo. No obstante queda en duda el tipo de conformación adoptada por estas enzimas, ya que al aglomerarse entre ellas por acción del GA pudiera suceder que entre ellas mismas se llegasen a bloquear sus sitios activos inhabilitando completamente la transferencia electrónica. La técnica de VPD hubiera podido percibir este comportamiento inmediatamente, favorablemente no fue el caso y la respuesta dada al incluir el GA fue mejor comparado con tener sólo GOx/NEC.

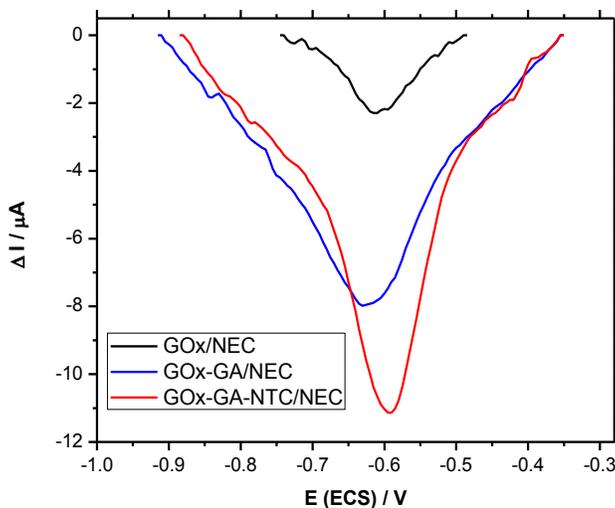


Figura 22. Comparación inmovilización por inmersión de GOx/NEC, GOx-GA/NEC y GOx-GA-NTC/NEC

En definitiva, al hacer uso de un cableado molecular con los nanotubos de carbono en la inmovilización de GOx-GA-NTC/NEC es posible conseguir una transferencia directa de electrones. Como se mencionó anteriormente esto es que los electrones serán transferidos por medio de los NTC desde el sitio activo de la enzima hacia la superficie del electrodo.

Todo lo anterior se ve reflejado en la Figura 22, una mejor transferencia directa de electrones es conseguida gracias al agente entrecruzante GA y a los nanotubos de carbono de multipared.

Finalmente, se calculó la cantidad de enzima electroquímicamente adsorbida en la dentro de la estructura 3-D utilizando el modelo de Brown y Anson para especies redox electroquímicamente activas, utilizando la Ecuación 2 en donde I_p máxima es el pico máximo de corriente del método, τ ancho de pico y ΔE amplitud de pulso (Jensen, y otros, 2012).

$$\Gamma = \frac{4 R T (I_p)_{\max} \tau e}{\Delta E n^2 F^2}$$

Ecuación 2. Modelo de Brown y Anson para especies redox electroquímicamente activas.

Aplicando la formula se calculó para GOx una Γ de $1.643 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-2}$, mientras que al utilizar la enzima junto con el GA se aumentó la cantidad de GOx inmovilizada de $4.695 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-2}$ debido a la función del GA de fijar la enzima a la estructura de carbono y finalmente, al incorporar los NTCMP aumentó un 67 % ($7.852 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-2}$) con respecto a GOx-GA, ya que además de fijarse la enzima a la estructura de carbón 3-D también se fija con los NTC, como se ha reportado por otros autores, viéndose beneficiada la inmovilización por ambos parámetros (Jensen, y otros, 2012).

6.4 Inmovilización de GOx-GA-NTC en un electrodo de papel de carbono (Toray)

Las principales diferencias entre las estructuras de carbono tridimensional, nanoespuma y papel carbono, radican en la distribución, interconectividad y el tamaño de sus poros lo que se traduce en una diferente área superficial. Difieren también en su resistividad y capacitancia. La nanoespuma de carbono (NEC) al tener un menor tamaño de poro, en el orden de los nanómetros, logra aumentar su área superficial, incrementando su capacitancia. Contrariamente al Toray su área superficial es menor y sus poros se encuentran en el orden de las micras. Esto se puede traducir en una mayor cantidad de enzima retenida dentro de su estructura, pero no necesariamente. También es importante de considerar que al tener mayor espacio abierto dentro de la microestructura de carbono, la enzima puede perder superficies de contacto con el electrodo, aun con la adición del cableado molecular, debido a la gran diferencia en tamaño del poro respecto al de la enzima. Si se el contacto entre el sitio activo de la enzima y la superficie del electrodo no es adecuado la transferencia directa de electrones se verá perjudicada, traduciéndose directamente en una pérdida en la corriente entregada por éste.

En la pasada sección se ilustra que no hay una diferencia tan significativa en los métodos empleados, tanto de inmovilización, inmersión vs sonicado, como los usados para dispersar los NTC. Ambos métodos de inmovilización y ambos métodos de dispersión llevan a una atractiva inmovilización de la GOx dentro de las estructuras de carbono tridimensional. Sin embargo, las mayores diferencias que se puedan encontrar entre estos serán principalmente debidas a la poca homogeneidad tanto de la NEC como del Toray. Aunque conservan una distribución y un tamaño promedio de poro, pueden presentarse diferentes tipos de interacciones de la enzima hacia la superficie del electrodo en cada inmovilización. Es por ello que para la inmovilización de GOx-GA-NTC en papel Toray se optó por usar el método de dispersión M2 de NTC y el método de inmersión para la inmovilización.

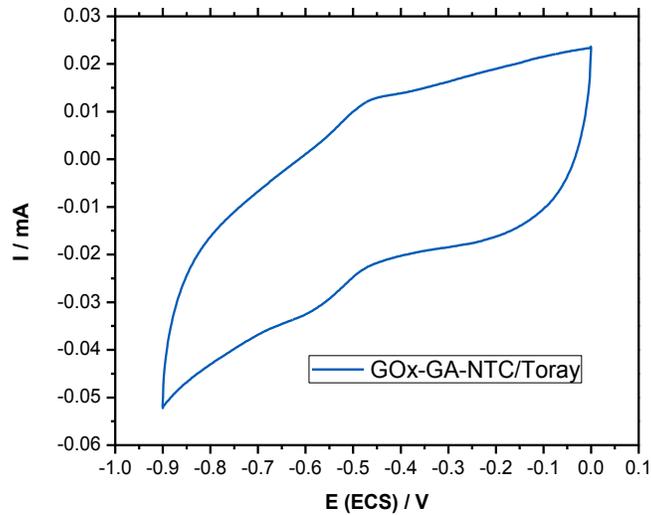


Figura 23. VC de GOx-GA-NTC/Toray inmovilizado por inmersión y usando la dispersión de NTC No.2.

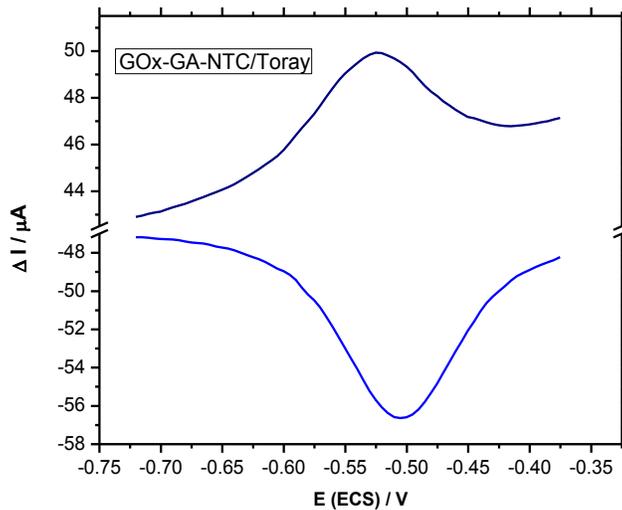


Figura 24. VPD de GOx-GA-NTC/Toray por inmersión y usando la dispersión de NTC No.2.

Debido a que la capacitancia del papel Toray se ve disminuida fue posible observar directamente en una VC la presencia de la GOx inmovilizada. En Figura 23 **Figura 23.** VC de GOx-GA-NTC/Toray se presenta dicha VC. Se logra observar los picos características en -0.58 V y -0.4614, E_{Pc} y E_{Pa} , respectivamente, con un ΔE_P de 119.4 mV y un $E^{\circ}_{P} = -0.5211$ V.

Asimismo, el conjunto GOx-GA-NTC/Toray fue evaluado por VDP. En la Figura 24 se logran apreciar las señales debidas a la GOx. En un potencial de -0505 V el E_{Pc} , mientras que el E_{Pc} se presenta en -0.525 V. Se observa que las señales se encuentran ligeramente desplazadas hacia potenciales más anódicos. La separación de pico encontrada en estas señales es tan solo de 20 mV y un E°_p de -0.5153 V. Por otro lado, se calculó la Γ siendo de $3.411 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-2}$ el cuál es un 52 % más con respecto a GOx, pero un 27 % y 56 % menor que GOx-GA y GOx-GA/NTCMP respectivamente, debido posiblemente a que el Toray presenta un mayor tamaño de poro, $\sim 100 \mu\text{M}$, por lo que la enzima puede lixiviarse más fácilmente.

En ambas estructuras de carbono tridimensional, NEC y Toray, es posible apreciar la GOx inmovilizada junto con el GA y los NTC. La obtención de una respuesta en forma de corriente indica que evidentemente se está llevando a cabo una transferencia electrónica entre la enzima y los electrodos de carbono.

6.5 Evaluación bioelectrocatalítica de la enzima GOx

6.5.1 Evaluación bioelectrocatalítica de la enzima GOx en un electrodo de nanoespuma de carbono (NEC)

En esta sección serán presentados los resultados de la evaluación bioelectrocatalítica realizada en el electrodo de GOx-GA-NTC/NEC con el fin de observar el comportamiento la actividad de la enzima glucosa oxidasa en presencia de glucosa. La GOx ya se encuentra inmovilizada dentro de la estructura tridimensional de la NEC, como se corroboró anteriormente, aun así esto no demuestra que la enzima se encuentre electrocatalíticamente activa, es decir que pueda llevar a cabo la reacción de oxidación de la glucosa.

En este contexto la molécula sonda ferrocianuro de potasio (FCN) fue empleada como mediador en solución en las pruebas de bioelectroactividad. Esto, debido a su señal en VC donde se logra apreciar significativamente su estado oxidado y su estado reducido ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$). En la Figura 25 A) se muestra la actividad bioelectrocatalítica de la GOx por medio del FCN al adicionar concentraciones crecientes de β -d-glucosa. El incremento en la corriente catódica y anódica son

indicio de que se está llevando a cabo una mayor transferencia de electrones relacionada directamente con la concentración de glucosa añadida en la solución (Xue, y otros, 2010).

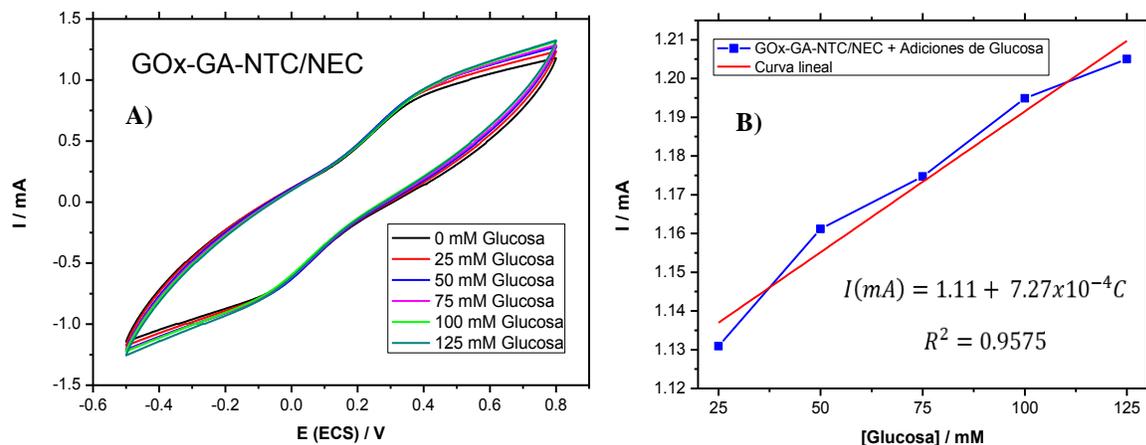


Figura 25. A) VC del electrodo de GOx-GA-NTC/NEC en BF 0.1 M pH 7.1 con 50 mM de FCN y glucosa a varias concentraciones con velocidad de barrido de 50 mV/s. B) Corriente (mA) en función de la concentración de glucosa adicionada (mM).

Mientras que la glucosa es oxidada a gluconolactona el GOx(FAD) es reducido a GOx(FADH₂). La GOx reducida volverá a su estado oxidado al reducirse el mediador F^{III}CN a F^{II}CN, y éste será oxidado nuevamente en la superficie del electrodo. Debido a la transferencia electrónica que se está llevando a cabo la señal en VC del FCN, tanto para el pico catódico como el pico anódico, se ve incrementada (You, y otros, 2009). En la Figura 26 se ilustra claramente cómo se llevan a cabo las reacciones descritas anteriormente.

En la Figura 25 **Figura 25.** A) VC del electrodo de GOx-GA-NTC/NEC en BF 0.1 M pH 7.1 con 50 mM de FCN y glucosa a varias concentraciones con velocidad de barrido de 50 mV/s. B) Corriente (mA) en función de la concentración de glucosa adicionada (mM). B) se muestra la gráfica de corriente en función de la concentración de glucosa. Como se indicó anteriormente, a mayor concentración de glucosa en la solución hay una mayor corriente obtenida. En ésta se logró obtener la regresión lineal donde la pendiente obtenida fue de 0.7276 $\mu\text{A mM}^{-1}$ que indica que tan sensible es el electrodo de GOx-GA-NTC/NEC hacia la glucosa (Wu, y otros, 2007). La

sensibilidad obtenida es muy poca comparándola con algunos biosensores de glucosa basados en electrodos de carbono con NTC y en electrodos adicionados con nanopartículas de diferentes metales. Dichos biosensores alcanzan sensibilidades de $106.57 \text{ mA mM}^{-1}$ o $113.13 \text{ 57 mA mM}^{-1}$ por mencionar algunos ejemplos. El funcionamiento de este tipo de electrodos como biosensores es una perspectiva de lo que se pudiera realizar si se enfocase específicamente en esta área, (Gao, Guo, Zhang, Qia, & Zhang, 2011), (Chu, y otros, 2012) y (Liu, y otros, 2010). No obstante, con ello se puede corroborar que la enzima se encuentra de forma activa.

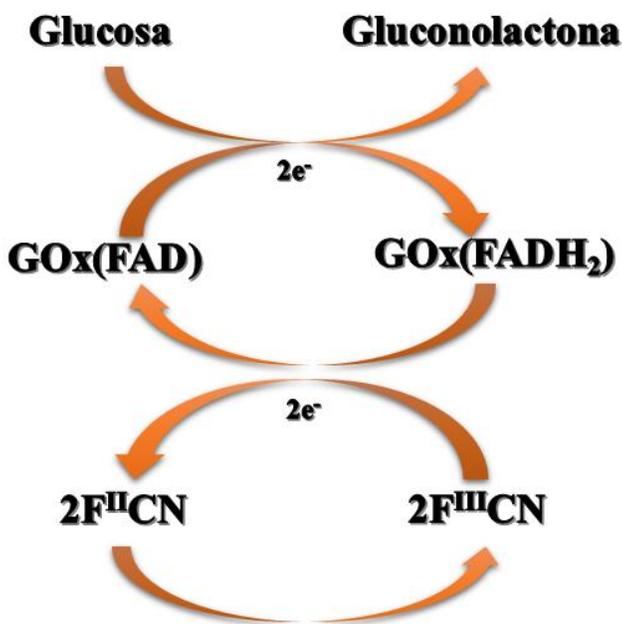


Figura 26. Reacciones para la transferencia electrónica desde la oxidación de la glucosa hacia el mediador FCN

6.5.2 Evaluación bioelectrocatalítica de la enzima GOx en un electrodo de papel de carbono (Toray)

En el caso del electrodo basado en GOx-GA-NTC/Toray la corriente generada por cada incremento en la concentración de glucosa fue mayor. Asimismo las adiciones de glucosa

realizadas a la solución fueron de una menor concentración, de 1 mM cada una. Como se observa en la Figura 27 A) hasta que se agregó una concentración de 6 mM de glucosa el electrodo fue capaz de llevar a cabo la reacción de oxidación y producir una mayor corriente. Con adiciones posteriores de 1 mM el incremento en la corriente catódica fue bastante notorio, superando al electrodo basado en nanoespuma de carbono.

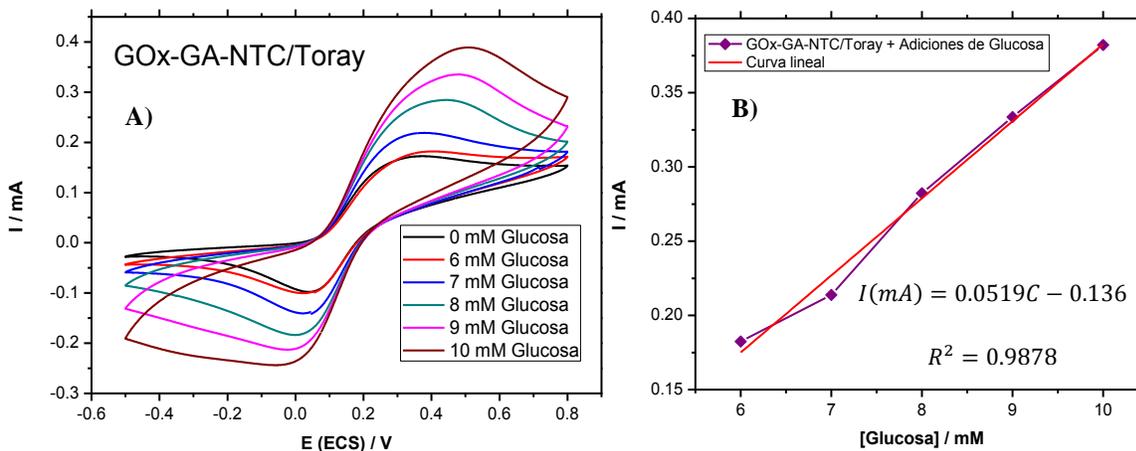


Figura 27. A) VC del electrodo de GOx-GA-NTC/Toray en BF 0.1 M pH 7.1 con 50 mM de FCN y glucosa a varias concentraciones con velocidad de barrido de 50 mV/s. B) Corriente (mA) en función de la concentración de glucosa adicionada (mM).

En la Figura 27 B) se muestra la gráfica de corriente en función de la concentración de glucosa. Llevando a cabo la regresión lineal la pendiente obtenida fue de 0.0519 mA mM⁻¹, que supera con un orden de magnitud al electrodo de NEC. El coeficiente de correlación obtenido en este caso fue de 0.9878, acercándose más a la linealidad ($R^2=1$) e indicando una sensibilidad mayor que demuestra que el electrodo de Toray puede resultar en un mejor biosensor comparado con el de NEC, si se llegara a usar como tal (Gao, Guo, Zhang, Qia, & Zhang, 2011).

6.5.3 Bioelectroactividad GOx-GA-NTC/NEC vs GOx-GA-NTC/Toray

En la Tabla 2 se resumen los valores de la sensibilidad para cada electrodo así como el coeficiente de correlación. Dichos valores indican que tan eficiente es GOx en cada electrodo para oxidar la glucosa y proporciona una idea de cuál material facilita una mayor corriente cuando se lleva a cabo la reacción, pudiendo ser un factor indicativo de un posible resultado en celda completa.

Como se logra observar el valor de sensibilidad para la NEC es bastante bajo comparado con el que se obtiene con el Toray. De la misma manera, la concentración de glucosa para su detección fue mayor para la NEC en comparación con el Toray.

Tabla 2. Comparación sensibilidad y coeficiente de correlación electrodos de GOx-GA-NTC/NEC vs GOx-GA-NTC/Toray

Electrodo	Sensibilidad	R²
GOx-GA-NTC/NEC	0.7276 $\mu\text{A mM}^{-1}$	0.9575
GOx-GA-NTC/Toray	51.9 $\mu\text{A mM}^{-1}$	0.9878

El notable cambio en la corriente debido al aumento en la concentración de glucosa para el electrodo de Toray se debe principalmente al efecto de la GOx conectada con los NTCMP dentro de los poros de la estructura, con lo cual puede albergar una mayor cantidad de enzima en su superficie así como mejorar la difusión de la glucosa hacia su interior para que su encuentro con la GOx sea favorable y la reacción de oxidación se lleve a cabo óptimamente.

Para el caso de la NEC la poca sensibilidad obtenida y el escaso incremento de corriente con el incremento de concentración de glucosa se presume se deben principalmente a problemas de difusión en el sistema, es decir, la glucosa en solución no logra difundir adecuadamente hasta la superficie e interior del electrodo (GOx-GA-NTC/NEC) provocando una deficiencia en la reacción de oxidación efectuada por la GOx.

6.6 Mecanismo de reacción de la reacción de oxidación de glucosa por GOx

Para entender el mecanismo de oxidación de la glucosa por la GOx se deben de considerar ciertos aspectos. Uno de ellos es el tamaño de la enzima que es de 2.3 Å, su estructura terciaria donde la coenzima FAD es localizada en una cavidad dentro de la apoenzima, parte proteica de la enzima, y la evidencia de que el centro de la reacción catalítica es el nitrógeno en la posición 5 del anillo isoaloxazina del FAD, Figura 28, que se encuentra más expuesto al área hidrofílica y es potencial aceptor de protones y electrones (Ghisla & Massey, 1986).

Existen tres aminoácidos próximos al centro catalítico, Glu412, His516 y His559. Mientras que His559 está unido fuertemente por puentes hidrogeno con el Ne y Oε del Glu412 que se encuentra más en el interior de la enzima, la His516 es más flexible y expuesta al contacto con el disolvente (Roth & Klinman, 2002). En presencia de la molécula de agua, el sitio activo contiene H₂O, w110, que forma enlaces a partir de los hidrógenos bifurcados con los 2 residuos de histidina.

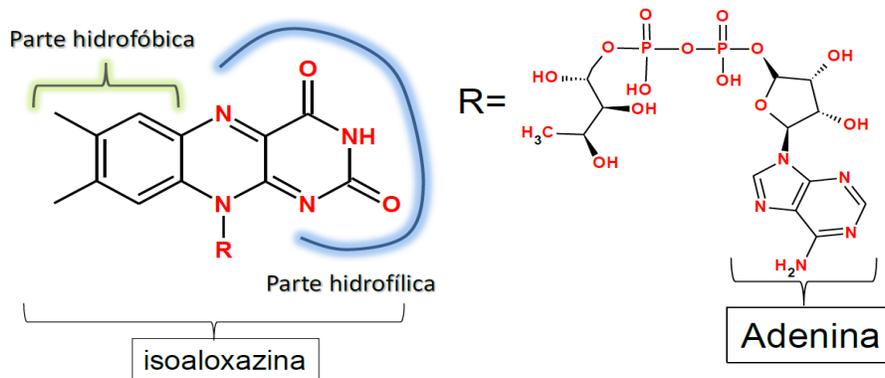


Figura 28. Estructura química del FAD (Villalpando, 2014)

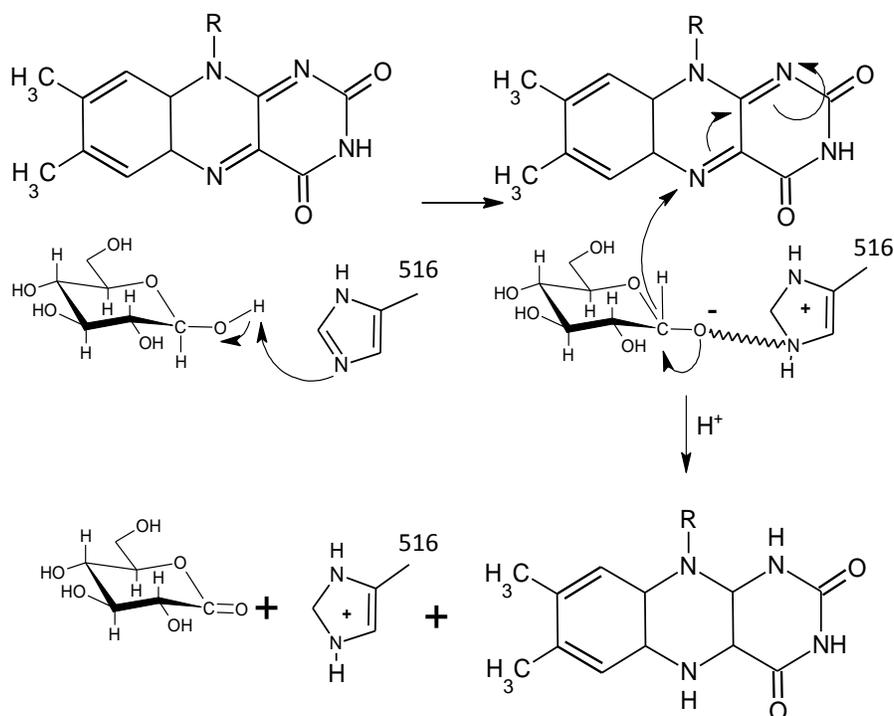


Figura 29. Mecanismo de reacción de GOx en la oxidación de glucosa en ausencia de oxígeno (Villalpando, 2014)

El mecanismo de reacción, en ausencia de oxígeno, comienza con el acercamiento de la glucosa por el C1 a 3.42 Å de N5 del FAD, el oxígeno del hidroxilo de la glucosa (GlcO1) se encuentra posicionado equidistante a 2.78 Å entre el nitrógeno en His516 Nε2 y la His559 Nδ1. En esta posición la His516 Nε2 por un ataque nucleofílico remueve un protón de la β-D-glucosa del C1-hidroxilo, seguido por la formación de un doble enlace del oxígeno C1 promoviendo la transferencia de un protón de C1 a N5 de FAD. Posteriormente, una molécula de agua w110 es remplazada por glucosa dejando el sitio activo con el N3 un protón de His516. Finalmente la gluconolactona es remplazada por una molécula de w110, dejando el sitio activo con His516 protonada y la coenzima en la forma FADH⁻ (Figura 29). Se vuelve a repetir el ciclo con otra molécula de glucosa para formar FADH₂ (Leskovac, Trivic, Wohlfahrt, Kandrac, & Pericina, 2005).

La δ-gluconolactona es hidrolizada para la formación del ácido glucónico como subproducto de la reacción (Figura 30). Asimismo, dependiendo del pH del medio se puede

favorecer o no la velocidad de reacción, a pH neutro no existe un cambio significativo en la velocidad de reacción, dependiendo directamente de la concentración de glucosa y la actividad catalítica de la enzima (Meyer, Wohlfahrt, Knäblein, & Schomburg, 1998)

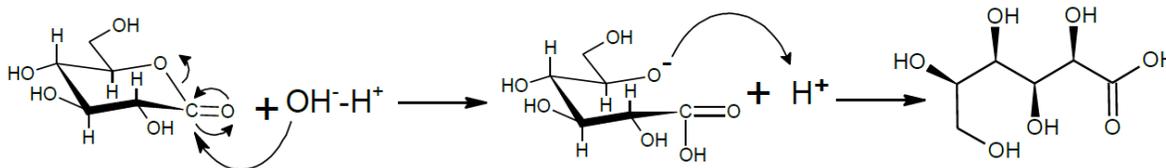


Figura 30. Hidrólisis de la gluconolactona para la formación del ácido glucónico.

6.7 Celdas de combustible micro/nanofluídicas

Una vez concluidos los análisis semi bioelectrocatalíticos para los bioánodos de nanoespuma de carbono y de Toray, GOx-GA-NTC/NEC y GOx-GA-NTC/Toray, respectivamente, se prosiguió a su evaluación en una biocelda de combustible microfluídica para el caso de Toray y nanofluídica en el caso de la NEC. Dicha clasificación se da en función del tamaño de los poros de cada estructura de carbono, nanométrico o micrométrico, ya que es a través de estos donde se hace pasar el reactante correspondiente, combustible u oxidante. (Lee & Kjeang, 2013).

6.7.1 Evaluación del bioánodo GOx-GA/NEC en una biocelda de combustible nanofluídica híbrida (BCCnFH)

En esta primera parte se evaluó el funcionamiento de la BCCnFH cuando el bioánodo se compone sólo de GOx-GA, es decir, la enzima sólo se encuentra inmovilizada con el agente entrecruzante dentro de la nanoesponja de carbono usando como anolito una solución de glucosa 5 mM en BF previamente nitrogenada. En el caso del cátodo se usó un material inorgánico de Pt soportado sobre carbón vólcan depositado sobre de la NEC, y fue usando como catolito una

solución de KOH 0.3 M previamente oxigenada. El Pt es por excelencia el mejor catalizador para la reacción de reducción de oxígeno (Long, Hien, Asaka, Ohtaki, & Nogami, 2011). Las velocidades de flujos empleadas tanto para el anolito como el catolito fueron de 6 mL h^{-1} , donde se logró alcanzar un voltaje de circuito abierto (VCA) estable. En la Figura 31 se muestran las curvas de polarización y de densidad de potencia correspondientes a la BCCnFH de ánodo GOx-GA/NEC y cátodo Pt/C/NEC. El VCA alcanzado por este sistema fue de 0.345 V con una potencia máxima de 2.101 mW cm^{-2} .

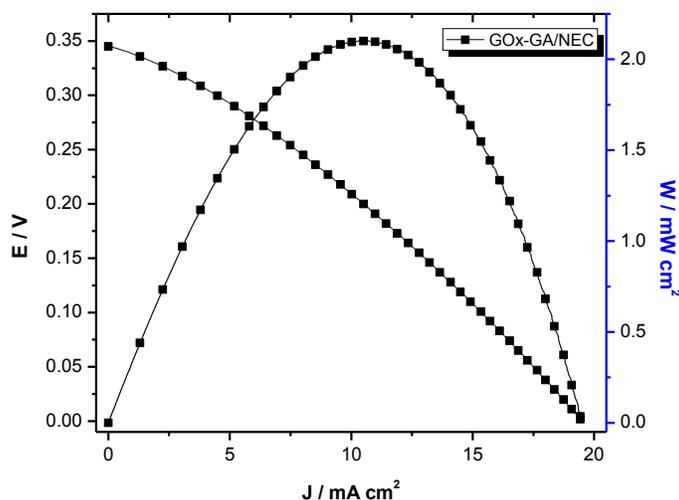


Figura 31. Curvas de polarización y densidad de potencia en 5mM de Glucosa para un bioánodo de GOx-GA/NEC y 0.3 M KOH para un cátodo de Pt/C

6.7.2 Evaluación del bioánodo GOx-GA-NTC/NEC en una biocelda de combustible nanofluídica híbrida (BCCnFH)

Teniendo dos métodos de dispersión para los NTC, que fueron presentados con anterioridad, se prosiguió a evaluar en una BCCnFH los bioánodos preparados con cada uno, GOx-GA-NTC/NEC (M1 y M2). Como se presentó en la sección de inmovilización los bioánodos preparados con NTC exhibieron una mayor corriente en los VPD donde fue posible la detección de la enzima inmovilizada. En el caso de la evaluación de la BCCnFH se espera se mantenga dicha

tendencia. El anolito y catolito empleados fueron glucosa 5mM en BF previamente nitrogenado y KOH 0.3 M previamente oxigenado respectivamente.

Tabla 3. Velocidades de flujo y VCA para el anolito y catolito en una BCCnFH con bioánodo de GO_x-GA-NTC/NEC M1.

Velocidad anolito (mL h ⁻¹)	Velocidad catolito (mL h ⁻¹)	VCA (V)
1.5	1.5	0.36
3	3	0.44
6	6	0.42
3	6	0.55

Antes de obtener las velocidades de flujo óptimas para el anolito y catolito se evaluaron diferentes valores de velocidad para cada uno. Los valores se presentan en la Tabla 3 donde se indica la velocidad asignada y el VCA obtenido. Esta evaluación fue llevada a cabo en el bioánodo GO_x-GA-NTC/NEC M1.

El valor de VCA más alto obtenido fue de 0.55 V para 3 mL h⁻¹ en anolito y 6 mL h⁻¹ en catolito, valores que se repitieron para la evaluación del bioánodo preparado por la dispersión M2.

En la Figura 32 se muestran las curvas de polarización y de densidad de potencia correspondientes a la BCCnFH de ánodo GO_x-GA-NTC/NEC y cátodo Pt/C/NEC, para la dispersión M1 y M2 usando las velocidades de flujo de 3 mL h⁻¹ y 6 mL h⁻¹ respectivamente. En el caso de la dispersión M1 el VCA obtenido fue de 0.551 V con una potencia máxima de 5.68 mW cm². Para la dispersión M2 el VCA se ve disminuido a 0.406 V, pero la densidad de corriente aumenta, por consiguiente la densidad de potencia también con un valor de 6.12 mW cm².

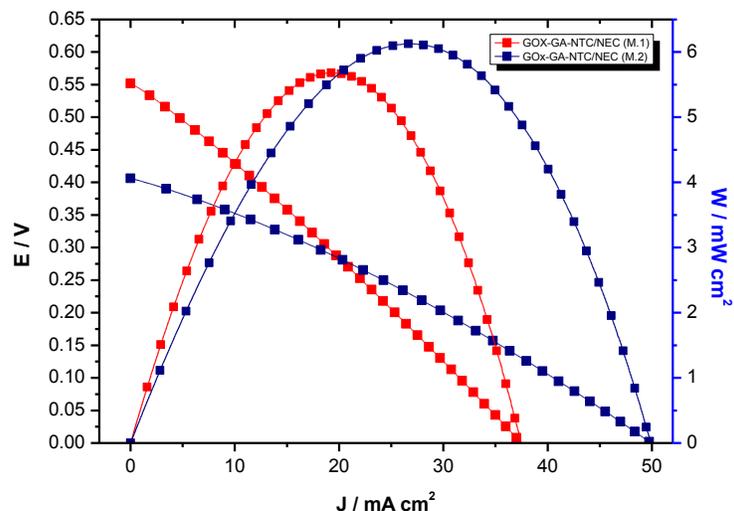


Figura 32. Curvas de polarización y densidad de potencia en 5mM de Glucosa para los bioánodo de GOx-GA-NTC/NEC por M1 y M2 y 0.3 M KOH para el cátodo de Pt/C.

En posteriores evaluaciones de BCCnFH se siguió usando ambos bioánodos de GOx-GA-NTC/NEC (M1 y M2). Los valores VCA se mantienen constantes, variando sólo en la densidad de corriente entregada así como en la densidad de potencia, para M1 de 9.4 mW cm^2 y para M2 de 6 mW cm^2 . Variaciones principalmente atribuibles al método de inmovilización empleado. El método de dispersión que se decidió seguir empleando para estudios futuros fue el M2.

6.7.3 BCCnFH: GOx-GA/NEC vs GOx-GA-NTC/NEC

Comparando las curvas de polarización y de potencia obtenidas para los bioánodos de GOx-GA/NEC y GOx-GA-NTC/NEC, que se muestran en la Figura 33, se observa una gran diferencia tanto en el VCA como en la potencia máxima entregada por cada BCCnFH. Ambas, hacen uso del cátodo inorgánico Pt/C/NEC, el aumento obtenido se le atribuye al mejoramiento del bioánodo al agregar los NTC. Esto se corroboró con los resultados obtenidos en los VPD donde la corriente de la señal de reducción de GOx-FADH₂ se veía incrementada también con el uso de los NTC.

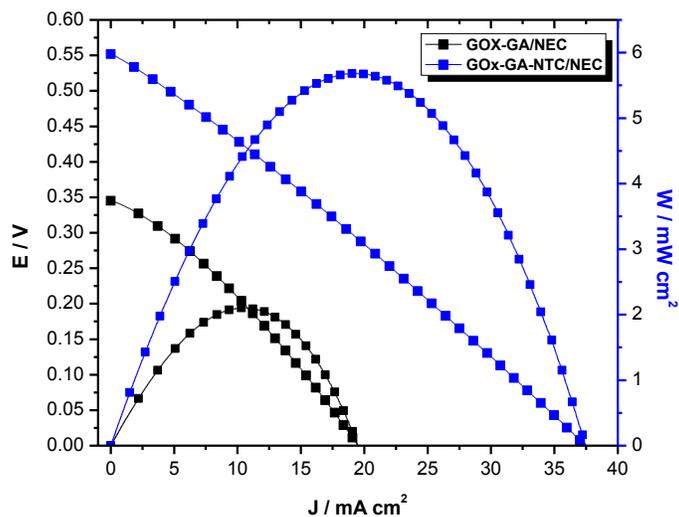


Figura 33. Curvas de polarización y densidad de potencia en 5mM de Glucosa para los bioánodos de GOx-GA/ NEC vs GOx-GA-NTC/NEC por M1y 0.3 M KOH para el cátodo de Pt/C.

Con estos resultados se reconoce la contribución hecha por los nanotubos de carbono que actúan como un cableado molecular; logrando mejorar la transferencia directa de electrones desde el sitio activo de la enzima hacia la superficie del electrodo de NEC, traduciéndose así en una mejora en la densidad de corriente obtenida así como en el VCA, de acuerdo a lo establecido por diferentes autores en la literatura (Jose, Marx, Murata, Koepsel, & Russell, 2012) La variación principal del VCA puede ser debida a la manera en cómo se está dando la reacción entre ambos electrodos. El adicionar los NTC puede que haya cambiado la conformación de la estructura de la GOx logrando que la comunicación entre el bioánodo y el cátodo inorgánico se optimizara y como resultado el valor de VCA se ve incrementado disminuyendo así los valores de los sobrepotenciales.

Asimismo, las curvas de polarización proporcionan información sobre el adecuado funcionamiento de una biocelda nanofluídica de combustible. Como se discute principalmente en “Nanofluidic fuel cell” por (Lee & Kjeang, 2013), la nanoespuma de carbono logra reducir ciertos sobrepotenciales de activación mejorando la cinética de reacción entre los electrodos. Mejoran

asimismo el desempeño de la BCCnFH a altos valores de VCA, esto se observa en que la curva de polarización no cae tan precipitadamente a altos valores de VCA.

En la segunda región de la curva de polarización, que es determinada por el conjunto de resistencias óhmicas (Luz, Pereira, Souza, Sales, & Crespilho, 2014), presenta una pendiente pronunciada, indicando que a densidades de corriente mayor la eficiencia de los electrodos de NEC se ve restringida por la alta resistencia dada por el material, resistencia que llega a ser hasta cuatro veces mayor que la que se tiene en los electrodos de papel de carbono (Lee & Kjeang, 2013). Asimismo, en este sistema de BCCnFH se hace uso de una solución amortiguadora de buffer de fosfatos como anolito, la resistencia proporcionada por esta solución se hace presente también en la curva de polarización aunada a las resistencias debidas al tipo de celda empleada.

En la tercera y última región de la curva de polarización se encuentra la pérdida debido al transporte de masa que es resultado del cambio de concentración de los reactantes en la superficie del electrodo mientras el combustible es consumido. Este tipo de pérdida es resultado de un fallo en el transporte de reactivos suficientes a la superficie del electrodo (Luz, Pereira, Souza, Sales, & Crespilho, 2014). En el caso de la NEC empleada se esperaba reducir los sobrepotenciales debidos al transporte de masa debido a la alta área superficial del material así como a la cercana proximidad del flujo de reactantes y la superficie del electrodo. Sin embargo, debido a la alta resistencia óhmica presente los beneficios del transporte de masa no son efectivos (Lee & Kjeang, 2013).

6.7.4 Estudio de la BCCnFH con electrodos sin modificar en presencia de glucosa y electrodos modificados sin glucosa

Para evidenciar el funcionamiento de la BCCnFH, es decir, que tanto el electrodo a base de GOx inmovilizada como el electrodo de Pt funcionaran activamente. Para ello se realizaron dos pruebas blanco en una BCCnFH. En la primer prueba se evaluó un cátodo inorgánico de Pt/C/NEC con KOH 0.3 M saturado con O₂ como catolito, mientras que el ánodo sólo se empleó un electrodo de NEC sin enzima inmovilizada usando como anolito glucosa 5 mM en BF previamente nitrogenada. En la segunda prueba fueron evaluados en el cátodo un electrodo de Pt/C/NEC con

KOH 0.3 M saturado con O_2 como catolito y en el caso del ánodo un bioánodo de GOx-GA-NTC/NEC usando como anolito únicamente BF pH 7.1 sin glucosa.

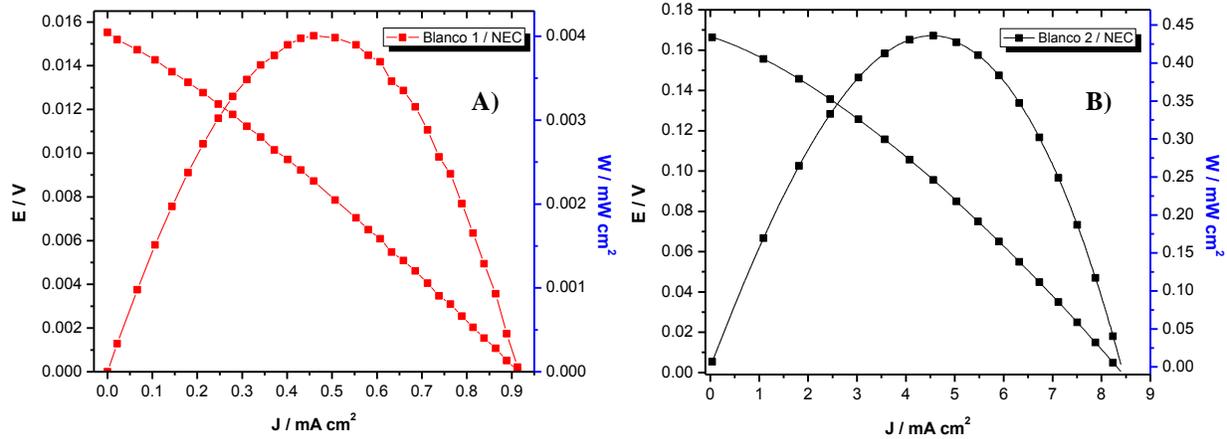


Figura 34. Curvas de polarización y densidad de potencia. A) Prueba 1: Cátodo inorgánico Pt/C/NEC KOH 0.3 M O_2 y ánodo NEC en glucosa 5 mM/BF N_2 . B) Prueba 2: Cátodo inorgánico Pt/C/NEC KOH 0.3 M O_2 y bioánodo de GOx-GA-NTC/NEC en BF N_2 .

En la Figura 34 se muestran las curvas de polarización y de potencia correspondientes a las dos pruebas de BCCnFH evaluadas con electrodos sin modificar con glucosa y electrodos modificados sin glucosa. En la Figura 34 A) se presentan los resultados de la primera prueba. En este caso al utilizarse un ánodo no modificado en presencia de glucosa no hay efectos considerables tanto en el VCA como en la densidad de corriente. De esta manera se corrobora que la presencia de la enzima GOx en el electrodo sí es una influencia considerable. En el caso de la Figura 34 B) el ánodo empleado contiene al conjunto GOx-GA-NTC inmovilizado pero la prueba se ejecuta sin la presencia de la glucosa. Es decir, no hay combustible que oxidar y por lo tanto la contribución de éste no será significativa. Los valores obtenidos son mayores comparados con la primer prueba evaluada y esto es debido a que con la ayuda del conjunto inmovilizado GOx-GA-NTC hay una disminución en los sobrepotenciales de resistencia óhmica, teniendo entonces un aumento en la corriente capacitiva.

Figura 14**Figura 34.** Curvas de polarización y densidad de potencia. A) Prueba 1: Cátodo inorgánico Pt/C/NEC KOH 0.3 M O₂ y ánodo NEC en glucosa 5 mM/BF N₂. B) Prueba 2: Cátodo inorgánico Pt/C/NEC KOH 0.3 M O₂ y bioánodo de GO_x-GA-NTC/NEC en BF N₂.**Figura 34.** Curvas de polarización y densidad de potencia. A) Prueba 1: Cátodo inorgánico Pt/C/NEC KOH 0.3 M O₂ y ánodo NEC en glucosa 5 mM/BF N₂. B) Prueba 2: Cátodo inorgánico Pt/C/NEC KOH 0.3 M O₂ y bioánodo de GO_x-GA-NTC/NEC en BF N₂. Ambas pruebas entonces indican que el bioánodo GO_x-GA-NTC/NEC al ser usado en una BCCnFH en presencia de glucosa logra llevar a cabo la reacción deseada satisfactoriamente comparándolo con las pruebas blanco efectuadas.

6.7.5 Estabilidad de la BCCnFH

Para que la aplicación final de la BCCnFH, un dispositivo biomédico implantable, pueda llevarse a cabo debe de cumplir ciertas características importantes. Una de ellas o la más importante de ellas es que debe de ser biocompatible. Sin embargo, antes de preocuparse por los materiales adecuados para elaborar la BCCnFH y hacerla biocompatible es necesario que su funcionamiento sea estable, es decir que cada vez se encienda el dispositivo alcance el valor de VCA establecido y genere la corriente deseada.

Para estudiar esta característica tan importante del funcionamiento de la BCCnFH se realizaron una serie de polarizaciones en 1 hora. (Figura 35).

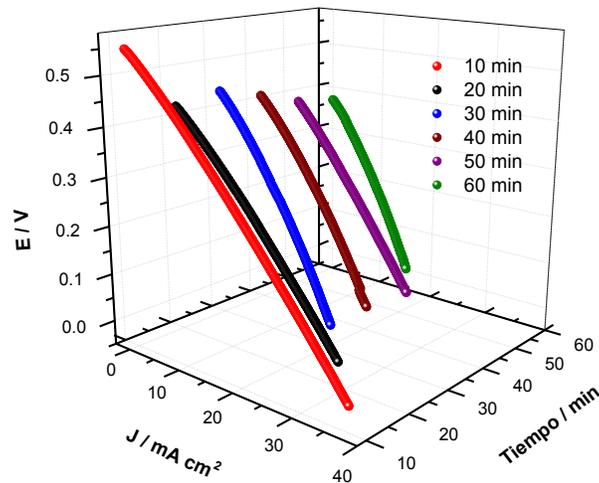


Figura 35. Curvas de estabilidad de la BCCnFH usando como bioánodo GOx-GA-NTC/NEC y cátodo Pt/C/NEC. Las polarizaciones se realizaron cada 10 min.

Lo anterior con el fin de estudiar la estabilidad del dispositivo. Es decir, cuánto tiempo le toma a la BCCnFH volver a su estado estable de VCA generando la misma corriente cada vez que una polarización es efectuada. En la Figura 35 se logra apreciar las polarizaciones realizadas en la BCCnFH en un tiempo de 60 min. Cada polarización se efectuó cada 10 min, teniendo este tiempo de recuperación de la BCC. En dicha imagen se observa como el VCA y la densidad de corriente se ven disminuidos conforme pasa el tiempo.

En la Tabla 4 **Tabla 4.** Valores de VCA (V), densidad de corriente, a la potencia máxima (J), y potencia máxima (W), de las curvas de polarización realizadas cada 10 min. se logra apreciar la disminución en el VCA con el avance del tiempo de hasta un 30%, asimismo, se observa que la densidad de corriente a la potencia máxima, disminuye en un 43% pero se mantiene constante hasta el minuto 50, disminuyendo una vez más para el minuto 60 con un 57%. Con la potencia máxima sucede algo similar. Dichas disminuciones indican pérdida de estabilidad del sistema. Es decir la efectividad de la reacción va disminuyendo con el tiempo debido a diferentes problemas dentro del sistema. Acumulación de subproductos dentro de la estructura, inhibición de la enzima, difusión del reactante al sitio activo, etc.

Tabla 4. Valores de VCA (V), densidad de corriente, a la potencia máxima (J), y potencia máxima (W), de las curvas de polarización realizadas cada 10 min.

VCA (V)	J (mA cm ⁻²) a la potencia máxima	W _{max} (mW cm ⁻²)	Tiempo (min)
0.5517	19.467	5.683	10
0.435	14.787	3.387	20
0.439	11.347	2.673	30
0.413	11.085	2.483	40
0.382	11.074	2.075	50
0.369	8.3	1.66	60

Con los resultados anteriores se puede determinar entonces que la capacidad de almacenar carga del electrodo de GOx-GA-NTC/NEC no es del todo adecuada. La caída del VCA así como de la densidad de corriente y en consecuencia de la potencia del sistema puede deberse a que el conjunto inmovilizado GOx-GA-NTC/NEC comienza a transferir los electrones de la reacción de oxidación de glucosa menos eficientemente. Es decir, aunque el acoplamiento entre el reactante y la enzima sea adecuado si no hay un aprovechamiento adecuado de los electrones producidos la comunicación entre ambos electrodos se verá afectada resultando así en la caída del VCA y de la densidad de corriente.

Asimismo, aunque haya un flujo constante de los reactantes y haya una salida de todos los productos en la BCCnFH, puede ser que ciertas moléculas de estas se queden atrapadas interaccionando con restos de aminoácidos en la periferia de las enzimas inmovilizadas, provocando así cierta inhibición, reflejándose principalmente en el aumento de la resistencia óhmica y la pérdida de difusión del reactante. Aunado a ello se aumenta la resistencia de la solución, de la cual, los protones generados por la reacción deben de cruzar al otro lado del sistema, al cátodo, para lograr completar el circuito y la diferencia de potencial se lleve a cabo satisfactoriamente.

6.7.6 Evaluación del bioánodo GO_x-GA-NTC/Toray en una biocelda de combustible microfluídica híbrida (BCC_μFH)

En esta segunda parte se presentan los resultados de las evaluaciones realizadas en una BCC_μFH. Tomando en cuenta el complemento tan importante en la densidad de corriente de los NTC todas estas evaluaciones fueron llevadas a cabo con bioánodos de GO_x-GA-NTC/Toray. La particularidad de esta biocelda de combustible microfluídica híbrida se encuentra en el tamaño de los poros. En la estructura interna tridimensional del carbono en el papel Toray, como se mencionó en la sección de inmovilización, el tamaño de poro promedio del papel de carbono se encuentra en micras aproximadamente de 25 a 50 μm .

En la Figura 36 **Figura 36.** Curvas de polarización y densidad de potencia en 5mM de Glucosa para un bioánodo de GO_x-GA-NTC/Toray y 0.3 M KOH para un cátodo de Pt/Cse presenta la curva de polarización y de potencia para la BCC_μFH usando como bioánodo GO_x-GA-NTC/Toray y como cátodo Pt/C/Toray. En este dispositivo se logró obtener un VCA de 1.12 V y una densidad de potencia máxima de 1.61 mW cm². Se observa un claro incremento en el VCA y una clara disminución en la densidad de corriente J, comparándolos con la BCC nanofluídica. Estas diferencias tanto en el VCA como en la J así como en la W_{máx}, se deben principalmente a características intrínsecas de la estructura interna del Toray, el tamaño de sus poros, su interconectividad, su área superficial y la resistencia del material. En contraste a lo descrito anteriormente sobre la curva de polarización de la BCC_nFH, la descripción de la BCC_μFH sigue a continuación:

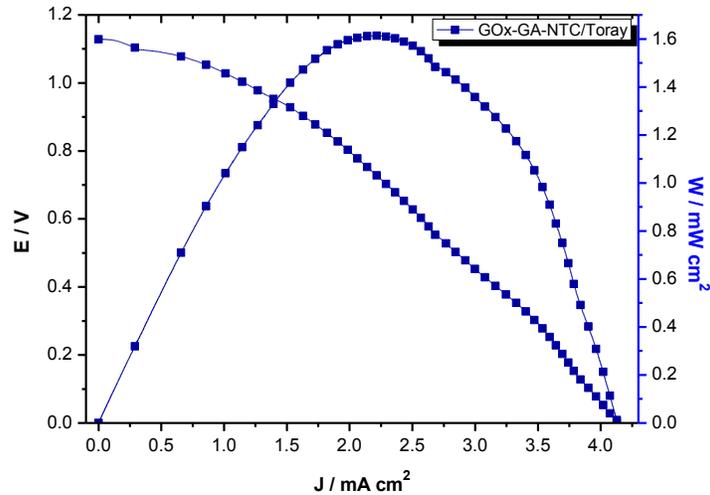


Figura 36. Curvas de polarización y densidad de potencia en 5mM de Glucosa para un bioánodo de GOx-GA-NTC/Toray y 0.3 M KOH para un cátodo de Pt/C

En la primera región de la curva de polarización, la región de activación, se presume no hay diferencia explícita entre la celda microfluídica ($C_{\mu}F$) y la celda nanofluídica (C_nF). De acuerdo con (Lee & Kjeang, 2013) la $C_{\mu}F$ presenta sobrepotenciales de activación mayores comparados con la C_nF .

En la siguiente parte, resistencia óhmica, se nota una pendiente menor comparándola con la C_nF . Y esto es debido a que la resistencia del Toray es hasta cuatro veces más pequeña que la de la NEC, es por ellos que los sobrepotenciales debidos a la resistencia del material se ven bastante atenuados.

La última parte, transferencia de masa, se nota más la caída de la curva donde se presume hay buena transferencia de reactantes y de productos dentro del material. Asimismo, debida al gran tamaño de sus poros comparándolos con los de las moléculas partícipes.

Lo más destacable de la $BCC_{\mu}FH$ son sus altos valores de VCA así como sus bajos valores de J , traduciéndose en una baja W . El alto VCA obtenido, como se menciona anteriormente, se presume es debido a los bajos sobrepotenciales presentados causados por la baja resistencia y una buena transferencia de masa. Esto ocasiona que el VCA total de la celda se vea menos afectado y entonces se obtenga un alto VCA, ilustrándose lo anterior con la Ecuación 3.

$$E_{celda} = E_{cátodo} - E_{ánodo} - \sum IR$$

Ecuación 3. Potencial de la celda

La máxima densidad de corriente que puede alcanzarse, y en consecuencia la máxima potencia, depende de la densidad de sitios activos catalíticos (es decir la cobertura electrocatalítica) y de la proporción de catalizador por sitio activo, es decir la cantidad de enzima activa inmovilizada (Luz, Pereira, Souza, Sales, & Crespilho, 2014).

Debido a la baja área superficial que tiene el papel de carbono Toray y debido al gran tamaño de sus poros es muy posible que la cantidad de enzima activa dentro de su estructura sea menor logrando así que la transferencia electrónica a través del todo el complejo no se aproveche adecuadamente. De igual manera, se presume que las enzimas inmovilizadas dentro de este material se encuentran demasiado dispersas entre ellas, es decir, al no formar un complejo lo suficientemente grande los electrones se van perdiendo fácilmente (Poulpiquet, Ciaccafava, & Lojou, 2014).

6.7.7 Estudio de la BCC μ FH con electrodos sin modificar en presencia de glucosa y electrodos modificados sin glucosa

Al igual que en la BCCnFH en la BCC μ FC se evaluaron dos pruebas blanco para demostrar el funcionamiento de dicha celda. En la primer prueba se evaluó un cátodo inorgánico de Pt/C/NEC con KOH 0.3 M saturado con O₂ como catolito, mientras que el ánodo sólo se empleó un electrodo de papel Toray sin enzima inmovilizada usando como anolito glucosa 5 mM en BF previamente nitrogenada. En la segunda prueba fueron evaluados en el cátodo un electrodo de Pt/C/NEC con KOH 0.3 M saturado con O₂ como catolito y en el caso del ánodo un bioánodo de GOx-GA-NTC/Toray usando como anolito únicamente BF pH 7.1 sin glucosa.

Los resultados obtenidos en esta serie de pruebas blanco fueron acertados y comparables con aquellos obtenidos en la BCCnFH. En la Figura 37 se muestran las gráficas obtenidas de dichas

pruebas. En la primera, se observa un déficit en el VCA así como en la densidad de corriente ocasionados por la falta de catalizador en el sistema. En la segunda el incremento del VCA así como de la densidad de corriente, como se comentó en el caso de la CnF, viene dado a que el conjunto GOx-GA-NTC/Toray que de alguna manera disminuye los sobrepotenciales presentados en la biocelda. Así mismo, la aportación dada por la reacción de reducción de oxígeno por el Pt en papel Toray es bastante considerable comparada con su contribución cuando se usa Pt/NEC.

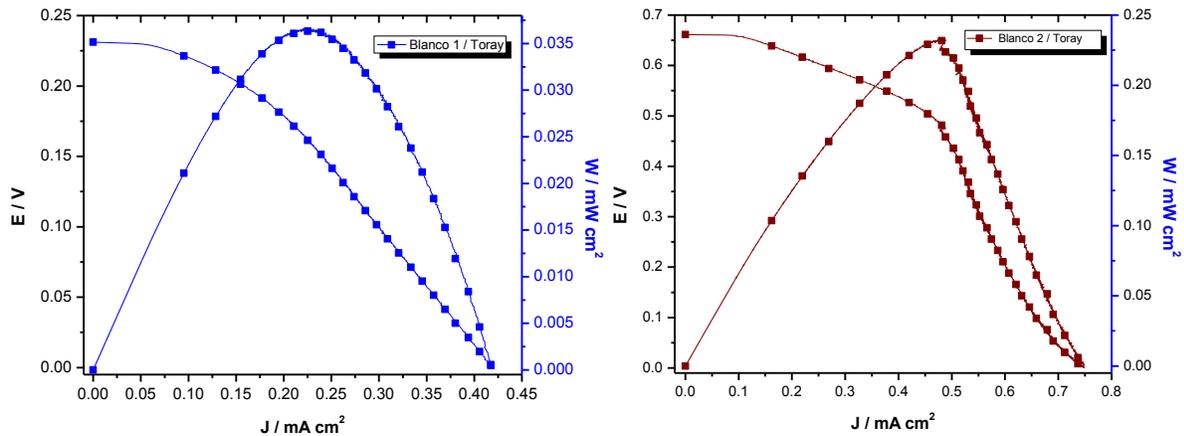


Figura 37. Curvas de polarización y densidad de potencia. A) Prueba 1: Cátodo inorgánico Pt/C/Toray KOH 0.3 M O₂ y ánodo Toray en glucosa 5 mM/BF N₂. B) Prueba 2: Cátodo inorgánico Pt/C/Toray KOH 0.3 M O₂ y bioánodo de GOx-GA-NTC/Toray en BF N₂.

En este caso así como en la CnF se corrobora que la enzima sí efectúa un cambio considerable en el sistema de biocelda de combustible, logrando así obtener una mejor eficiencia de las mismas traduciéndose en un alto VCA así como en una mejor densidad de corriente y densidad de potencia.

6.7.8 Estabilidad de la BCC μ FH

En la Figura 38 se presentan las curvas de estabilidad de la BCC μ FH con polarizaciones cada 10 min. En dicha grafica se observa claramente que la estabilidad en la celda microfluídica

usando papel de carbono Toray como electrodos se mantiene a lo largo de 60 minutos de operación de la celda.

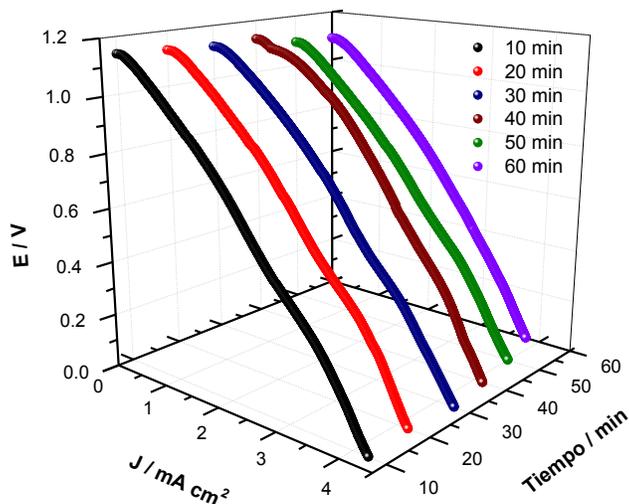


Figura 38. Curvas de estabilidad de la BCC μ FH usando como bioánodo GOx-GA-NTC/Toray y cátodo Pt/C/Toray. Las polarizaciones se realizaron cada 10 min.

En la Tabla 5 **Tabla 5.** Valores de VCA (V), densidad de corriente, a la potencia máxima (J), y potencia máxima (W), de las curvas de polarización realizadas cada 10 min. se logra apreciar claramente que la disminución en el VCA con el avance del tiempo es poca y se mantiene más o menos constante, asimismo se observa que la densidad de corriente a la potencia máxima se ve ligeramente aumentada manteniéndose constante hasta el minuto 60, y disminuye una vez más para el minuto 60. El caso de la potencia máxima es algo similar.

Tabla 5. Valores de VCA (V), densidad de corriente, a la potencia máxima (J), y potencia máxima (W), de las curvas de polarización realizadas cada 10 min.

VCA (V)	J (mA cm ⁻²) a la potencia máxima	W _{max} (mW cm ⁻²)	Tiempo (min)
1.14	2.133	1.445	10

1.13	2.186	1.471	20
1.12	2.223	1.487	30
1.12	2.23	1.613	40
1.095	2.129	1.354	50
1.090	2.104	1.313	60

La disminución total del VCA después de una hora en el caso de la BCC μ FH es de tan solo 4.4%, con el Toray como electrodos. Para el caso del uso de la NEC en la BCCnFH disminuye hasta un 33.12%, la disminución neta en esta celda es de casi 8 veces la disminución con el papel Toray.

La capacidad de almacenamiento de carga así como de recuperación después de una polarización es superada totalmente por la BCC μ FH al usar electrodos de Toray. La interacción interna entre la enzima, el electrodo, así como con los reactantes involucrados desempeña un factor crucial para que esto se pueda llevar a cabo. En general la estructura microporosa del Toray es la responsable de que esto suceda. Se sugiere que esté fungiendo como un posible capacitor, se deben de realizar más estudios.

6.7.9 Bioceldas de combustible micro/nanofluídicas híbridas

Tomando en cuenta las propiedades intrínsecas de las estructuras de carbono tridimensional, NEC y Toray, y sus mejores resultados en una biocelda de combustible, un buen VCA para el caso de Toray y una buena densidad de corriente para el caso de la NEC, se intentó combinar ambas estructuras en una biocelda de combustible micro/nanofluídica usando como ánodo GOx-GA-NTC/NEC y como cátodo Pt/C/Toray. Recíprocamente se hizo uso de un ánodo de Toray y el cátodo de NEC.

En la Figura 39 se observa claramente que sus propiedades no son aditivas, es decir, el alto VCA de Toray no se presenta en A) pero sí en B), cuando el bioánodo se elabora a base de éste. En el caso de la densidad de corriente se mantiene alta en A) donde el bioánodo se elabora a base de NEC.

Se observa entonces que son las propiedades intrínsecas de estos materiales que al ser usado como bioánodos o biocátodos determinan el eficiente funcionamiento de la biocelda de combustible.

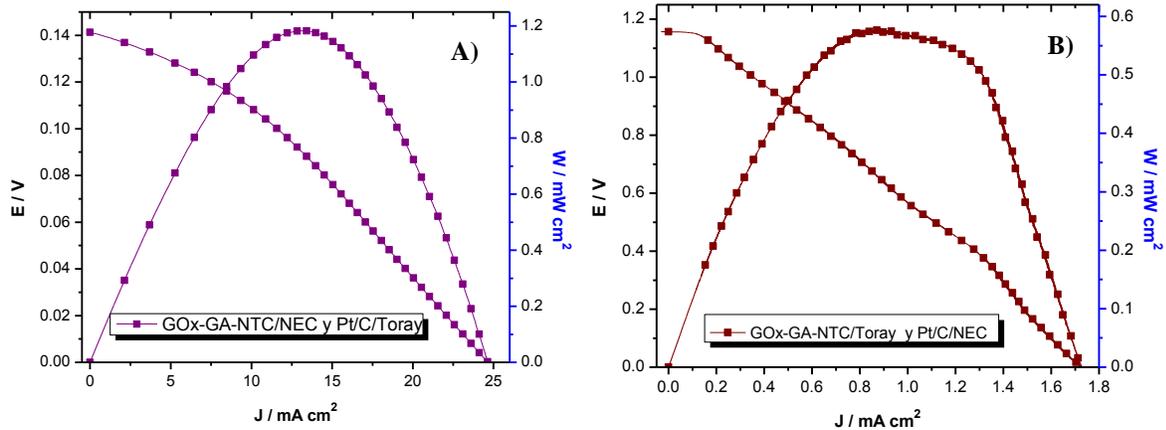


Figura 39. Curvas de polarización y densidad de potencia en 5mM de Glucosa para A) un bioánodo de GOx-GA-NTC/NEC y 0.3 M KOH para un cátodo de Pt/C/Toray y B) bioánodo de GOx-GA-NTC/Toray y cátodo de Pt/C/NEC.

6.7.10 Biocelda de combustible micro/nanofluídica enzimática

Una vez que fueron evaluadas las bioceldas de combustible micro y nanofluídicas híbridas, que usan como bioánodos electrodos compuestos por la enzima glucosa oxidasa y como cátodos Pt/C ambos en las estructuras de carbono NEC y Toray.

Lo siguiente consistió en probar una biocelda de combustible enzimática (BCE), es decir, que tanto el ánodo como el cátodo fueran “bio”, usando en ambos electrodos catalizadores biológicos para llevar a cabo las reacciones de oxidación de combustible y de reducción de oxidante simultáneamente. Para estas celdas, tanto microfluídicas como nanofluídicas, se hizo uso del bioánodo compuesto por GOx-GA-NTC, el cual ya se ha estudiado a lo largo de este documento, y como biocátodo una mezcla similar de la enzima lacasa del hongo *trametes*

versicolor, Lc-GA-NTC, la cual se ha estudiado por tener excelentes propiedades en la reducción de oxígeno (Maciel, 2015) (Cracknell, Vincent, & Armstrong, 2008).

En la Figura 40 se muestran las curvas de polarización y de potencia de las bioceldas enzimáticas micro y nanofluídicas, ambas usando como anolito glucosa 5 mM en BF pH 7.1 (nitrogenado) y como catolito una solución amortiguadora de acetatos (BA) pH 5 saturada con oxígeno.

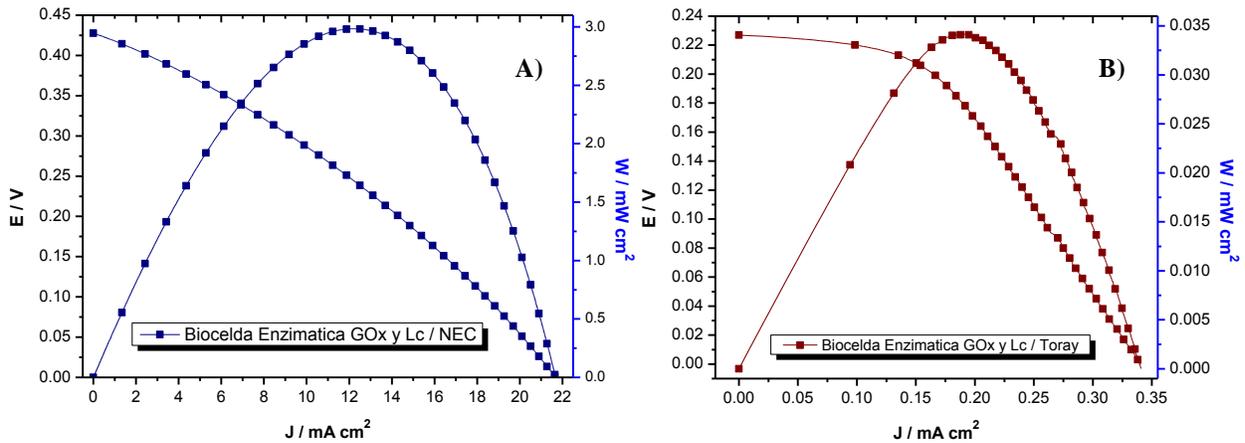


Figura 40. Bioceldas de combustible enzimáticas A) GOx y Lc / NEC y B) GOx y Lc / Toray

El mejor resultado se obtuvo con la biocelda de combustible nanofluídica enzimática usando en ambos electrodos la nanoespuma de carbono con un VCA de 0.427 V con una densidad de potencia máxima de 2.98 mW cm⁻². Mientras que en la celda microfluídica con papel Toray los resultados fueron sorprendentes ya que se esperaba un alto valor de VCA como se había presentado en las celda híbrida con Pt/C en el cátodo. Los valores para dicha celda fueron para VCA de 0.227 con una potencia máxima de 0.034 mW cm⁻².

Como se había mencionado anteriormente una buena comunicación entre ambos electrodos es necesaria para que se lleve a cabo la transferencia electrónica y así los valores de sobrepotencial se vean reducidos. En el caso del uso del Toray para la biocelda enzimática se presume estos sobrepotenciales incrementaron reduciendo así el valor final del VCA. El único valor que se mantiene similar a las bioceldas híbridas es el de la densidad de corriente, que se

mantiene bajo debido a los pocos cúmulos de enzima inmovilizada que se pueden encontrar en la estructura interna del Toray.

La biocelda de combustible nanofluídica enzimática (BCCnE) fue sometida a pruebas de estabilidad durante cuatro días de evaluación continua. En la Figura 41 se muestran las curvas de polarización y de potencia correspondientes a dichas evaluaciones. En el segundo día de evaluación la estabilidad de la celda cae hasta un 4.69%, en el tercer día lo hace en un 14.20% y en el cuarto día llega hasta un 76.35%, respecto al VCA.

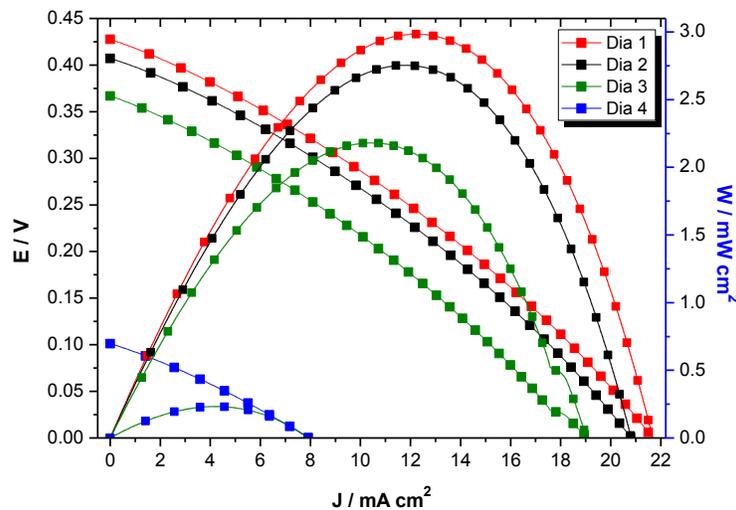


Figura 41. Curvas de estabilidad de la biocelda de combustible nanofluídica enzimática durante 4 días de operación.

En la Tabla 6 se muestran los valores de VCA, densidad de corriente y potencia máxima de la BCCnE, donde se indica la caída en estos valores con el paso del tiempo. Sin embargo es importante hacer mención que con el uso de la NEC como electrodos en la BCE se obtienen resultados bastante prometedores en el campo de las bioceldas enzimáticas y comparables con los reportados en la literatura.

Tabla 6 Valores de VCA (V), densidad de corriente, a la potencia máxima (J), y potencia máxima (W), de estabilidad de la BCCnE,

VCA (V)	J (mA cm ⁻²) a la potencia máxima	W _{max} (mW cm ⁻²)	Día
0.427	12.351	2.984	1
0.407	11.877	2.754	2
0.366	10.453	2.181	3
0.101	4.260	0.232	4

En la Figura 42 se presentan las pruebas realizadas en bioceldas de combustible micro/nanofluídicas combinando ambas estructuras de carbono tridimensional. En la Figura 42 A) se usa como bioánodo GOx-GA-NTC/NEC y como biocátodo el Lc-GA-NTC/Toray, obteniéndose un VCA de 0.257 y una densidad de potencia de 21.32 $\mu\text{W cm}^{-2}$. En la parte B) se usa un bioánodo de Toray con un biocátodo de NEC con un VCA de 0.311 y una potencia de 11.21 $\mu\text{W cm}^{-2}$. Los resultados son muy parecidos a los obtenidos en las bioceldas micro/nanofluídicas híbridas, donde se muestra una baja tanto en el VCA como en la densidad de potencia, asimismo en la densidad de corriente. Siguiendo con la presunción de que sus propiedades no son aditivas.

En la Tabla 7 se resumen las bioceldas de combustible híbridas y enzimáticas que se elaboraron. Se variaron diferentes parámetros como el tipo de material usado en los electrodos, la carga neta de NTC empleada, el grosor del electrodo, el pH de la solución amortiguadora así como su concentración, la adición de agentes externos como Nafion o mediadores como el ABTS o el ferrocianuro de potasio. Los valores comparativos de dichas celdas fueron el VCA, la densidad de corriente a la potencia máxima y la potencia máxima.

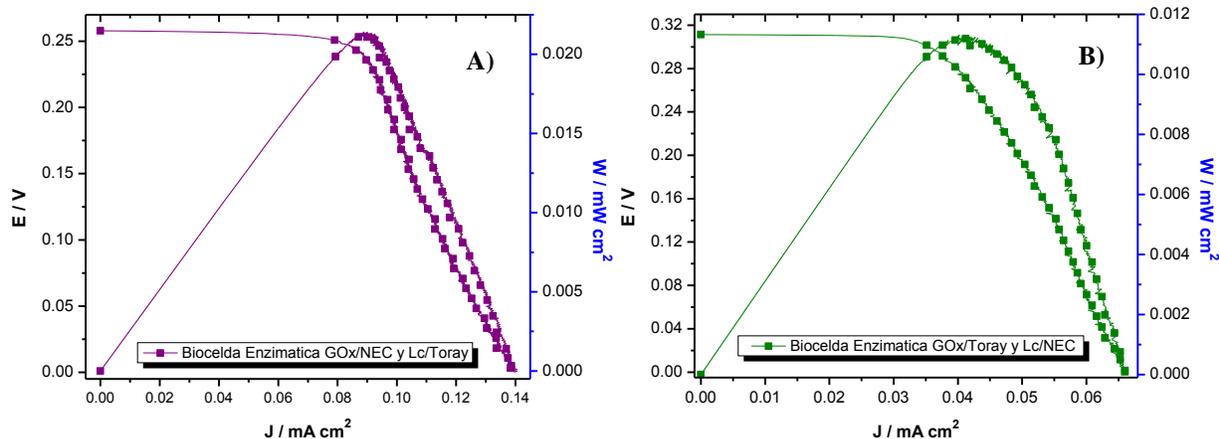


Figura 42. Curvas de polarización y densidad de potencia en 5mM de Glucosa para A) un bioánodo de GOx-GA-NTC/NEC y biocátodo de Lc-GA-NTC/Toray en BA pH 5 y B) bioánodo de GOx-GA-NTC/Toray y Lc-GA-NTC/Toray en BA pH 5.

Tabla 7. Bioceldas de combustible elaboradas

Tipo de Celda	Ánodo/Anolito	Cátodo/Catolito	VCA (V)	J (mA cm ⁻²) a la potencia máxima	W _{max} (mW cm ⁻²)
BCC_nFE	GOx-GA-NTC/Doble-NEC/Glucosa 5 mM en BF N ₂	Lc-GA-NTC/Doble-NEC/BA O ₂	0.218	5.619	0.647
BCC_μFE	GOx-GA-NTC/Doble-Toray/Glucosa 5 mM en BF N ₂	Lc-GA-NTC/Doble-Toray/BA O ₂	0.205	0.198	0.03
BCC_μFE	GOx-GA-NTC/Toray/Glucosa 5 mM en BF 0.025M N ₂	Lc-GA-NTC/Toray/BA O ₂	0.229	0.016	0.003
BCC_nFE	GOx-GA-NTC- CV ¹ /NEC/Glucosa 5 mM en BF N ₂	Lc -GA-NTC-CV/NEC/BA O ₂	0.160	3.307	0.281
BCC_nFE	GOx-GA-NTC- CV-Nafion [®] 1%/NEC/ Glucosa 5 mM en BF N ₂	Lc -GA-NTC- CV-Nafion [®] 1%/NEC/BA O ₂	0.15	2.953	0.237
BCC_μFE	GOx-GA-NTC-CV/Toray/Glucosa 5 mM en BF N ₂	Lc -GA-NTC-CV/Toray/BA O ₂	0.412	0.08	0.024

BCCnFE	GOx-GA-2 ² NTC/NEC/ Glucosa 5 mM en BF N ₂	Lc-GA-2NTC/NEC/BA O ₂	0.144	3.78	0.286
BCCnFE	GOx-GA-NTC/Au/NEC/ Glucosa 5 mM en BF N ₂	Lc-GA-NTC/Au/NEC/ BA O ₂	0.438	10.775	2.725
BCCμFE	GOx-GA-NTC/Au/Toray/ Glucosa 5 mM en BF N ₂	Lc-GA-NTC/Au/Toray/ BA O ₂	0.349	0.363	0.075
BCCnFE	GOx-GA-NTC ³ /NEC/ Glucosa 5 mM en BF N ₂	Lc-GA-NTC ² /NEC/BA O ₂	0.242	6.407	0.844
BCCnFE	GOx-GA-NTC/FCN ⁴ /NEC/ Glucosa 5 mM en BF N ₂	Lc-GA-NTC/ABTS ⁴ /NEC/ BA O ₂	0.3	3.494	0.685

1. Carbón Vulcan
2. Doble carga de NTC
3. Nanotubos de carbono comerciales
4. Ferrocianuro de Potasio
5. ABTS = 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

Como se observa en la tabla anterior los valores encontrados con las diferentes modificaciones no manifestaron resultados sobresalientes para lo que se buscaba, sin embargo sí reflejaron resultados interesantes que con el debido tiempo y dedicación se le puede dar seguimiento y una correcta interpretación.

En la Tabla 8 se muestran algunas de las bioceldas de combustible híbridas y enzimáticas que se han reportado en los últimos años que emplean electrodos basados en estructuras de carbono tridimensional, estructuras mesoporosas, estructuras porosas de oro y de carbón vítreo. Las enzimas empleadas son la GOx, GDH y MDG para la oxidación de glucosa algunas añadiendo el cofactor NAD⁺ o FAD y para la reducción de oxígeno Lc, Pt y BOD.

Tabla 8. Tabla comparativa de las Bioceldas de Combustible Híbridas y Enzimáticas más sobresalientes reportadas en la literatura.

Ánodo/anólito	Cátodo/catolito	VCA (V)	Densidad de Corriente($\mu\text{A cm}^{-2}$)	Densidad de Potencia ($\mu\text{W cm}^{-2}$)	Tipo de celda	Tamaño de poro	Referencia
GOx-hPG ¹ /BF 27.8 mM Glucosa	Lc-hPG/O ₂	0.58	30	6	Vaso	-	(Toit & Lorenzo, 2014)
MDH ² /L-malato BF 0.05M	O ₂	-0.035	-	-	-	A través	(Rincón, Lau, Garcia, & Atanassov, 2011)
1)Toray-GOx 2)Toray-GOx-Nafion/0.1 BF	Pt	1) 0.3 2)0.24	1)100 2)395	1) 10 2) 45	Flujo de 10 mL/min	-	(Tamaki & Yamaguchi, 2006)
a) GDH ³ /OMC ⁴ b) GDH/NTC (BF 0.1 M 6-0) 60 mM Glu-20mM-NAD ⁵⁺)	a) Lc/OMC b) GDH/NTC (BF 0.1 M 6-0) 60 mM Glu-20mM-NAD ⁺)	a) 0.82 b) 0.75	a) 63 b) 10	38.7 (0.54 V) 2.1 (0.46 V)	-	5 nm	(Zhou, y otros, 2009)
Nafion/GOx /ferroceno/3D-GNs ⁶ /GCE ⁷ (BA-O ₂ (pH 5.0 + 10 mM glucosa)	Nafion/Lc/3D-GNs-PTCA ⁸ -DA ⁹ /GCE (BA-O ₂ (pH 5.0 + 10 mM glucosa)	0.4	0.96	112	-	2-9	(Zhang, y otros, 2014)
BCC1. GOx/PVP ¹⁰ -[Os(N,N0-dialquilado-2,20-bis-imidazol) ₃] ^{2+/3+} BCC2. GOx/(PVP-Os(1,10-dimetil-2,20-biimidazol)2-2-[6-metilpiridina-2-imidazol] ^{2+/3+}) BCC3. GOx/(PVP-Os(1,10-dimetil-2,20-biimidazol)2-2-[6-metilpiridina-2-yl]imidazol) ^{2+/3+} 50 mM glucosa	BCC 1. BOD ¹¹ 1000 RPM BCC 2. BOD 1000 RPM BCC 3. BOD 100 mM BF pH 7.2 27 °C	BCC 1. 0.57 BCC 2. 0.55 BCC 3. 0.5	-	BCC 1. 202 BCC 2. 188 BCC 3. 125	Sin membrana	60-Carb(PHIPE) 1.7-50 ¹²	(Flexer, Brun, Destribats, Backov, & Mano, 2013)
GOx/OMC 10 mM Glu 0.1 M pH 7	Pt alambres 0.1 M BF pH 1	0.72	150	110	PEM	3. 6 nm (475 m ² g ⁻¹)	(Guo, Hu, Lou, & Li, 2010)
GOx-GA-NTC 5 mM Glu BF 0.1 M pH 7 (N2)	Pt/C/KOH 0.3 M (O2)	0.55	19.1 mA cm² ()	5.7 mW cm² ()	NEC		Este trabajo

AuAg 5mM Glu KOH 0.3 M	Lc-GA-NTC (O2) BA 0.1 M	0.91	33 mA cm⁻²	17 mW cm⁻²	NEC	Este trabajo
GOx-GA-NTC 5 mM Glu BF 0.1 M pH 7 (N2)	Lc-GA-NTC (O2) BA 0.1 M	0.44	11 mA cm⁻²	2.7 mW cm⁻²	NEC	Este trabajo

1. hPG = estructuras altamente porosas de oro
2. MDH = malato deshidrogenasa
3. GDH = glucosa deshidrogenasa
4. OMC = estructuras de carbono mesoporosas
5. NAD = nicotinamida adenina dinucleótido
6. GNs = redes de grafeno
7. GCE = electrodo de carbón vítreo
8. PTCA = Ácido 3,4,9,10-tetracarboxílico perileno
9. Da = dopamina
10. PVP = Polivinilpirrolidona
11. BOD = Bilirrubina oxidasa

En la tabla se puede observar que las bioceldas de combustible reportadas en este trabajo así como en trabajos del mismo grupo de investigación se posicionan en muy buenos lugares respecto a otros autores dentro de la comunidad internacional. Cabe destacar que aún faltan bastantes parámetros que mejorar en dichos dispositivos para poder hacerlos completamente biocompatibles así como estables y rentables.

7. Conclusiones

La enzima GOx, GOx-GA y GOx-GA-NTC fueron inmovilizados sobre dos diferentes estructuras de carbono tridimensional, NEC y Toray respectivamente. La GOx inmovilizada se logró identificar por medio de los picos característicos del cofactor FAD/FADH₂ en los potenciales de -0.63 V y -0.55, aproximadamente, para el pico de reducción y de oxidación respectivamente. Dichas señales son evidencia de la presencia de la enzima dentro de las estructuras de carbono. Asimismo, la cantidad de enzima inmovilizada aumenta un 67% cuando se agrega GA y NTC reflejándose en el incremento en la intensidad de corriente de la señal del cofactor.

La actividad de la GOx fue evaluada por la acción del mediador ferrocianuro de potasio en una solución amortiguadora de fosfatos encontrando que con el incremento de la concentración de glucosa en la solución ocurría un aumento en la corriente de oxidación correspondiente al mediador. Los electrones producidos por la oxidación de glucosa llevada a cabo por la enzima son transferidos directamente al mediador de ferrocianuro demostrando así la bioactividad del conjunto GOx-GA-NTC inmovilizado.

Se determinó que los nanotubos de carbono añadidos en la inmovilización de la GOx mejoraron notablemente la transferencia electrónica desde el centro catalítico de la enzima hacia la superficie del electrodo. En las pruebas de VPD, así como las realizadas en celda completa, se observó un incremento muy considerable en la densidad de corriente cuando se agregaban NTC al conjunto inmovilizado. La alta conductividad eléctrica de los NTC así como el acomodo conformacional que la enzima adopta cuando estos están presentes resultaron en una buena TDE.

Los bioánodos evaluados en BCCnFH y BCC μ FH presentaron diferentes curvas de polarización, diferencias provocadas por las propiedades intrínsecas de los materiales de los bioánodos. Mientras que con la NEC es posible obtener un VCA entre 0.3 y 0.55 V con el Toray se obtienen VCA de hasta 1.2 V, pero con éste material la densidad de corriente se ve disminuida entre 4 mA cm⁻², mientras que la NEC ofrece valores de hasta 40 mA cm⁻² aproximadamente.

Los bioánodos evaluados en BCCE utilizando cátodos de lacasa *Trametes versicolor*, Lc-GA-NTC, presentaron un VCA de 0.44, densidad de corriente de 11 mA cm⁻² y densidad de potencia de 2.7 mW cm⁻². Dichos resultados son bastante prometedores y alentadores ya que efectivamente

la actividad catalítica de la enzima GOx se ve incrementada con la combinación de GA y de NTC al ser inmovilizada en las estructuras de carbono tridimensional. Comparando estos resultados con los ofrecidos por la literatura hasta el momento se encuentra una nueva brecha de inmovilizar enzimas en este tipo de estructuras tridimensionales.

Estudios posteriores pueden efectuarse para mejorar el método de inmovilización dentro de las estructuras de carbono tridimensional, aumentar la cantidad de enzima inmovilizada así como aumentar el número de sitios activos en los electrodos. Asimismo, cabe destacar que la mejora continua en el diseño de las celdas de combustible microfluídicas siempre será un reto para la obtención de mayor energía.

8. Referencias

- Agüi, L., Yáñez-Sedeño, P., & Pingarrón, J. M. (2008). Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry. A review. . *Analytica Chimica Acta*, 11–47.
- Antolini, E. (2007). Catalysts for direct ethanol fuel cells. *Journal of Power Sources*, 1-12.
- Arjona, N., Dector, A., M. Guerra-Bálcazar, b. L.-C., Sabaté, N., Esquivel, J. P., Ledesma-García, J., & Arriaga, L. G. (2014). Effect of metal content on the electrocatalytic activity of AuPd mixtures and their use in a glucose membraneless microfluidic fuel cell. *RSC Advances*, 26158–26165.
- Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 23-29.
- Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S., & Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase — An overview . *Biotechnology Advances*, 489–501.
- Brena, B. M., & Batista-Viera, F. (2010). Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. En J. M. Guisán, *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells* (págs. 15-30). Humana Press.
- Bullen, R., Arnot, T., Lakeman, J., & Walsh, F. (2006). Biofuel cells and their development. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015–2045.
- Bullen, R., Arnot, T., Lakeman, J., & Walsh, F. (2006). Biofuel cells and their development . *Biosensors and Bioelectronics*, 2015-2045.
- Chen, R., He, Z., Li, L., Wu, F., Xu, B., & Xie, M. (2012). Pore Size Effect of Carbon Electrodes on the Electrochemical Double-Layer Capacitance in LiTFSI/2-Oxazolidinone Complex Electrolyte. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2594–2599.
- Chu, X., Zhu, X., Dong, Y., Chen, T., Ye, M., & Sun, W. (2012). An amperometric glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase on the platinum electrode modified with NiO doped ZnO nanorods. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 20-26.

- Cooney, M. J., Svoboda, V., Lau, C., Martin, G., & Minteer, S. D. (2008). Enzyme catalysed biofuel cells. *Energy & Environmental Science*, 320–337.
- Cracknell, J. A., Vincent, K. A., & Armstrong, F. A. (2008). Enzymes as Working or Inspirational Electrocatalysts for Fuel Cells and Electrolysis. *Chemical Reviews*, 2439–2461.
- EG&G Technical Services, I. (2004). *Fuel Cell Handbook*. USA: U.S. Department of Energy.
- Feng, W., & Ji, P. (2011). Enzymes immobilized on carbon nanotubes. *Biotechnology Advances*, 889-895.
- Flexer, V., Brun, N., Backov, R., & Mano, N. (2013). Designing highly efficient enzyme-based carbonaceous foams electrodes for biofuel cells. *Energy & Environmental Science*, 1302–1306.
- Flexer, V., Brun, N., Destribats, M., Backov, R., & Mano, N. (2013). A novel three-dimensional macrocellular carbonaceous biofuel cell. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 6437-6445.
- Gao, Q., Guo, Y., Zhang, W., Qia, H., & Zhang, C. (2011). An amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer GOx-SWCNT conjugate/redox polymer multilayer on a screen-printed carbon electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 219-225.
- Ghisla, S., & Massey, V. (1986). New flavins for old: artificial flavins as active site probes of flavoproteins. *Biochemical journal*, 1-12.
- Guo, C. X., Hu, F. P., Lou, X. W., & Li, C. M. (2010). High-performance biofuel cell made with hydrophilic ordered mesoporous carbon as electrode material . *Journal of Power Sources*, 4090–4097.
- Halámková, L., Halánek, J., Bocharova, V., Szczupak, A., Alfonta, L., & Katz, E. (2012). Implanted Biofuel Cell Operating in a Living Snail. *Journal of the American Chemical Society*, 5040–5043.
- Holzinger, M., Goff, A. L., & Cosnier, S. (2012). Carbon nanotube/enzyme biofuel cells . *Electrochimica Acta*, 179– 190.

- Hussein, A. K. (2015). Applications of nanotechnology in renewable energies — A comprehensive overview and understanding. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 460-476.
- Ivnitski, D., Branch, B., Atanassov, P., & Apblett, C. (2006). Glucose oxidase anode for biofuel cell based on direct electron transfer. *Electrochemistry Communications*, 1204–1210.
- Jensen, U. B., Lörcher, S., Vagin, M., Chevallier, J., Shipovskov, S., Koroleva, O., . . . Ferapontova, E. E. (2012). A 1.76 V hybrid Zn-O₂ biofuel cell with a fungal laccase-carbon cloth biocathode. *Electrochimica Acta*, 218-226.
- Jose, M. V., Marx, S., Murata, H., Koepsel, R. R., & Russell, A. J. (2012). Direct electron transfer in a mediator-free glucose oxidase-based carbon nanotube-coated biosensor. *C A R B O N*, 4 0 1 0 –4 0 2 0.
- Khan, A. Y., Noronha, S. B., & Bandyopadhyaya, R. (2014). Glucose oxidase enzyme immobilized porous silica for improved performance of a glucose biosensor. *Biochemical Engineering Journal*, 78–85.
- Kjeang, E., Djilali, N., & Sinton, D. (2009). Advances in Microfluidic Fuel Cells . En T. Zhao, *Micro Fuel Cells* (págs. 100-139). USA: ELSERVIER.
- Kjeang, E., Djilali, N., & Sinton, D. (2009). Microfluidic fuel cells: A review. *Journal of Power Sources*, 353–369.
- Lee, J. W., & Kjeang, E. (2013). Nanofluidic fuel cell. *Journal of Power Sources*, 472-477.
- Leskovac, V., Trivic, S., Wohlfahrt, G., Kandrak, J., & Pericina, D. (2005). Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 731–750.
- Liu, X., Zeng, X., Mai, N., Liu, Y., Kong, B., Li, Y., . . . Luo, S. (2010). Amperometric glucose biosensor with remarkable acid stability based on glucose oxidase entrapped in colloidal gold-modified carbon ionic liquid electrode . *Biosensors and Bioelectronics*, 2675–2679.

- Long, N. V., Hien, T. D., Asaka, T., Ohtaki, M., & Nogami, M. (2011). Synthesis and characterization of Pt-Pd alloy and core-shell bimetallic nanoparticles for direct methanol fuel cells (DMFCs): Enhanced electrocatalytic properties of well-shaped core-shell morphologies and nanostructures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 8478-8491.
- Luz, R. A., Pereira, A. R., Souza, J. C., Sales, F. C., & Crespilho, F. N. (2014). Enzyme Biofuel Cells: Thermodynamics, Kinetics and Challenges in Applicability. *ChemElectroChem*, 1751 – 1777.
- Maciel, A. C. (2015). *Estudio electrocatalítico de la enzima lacasa inmovilizada en estructuras de carbón tridimensional para su aplicación en celdas microfluídicas*. Querétaro: Universida Autónoma de Querétaro.
- Mahapatra, M. K., & Singh, P. (2014). Fuel Cells: Energy Conversion Technology. En T. M. Letcher, *FUTURE ENERGY. Improved, Sustainable and Clean Options for Our Planet*. (págs. 511-547). USA: ELSEVIER.
- Meredith, M. T., & Minter, S. D. (2012). Biofuel Cells: Enhanced Enzymatic Bioelectrocatalysis. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 157-79.
- Meyer, M., Wohlfahrt, G., Knäblein, J., & Schomburg, D. (1998). Aspects of the mechanism of catalysis of glucose oxidase: A docking, molecular mechanics and quantum chemical study. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 425-440.
- Minter, S. D., Liaw, B. Y., & Cooney, M. J. (2007). Enzyme-based biofuel cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 228–234.
- Molina, Á., Laborda, E., Rogers, E. I., Martínez-Ortiz, F., Serna, C., Limon-Petersen, J. G., . . . Compton, R. G. (2009). Theoretical and experimental study of Differential Pulse Voltammetry at spherical electrodes: Measuring diffusion coefficients and formal potentials. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 73-81.
- Ortiz-Ortega, E., Goulet, M.-A., Lee, J. W., Guerra-Balcázar, M., Arjona, N., Kjeang, E., . . . Arriaga, L. G. (2014). Nanofluidic direct formic acid fuel cell with combined flow-through and air-breathing electrode for high performance. *Lab on a Chip*, 4596-4598.

- Poulpiquet, A. d., Ciaccafava, A., & Lojou, E. (2014). New trends in enzyme immobilization at nanostructured interfaces for efficient electrocatalysis in biofuel cells. *Electrochimica Acta*, 104-114.
- Ramanavicius, A., Kausaite, A., & Ramanaviciene, A. (2005). Biofuel cell based on direct bioelectrocatalysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 1962–1967.
- Rao, C. N., & Govindaraj, a. A. (2011). *Nanotubes and Nanowires*. Royal Society of Chemistry.
- Rincón, R. A., Lau, C., Garcia, K. E., & Atanassov, P. (2011). Flow-through 3D biofuel cell anode for NAD⁺-dependent enzymes. *Electrochimica Acta*, 2503–2509.
- Roth, J. P., & Klinman, J. P. (2002). Catalysis of electron transfer during activation of O₂ by the flavoprotein glucose oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 62–67.
- Shan, S., Luo, J., Wu, J., Kang, N., Zhao, W., Cronk, H., . . . Zhong, C.-J. (2014). Nanoalloy catalysts for electrochemical energy conversion and storage reactions. *RSC Advances*, 42654–42669.
- Sharaf, O. Z., & Orhan, M. F. (2014). An overview of fuelcell technology: Fundamentals and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 810-853.
- Si, P., Huang, Y., & Ma, T. W. (2007). Nanomaterials for electrochemical non-enzymatic glucose biosensors . *RSC Advances*, 3487–3502.
- Strack, G., & Johnson, G. R. (2014). HIERARCHICAL MATERIALS ARCHITECTURES FOR ENZYMATIC FUEL CELLS. En H. R. LUCKARIFT, P. ATANASSOV, & G. R. JOHNSON, *ENZYMATIC FUEL CELLS: From Fundamentals to Applications* (págs. 181-207). New Jersey: John Wiley & Sons.
- Suk Bon Yoon, B. F.-S. (2009). Nanostructured Supported Catalysts for Low-Temperature Fuel Cells. En G. Wilde, *Nanostructured Materials* (págs. 173-231). Karlsruhe, Germany: ELSEVIER.
- Tamaki, T., & Yamaguchi, T. (2006). High-Surface-Area Three-Dimensional Biofuel Cell Electrode Using Redox-Polymer-Grafted Carbon. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 3050-3058.

- Toit, H. d., & Lorenzo, M. D. (2014). Glucose Oxidase Directly Immobilized onto Highly Porous Gold Electrodes for Sensing and Fuel Cell applications. *Electrochimica Acta*, 86-92.
- Villalpando, R. A. (2014). *Desarrollo de bioánodos a partir de glucosa oxidasa (GOx) para su aplicación en biomicroceldas que usan glucosa como combustible*. Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro.
- Wang, K., Yang, H., Zhu, L., Ma, Z., Xing, S., Lv, Q., . . . Xing, W. (2009). Direct electron transfer and electrocatalysis of glucose oxidase immobilized on glassy carbon electrode modified with Nafion and mesoporous carbon FDU-15. *Electrochimica Acta*, 4626–4630.
- Wong, C. M., Wong, K. H., & Chen, X. D. (2008). Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 927–938.
- Wu, B.-Y., Hou, S.-H., Yin, F., Zhao, Z.-X., Wang, Y.-Y., Wang, X.-S., & Chen, Q. (2007). Amperometric glucose biosensor based on multilayer films via layer-by-layer self-assembly of multi-wall carbon nanotubes, gold nanoparticles and glucose oxidase on the Pt electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 2854–2860.
- Xiao-Yu Yang, Tian, G., Jiang, N., & Su, B.-L. (2012). Immobilization technology: a sustainable solution for biofuel cell design. *Energy & Environmental Science*, 5540–5563.
- Xu, B., FengWu, Chen, S., Zhou, Z., Cao, G., & Yang, Y. (2009). High-capacitance carbon electrode prepared by PVDC carbonization for aqueous EDLCs. *Electrochimica Acta*, 2185–2189.
- Xue, C.-H., Zhou, R.-J., Shi, M.-M., Wu, G., Zhang, X.-B., Wang, M., & Chen, H.-Z. (2010). Electrochemistry of glucose oxidase immobilized on carbon nanotubes noncovalently functionalized by multihydroxyl and multicarboxyl groups. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 92-97.
- Yang, X.-Y., Tian, G., Jiang, N., & Su, B.-L. (2012). Immobilization technology: a sustainable solution for biofuel cell design. *Energy & Environmental Science*, 5540–5563.

- You, C., Xu, X., Tian, B., Kong, J., Zhao, D., & Liu, B. (2009). Electrochemistry and biosensing of glucose oxidase based on mesoporous carbons with different spatially ordered dimensions. *Talanta*, 705-710.
- Zhang, Y., Chu, M., Yang, L., Tan, Y., Deng, W., Ma, M., . . . Xie, Q. (2014). Three-Dimensional Graphene Networks as a New Substrate for Immobilization of Laccase and Dopamine and Its Application in Glucose/O₂ Biofuel Cell . *Applied Materials & Interfaces*, 12808–12814.
- Zhao, H.-Z., Sun, J.-J., Song, J., & Yang, Q.-Z. (2010). Direct electron transfer and conformational change of glucose oxidase on carbon nanotube-based electrodes. *C A R B O N*, 1508–1514.
- Zhou, M., & Dong, S. J. (2011). Bioelectrochemical Interface Engineering: Toward the Fabrication of Electrochemical Biosensors, Biofuel Cells, and Self-Powered Logic Biosensors. *Accounts of chemical research* , 1232–1243.
- Zhou, M., Deng, L., DanWen, Shang, L., Jin, L., & Dong, S. (2009). Highly ordered mesoporous carbons-based glucose/O₂ biofuel cell. *Biosensors and Bioelectronics*, 2904–2908.

9. Anexos

9.1 Abreviatura

BCC	Biocelda de combustible
BCCE	Biocelda de combustible enzimática
BCCnF	Biocelda de combustible nanofluídica
BCCμF	Biocelda de combustible microfluídica
CC	Celda de combustible
CnF	Celda nanofluídica
CμF	Celda microfluídica
GA	Glutaraldehído
GOx	Glucosa oxidasa
h	Hora
J	Densidad de corriente
mM	Mili molar
mL	Mili litro
min	Minutos
NEC	Nanoespuma de carbono
NTC	Nanotubos de carbono
NTCMP	Nanotubos de carbono multi pared
L	Litros
TDE	Transferencia directa de electrons
TME	Transferencia mediada de electrones
VC	Voltametría cíclica
VPD	Voltametría de pulso diferencial
VCA	Voltaje de circuito abierto
W	Potencia
μm	Micrometros

9.2 Productividad

9.2.3. Producción científica:

Three-dimensional air-breathing nanofluidic fuel cells: hybrid and bio cells for high performance.

9.3.4. Reconocimientos, congresos y premios



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE
QUERÉTARO



CONCYTEQ



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



**VERANO
DE LA CIENCIA**
UAQ - 2014

IMPULSANDO EL TALENTO
Y LA VOCACIÓN CIENTÍFICA
EN LAS CIENCIAS EXACTAS
Y LAS HUMANIDADES

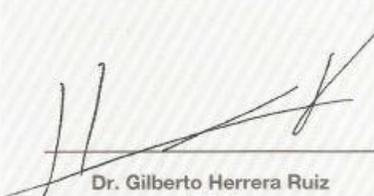
La UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
y el COMITE ORGANIZADOR
otorga el presente

RECONOCIMIENTO

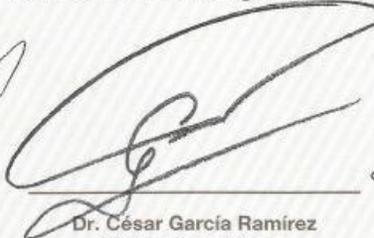
A Julio César Espinosa Ángeles

Por obtener el **Segundo Lugar** del Concurso de Cartel Científico con el título:
**INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA EN UNA ESTRUCTURA DE
CARBÓN TRIDIMENSIONAL.**

Querétaro, Qro., agosto de 2014.



Dr. Gilberto Herrera Ruiz
Rector



Dr. César García Ramírez
Secretario Académico



Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado



UASLP
Universidad Autónoma
de San Luis Potosí



UNIVERSIDAD
DE GUANAJUATO



CONACYT

El Comité Organizador del Verano de la Ciencia de la Región Centro
otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a Julio César Espinosa Angeles

Por su participación en la modalidad de **Cartel** del

7° Congreso del Verano de la Ciencia de la Región Centro

que se llevó a cabo el 11 y 12 de septiembre de 2014,
en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P, México.

Dr. Salvador Hernández Castro

Director de Apoyo a la Investigación y al Posgrado
Universidad de Guanajuato

Dr. Jorge Fernando Toro Vazquez

Secretario de Investigación y Posgrado
Universidad Autónoma de San Luis Potosí



El Comité Organizador de

16° VERANO DE LA CIENCIA DE LA REGIÓN CENTRO 2014

Otorga la presente

CONSTANCIA

a

Julio César Espinosa Ángeles

Por su participación como Estudiante Visitante

Del 2 de junio al 1 de agosto de 2014.

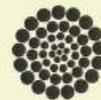
Dr. Miguel Torres Cisneros
Presidente del Comité Organizador

Dr. Jorge Fernando Toro Vazquez
Secretario Técnico del Comité Organizador





UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE
QUERÉTARO



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

A TRAVÉS DE LA DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Otorgan la presente

Constancia

A

Julio César Espinosa Ángeles

POR OBTENER EL

SEGUNDO LUGAR

DEL ÁREA CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS, MODALIDAD PONENCIA ORAL, NIVEL LICENCIATURA

CON LA PONENCIA TITULADA

Inmovilización de glucosa oxidasa sobre estructuras de carbón 3-d y su evaluación en una celda de combustible híbrida nanoflúidica.



Dr. Gilberto Herrera Ruiz
Rector de la Universidad Autónoma de Querétaro



Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Santiago de Querétaro, Qro., a 5 y 6 de Noviembre de 2014.