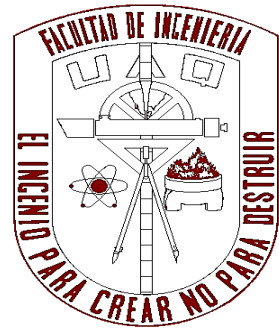




**Universidad Autónoma
de Querétaro**

Facultad de Ingeniería



**“Modificación de nanoestructuras de carbón para la
inmovilización dirigida de la enzima lacasa y su
aplicación en bioceldas de combustible.”**

Tesis de Licenciatura

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

Ingeniero en Nanotecnología

Presenta:

Fernando Ávalos Velázquez

**Director de Tesis:
Dr. Escalona Villalpando
Ricardo Antonio**

**Codirectora de Tesis:
Dra. Ledesma García Janet**

**Santiago de Querétaro, Qro.
Junio 2022**



Universidad Autónoma de Querétaro



Facultad de Ingeniería.

“Modificación de nanoestructuras de carbón para la inmovilización dirigida de la enzima lacasa y su aplicación en bioceldas de combustible.”

Tesis

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

Ingeniero en Nanotecnología

Presenta:

Fernando Avalos Velázquez

Dirigido por:

Dr. Ricardo Antonio Escalona Villalpando

Codirigido por:

Dra. Janet Ledesma García

Dr. Ricardo Antonio Escalona Villalpando
Presidente

Ricardo Antonio Escalona U
Firma

Dra. Janet Ledesma García
Secretario

[Signature]
Firma

Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña
Vocal

[Signature]
Firma

Dr. José Roberto Espinosa Lumbreras
Suplente

[Signature]
Firma

Resumen

En el presente proyecto se modificaron nanoestructuras de carbón (Carbón Vulcan y Nanofibras de Carbono) con niacina y ácido antraceno-9-carboxílico, para la inmovilización dirigida de la enzima lacasa y su implementación en biocátodos de papel toray. Para lo anterior, se hidroxilaron las nanoestructuras de carbón por la reacción de fenton, para posteriormente ser funcionalizadas por una reacción de esterificación con $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ o $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ como catalizador. Específicamente en el caso de las nanofibras, se realizó una síntesis adicional diferente a las anteriores, usando cloruro de oxalilo (buscando hacer más reactiva a la niacina y al ácido antraceno-9-carboxílico). De los métodos anteriores, se encontró que el $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ tuvo mejores resultados que el $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ y hablando de las nanofibras en las que se utilizó el cloruro de oxalilo como reactivo, no se encontró una mejora en comparación con los otros métodos.

Una vez se eligió el método de síntesis más conveniente, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ como catalizador y ácido antraceno-9-carboxílico como modificador, se procedió a implementar este método de inmovilización para un nuevo diseño de biocelda de combustible. Este diseño de celda al que llamaremos “Celda de Gravedad”, funciona manteniendo el flujo de alimentación aprovechando la fuerza de la gravedad, con el fin de no utilizar una fuente de energía externa que movilice el combustible.

En la celda de gravedad, se utilizó el método previamente establecido para la fabricación del biocátodo, mientras que el bioánodo fue proporcionado por el Laboratorio Nacional de Micro y Nanofluídica (LabMyN). Para el bioánodo se inmoviliza a la enzima glucosa oxidasa por entrecruzamiento y se usa ferroceno como intermediario electroquímico. Esta celda mostró funcionar correctamente, obteniendo un potencial de circuito abierto de 0.37V y una densidad de potencia de $2.4 \mu W/cm^2$.

Palabras clave: Biocelda de combustible, carbón vulcan, nanofibras de carbono, niacina, ácido antraceno-9-carboxílico, lacasa, celda de gravedad.

Summary

In this project, carbon nanostructures (Vulcan Carbon and Carbon Nanofibers) were modified with niacin and anthracene-9-carboxylic acid, for the oriented immobilization of the laccase enzyme and its implementation in toray paper biocathodes. In order to achieve this, the carbon nanostructures were hydroxylated by the fenton reaction, to later be functionalized by an esterification reaction with $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ or $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ as catalyst. Specifically in the case of nanofibers, an additional synthesis different from the previous ones was carried out, using oxalyl chloride (seeking to make niacin and anthracene-9-carboxylic acid more reactive). Of the above methods, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ was found to have better results than $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ and speaking of the nanofibers in which oxalyl chloride was used as reagent, no improvement was found compared to the other methods.

Once the most convenient synthesis method was chosen, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ as catalyst and anthracene-9-carboxylic acid as modifier, this immobilization method was implemented for a new biofuel cell design. This cell design, which will be called “Gravity Cell”, works by maintaining the flow of combustible by taking advantage of the force of gravity, in order not to use an external energy source to move the fuel.

In the gravity cell, the previously established method for manufacturing the biocathode was used, while the bioanode was provided by the National Laboratory of Micro and Nanofluidics (LabMyN). For the bioanode, the glucose oxidase enzyme is immobilized by crosslinking and ferrocene is used as an electrochemical intermediate. This cell was shown to function correctly, obtaining an open circuit potential of 0.37V and a power density of $2.4 \mu W/cm^2$.

Keywords: Biofuel cell, vulcan carbon, carbon nanofibers, niacin, anthracene-9-carboxylic acid, laccase, gravity cell.

Dedicatoria

*Al niño que fui,
Porque aún te debo muchas cosas,
Pero estoy en camino de cumplirlas ...*

*... A mis padres, hermanas y mi tío Sergio,
Porque más allá de lo difícil que llego a ser
Siempre me han apoyado ...*

*... A mis amigos dentro y fuera de la carrera,
Por los momentos felices que pasamos
Y que espero sigamos teniendo ...*

*... A todos los que me apoyaron
En cualquier área y momento
Gracias por su ayuda altruista ...*

*... Finalmente, a mi yo del futuro,
No sé qué decisiones tomaste o
Que es lo que estás haciendo ahora,
Pero recuerda que todo lo que has hecho para ti
No debe causarte arrepentimiento, sigue adelante y encuentra tu camino.*

Agradecimientos

“Sigue al objetivo, no a la gente”

-Juan Comparán

Pocas veces una frase queda graba en mi mente, como lo hizo la que abre esta sección. Desde que la escuche del autor mexicano Juan Comparan, intento cumplir todas mis metas y hasta el momento lo he hecho bastante bien. Pero mentiría al decir que lo he conseguido sin ayuda, ya que parafraseando un dicho atribuido a Newton:

“Si he logrado ver más allá de los que han visto los que vinieron detrás de mí, no es porque sea más hábil o tenga una mejor vista, es porque estoy parado sobre los hombros de gigantes”

Soy lo que soy gracias a las personas que está y han estado cerca de mí. Por eso quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Ricardo Escalona, siempre me tuvo paciencia y confianza. Cuando cometí algún error o no supe que hacer, recibí su apoyo y guía, así como sus consejos que siempre tienen el objetivo de ayudarme. También a la Dra. Janet Ledesma, mi codirectora, quien estuvo al pendiente para auxiliarme en lo que fuera necesario.

A mis compañeros de laboratorio Ari, con quien siempre pude platicar y pasar el rato mientras realizaba mis experimentos, por regalarme de sus electrodos y convertirse en mi amiga y Arrúan, quien nunca se quejó de mí, a pesar de que varias veces tenía que trabajar de más por ayudarme. También a mis compañeros de universidad: Lore, Ximena, André, Alex, Johan y Solecito, a quienes conocí desde el inicio de la carrera y con quienes he pasado muchos buenos momento; así como Irasemiaw, Yess, Gio, Santi y Citlali F. , agradezco haberles conocido en el transcurso de la carrera, las clases se volvían más amenas con ustedes, ojalá este no sea un adiós con ninguno.

A mi *alma mater*, la Universidad Autónoma de Querétaro, por darme las herramientas para desarrollarme como profesionista y como persona; así como a los maestros que me impactaron tanto a nivel tanto académico como personal, en especial a: el Dr. J.J. Trejo, la Dra. Alejandra Álvarez, la Dra. Karen Esquivel, la Dra. Guadalupe Ferreira, el Dr. Héctor Pool, la Dra. Xóchitl Pastrana y el Dr. Rodrigo Velázquez, porque son un ejemplo de cómo debe ser la docencia y de calidad humana.

A CIDESI por permitirme realizar las prácticas profesionales en su institución, en especial a la MC. Viridiana Humarán, quien me trato de forma amable y respetuosa, además de que siempre fue muy considerada conmigo y de quién aprendí muchas dentro y fuera del ámbito profesional. También a los doctores Iván García y Enrique Martínez, ya que sin su apoyo no podría haber disfrutado de la grata experiencia que fue ser becario en CIDESI.

A los amigos que siempre tengo en mente: A Chuy, tanto mi amigo de la niñez como a mi amigo actual, no soy de creer en el destino pero que ambos compartan el mismo nombre y sean de las personas que más me han apoyado, creo que es de las coincidencias más gratas de mi vida. Chuy Martínez tiene mucho que no te veo, pero espero volverte a encontrar. Chuy Lagunas gracias por no dejar de lado nuestra amistad y siempre considerarme, aunque esté lejos. A Ivette, sé que no siempre soy el amigo que necesitas, pero siempre estaré para apoyarte. A Elí, Jully, Gera y Emmy por todos los momentos divertidos y felices que pasamos.

A los que ya no están, sé que nunca podrán leer esto, pero no me sentiría bien conmigo mismo si los excluyera. A mi tío Enrique, que sé que sería de los más felices si me viera terminar mi carrera, a mi abuela Carmen que a pesar de no entender que estudiaba siempre se interesaba por cómo iba en la escuela, a Juana que siempre me alegraba con sus historias y que si estuviera aquí no dudaría en felicitarme, y Yolanda sé que me prepararía un pastel azteca para celebrar.

A mí familia, gracias a mi abuela Juana y a mis tíos que siempre me han apoyado: tío Sergio, tío Mono, tía Caridad, tía Elena y tía Fanny. A mis primas, primos, sobrinos, sobrinas y demás que me tienen en mente y a quienes mencionaría, pero tengo miedo de dejar a alguien fuera. A Belén, que me cuidó de niño con mucha paciencia y amor.

A mi hermana Karina, que me aguantó y a quien aguanté desde que nos mudamos a Querétaro, quien diría que sería tan diferente vivir nosotros solos sin nuestros papás; gracias por todas las veces que me apoyaste con buena actitud, pero te agradezco aún más cuando me ayudaste enojada o harta de mí, en esos momentos supe que siempre podría contar contigo. A mi hermana Eve, gracias por motivar muchas de las locuras que hago, tú has sido muchas veces, consciente o inconscientemente, ese último empujoncito que necesitaba para hacer las cosas, sigues haciendo que mis papás me regañen por cosas que haces (o que no haces) y realmente eso me divierte más de lo que me enoja, me recuerda mucho cuando éramos niños. Quiero que sepan ambas que, para mí, es loable la dedicación que le dan a todo lo que se proponen, cada una a su manera y con su propio estilo me han dejado claro que merecen lo que tienen y más.

A mis padres Fernando y María, gran parte de lo que soy es por ustedes, desde aprender a como caminar y hablar, hasta terminar mi carrera es porque siempre están ahí para mí. Pocas veces recibí algún regaño o prohibición de su parte y las veces que pasó, fue con ustedes buscando lo mejor para mí. Se dice que nadie enseña a ser padre y que no hay escuela para aprenderlo, pero yo les pido que tengan en cuenta que pasa lo mismo para ser hijo, si alguna vez he hecho algo que los hizo sentir mal o fui más imprudente de lo que ya soy habitualmente, les pido perdón; ustedes saben que no soy tan expresivo como mis hermanas y mucho menos digo seguido lo que siento, pero en caso de que necesiten saberlo por mí, no desearía tener otros padres, no cambiaría ningún momento bueno ni malo, realmente agradezco tenerlos conmigo, espero realmente ser el hijo que ustedes merecen o al menos estar en camino para serlo.

Finalmente, a todos esos investigadores que se encuentran en mis referencias, son muchos para mencionarlos individualmente, pero sin ellos este trabajo no sería posible.

Índice General

1. ANTECEDENTES.	5
1.1. LACASA.	6
1.1.1. ESTRUCTURA Y MECANISMO DE REACCIÓN.	6
1.1.2. INMOVILIZACIÓN Y APLICACIONES DE LA LACASA.	11
1.2. BIOCELDAS DE COMBUSTIBLE.	16
1.2.1. NANOMATERIALES EN BIOCELDAS DE COMBUSTIBLE.	18
BIOCELDAS DE COMBUSTIBLE ENZIMÁTICAS BASAS EN CNTS.	18
BIOCELDAS DE COMBUSTIBLE ENZIMÁTICAS BASAS EN OTROS NANOMATERIALES DE CARBONO.	18
BIOCELDAS DE COMBUSTIBLE ENZIMÁTICAS BASAS EN NANOPARTÍCULAS DE ARCILLAS.	19
BIOCELDAS DE COMBUSTIBLE ENZIMÁTICAS BASAS EN NANOPARTÍCULAS DE METÁLICAS.	19
1.2.2. BIOCELDAS DE COMBUSTIBLE BASADAS EN LA ENZIMA LACASA.	19
CÁTODO PLANO DE ORO MODIFICADO CON AUNPs CON LACASA INMOVILIZADA.	20
BFC CON PUNTOS CUÁNTICOS DE CARBONO (CNDs) COMO SOPORTE EN LOS ELECTRODOS.	20
CÁTODO DE LACASA ENTRAMADA A UNA PARED SIMPLE DE NANOTUBOS DE CARBONO CARBOXILADOS.	21
BFC DE ENZIMA ÚNICA (LACASA).	22
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	23
3. JUSTIFICACIÓN.	24
4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.	25
4.1. HIPÓTESIS.	25
4.2. OBJETIVO GENERAL.	25
4.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	25
5. METODOLOGÍA.	26
5.1. MATERIALES.	26
5.2. MÉTODOS	26
5.2.1. FUNCIONALIZACIÓN DE LAS NANOESTRUCTURAS DE CARBÓN.	26
HIDROXILACIÓN POR REACCIÓN DE FENTON.	26
ESTERIFICACIÓN CON $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ COMO CATALIZADOR.	27
ESTERIFICACIÓN CON $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ COMO CATALIZADOR.	28
ESTERIFICACIÓN USANDO CLORURO DE OXALILO.	28
5.2.2. INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA LACASA.	29
5.2.3 PREPARACIÓN DE LOS BIOELECTRODOS.	29
5.2.4 PREPARACIÓN DE LA CELDA DE COMBUSTIBLE.	30
5.2.2. EVALUACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LOS ELECTRODOS.	31
SISTEMA DE EVALUACIÓN ELECTROQUÍMICA	31
MÉTODOS DE EVALUACIÓN ELECTROQUÍMICA	32
6. RESULTADOS	33
6.1. FUNCIONALIZACIÓN DE LAS NANOESTRUCTURAS DE CARBÓN	33
6.2. CÁTODOS OBTENIDOS	35
6.3. INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA LACASA SOBRE NANOFIBRAS DE CARBONO	36
6.4. INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA LACASA SOBRE CARBÓN VULCAN	37
6.5. SELECCIÓN DEL MATERIAL PARA LA CELDA DE GRAVEDAD	39
6.6. PRUEBAS DE LA CELDA DE GRAVEDAD	41
6.6.1. VALIDACIÓN DE LA CELDA	42
7. CONCLUSIONES	45
8. PERSPECTIVAS A FUTURO	46
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	47

Índice de Figuras

Figura 1 Función de la lacasa, adaptado de Janusz et al.	6
Figura 2 Dominios y centros activos de la Lacasa. Adaptado de Mehra et al.	7
Figura 3 Representación esquemática del ciclo catalítico de lacasa.	8
Figura 4 a) Reacción catalítica de la lacasa. b) Ciclo catalítico de la lacasa. "S" representa una molécula de sustrato en su forma reducida. Extraído de Vaz Domínguez.	9
Figura 5 Mecanismo de reducción de O_2 a H_2O por las Lacasa. Adaptado de Mot & Silaghi-Dumitrescu.	10
Figura 6 Modelo de mediador (Martínez Ruiz, 2015).	11
Figura 7 Tipos de inmovilización	12
Figura 8 Esquema representativo de a) Celda típica de combustible b) Biocelda de combustible enzimática. Adaptada de Luz et al.	17
Figura 9 Representación esquemática de cátodo de oro modificado con AuNPs y lacasa, se presentan también el potencial alcanzado. Extraído de Krikstolaityte et al.	20
Figura 10 BFC con CNDS como electrodos, múltiples enzimas inmovilizadas en el ánodo y lacasa inmovilizada del cátodo. Adaptado de Wu et al., 2017.	21
Figura 11 Esquema de cátodo de lacasa entramada a una pared simple de nanotubos de carbono carboxilados. Adaptado de Kim et al.	21
Figura 12 Diagrama de una BFC de enzima única. Adaptado de Ji et al.	22
Figura 13 Esquema del "Bolsillo" hidrofóbico de la lacasa .Adaptado de Elouarzaki et al.	23
Figura 14 Esquema de nanoestructuras hidroxiladas.	27
Figura 15 Modificación con moléculas aromáticas con <i>CoCl2</i> (simplificación).	27
Figura 16 Modificación con moléculas aromáticas con <i>FeCl3</i> (simplificación).	28
Figura 17 Modificación con cloruro de oxalilo (simplificación).	29
Figura 18 Dimensiones de los electrodos de prueba.	30
Figura 19 Dimensiones de la celda de gravedad.	30
Figura 20 Sistema de configuración de tres electrodos.	31
Figura 21 Configuración de la celda de gravedad.	32
Figura 22 Formación del complejo con <i>CoCl2</i> como catalizador.	33
Figura 23 Reacción con cloruro de oxalilo	34
Figura 24 Apariencia general de las nanoestructuras obtenidas.	35
Figura 25 Electrodos de prueba	35
Figura 26 Voltamperometría Cíclica de los electrodos de CNFs	36
Figura 27 Voltamperometría Cíclica de los electrodos de CV.	38
Figura 28 Prueba s en solución tampón sin modificar, saturada con N_2 y saturada con O_2	39
Figura 29 Prueba de respuesta a cloruros.	40
Figura 30 Curvas de descarga a diferentes concentraciones de glucosa	41
Figura 31 Celda de gravedad en funcionamiento.	42
Figura 32 Curvas de descarga de la celda de gravedad a distintas concentraciones de glucosa.	43
Figura 33 Densidad de potencia y carga a 10mM de glucosa.	44

Índice de Tablas

Tabla 1 Inmovilización por unión covalente directa .	13
Tabla 2 Inmovilización por atrapamiento físico.	14
Tabla 3 Inmovilización por adsorción física.	14
Tabla 4 Inmovilización por entrecruzamiento.	15
Tabla 5 Resultados de inmovilización en CNFs	37
Tabla 6 Resultados de inmovilización en CV	38
Tabla 7 Resumen de celdas de combustible GOx-Lacasa	44

1. Antecedentes.

El uso de enzimas ha estado presente en la humanidad prácticamente desde sus inicios; cuando las tribus dejaron de ser nómadas y comenzaron a crear asentamientos, surgió la necesidad de generar métodos para preservar sus alimentos por más tiempo, para así tener productos en las épocas más frías cuando existe una menor capacidad de encontrar y generar recursos, para ello, entre algunos otros mecanismos, emplearon la acción enzimática de algunos microorganismos para mantener la viabilidad de sus alimentos, aún sin entender del todo que estaban haciendo (Vogel & May, 2019).

Con el tiempo se sofisticaron los métodos utilizados, hasta llegar a la forma actual de fermentar lácteos y semillas o de ablandar carne (por mencionar algunos ejemplos), pero la aplicación de las enzimas no se quedó solo en el área de los alimentos, con el avance de la humanidad, avanzó también la comprensión de las enzimas y con ello, las aplicaciones de estas mismas para diversas áreas como son: generación de pigmentos, eliminación/degradación de moléculas, sensores de moléculas orgánicas e inorgánicas, producción de fármacos, entre otras.

A pesar de la gran utilidad que presentan las enzimas, existe un problema intrínseco a su naturaleza, cuando las enzimas son extraídas de su organismo de origen, es necesario estabilizarlas o debido a su procedencia proteica corren el riesgo de desnaturalizarse, lo que resulta en la pérdida parcial o total de su actividad catalítica y con ello su aplicación se vuelve compleja. Afortunadamente, existen métodos para sobrellevar la situación anterior, y es posible mantener en cierta medida las características de las enzimas.

Entre la gran cantidad de enzimas que existen en la naturaleza, la lacasa presenta propiedades muy interesantes que motivaron el presente trabajo; así mismo, el empleo de materiales nanoestructurados para inmovilizar enzimas como técnica de estabilización, es de gran utilidad debido a los prometedores resultados que han mostrado en diversas áreas (Cosnier et al., 2013).

1.1.Lacasa.

La lacasa (EC 1.10.3.2) pertenece al grupo de las oxidorreductasas que actúan oxidando los p-difenoles o sustancias relacionadas y sobre la molécula de oxígeno reduciéndola a agua. Esta enzima, fue aislada por primera vez de la savia del árbol de laca japones *Rhus vernicifera* y es la responsable, entre otras cosas, del endurecimiento en contacto con el aire de la laca (Yoshida, 1883).

Con el tiempo se ha encontrado la lacasa en diferentes especies de plantas, hongos, insectos y arqueas, donde actúa con diferentes fines como se muestra en la Figura 1, pero manteniendo la generalidad de su estructura y mecanismo de reacción (Janusz et al., 2020).

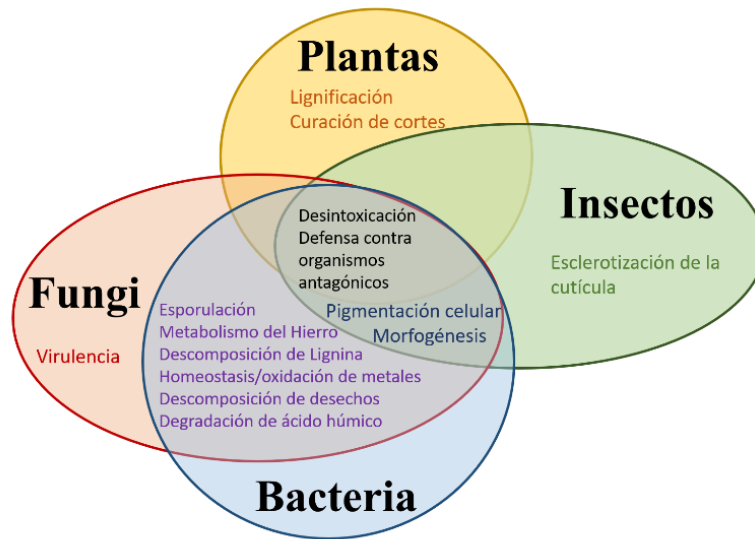


Figura 1 Función de la lacasa, adaptado de Janusz et al (Janusz et al., 2020)

1.1.1. Estructura y mecanismo de reacción.

La lacasa es una holoenzima cuyo cofactor es el cobre, puede encontrarse en monómeros, dímeros o tetrameros y se encarga de la reducción por cuatro electrones del oxígeno molecular a agua, por la oxidación consecutiva de un electrón, de uno o varios sustratos (Messerschmidt et al., 1989).

La estructura de la lacasa consiste en tres dominios que dan soporte a la enzima, contiene 4 cobres catalíticos de los cuales uno se localiza en el sitio T1 (denominado como Cu T1) y los tres restantes forman el centro trinuclear en el sitio T2/T3 (se denominan para su diferenciación como Cu T2, Cu T3 α y Cu T3 β), el sitio T1 se encuentra en el tercer dominio cercano a la superficie de la proteína, mientras que el sitio T2/T3 se encuentra en la interfase entre el primer y el tercer dominio (Mehra et al., 2018), en la Figura 2 se puede observar esquemáticamente la estructura de la enzima resaltando los dominios y los sitios catalíticos.

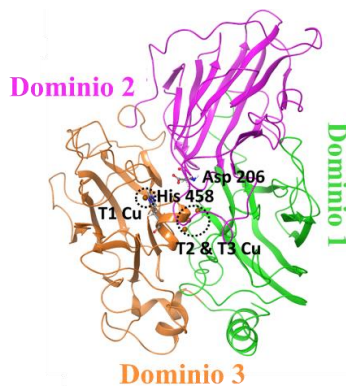


Figura 2 Dominios y centros activos de la Lacasa. Adaptado de Mehra et al (2018).

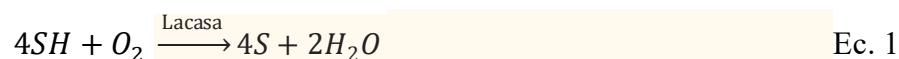
El Cu T1 se encuentra con un estado de oxidación 2+ y es el responsable del color azul característico de la enzima, en virtud de su absorbancia a 600 nm ($\epsilon = 5000M^{-1}cm^{-1}$); así mismo, está coordinado con dos histidinas, una cisteína y una metionina como ligandos. El sitio T2 se constituye de un catión Cu^{2+} que no confiere color, pero es detectable por resonancia paramagnética electrónica (EPR) y está ligado a dos histidinas y agua. Sin embargo, los dos cationes Cu^{2+} del sitio T3 son indetectables por EPR, debido al fuerte acoplamiento antiferromagnético mantenido por un puente hidroxilo y las 3 histidinas que coordinan los átomos (Dwivedi et al., 2011).

Debido a la estructura y propiedades de los centros de cobre, las lacasas se pueden dividir en lacasas de potencial redox bajo, medio y alto. Las lacasas de basidiomicetos (especialmente las del hongo blanco) suelen ser lacasas de alto potencial redox, mientras que las lacasas procedentes de bacterias y plantas son ejemplos de lacasas con menor potencial redox.

Las lacasas de potencial bajo, son aquellas que presentan un potencial redox menor a 460 mV, las lacasas de potencial medio tienen un potencial en el rango de 460-710 mV y las lacasa de potencial alto presentan un potencial redox mayor a 710 mV (Mot & Silaghi-Dumitrescu, 2012).

La distribución de cargas sobre la superficie de la lacasa de *T. versicolor*, manifiesta una carga predominante negativa, confirmada con su punto isoeléctrico (pI) ácido en torno a pH 3.5. Gracias a la estructura cristalina del complejo enzima sustrato, es conocido que el sustrato se une por una pequeña cavidad cargada negativamente cercana al cobre T1. Las cargas negativas localizadas en este sitio podrían tener una significativa funcionalidad, debido a que pueden ser las responsables de estabilizar los productos catiónicos resultantes del ciclo catalítico (Martínez Ruiz, 2015).

La forma más simple de describir el mecanismo de reacción de la lacasa, podría ser denotando la ecuación de la reacción que cataliza:



En la ecuación anterior (Ec. 1), se resume la acción catalítica de la enzima, pero no resulta muy útil para la descripción detallada del mecanismo de reacción, por lo que es posible escalar un poco describiendo los cambios en estado de oxidación y generación de productos como se muestra en la Figura 3.

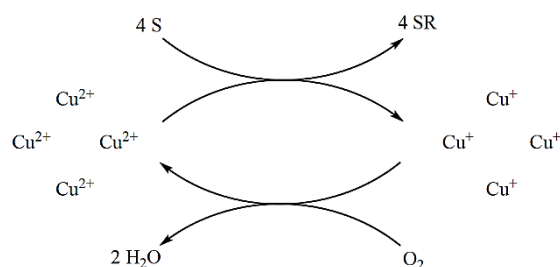


Figura 3 Representación esquemática del ciclo catalítico de lacasa (Riva, 2006).

Ahora, es más fácil observar la manera en que actúa la enzima lacasa, se puede decir que de manera general, cada uno de los cuatro cobres acepta un electrón oxidando a un sustrato cada uno (es posible que cada sustrato pueda oxidarse en más de una ocasión), posterior a la reducción

total del grupo de cobres, se produce la oxidación de la lacasa por la molécula de oxígeno produciendo dos moléculas de agua y regresando al estado original de la lacasa.

En la Figura 4a se puede observar una representación simplificada en 2D, donde se marca la oxidación del sustrato en T1, para posteriormente reducir a Cu T2 y a los Cu T3. Este esquema permite distinguir, que los sitios de oxidación y reducción se encuentran paralelos el uno del otro. Ahora bien, en la Figura 4b se observa una mejor descripción de los pasos del proceso catalítico. Iniciando del intermedio nativo, se encuentran dos rutas; en la primero, se pasa a la forma reducida de la lacasa tras la oxidación de 4 moléculas de sustrato y formación de una molécula de agua que se localizará en el medio de los Cu T3.

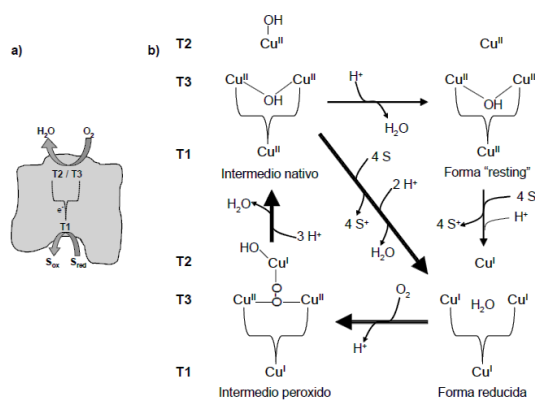


Figura 4 a) Reacción catalítica de la lacasa. b) Ciclo catalítico de la lacasa. "S" representa una molécula de sustrato en su forma reducida. Extraído de Vaz Domínguez. (2009).

La segunda vía, sucede cuando no hay una gran cantidad de sustrato (aunque también ocurre en presencia alta de sustrato, pero en una proporción muy baja), ocasionando la desaparición del grupo hidroxilo coordinado al Cu T1, lo que lleva a la enzima a la forma "resting" la cual en presencia de sustrato y tras un tiempo de semivida relativamente alto (cerca de 13 s (Messerschmidt, 1997)) pasa a la forma reducida. Ambas vías convergen en la forma reducida de la lacasa, pasan al intermedio peróxido, denominado así por la coordinación de la molécula de oxígeno a los Cu T3 y T2, posteriormente y con la incorporación de 3 protones, se genera la segunda molécula de agua regresando al intermedio nativo de la enzima.

Solomon et al. (1996) proponen dos métodos diferentes para la transferencia de electrones del Cu T1 al centro trinuclear T2/T3; en el primero, los electrones captados en el Cu T1 son transferidos uno a uno directamente a los Cu T3 y Cu T2, mientras que en el segundo, el Cu T1 pasa los electrones al Cu T2 que secuencialmente lleva los electrones a los Cu T3. Esta descripción más profunda puede observarse en la Figura 5, donde se muestran ambas alternativas junto con una expansión del mecanismo de reacción presentado anteriormente en la Figura 4b.

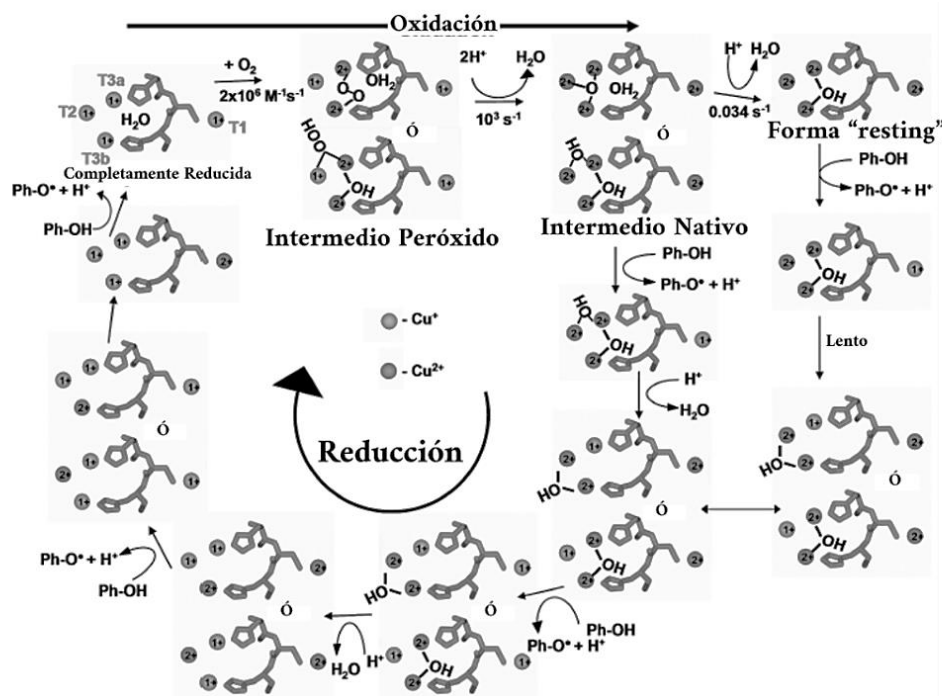


Figura 5 Mecanismo de reducción de O_2 a H_2O por las Lacasa. Adaptado de Mot & Silaghi-Dumitrescu (2012)

Finalmente, para poder aprovechar al máximo posible la acción de la lacasa, resulta importante conocer los dos tipos de procesos por los que puede oxidar a un sustrato; en principio, la lacasa a pesar de ser una enzima, no presenta una alta especificidad, pudiendo actuar sobre varios sustratos siempre que sean p-difenoles o sustancias relacionadas, pero además la lista de sustratos se ve ampliada si introducimos algún intermediario a la ecuación.

La forma de oxidación de p-difenoles y sustancias relacionadas, a la que se denomina forma directa, ya fue presentada con anterioridad, los cuatro cobres oxidan directamente al sustrato y generan dos moléculas de agua. Mientras que, en una segunda forma, la lacasa oxida un sustrato que le es afín, al que se denomina mediador y produce 2 moléculas de agua, posteriormente el mediador oxidado se encargará de la oxidación del sustrato diana siempre que el potencial de oxidación del mediador sea lo suficientemente alto (ver figura 6).

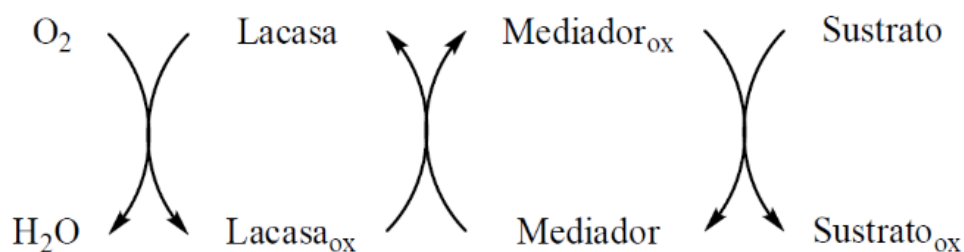


Figura 6 Modelo de mediador (Martínez Ruiz, 2015).

1.1.2. Inmovilización y aplicaciones de la lacasa.

Como se mencionó al inicio de la sección, la estabilización de la enzima es importante para mantener su función una vez es extraída y aislada; uno de los métodos más usados para, además de estabilizar enzimas, poder reutilizarlas por más tiempo, es la inmovilización.

Cuando se habla de inmovilización, no se trata de un solo método infalible, más bien, se refiere a diversos procesos físicos o químicos, que tienen como fin, el mantener fija a una superficie a cierta enzima, de manera que no pierda su capacidad catalítica y que cumpla con algunas características, si es que la aplicación lo requiere (como pueden ser conducir electrones en cierto plano, degradar algún sustrato con una velocidad específica, entre otras). Es muy importante elegir el método de inmovilización adecuado a la aplicación que se tiene contemplada para la enzima, pues de este método podría depender el éxito o fracaso de un proyecto.

Es posible diferenciar cuatro tipos principales de inmovilización (Figura 7):

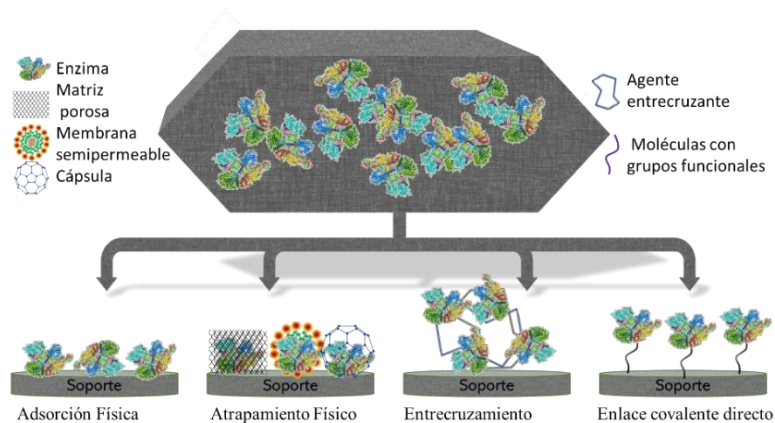


Figura 7 Tipos de inmovilización

I. Adsorción Física: Este método se basa en las interacciones de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas o interacciones electrostáticas de la superficie funcionalizada o “desnuda”. Presenta una baja pérdida de actividad enzimática, pero sufre la desventaja de mantener una unión débil que se puede perder con el cambio de pH, la aparición de iones o por simple difusión en el medio.

II. Atrapamiento Físico: Técnica que se fundamenta en la retención de la enzima por medio de una barrera física, es posible realizarlo por medio de membranas semipermeables, matrices porosas o encapsulamiento, de tal forma que la enzima queda rodeada de una barrera que impide se escape, por esta razón, se soluciona el problema de pérdida enzimática de la adsorción física, pero aparece un nuevo problema, es posible que el sustrato no pueda llegar a la enzima disminuyendo la actividad catalítica.

III. Entrecruzamiento: Se aplican agentes entrecruzantes, que ocasionan la unión covalente enzima-enzima y enzima-soporte, la pérdida enzimática por este método es muy baja, pero debido a que es difícil de controlar, es posible que se pierda o reduzca la actividad catalítica.

IV. Enlace covalente directo: Para esta técnica, se funcionalizan los soportes

con alguna molécula, buscando que algún grupo funcional se una de manera covalente a la enzima. Por lo anterior, la pérdida de enzima es muy baja y es posible orientarla de manera preferente sobre el soporte, pero debido al enlace, la estructura puede verse modificada y con ello perder de manera parcial o total la actividad enzimática.

Hablando específicamente de la enzima lacasa, se presentan en la literatura diversos métodos de inmovilización; en la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos donde se realizó un enlace covalente directo entre el soporte y la enzima.

Tabla 1 Inmovilización por unión covalente directa .

Soporte	Funcionalización	Resultado	Referencia
Nanotubos de Magnetita (Fe₃O₄)	3-aminopropilsilano	Mayor inmovilización que 3-CPTMS pero con pérdida de acción catalítica (su constante catalítica es más baja).	(López, 2016)
	3-glicidoxipropilsilano	No funciona como agente de acoplamiento, ya que la enzima pierde su actividad.	
	3-cloropropiltrimetoxisilano	Mantiene una actividad enzimática más alta que el 3-APTMS, pero acopla una menor cantidad de enzima.	
Electrodo de disco de oro	SAMs de grupos tioles	Presenta una corriente catalítica baja	(Vaz Domínguez, 2009)
Electrodo de oro 3D	SAMs de grupos tioles	No presentó corriente catalítica directa.	
Au Np's	SAMs de grupos tioles	A pesar de la baja corriente catalítica, debido al potencial se cree que existe orientación a T1.	
Carbón vitrificado	Aminofenilos/ Hidroxilaminofenilos	Se obtuvo corriente catalítica directa en todos los casos y parece existir una orientación preferente a el centro T1, pero las corrientes eran muy bajas. Parece ser que sus microporosidades, no permiten una buena inmovilización de la enzima.	
	Aminofenoles		
Grafito pirolítico	Aminofenilos/ Hidroxilaminofenilos	Se obtuvo corriente catalítica directa en todos los casos y parece existir una orientación preferente a el centro T1, las corrientes fueron buenas, pareciendo que su la presencia de macroporos favorece la inmovilización y actividad de la enzima..	
	Aminofenoles		
Grafito de LD /Teflón	Aminofenilos/ Hidroxilaminofenilos	Se obtuvo corriente catalítica directa en todos los casos y parece existir una orientación preferente a el centro T1, las corrientes fueron buenas, pareciendo que su la presencia de macroporos favorece la inmovilización y actividad de la enzima..	
	Aminofenoles		
Grafito espectroscópico/Teflón	Aminofenilos/ Hidroxilaminofenilos	Se obtuvo corriente catalítica directa en todos los casos y parece existir una orientación preferente a el centro T1, las corrientes fueron buenas, pareciendo que su la presencia de macroporos favorece la inmovilización y actividad de la enzima..	
	Aminofenoles		
Esferas de SiO₂	Activadas con glutaraldehído	Retención de actividad enzimática entre 46 y 60%.	(Alvarado Ramírez, 2015)

En la Tabla 2 se observa algunos ejemplos de inmovilización por atrapamiento físico, en este tipo de método, normalmente se busca que la enzima quede “aprisionada” entre poros o cavidades de los materiales .

Tabla 2 Inmovilización por atrapamiento físico.

Soporte	Resultado	Referencia
Tubos de carbono porosos	Se encontró una buena densidad de corriente, pero se estudió utilizando un mediador.	(Servat et al., 2007)
Lámina de tetrametoxisilano sobre partículas de grafito	Se obtuvo un resultado de catálisis similar a la de la enzima libre.	(Nogala et al., 2006)
Membranas microporosas de fibras de polipropileno	Mantiene una buena actividad catalítica eliminando diversos contaminantes entre un 50–100% en 48 h.	(Moeder et al., 2004)

Ahora bien, algunos ejemplos de inmovilización por adsorción física se encuentran descritos en la Tabla 3, para este enfoque, se busca que las fuerzas electrostáticas (fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno...) de las superficies, sean capaces de mantener a la enzima unida a la superficie..

Tabla 3 Inmovilización por adsorción física.

Soporte	Resultado	Referencia
Electrodos de grafito	Se obtuvo una respuesta buena como biosensor, pero resulta mejor opción una inmovilización covalente.	(Portaccio et al., 2006)
Fibras de algodón	Presenta un grado alto de retención tanto de la enzima como de la actividad enzimática.	(Ibrahim et al., 2007)
Cristales de Mg/Al en capas dispuestas sobre oro nanoporoso	Se mantuvo hasta un 97% de la actividad enzimática en la enzima inmovilizada en comparación con la enzima libre.	(Camacho Córdova et al., 2009)

Finalmente, en la Tabla 4 se presentan algunos ejemplos de inmovilización por entrecruzamiento.

Tabla 4 Inmovilización por entrecruzamiento.

Soporte	Resultado	Referencia
Agregados enzimáticos (CLEAs) con polietilenglicol y glutaraldehído	Mantiene una termorresistencia más alta que la enzima libre, pero con pérdida de actividad enzimática.	(Cabana et al., 2007)
Superficie de silicona con monocapa de hidrofobinas	La superficie de silicona parece ayudar a mantener la actividad enzimática.	(De Stefano et al., 2009)
Spherezymes. Agentes de entrecruzamiento: glutaraldehído y etilendiamina.	La actividad enzimática se mantiene y su estabilidad en almacenaje es buena.	(Matijošytė et al., 2010)

Como fue mostrado, la enzima lacasa puede ser inmovilizada por los cuatro métodos de inmovilización, por lo que, para definir la mejor estrategia, se requiere conocer la aplicación final en la que se desea aplicar la acción de la lacasa; esto se debe, a que cada aplicación final tiene ciertas características específicas, que pueden verse mermadas a causa del tipo de inmovilización, tipo de soporte, estabilidad de la inmovilización, entre otras.

Algunas de las aplicaciones más comunes para la lacasa son:

- **Industria alimentaria:** Uno de los usos habituales de la lacasa dentro de la industria alimentaria, lo encontramos en la clarificación de los jugos, cervezas y vinos, debido a su capacidad para degradar compuestos fenólicos y con ello, eliminar la turbidez y tonalidad café de estas bebidas (Dana et al., 2017).
- **Papel y pulpa:** Además del conocido mecanismo para despolimerización de la lignina. Es posible utilizar a la lacasa para blanquear papel y pulpa (Vogel & May, 2019).

- **Industria textil:** Es posible utilizar la acción catalítica de la lacasa con el fin de degradar ciertos colorantes, ya sea para que se eliminen completamente o para modificar sus tonalidades (Dana et al., 2017).
- **Biorremediación:** Gracias a su capacidad para degradar xenobióticos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), compuestos fenólicos y fenólicos clorados, es posible utilizar a la lacasa para remediar el suelo contaminado a causa de la explotación de depósitos de hidrocarburos o de desechos de combustibles (Dana et al., 2017).
- **Biosensor:** La lacasa ha sido utilizada como componente para biosensores de compuestos fenólicos (Rodríguez-Delgado et al., 2015), presentando algunas ventajas por encima de biosensores basados en peroxidasas o tirosinasas.
- **Biocelda de combustible (BFC):** Finalmente, la aplicación que motiva este trabajo, es la posibilidad de utilizar a la enzima lacasa como componente en una biocelda de combustible, algunas ventajas que presenta sobre otro tipo de enzimas, es que no genera o requiere peróxido de hidrogeno en su proceso catalítico, por lo que se elimina el peligro de expulsar compuestos peligrosos al ambiente.

1.2. Bioceldas de combustible.

Si se desea implementar a la enzima lacasa en una biocelda de combustible, primero se debe definir de manera clara y precisa, qué es una biocelda de combustible, cómo funciona y cuáles son sus ventajas y desventajas.

Una celda de combustible (FC) puede entenderse como un dispositivo capaz de extraer la energía química de un compuesto, que luego es convertida a energía eléctrica, la entrada de combustible al dispositivo debe ser constante y la salida de poder de la celda está limitada por la cantidad de reacciones electroquímicas que ocurren en los dos electrodos (normalmente

favorecida por agentes metálicos o por óxidos metálicos que funcionan como catalizador). En el ánodo, ocurre la oxidación del combustible y en el cátodo se lleva a cabo la reducción del agente oxidante.

Ahora bien, una biocelda de combustible es un tipo de FC donde los electrodos, para poder catalizar la reacción, son enriquecidos con componente biológicos, como pueden ser microorganismos, organelos celulares o enzimas. Para fines de este trabajo, el enfoque girará directamente en las BFC enzimáticas.

Las BFC a diferencia de otras FC, no requieren de manera forzosa la incorporación de una membrana en el dispositivo, esto debido a que a menos que el agente oxidante y el combustible reaccionen entre sí, el componente biológico, es capaz de cumplir la función de la membrana. En la Figura 8a podemos observar el diagrama general de una FC, mientras que en la Figura 8b se puede observar el diagrama de una BFC.

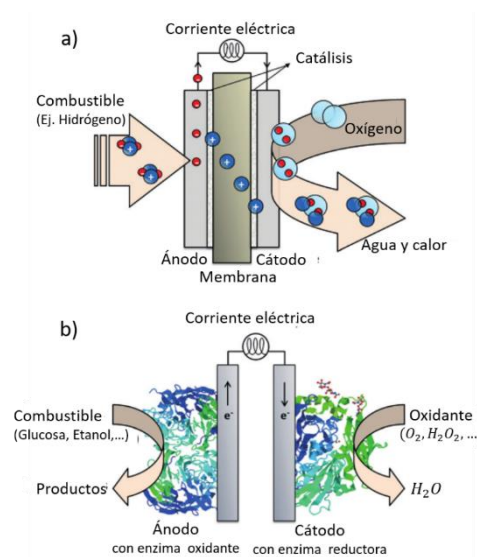


Figura 8 Esquema representativo de a) Celda típica de combustible b) Biocelda de combustible enzimática. Adaptada de Luz et al. (2014)

A pesar de que las BFC presentan un desempeño inferior, en comparación de las FC más usuales en términos de densidad de poder, tiempo de vida y estabilidad operacional, la aplicación en ciertos dispositivos específicos ha levantado gran interés, como son: dispositivos implantables, liberación de fármacos, microchips y fuentes de alimentación portátiles (Luz et al., 2014).

1.2.1. Nanomateriales en bioceldas de combustible.

Hablando de bioceldas de combustible, nanomateriales como: arcillas redox, nanopartículas metálicas o nano-objetos como nanotubos de carbono (CNTs), juegan un papel sumamente importante en la interconexión de enzimas con circuitos electrónicos. En particular, estos nanomateriales constituyen una nueva herramienta versátil para el desarrollo de biomateriales tridimensionales dedicados a mejorar el rendimiento de los bioelectrodos. Además, los nanomateriales constituyen una nueva generación de matrices anfitrión para macromoléculas biológicas. Esto puede conferir nuevas funcionalidades múltiples a los biorrecubrimientos, a través de sus propias propiedades específicas (conductividad eléctrica, magnetismo, propiedades redox, interacciones de afinidad) a nivel de nanoescala. En particular, estos nanomateriales pueden establecer una comunicación eléctrica con enzimas a través de su conductividad intrínseca (como los nanotubos de carbono) o a través del transporte de electrones a enzimas, garantizados por el salto de electrones entre centros redox inmovilizados. Como consecuencia, los electrodos modificados por nanomateriales han despertado una atención generalizada en el diseño de bioceldas de combustible (Cosnier et al., 2013).

Bioceldas de combustible enzimáticas basas en CNTs.

Debido a la morfología de nanocable, biocompatibilidad y buena conducción eléctrica, los CNTs son considerados como una de las propuestas más prometedoras para dispositivos biosensores y bioceldas de combustible. Es posible funcionalizar CNTs con moléculas afines a las enzimas, con el fin de fijarlas sobre un electrodo e incluso es posible que las enzimas sean adsorbidas directamente sobre los CNTs “desnudos”.

Bioceldas de combustible enzimáticas basas en otros nanomateriales de carbono.

Grafeno: Nanoplaquetas de grafeno han sido utilizadas en electrodos de bioceldas de combustible, obteniendo buenos resultados.

Carbón mesoporoso: Electrodos basados en carbón mesoporoso han sido estudiados y se ha encontrado una buena respuesta por parte de estos en bioceldas de combustible.

Bioceldas de combustible enzimáticas basas en nanopartículas de arcillas.

Las nanopartículas de arcillas pueden funcionar como un buen soporte, debido a que suelen formar estructuras altamente porosas. Para la inmovilización de la enzima sobre el electrodo, se puede disolver en un medio acuoso que contenga nanopartículas de arcillas, posteriormente esta solución se pone en contacto con el electrodo y la arcilla con la enzima se une al electrodo, las estructuras formadas por las arcillas permiten el acceso al sitio activo gracias a su porosidad, pero es posible que la actividad enzimática se vea disminuida.

Bioceldas de combustible enzimáticas basas en nanopartículas de metálicas.

Diversas nanopartículas metálicas de óxidos de metales lucen prometedoras para su aplicación en electrodos de bioceldas de combustible, no existe mucha información, pero podría existir una buena interacción de los electrodos con las nanopartículas de oro (AuNPs) y las enzimas, debido a que las AuNPs son fácilmente funcionalizadas con diversos grupos funcionales. También es posible utilizar algunos óxidos de metales e intentar combinar la electrocatálisis con la capacidad de algunos óxidos de generar cierta respuesta ante un haz de luz, pudiendo generar bioceldas de combustible fotoelectroquímicas (Cosnier et al., 2013).

1.2.2. Bioceldas de combustible basadas en la enzima lacasa.

Cuando se estudian las bioceldas de combustible enzimáticas, es común encontrar la oxidación de glucosa como reacción anódica y la reducción de oxígeno o peróxido de hidrógeno como reacción catódica; la lacasa es una enzima que se ha estudiado ampliamente como elemento en los electrodos de bioceldas de combustible, debido a su capacidad para reducir el oxígeno molecular a agua, es por ello que a continuación se presentarán algunos electrodos de bioceldas de combustible que contienen a la enzima lacasa. Además, los electrodos presentadas contendrán elementos nanoestructurados debido a la nobleza que presentan para inmovilizar enzimas y a la basta cantidad de estudios que reúnen ambos elementos.

Cátodo plano de oro modificado con AuNPs con lacasa inmovilizada.

La modificación de un cátodo de oro modificado con AuNPs y la enzima lacasa es presentado en la Figura 9, el oxígeno es reducido por la lacasa y los electrones necesarios para este proceso son extraídos de las AuNPs, éstas a la vez, extraen los electrones del electrodo plano de oro. Como puede también observarse en la Figura 9, se obtiene una densidad corriente bastante buena que puede explicarse porque las AuNPs facilitan que el centro activo T1 intercambie electrones con el electrodo (Krikstolaityte et al., 2014).

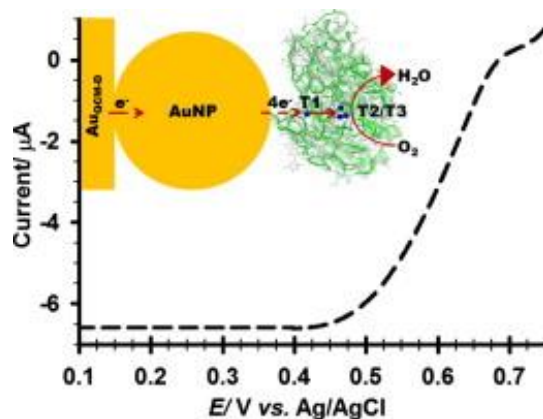


Figura 9 Representación esquemática de cátodo de oro modificado con AuNPs y lacasa, se presentan también el potencial alcanzado. Extraído de Krikstolaityte et al. (2014)

BFC con puntos cuánticos de carbono (CNDs) como soporte en los electrodos.

Wu et al. (2017) presentan una BFC sin membrana, donde en el ánodo se co-inmovilizaron alcohol deshidrogenasa (ADH), aldehído deshidrogenasa (ALDH) y formato deshidrogenasa (FDH) y el cátodo mantenía inmovilizada lacasa. Ambos electrodos (como se muestra en la Figura 10) tienen cubierta su superficie con CNDs. El trabajo muestra que los CNDs actúan como una nueva arquitectura para generar electrodos enzimáticos.

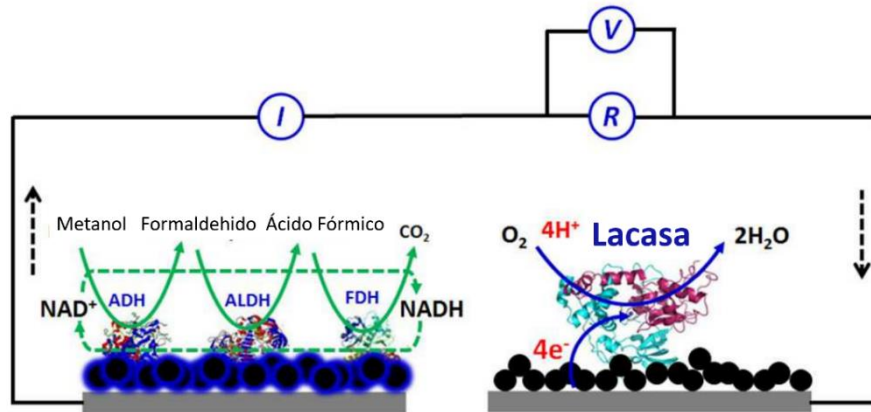


Figura 10 BFC con CNDs como electrodos, múltiples enzimas inmovilizadas en el ánodo y lacasa inmovilizada del cátodo. Adaptado de Wu et al. (2017).

Cátodo de lacasa entramada a una pared simple de nanotubos de carbono carboxilados.

Existe un cátodo basado en entramar lacasa y nanotubos de carbono carboxilados con un polímero REDOX sobre un electrodo de carbón vítreo cubierto con tela de carbón (

Figura 11). La incorporación de grupos carboxílicos en nanotubos de carbono muestra una mejora en la densidad de corriente en comparación de los nanotubos “desnudos”.

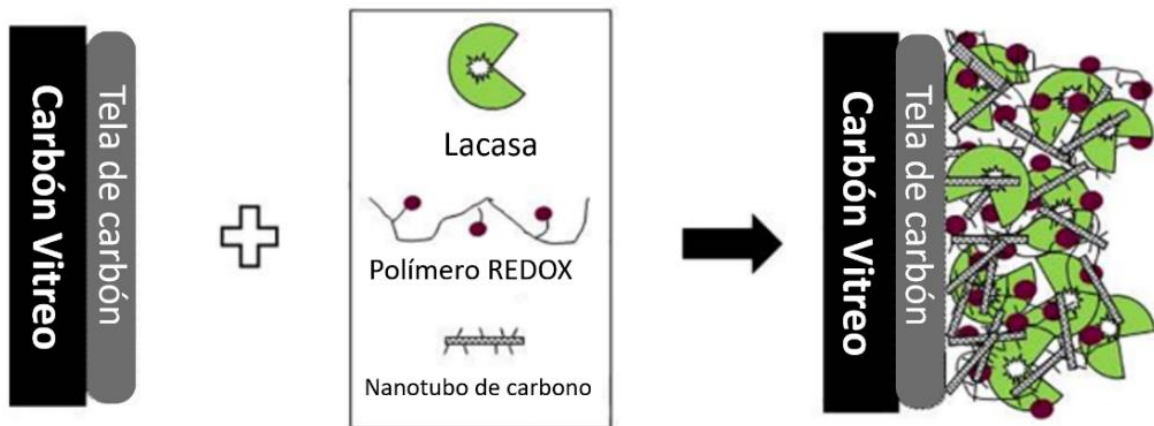


Figura 11 Esquema de cátodo de lacasa entramada a una pared simple de nanotubos de carbono carboxilados. Adaptado de Kim et al. (2020)

BFC de enzima única (Lacasa).

Una propuesta muy interesante para una BFC es presentada por Ji et al. (2017), donde se utiliza a la enzima lacasa tanto en el ánodo como en el cátodo como se muestra en la Figura 12, es importante señalar que debe existir una membrana de intercambio protónico (para evitar que ocurra la reacción opuesta en el electrodo contrario) y que su combustible fue bisfenol A (BPA). Esta biocelda de combustible mostró buenos resultados, manteniendo ambas reacciones con una densidad de potencial importante, pero además, ayuda a observar la importancia de la orientación de la enzima sobre su soporte.

Como se puede notar de manera directa en la Figura 12, si los electrones son donados al nanotubo de carbono tendremos un ánodo y si los extraemos desde el nanotubo de carbono estaremos hablando de un cátodo. Por otro lado, si el centro T1 está más cercano al nanotubo, podríamos tener una mejor respuesta catódica, debido a que mejora la extracción de electrones de nuestro soporte.

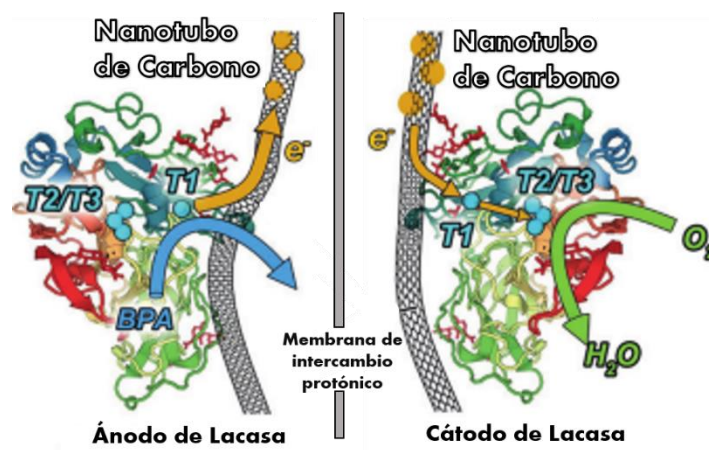


Figura 12 Diagrama de una BFC de enzima única. Adaptado de Ji et al. (2017)

2. Planteamiento del Problema.

Se ha encontrado que la inmovilización de la enzima lacasa con el cobre tipo I cercano a la superficie de sostén, genera mejores resultados en la reducción de la molécula de oxígeno que la inmovilización al azar; debido a que en esta última puede presentar pérdida de actividad por bloqueo de canales de entrada y salida, o la inmovilización dirigida a otra zona, donde se puede ver reducido el potencial redox por una menor interacción con los electrones de la superficie de sostén; por lo anterior, resulta de gran interés encontrar nuevas alternativas más eficaces y eficientes para inmovilizar a la lacasa.

En el presente trabajo, se busca orientar de manera preferente a la enzima lacasa sobre nanoestructuras de carbón modificadas con compuestos aromáticos, buscando que las zonas hidrofóbicas que rodean al cobre tipo I, también conocidas como “Bolsillos de unión hidrofóbica” (Figura 13), se fijen a los anillos resonantes; y de esta manera, conseguir que se mantenga una alta actividad enzimática, un buen potencial redox y que sea posible su aplicación en bioceldas de combustible.

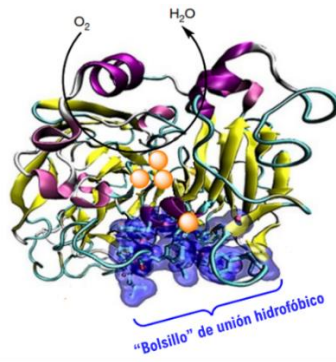


Figura 13 Esquema del "Bolsillo" hidrofóbico de la lacasa .Adaptado de Elouarzaki et al. (2018).

3. Justificación.

En el desarrollo cada vez más amplio de nuevas tecnologías, existe un lugar muy relevante para las bioceldas de combustible debido a su potencial aplicación para el desarrollo de dispositivos autónomos. Entre los distintos tipos de BFC, las BFC enzimáticas son las más prometedoras, debido a su capacidad para generar una respuesta a combustibles específicos.

Hablando propiamente de las BFC basadas en la enzima lacasa, podemos encontrar grandes ventajas, como pueden ser que no interviene el peróxido de hidrogeno en ningún paso de la catálisis de la enzima; también, es posible trabajar con la enzima lacasa en un rango amplio de pH ácido-neutro e incluso existen variedades de lacasa capaces de trabajar en pH básico. Todo lo anterior permite evaluar distintos tipos de BFC para aplicaciones diversas, por lo que este trabajo busca encontrar un método útil para la inmovilización dirigida de la lacasa, con el fin de generar bioceldas de combustible funcionales capaces de aplicarse en el futuro en diversos dispositivos.

4. Objetivos e Hipótesis.

4.1.Hipótesis.

La modificación estratégica de nanoestructuras de carbono con moléculas aromáticas seleccionadas permitirá una inmovilización dirigida de la enzima lacasa, permitiéndole incrementar su actividad catalítica, tiempo de vida útil y estabilidad, para aumentar el rendimiento de una biocelda de combustible.

4.2.Objetivo General.

Modificar químicamente nanoestructuras de carbono con derivados aromáticos para favorecer la inmovilización dirigida de la enzima lacasa de *Trametes versicolor* y poder utilizarla como biocátodo en una bioceldas de combustible.

4.3.Objetivos Específicos.

I. Funcionalizar nanoestructuras de carbón elegidas con derivados aromáticos de haluros de ácido y de ácidos carboxílicos.

II. Caracterizar por técnicas fisicoquímicas las nanoestructuras de carbón funcionalizadas.

III. Evaluar la inmovilización de la enzima lacasa de sobre las nanoestructuras de carbón funcionalizadas.

IV. Optimizar y caracterizar la inmovilización de la enzima lacasa sobre las estructuras de carbón funcionalizadas, por técnicas electroquímicas.

V. Incorporar el electrodo de la enzima lacasa en una biocelda de combustible y evaluar su rendimiento.

5. Metodología.

5.1. Materiales.

Para el desarrollo del presente proyecto se requirió lacasa (EC 1.10.3.2) de *Trametes versicolor* (≥ 10 U/mg) como enzima para el electrodo, como soporte se usaron CV (Carbón Vulcan) y CNFs (Nanofibras de Carbono) proporcionados por el Laboratorio Nacional de Micro y Nanofluídica (LabMyN). Para la modificación de las nanoestructuras se usó H_2O_2 , $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, tetrahidrofurano (THF), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, cloruro de oxalilo, dicloro metano, N,N- dimetilformamida (DMF), trietilamina, tolueno y acetonitrilo. Además de niacina (B3) y ácido antraceno-9-carboxílico, que fueron los compuestos aromáticos encargados de dirigir la inmovilización de la enzima, usando Nafion® modificada con TBAB (bromuro de tetrabutil amonio) como agente de inmovilización.

ácido antraceno-9-carboxílico Como base de los electrodos, se utilizó papel de carbón Toray de Fuel Cell Earth (EE. UU., TGP-H-060). En la prueba del biocátodo de lacasa, se utilizó un bioelectrodo a base de glucosa oxidasa y ferroceno proporcionado por el LabMyN, así como soluciones tampón con y sin glucosa. La solución de tampón fosfato (PBS) pH 5.6 [0.1 M] se preparó usando K_2HPO_4 y KH_2PO_4 de J. T. Baker. Todos aquellos reactivos cuyo origen no fue especificado, fueron obtenidos de Sigma Aldrich.

5.2. Métodos

5.2.1. Funcionalización de las nanoestructuras de carbón.

Hidroxilación por reacción de Fenton.

Para la hidroxilación de las nanoestructuras de carbón (CV o CNFs), 400 mg de la estructura de soporte de carbón se dispersan en 35 ml de THF por sonicación durante 40 min. Posteriormente se filtran con papel filtro y se deja secar a temperatura ambiente.

A continuación, 300 mg de $FeSO_4$ se disuelven en 100 ml de agua desionizada. Se añade la nanoestructura de carbón en agitación constante. Adiciones de H_2O_2 se realizan en un lapso de 4 h, hasta acumular 60 ml de peróxido de hidrogeno y se deja reaccionar por 24 h en agitación.

Una vez a transcurrido el tiempo marcado, se filtran al vacío las nanoestructuras hidroxiladas y se almacenan a temperatura ambiente.

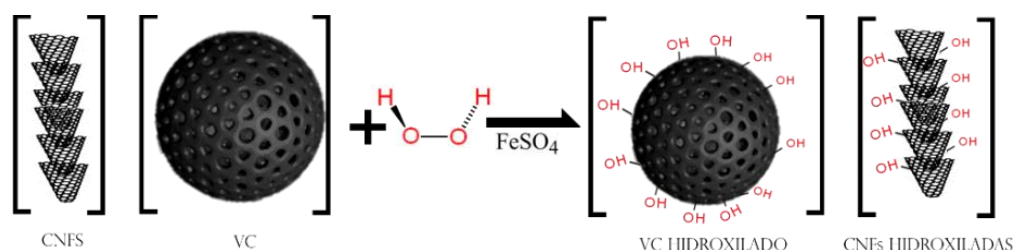


Figura 14 Esquema de nanoestructuras hidroxiladas.

Esterificación con $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ como catalizador.

Se adaptó un método de esterificación (Figura 15), del proceso de síntesis reportado por Velusamy et al. (2005) ; se disolvieron 0.07g de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ en 20mL de acetonitrilo, después, se añadieron 5 mmol de la molécula aromática (niacina o ácido antraceno-9-carboxílico) y se mezcló 15 min.

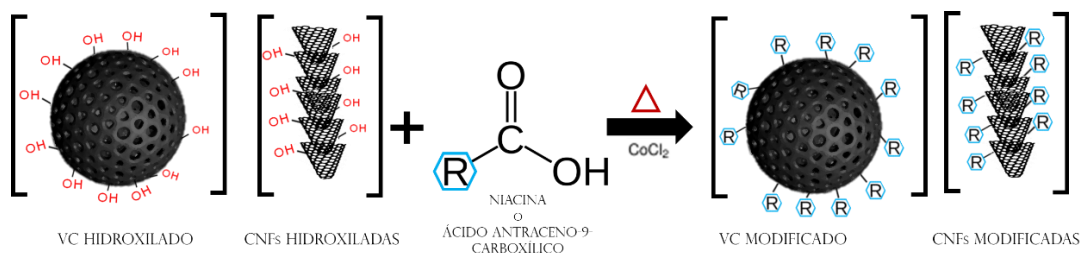


Figura 15 Modificación con moléculas aromáticas con $CoCl_2$ (simplificación).

Se añadió 0.1g de la nanoestructura de carbono hidroxilada (CV o CNFs) y se mantuvieron en agitación constante y reflujo por 14 h a $95^{\circ}C$ (

Figura 15 Modificación con moléculas aromáticas con $CoCl_2$ (simplificación). Finalmente se filtró al vacío y se almacenó a temperatura ambiente.

Esterificación con $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ como catalizador.

Para realizar la esterificación con $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Figura 16), se modificó el método de síntesis reportado en 2008 por Komura et al. En 40mL de tolueno se disolvieron 0.15mmol de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ en 40mL de tolueno, después, se añadieron 1.5 mmol de la molécula aromática (niacina o ácido antraceno-9-carboxílico) y se dejó mezclar por 15 min.

Se añadió 0.1g de la nanoestructura de carbono hidroxilada (CV o CNFs) y se mantuvieron en agitación constante por 12 h a 110°C con extracción de agua por el aparato de Dean-Stark. Finalmente se filtró al vacío y se almacenó a temperatura ambiente.

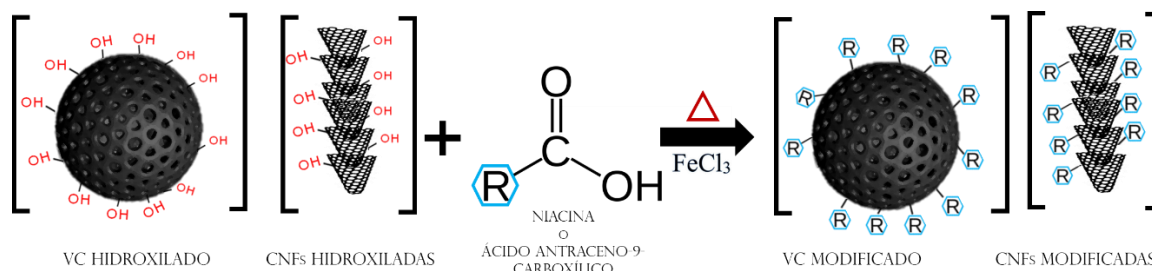


Figura 16 Modificación con moléculas aromáticas con $FeCl_3$ (simplificación).

Esterificación usando Cloruro de Oxalilo.

Una adaptación del método de modificación de nanotubos de carbono propuesto por Giroud y Minter (2013) fue empleada para funcionalizar CNFs (Figura 17). A una suspensión de niacina o ácido antraceno-9-carboxílico (1mmol) en dicloro metano, se añadió cloruro de oxalilo (2 mmol) por goteo y posteriormente se adicionó una gota de DMF como catalizador. Se mantuvo la reacción en agitación por un día.

A 0.1g de CNFs hidroxiladas dispersadas en dicloro metano, se agregaron 5 mmol de trietilamina. Por goteo, se adicionó el producto de la primera reacción y se dejó en agitación durante un día, para finalmente filtrar al vacío y reservar en temperatura ambiente.

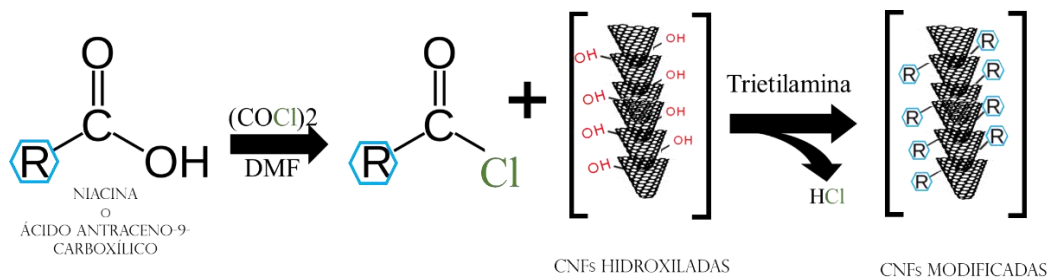


Figura 17 Modificación con cloruro de oxalilo (simplificación).

5.2.2. Inmovilización de la enzima lacasa.

Se mezclan las nanoestructuras modificadas con una solución de lacasa (1.5 mg) en tampón de fosfato (PBS) de pH 5.6 (75 μL), mediante pasos de sonicación y vórtice (1 min de vórtice y 15 s de sonicación, repetido 4 veces). Se utiliza una suspensión de Nafion® modificada con TBAB como agente inmovilizador agregándolo (25 μL) a la solución. La mezcla resultante se agita brevemente con vórtex y se sónica, para generar una tinta negra.

Para el CV se usó una relación 5:1 con la enzima, mientras que para las CNFs se utilizó una relación 1:1.

5.2.3 Preparación de los bioelectrodos.

Para los bioelectrodos destinados a la evaluación en media celda, se tomó un rectángulo de papel toray de 3cm x 0.5cm (figura 18 a la izquierda), mientras que para la evaluación de la celda de combustible, se utilizaron cuadrados de papel toray de 0.5 cm.

El rectángulo de 3 cm x 0.5 cm se sumergió en parafina líquida, dejando un área libre de 0.5 cm x 0.5 cm para realizar el depósito de la enzima inmovilizada. Al evaluar, un área de 0.5 cm x 0.5 cm de parafina del extremo contrario al depósito, fue expuesta, retirando la parafina con ayuda de una navaja fina.

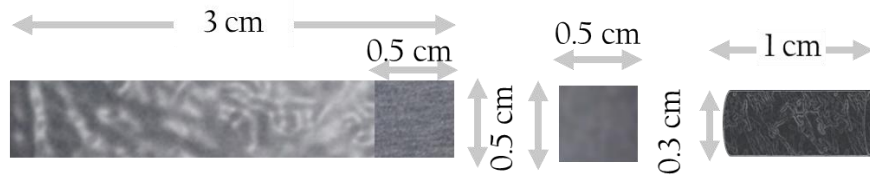


Figura 18 Dimensiones de los electrodos de prueba.

Para la evaluación de concepto de la celda de combustible, se utilizaron barras de grafito de 1 cm de largo y 0.3 cm de diámetro (figura 18 a la derecha). Sobre ellas se colocó un cuadro de papel conductor doble cara de 0.5 cm por lado (figura 18 en el centro) y sobre él, se adhirió el electrodo cuadrado de papel toray (con el depósito de la enzima inmovilizada sobre una cara).

Para ambos tipos de electrodo, se depositaron las tintas sobre el papel toray con ayuda de un pincel. Una vez depositada la tinta, el pincel es limpiado con alcohol, acetona y agua, con el fin de retirar restos de los depósitos previos.

5.2.4 Preparación de la celda de combustible.

Como celda de combustible (figura 19), se propuso un sistema que utiliza la fuerza de gravedad como método para mantener en movimiento el combustible la celda. Para ello, un contenedor de aproximadamente 10 mL de capacidad y con las dimensiones expuestas en la figura 19, es utilizado, seleccionando un par de orificios en la misma posición, pero en la cara opuesta, por ellos se introducen 0.5 cm de una barra de grafito de 1 cm de largo por 3 cm de diámetro. Posteriormente, el electrodo se prepara como fue presentado en la sección 5.2.3 .

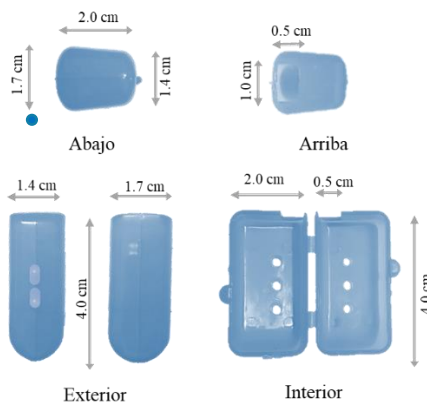


Figura 19 Dimensiones de la celda de gravedad.

A esta celda se le denominó “celda de gravedad”, debido a que el goteo responsable que el combustible se mantenga fluyendo, hace uso de la fuerza gravitatoria con el fin de no introducir energía externa para movilizar la fuente de alimentación.

5.2.2. Evaluación electroquímica de los electrodos.

Sistema de evaluación electroquímica

Para la evaluación en media celda, se utilizó la configuración de tres electrodos: electrodo de trabajo (electrodo de papel Toray junto con el depósito que es evaluado), contraelectrodo (barra de grafito) y electrodo de referencia (electrodo de Ag/AgCl) como se muestra en la figura 20.



Figura 20 Sistema de configuración de tres electrodos.

Se colocan en un vaso de precipitado con tapa con 4 cavidades, de izquierda a derecha, electrodo de trabajo, referencia y contra-electrodo.

Dentro del vaso se colocaron 5000 μL de PBS (0.1 M) con pH 5.6 y cantidades de glucosa o NaCl si lo requería cada experimento. Los tres electrodos se conectaron a un potencióstato/galvanostato (Biologic) para poder realizar las pruebas electroquímicas. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y a temperatura ambiente (25°C).

En la configuración para la celda de combustible (figura 21), se evaluó con dos electrodos: electrodo de trabajo (electrodo de papel Toray junto con el depósito que es evaluado) y contra-electrodo/electrodo de referencia (bioelectrodo a base de glucosa oxidasa y ferroceno).

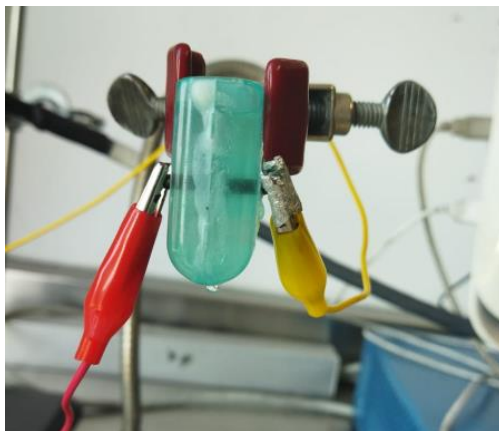


Figura 21 Configuración de la celda de gravedad.

Métodos de evaluación electroquímica

Las evaluaciones electroquímicas se llevaron a cabo por triplicado con ayuda de un potencióstato/galvanostato (Biologic). Se realizó voltamperometría cíclica para la selección del mejor método en relación con la resistividad del material, potencial de circuito abierto (OCP) y corriente eléctrica generada. Con cronoamperometrías en presencia y ausencia de NaCl (inhibidor), se determinó estabilidad enzimática y resistencia a inhibidores.

Para la celda de combustible, se hicieron pruebas de descarga para determinar la corriente de trabajo, así como caracterizar el funcionamiento de la celda.

6. Resultados

6.1. Funcionalización de las nanoestructuras de carbón

Tanto para la síntesis usando $CoCl_2$ como $FeCl_3$, se sabe que su forma de promoción de la reacción, es a través de la formación de complejos. Al formar esta clase de arreglos coordinados, con los ácidos carboxílicos aromáticos y las nanoestructuras hidroxiladas, se reduce el espacio entre los mismos y esto facilita que reacciones entre sí.

La formación del complejo por parte del $CoCl_2$ puede observarse fácilmente en la figura 22, donde son claros los cambios de color correspondientes a la coordinación de los ácidos carboxílicos de los compuestos aromáticos. Una vez se añaden las nanoestructuras de carbón, los cambios visuales dejan de ser notorios, debido a que el color negro del carbón los oculta.

Para la niacina, se obtiene primero un color azul rey, el cual cambia a un azul-morado claro y termina en un morado tenue. Mientras que para el Ácido antraceno-9-carboxílico, un color amarillo claro es obtenido en un inicio, que vira a verde claro después de 15 min.

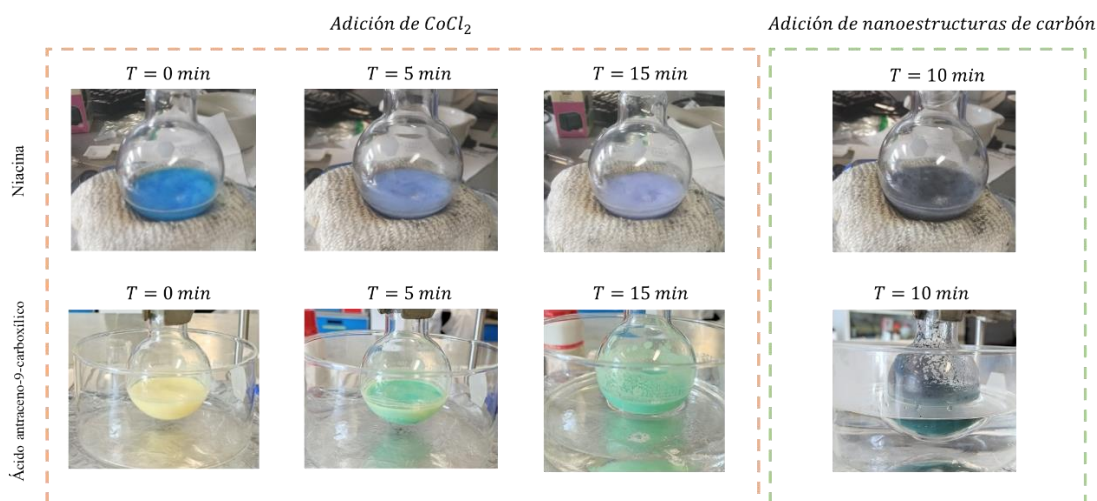


Figura 22 Formación del complejo con $CoCl_2$ como catalizador.

Para el cloruro de oxalilo, no hay grandes cambios que sean notorios a simple vista, pero debe recalarse que la liberación de gas se mantiene constante; por lo que es necesario, mantener una extracción regular de estos gases, así como utilizar protección tanto ocular como de las vías aéreas en todo momento.

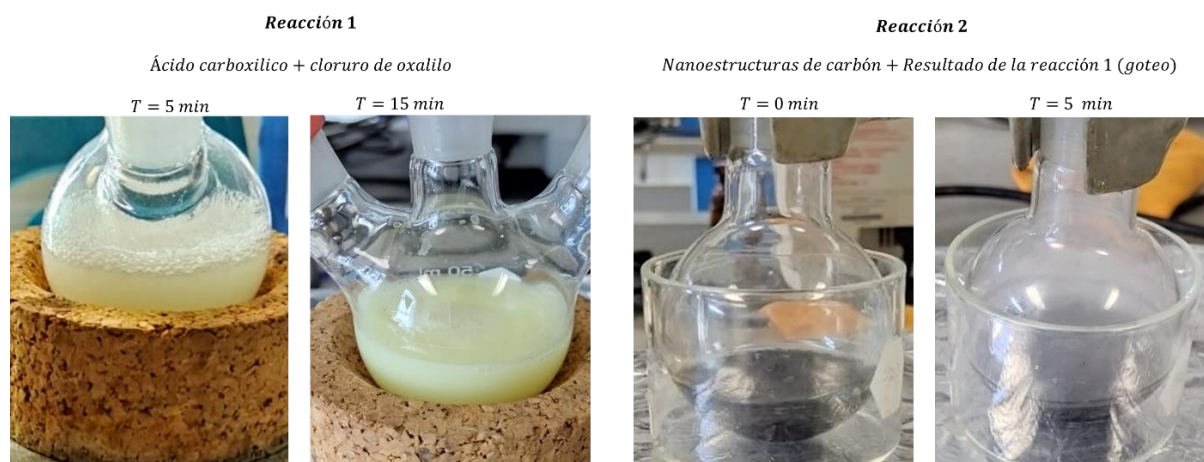


Figura 23 Reacción con cloruro de oxalilo

En la reacción 1 de la figura 23, se puede observar un burbujeo, el cual, liberaba gases incoloros. En la reacción 2, con la adición por goteo, un gas blanquecino se desprendía de la mezcla. Los gases anteriores, deben presumirse como subproductos de la reacción o el resultado de la descomposición del cloruro de oxalilo, por lo que su composición estaría cargada de HCl y Cl_2 , gases sumamente irritantes, por lo que el uso de una campana de extracción es necesario.

Las nuevas nanoestructuras de carbono funcionalizadas, mantenían ciertas características entre sí; en general, todas las estructuras de CV que se obtuvieron, tenían una apariencia quebradiza (figura 24b). Por otro lado, las CNFs obtenidas, mantenían una apariencia similar al caucho (figura 24a).

Además, las CNFs modificada presentaron una mayor volumen que el CV, a pesar de que en peso el CV aumento en aproximadamente 5 veces después de las reacciones de esterificación (se presume que por adsorción de las moléculas aromáticas), su densidad fue menor que en las CNFs .

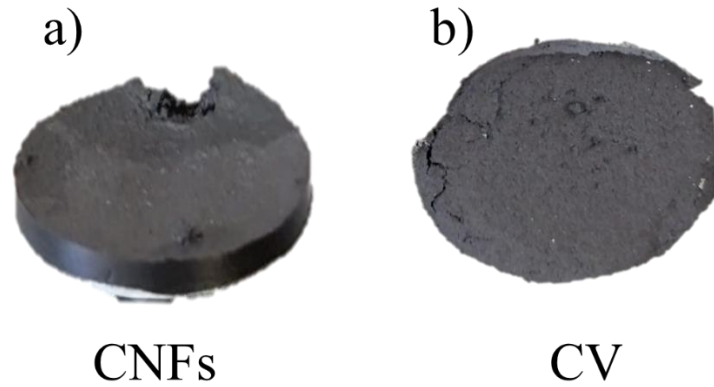


Figura 24 Apariencia general de las nanoestructuras obtenidas.

De igual forma, las nanoestructuras de CV resultaron dispersarse mejor en el PBS que las CNFs, y su depósito también fue más sencillo, debido a que las tintas de CV se adherían de manera más homogénea al papel *Toray*, mientras que las tintas de CNFs tendían a formar aglomeraciones en secciones del depósito.

Lo anterior, lo atribuimos a la naturaleza de las CNFs, ya que su estructura fibrosa facilita el hacinamiento, por su parte, la morfología del CV (pseudoesférica) facilita su dispersión en soluciones.

6.2. Cátodos obtenidos

Los biocátodos de lacasa fueron obtenidos como fue descrito en las secciones 5.2.2 y 5.2.3. En la figura 25, se ejemplifica el resultado final de los electrodos y como lucen (en su caso) los electrodos en la celda de gravedad.



Figura 25 Electrodo de prueba

6.3. Inmovilización de la enzima Lacasa sobre Nanofibras de Carbono

Los electrodos de CNFs fueron evaluados por medio de voltamperometrías ciclicas, las cuales se muestran en la figura 26. Para su facilitar su analisis, las voltamperometrías 26a, se distribuyeron en 3 imágenes más.

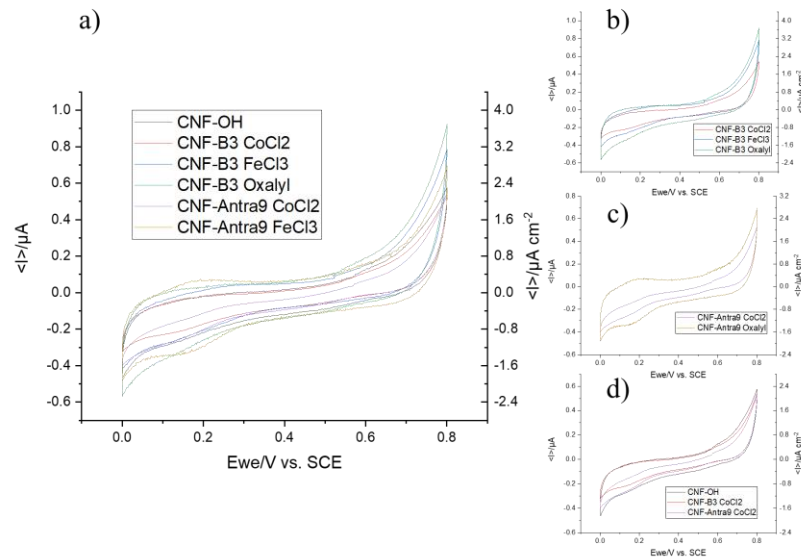


Figura 26 Voltamperometría Cíclica de los electrodos de CNFs

En la figura 26b, se pueden comparar los resultados de los diferentes métodos de síntesis, de los cuales destaca el método por $CoCl_2$, debido a la menor resistividad del material (en comparación con el resto), que podemos visualizar en ancho de su voltamperograma.

Derivado del resultado anterior, se decidió detener las síntesis por $FeCl_3$ y usar los métodos restantes para comprobar la diferencia entre ambos.

En la figura 26b, comparamos nuevamente dos métodos de síntesis (oxalyl y $CoCl_2$) de donde nuevamente el $CoCl_2$, presenta una menor resistividad en comparación con el otro método. Con lo que la síntesis por cloruro de oxalilo queda descartada por completo, debido a que la peligrosidad del reactivo y su costo superior, en comparación con los otros métodos, no se justifica con los resultados obtenidos.

Finalmente, la figura 26c muestra la comparativa entre las CNFs hidroxiladas y las modificadas por el método del $CoCl_2$, gracias a ello se encontró que la inmovilización mejora al añadir los compuestos aromáticos y que el ácido antraceno-9-carboxílico es mejor agente para la inmovilización en comparación con la niacina.

Los resultados de los triplicados se resumen en la tabla 5, donde se compara el OCP y la densidad de corriente de cada método. No existe realmente una diferencia significativa en el OCP, los cambios más grandes se notan en las densidades de corriente, de donde resaltan las CNFs modificadas con ácido antraceno-9-carboxílico, debido a que presentan una densidad de corriente mayor y un OCP bueno.

Tabla 5 Resultados de inmovilización en CNFs

Material	Método de Síntesis	Potencial de Circuito Abierto (OCP) [V]			Densidad de Corriente en 0.2 V [$\mu A/cm^2$]		
		Máximo	Promedio	s	Máximo	Promedio	s
CNF-OH	Fenton	0.572	0.555	0.022	-0.884	-0.831	0.046
CNF-B3	CoCl ₂	0.579	0.566	0.023	-0.512	-0.381	0.128
CNF-B3	FeCl ₃	0.553	0.527	0.025	-0.820	-0.699	0.196
CNF-B3	Oxalyl	0.572	0.548	0.021	-1.364	-1.151	0.184
CNF-Antra 9	CoCl ₂	0.571	0.564	0.008	-2.144	-1.800	0.515
CNF-Antra 9	Oxalyl	0.564	0.563	0.001	-2.264	-1.983	0.293

6.4. Inmovilización de la enzima Lacasa sobre Carbón Vulcan

Similar a las CNFs, se realizaron pruebas con el CV pero esta vez se redujeron los métodos de síntesis. Se utilizó la síntesis con $FeCl_3$ para corroborar que sus resultados eran inferiores al método del $CoCl_2$; nuevamente se utilizaron niacina y ácido antraceno-9-carboxílico como moléculas aromáticas.

Como es mostrado en la figura 27a, la diferencia de las respuestas de cada material es más marcado que en las CNF. La figura 27c compara los dos métodos de síntesis, mostrando cierta superioridad del método del $CoCl_2$ hablando específicamente de la resistividad aparente que se observa en el voltamperograma.

Por otro lado la figura 27b, muestra una clara diferencia entra el CV hidroxilado y el que esta modificado con ácido antraceno-9-carboxílico, con lo que podemos inferir que este método de síntesis esta dirigiendo de manera adecuada a la enzima lacasa.

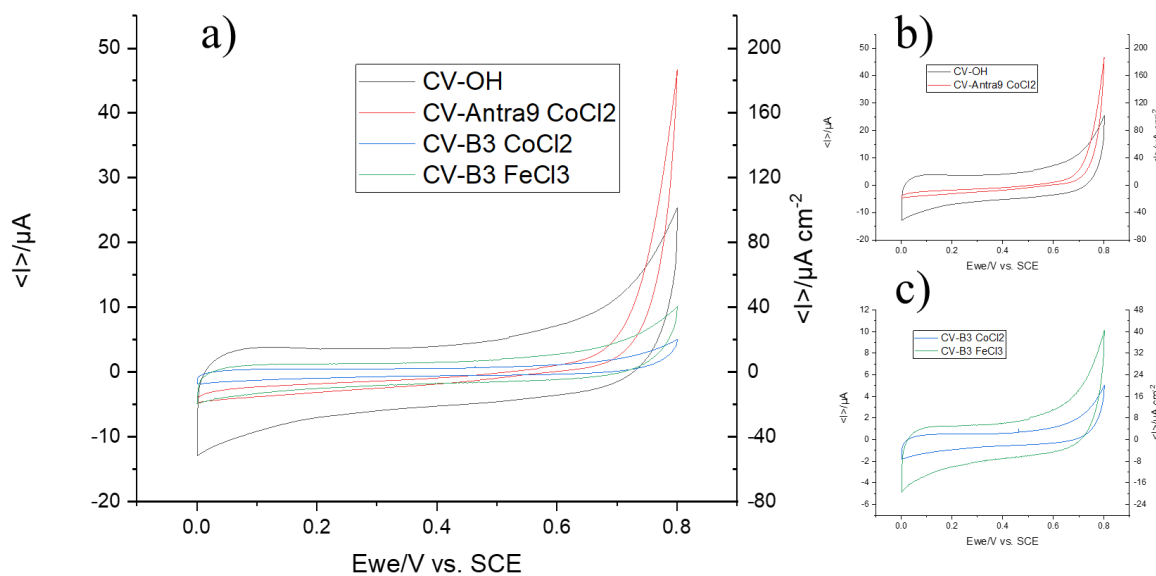


Figura 27 Voltamperometría Cíclica de los electrodos de CV.

El concentrado de los triplicados para el CV se muestra en la tabla 6, donde se observa con claridad como su densidad de corriente es bastante buena en comparación con el resto de los métodos. Además, su OCP es más alto en comparación con todos los demás materiales.

Tabla 6 Resultados de inmovilización en CV

Material	Método de síntesis	Potencial de Circuito Abierto (OCP) [V]			Corriente en 0.2 V [μA]		
		Máximo	Promedio	s	Máximo	Promedio	s
CV-OH	Fenton	0.530	0.520	0.010	-7.260	-6.341	0.842
CV-B3	CoCl ₂	0.463	0.427	0.032	-0.607	-0.489	0.108
CV-B3	FeCl ₃	0.504	0.487	0.021	-2.680	-2.529	0.158
CV-Antra9	CoCl ₂	0.569	0.567	0.002	-3.903	-3.565	0.297

6.5. Selección del material para la celda de gravedad

Para la celda de gravedad, se eligió el CV modificado con ácido antraceno-9-carboxílico y $CoCl_2$ como catalizador como el material de prueba, esto ya que a pesar de tener una reducción menos marcada en los voltamperogramas que los materiales de CNFs, su corriente es notablemente más alta y con ello, la generación de energía sería más alta.

Previo a la implementación en la celda de gravedad, se realizaron pruebas de cronoamperometría y voltamperometría con el buffer sin modificar (aire), saturándolo con N_2 y saturándolo con O_2 , esto con el fin de mostrar la respuesta enzimática a la presencia del sustrato sobre el que actúa. Además, en la cronoamperometría, se agregó al final una solución de NaF 1M, con el fin de mostrar la inactivación enzimática y con ello verificar, que efectivamente estamos hablando de una respuesta enzimática.

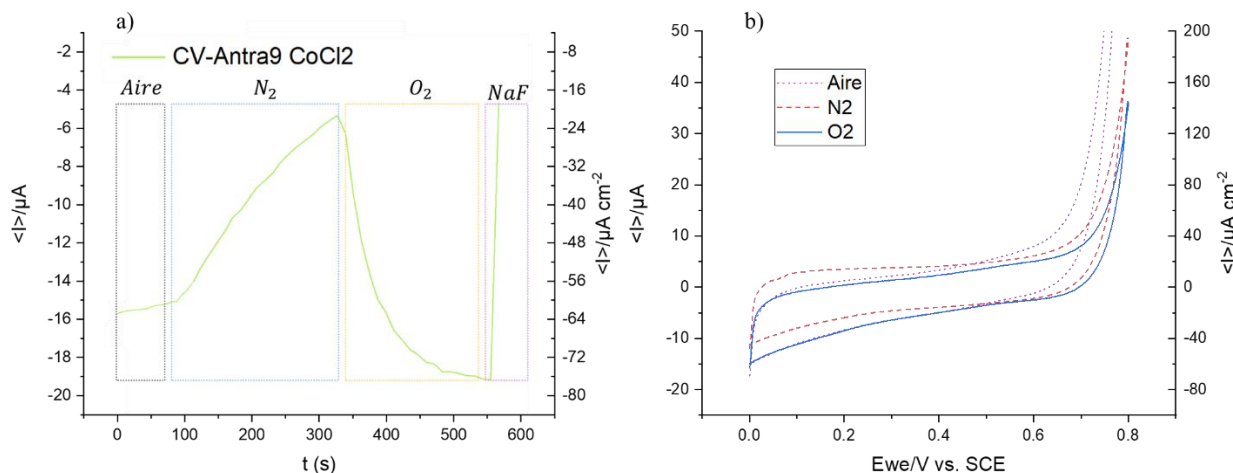


Figura 28 Pruebas en solución tampón sin modificar, saturada con N_2 y saturada con O_2

Como se esperaba, en las figuras 28a y 28b, se muestra como la respuesta enzimática mejora en presencia de oxígeno y se reduce en presencia de nitrógeno en comparación con el blanco (aire disuelto).

Algo muy notorio, es que en la voltamperometría cíclica (28b) en presencia de aire no tiene diferencia significativa con la de oxígeno saturado en el rango de 0-0.4 V, pero a partir de ahí, la de aire inicia un crecimiento muy rápido, mientras que la del oxígeno muestra una respuesta más estable. En

un sistema como la enzima lacasa, que es una oxidoreductasa, tener los valores del extremo de la oxidación más bajos, indican que tendrá una mejor respuesta que los que tienen unos valores más altos. Lo anterior se debe, a que un tamaño de “pico” más bajo, indica una menor acción oxidativa y por tanto predominará más la acción reductora.

Por otro lado, y como se mencionó anteriormente, en la imagen 28a, es bastante clara la reacción enzimática a los diferentes cambios en su entorno y es muy clara la forma en que el NaF la inhibe prácticamente por completo, con lo que determinamos que los resultados obtenidos se derivan del trabajo de la enzima y no de los soportes de carbón.

Adicional a las pruebas anteriores, se realizó una prueba de estabilidad en presencia de cloruros; para ello, mientras se realizaba una cronoamperometría, se realizaron adiciones de cloruros para lograr las siguientes concentraciones en solución: 5mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 50 mM, 70 mM y 90 mM. Posterior a eso se agregó una solución de NaF 1M, con el fin de inactivar por completo la actividad enzimática.

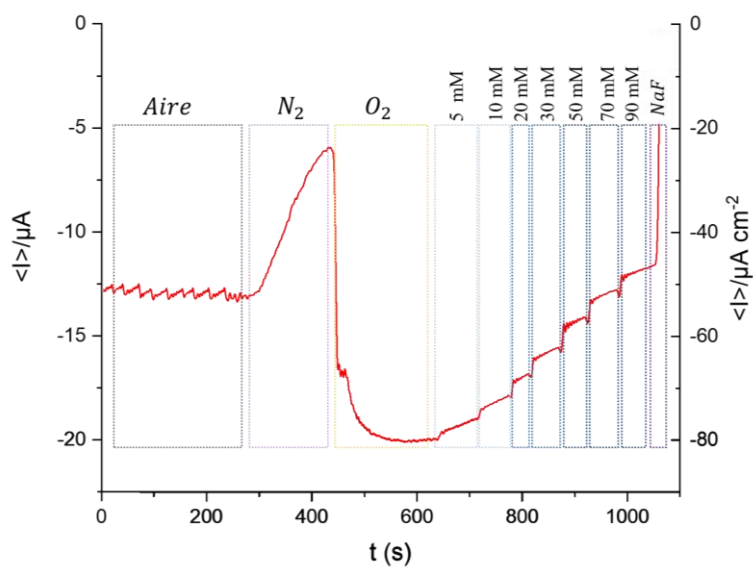


Figura 29 Prueba de respuesta a cloruros.

El experimento ilustrado en la figura 29, permite asegurar que la respuesta de nuestro electrodo es debido a la actividad enzimática y no a otra cosa. Además de que las adiciones de

cloruros, no permiten saber que la resistencia de nuestro material a las concentraciones de cloruros en ciertos fluidos(Gonçalves et al., 2019) como el sudor ($< 30 \text{ mM}$) y la saliva ($< 20 \text{ mM}$), están dentro del rango de tolerancia del material, por lo que su posible aplicación en un biosensor o una biocelda, con fluidos corporales como combustible es posible.

6.6. Pruebas de la Celda de gravedad

Para realizar las pruebas sobre la celda de gravedad, primero se evaluó el trabajo en conjunto del electrodo de CV modificado con ácido antraceno-9-carboxílico y CoCl_2 como catalizador, y el electrodo a base de glucosa oxidasa y ferroceno proporcionado por el LabMyN; por medio de pruebas de curvas de descarga.

Esta evaluación se realizó en un vaso de precipitados con soluciones con diferentes concentraciones de glucosa, obteniendo los resultados de la figura 30.

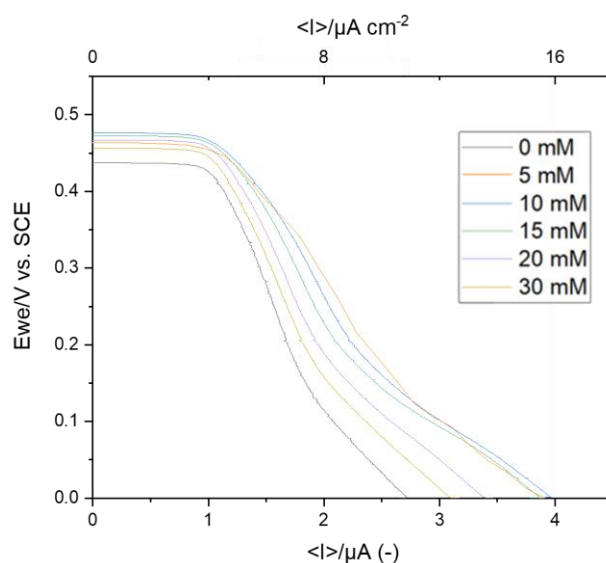


Figura 30 Curvas de descarga a diferentes concentraciones de glucosa

Encontrando que, en una concentración de 10 mM de glucosa, existe la corriente máxima y al incrementar la concentración, la corriente disminuye en lugar de aumentar.

6.6.1. Validación de la celda

Una vez montados los electrodos en la celda de gravedad, se cerró y se aseguró que no tuviera fugas cubriendo con parafina las áreas de unión. Se llenó con la solución tampón con la concentración de glucosa correspondiente y se mantuvo suspendida en el aire, sostenida por unas pinzas a un soporte universal. El combustible se añadió por goteo con ayuda de un gotero (con el fin de simular las condiciones previstas de trabajo) y el combustible que era expulsado por el orificio inferior, fue recolectado en un vaso de precipitados.

El sistema se muestra en la figura 31, como se mencionó en la sección 5.2.2, la evaluación se llevó a cabo con 2 electrodos. Para ello, una vez conectada la celda al potenciostato, se dejó que el sistema estabilizara su OCP y se procedió a realizar las pruebas de descarga.

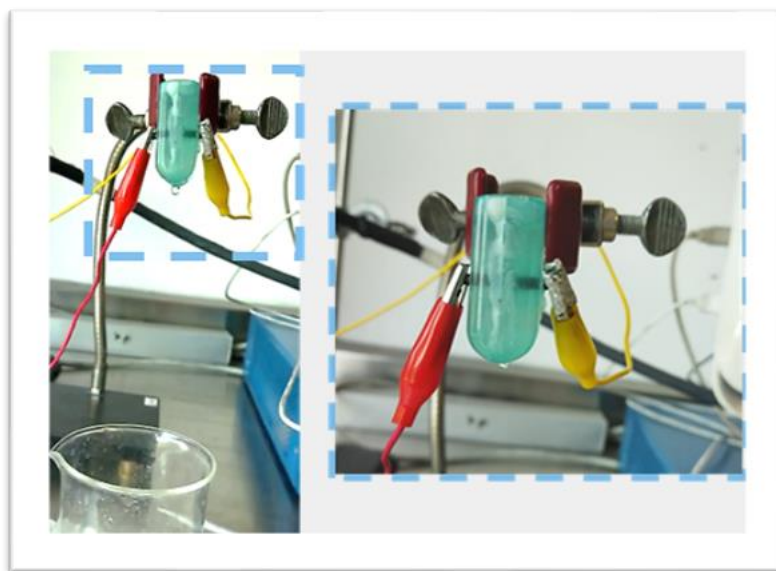


Figura 31 Celda de gravedad en funcionamiento.

Un parámetro importante en la propuesta de celda de gravedad, es el flujo de combustible que pasa a través de ella, mediciones en diferentes celdas con el mismo diseño fueron realizadas y se obtuvo que el flujo es de $10 \pm 2 \mu\text{L s}^{-1}$.

Se realizaron pruebas de descarga con el fin de caracterizar a la celda, obteniendo los resultados de la figura 32.

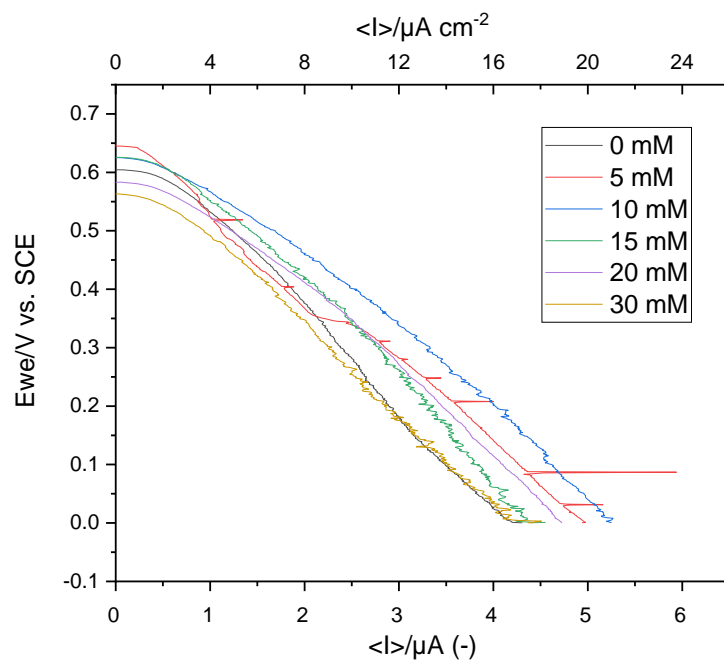


Figura 32 Curvas de descarga de la celda de gravedad a distintas concentraciones de glucosa.

De la figura 32, resaltan tres características muy interesantes, la primera es que, a pesar de tener la misma área de trabajo, los electrodos en la celda de gravedad presentaron una mayor corriente en comparación con aquellos que se utilizaron en el vaso de precipitados. La segunda surge de la observación de las curvas de descarga, parece ser que al menos en la concentración de 5 mM, la celda se vuelve muy sensible al goteo de combustible y reacciona en consecuencia con picos de corriente, esto puede deberse a el ingreso de glucosa, de oxígeno o ambos.

Llama la atención que se mantiene la tendencia de la figura 30, al mantener su mejor respuesta en una concentración de 10 mM y en disminuir la corriente al aumentar la concentración por arriba de los 10 mM.

En la figura 33, se ilustra la densidad de corriente y la densidad de poder de la celda a la concentración óptima de glucosa (10 mM). La densidad de poder máxima de $2.377 \mu W s^{-1}$ se encontró a 0.365 V.

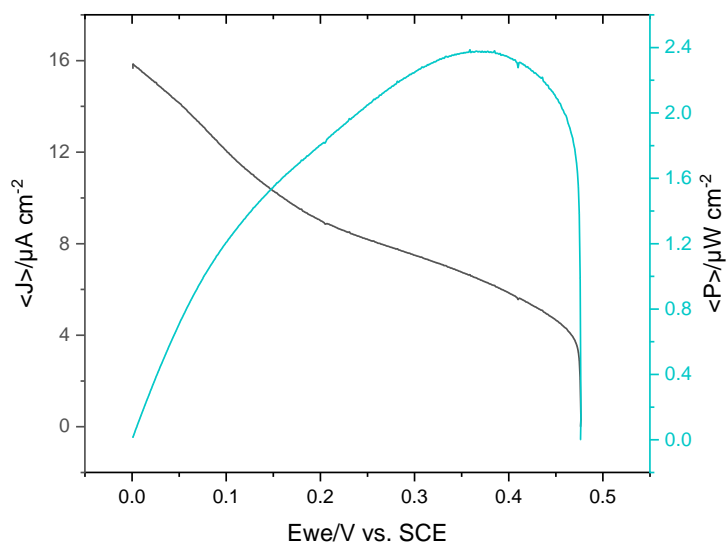


Figura 33 Densidad de potencia y carga a 10mM de glucosa.

En la tabla 7, se presenta un resumen derivado de indagar en diferentes fuentes, donde se compara el funcionamiento de celdas que utilizan a la glucosa oxidasa y a la lacasa como biocatalizadores. Habiendo obtenido en esta tesis, resultados equiparables con investigaciones previas.

Tabla 7 Resumen de celdas de combustible GOx-Lacasa

Material del electrodo/Biocatalizador	Ánolito/ Cátolito	OCP [V]	Densidad de Poder en [$\mu\text{W}/\text{cm}^2$]	Referencia
MWCNT,CV-Antra9/GOx, Lacasa	Ferroceno/ NA	0.37	2.4	Este trabajo
CNT-LIG/ GOx, Lacasa	PBQ/ ABTS	0.35	2.2	(U.S. et al., 2021)
SWCNT/GOx,Laccase	FEMOL/ ABTS	0.44	1.64	(Beneyton et al., 2013)
HPG-Oro/GOx, Lacasa	NA/ NA	0.34	1.6	(du Toit y di Lorenzo, 2015)
MWCNT/GOx, Lacasa	FMCA/ Aire	0.45	3.2	(Yan et al., 2007)
CNT/Gox, Laccase	TCNQ-TTF/ Oxígeno	0.5	8.1	(Koo & Yoon, 2013)

7. Conclusiones

Gracias a los resultados obtenidos en las secciones 6.3 y 6.4, podemos aseverar que tanto la niacina como el ácido antraceno-9-carboxílico, son capaces de dirigir de manera preferencial la inmovilización de la enzima lacasa, siendo el ácido antraceno-9-carboxílico el que mejor respuesta obtuvo.

Tanto las nanofibras como el carbón vulcan, fueron superficies de sostén capaces de inmovilizar lacasa, esto es un resultado bastante interesante, ya que son materiales con un costo más bajo en comparación con nanotubos de carbono o nanopartículas de algunos metales, por lo que presentan un área de avance muy importante en la reducción de costos, en la inmovilización enzimática.

La celda de gravedad funcionó de manera satisfactoria y los bioelectrodos fabricados, funcionaron de forma adecuada al ser implementados en esta celda.

Este proyecto cumplió con los alcances esperados, debido a que el método de inmovilización resultó funcional y pudo ser aplicado en una celda de combustible. Además, se pudo proponer un nuevo tipo de celda que no requiere una fuente de energía externa para mantener el flujo de combustible, lo que representa una ventaja sobre otro tipo de celdas, que requieren bombas para mantener el combustible en movimiento.

8. Perspectivas a futuro

Se plantea una revisión más extensa a la modificación con niacina, debido a que el OCP en media celda, así como la voltamperometría, indica que existe cierta orientación preferente de la enzima, por lo que un nuevo protocolo de modificación podría aprovechar esta cualidad, para generar una inmovilización de la enzima lacasa a menor costo.

El experimento de concepto de la “celda de gravedad”, proporcionó datos que indican su posible aplicación en celdas de combustible, ya que mantuvo el funcionamiento de los electrodos. Se debe desarrollar más este concepto, para encontrar resultados concluyentes; pero sin duda, es una propuesta que hasta el momento presenta luce prometedora.

La implementación de ánodos diferentes al utilizado en este trabajo (a base de glucosa oxidasa y ferroceno) debe ser revisada, a fin de caracterizar de manera más amplia los biocátodos presentados.

Finalmente, los electrodos presentados en este trabajo, podrían modificarse para su aplicación en dispositivos de sensado del tipo *self-powered*, para lo cual, es necesario un mayor desarrollo.

9. Referencias bibliográficas.

- Alvarado Ramírez, L. (2015). *INMOVILIZACIÓN DE LACASAS EN ESFERAS DE SiO₂ PARA LA DEGRADACIÓN DE ROJO CONGO*. Universidad Autónoma De Nuevo León.
- Beneyton, T., Wijaya, I. P. M., Salem, C. ben, Griffiths, A. D., & Taly, V. (2013). Membraneless glucose/O₂ microfluidic biofuel cells using covalently bound enzymes. *Chemical Communications*, 49(11), 1094–1096. <https://doi.org/10.1039/c2cc37906f>
- Cabana, H., Jones, J. P., & Agathos, S. N. (2007). Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals. *Journal of Biotechnology*, 132(1), 23–31. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.07.948>
- Camacho Córdova, D., Borges, R., Carbajal Arizaga, G., Wypych, F., & Krieger, N. (2009). Immobilization of laccase on hybrid layered double hydroxide. *Quimica Nova - QUIM NOVA*, 32. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000600025>
- Cosnier, S., Le Goff, A., & Holzinger, M. (2013). Nanobioelectrochemistry. In F. N. Crespilho (Ed.), *Nanobioelectrochemistry: From Implantable Biosensors to Green Power Generation* (Vol. 9783642292). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-29250-7>
- Dana, M., Khaniki, G. B., Mokhtarieh, A. A., & Davarpanah, S. J. (2017). Biotechnological and industrial applications of laccase: A review. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 4(4), 675–679.
- De Stefano, L., Rea, I., De Tommasi, E., Rendina, I., Rotiroti, L., Giocondo, M., Longobardi, S., Armenante, A., & Giardina, P. (2009). Bioactive modification of silicon surface using self-assembled hydrophobins from *Pleurotus ostreatus*. *The European Physical Journal. E, Soft Matter*, 30, 181–185. <https://doi.org/10.1140/epje/i2009-10481-y>
- du Toit, H., & di Lorenzo, M. (2015). Continuous power generation from glucose with two different miniature flow-through enzymatic biofuel cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 69, 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.02.036>
- Dwivedi, U., Singh, P., Pandey, V., & Kumar, A. (2011). Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68, 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.11.002>
- Elouarzaki, K., Cheng, D., Fisher, A. C., & Lee, J. M. (2018). Coupling orientation and mediation strategies for efficient electron transfer in hybrid biofuel cells. *Nature Energy*, 3(7), 574–581. <https://doi.org/10.1038/s41560-018-0166-4>
- Giroud, F., & Minteer, S. D. (2013). Anthracene-modified pyrenes immobilized on carbon nanotubes for direct electroreduction of O₂ by laccase. *Electrochemistry Communications*, 34, 157–160. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2013.06.006>
- Gonçalves, A. C., Marson, F. A. L., Mendonça, R. M. H., Bertuzzo, C. S., Paschoal, I. A., Ribeiro, J. D., Ribeiro, A. F., & Levy, C. E. (2019). Chloride and sodium ion concentrations in saliva and sweat as a method to diagnose cystic fibrosis. *Jornal de Pediatria*, 95(4), 443–450. <https://doi.org/10.1016/j.jped.2018.04.005>
- Ibrahim, N., Gouda, M., El-shafei, A., & Abdel-Fatah, O. (2007). Antimicrobial activity of cotton fabrics containing immobilized enzymes. *Journal of Applied Polymer Science*, 104, 1754–1761. <https://doi.org/10.1002/app.25821>
- Janusz, G., Pawlik, A., Świdarska-Burek, U., Polak, J., Sulej, J., Jarosz-Wilkolazka, A., &

- Paszczyński, A. (2020). Laccase properties, physiological functions, and evolution. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/ijms21030966>
- Ji, C., Hou, J., Wang, K., Ng, Y. H., & Chen, V. (2017). Single-Enzyme Biofuel Cells. *Angewandte Chemie*, 129(33), 9894–9898. <https://doi.org/10.1002/ange.201703980>
- Kim, S., Shin, H., & Kang, C. (2020). A Wired Laccase Oxygen Cathode with Carboxylated Single-Walled Carbon Nanotubes Incorporated. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 41(7), 765–772. <https://doi.org/10.1002/bkcs.12066>
- Komura, K., Ozaki, A., Ieda, N., & Sugi, Y. (2008). FeCl₃·6H₂O as a versatile catalyst for the esterification of steroid alcohols with fatty acids. *Synthesis*, 21, 3407–3410. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1083175>
- Koo, M. H., & Yoon, H. H. (2013). Fabrication of carbon nanotubes and charge transfer complex-based electrodes for a glucose/oxygen biofuel cell. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 13(11), 7434–7438. <https://doi.org/10.1166/jnn.2013.7859>
- Krikstolaityte, V., Barrantes, A., Ramanavicius, A., Arnebrant, T., Shleev, S., & Ruzgas, T. (2014). Bioelectrocatalytic reduction of oxygen at gold nanoparticles modified with laccase. *Bioelectrochemistry*, 95, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2013.09.004>
- López, E. A. (2016). *Inmovilización de lacasa de Coriopsis gallica en nanoestructuras magnéticas*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Luz, R. A. S., Pereira, A. R., de Souza, J. C. P., Sales, F. C. P. F., & Crespilho, F. N. (2014). Enzyme Biofuel Cells: Thermodynamics, Kinetics and Challenges in Applicability. *ChemElectroChem*, 1(11), 1751–1777. <https://doi.org/10.1002/celec.201402141>
- Martínez Ruiz, J. (2015). Caracterización cinética y aplicaciones biotecnológicas de Lacasa. In *All rights reserved. IJES* (Vol. 281, Issue 4). Universidad de Murcia.
- Matijošytė, I., Arends, I. W. C. E., de Vries, S., & Sheldon, R. A. (2010). Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62(2), 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.09.019>
- Mehra, R., Muschiol, J., Meyer, A. S., & Kepp, K. P. (2018). A structural-chemical explanation of fungal laccase activity. *Scientific Reports*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35633-8>
- Messerschmidt, A. (1997). *Multi-Copper Oxidases* (pp. 107–109). WORLD SCIENTIFIC. <https://doi.org/10.1142/3146>
- Messerschmidt, A., Rossi, A., Ladenstein, R., Huber, R., Bolognesi, M., Gatti, G., Marchesini, A., Petruzzelli, R., & Finazzi-Agró, A. (1989). X-ray crystal structure of the blue oxidase ascorbate oxidase from Zucchini. Analysis of the polypeptide fold and a model of the copper sites and ligands. *Journal of Molecular Biology*, 206(3), 513–529. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(89\)90498-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(89)90498-1)
- Moeder, M., Martin, C., & Koeller, G. (2004). Degradation of hydroxylated compounds using laccase and horseradish peroxidase immobilized on microporous polypropylene hollow fiber membranes. *Journal of Membrane Science*, 245(1), 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2004.07.024>
- Mot, A. C., & Silaghi-Dumitrescu, R. (2012). Laccases: Complex architectures for one-electron oxidations. *Biochemistry (Moscow)*, 77(12), 1395–1407. <https://doi.org/10.1134/S0006297912120085>
- Nogala, W., Rozniecka, E., Zawisza, I., Rogalski, J., & Opallo, M. (2006). Immobilization of

- ABTS – laccase system in silicate based electrode for bioelectrocatalytic reduction of dioxygen. *Electrochemistry Communications*, 8(12), 1850–1854.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.elecom.2006.08.024>
- Portaccio, M., Di Martino, S., Maiuri, P., Durante, D., De Luca, P., Lepore, M., Bencivenga, U., Rossi, S., De Maio, A., & Mita, D. G. (2006). Biosensors for phenolic compounds: The catechol as a substrate model. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 41(3), 97–102.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.05.002>
- Riva, S. (2006). Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*, 24(5), 219–226. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.03.006>
- Rodríguez-Delgado, M. M., Alemán-Nava, G. S., Rodríguez-Delgado, J. M., Dieck-Assad, G., Martínez-Chapa, S. O., Barceló, D., & Parra, R. (2015). Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 74, 21–45.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.008>
- Servat, K., Tingry, S., Brunel, L., Querelle, S., Cretin, M., Innocent, C., Jolival, C., & Rolland, M. (2007). Communication Orale : “Modification of porous carbon tubes with enzymes : application for biofuel cells.” *Journal of Applied Electrochemistry*, 37, 121–127.
<https://doi.org/10.1007/s10800-006-9221-0>
- Solomon, E. I., Sundaram, U. M., & Machonkin, T. E. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews*, 96(7), 2563–2605. <https://doi.org/10.1021/cr950046o>
- U.S., J., Rewatkar, P., & Goel, S. (2021). Miniaturized polymeric enzymatic biofuel cell with integrated microfluidic device and enhanced laser ablated bioelectrodes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(4), 3183–3192.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.06.133>
- Vaz Domínguez, C. (2009). *Inmovilización covalente y orientada de enzima lacasa sobre distintas superficies para su uso como cátodo en pilas de combustible*. Universidad Autónoma de Madrid.
- Velusamy, S., Borpuzari, S., & Punniyamurthy, T. (2005). Cobalt(II)-catalyzed direct acetylation of alcohols with acetic acid. *Tetrahedron*, 61(8), 2011–2015.
<https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.01.006>
- Vogel, A., & May, O. (2019). Industrial enzyme applications. In *Industrial Enzyme Applications*.
<https://doi.org/10.1002/9783527813780>
- Wu, G., Gao, Y., Zhao, D., Ling, P., & Gao, F. (2017). Methanol/Oxygen Enzymatic Biofuel Cell Using Laccase and NAD⁺-Dependent Dehydrogenase Cascades as Biocatalysts on Carbon Nanodots Electrodes. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 9(46), 40978–40986.
<https://doi.org/10.1021/acsami.7b12295>
- Yan, Y., Su, L., & Mao, L. (2007). Multi-walled carbon nanotube-based glucose/O₂ biofuel cell with glucose oxidase and laccase as biocatalysts. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 7(4–5), 1625–1630. <https://doi.org/10.1166/jnn.2007.346>
- Yoshida, H. (1883). Chemistry of Lacquer (Urushi). *J. Chem. Soc. Trans.*, 43(47), 472–486.