



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

Desarrollo de bioánodos a partir de glucosa oxidasa (GOx) para su aplicación en biomicroceldas que usan glucosa como combustible

Tesis para obtener el grado de:

Maestro en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta:

Q.F.B Ricardo Antonio Escalona Villalpando.

Asesor: Dra. Janet Ledesma García.

Coasesor: Dra. en C. Marisol Galván Valencia.

Querétaro, Querétaro, Septiembre 2014.



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

Desarrollo de bioánodos a partir de glucosa oxidasa (GOx) para su aplicación en biomicroceldas que usan glucosa como combustible

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta:

Q.F.B Ricardo Antonio Escalona Villalpando

Dirigido por:

Dra. Janet Ledesma García

Codirector

Dra. en C. Marisol Galván Valencia

SINODALES

Dra. Janet Ledesma García
Presidente



Firma

Dra. en C. Marisol Galván Valencia
Secretario



Firma

Dr. Rufino Nava Mendoza
Vocal



Firma

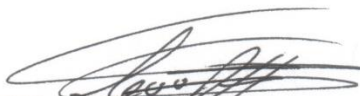
Dr. Luis Gerardo Arriaga Hurtado
Suplente



Firma

M. en C. Gustavo Pedraza Aboytes
Suplente



Firma

M.S.P Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad de Química

Dr. Iliseo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
México
Septiembre del 2014

RESUMEN

En el presente trabajo, se evaluaron tres formas diferentes de inmovilización de la enzima glucosa oxidasa (GOx) para su uso como bioánodo en una biocelda de combustible híbrida microfluídica (BCH- μ F) que utiliza glucosa como combustible. Los métodos de inmovilización probados fueron: adsorción física, por entrecruzamiento e inmovilización covalente de la GOx. La inmovilización física de la GOx se caracterizó por voltamperometría cíclica (VC) encontrándose un pico de oxidación en -0.44 V y otro de reducción a -0.49 V (vs Electrodo de Calomel Saturado ECS) pertenecientes al cofactor FAD/FADH₂ (Flavín adenín dinucleótido) respectivamente. Por otro lado, los dos agentes entrecruzadores evaluados fueron glutaraldehído (GA), poli-L-lisina y una combinación de ambos, obteniendo con GA (4.5 %) una mayor cantidad de GOx inmovilizada con un recubrimiento de $2.6865 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$. Posteriormente, el depósito se optimizó con el uso de nanotubos de carbono de multipared (NTCMP) combinados con GOx y GA (1%), mejorando la transferencia directa de electrones (TDE), caracterizado por métodos electroquímicos y por FTIR (espectroscopia de infrarrojo con transformadas de Fourier). Mediante el modelo de Laviron se estimó el coeficiente de transferencia de electrones (α) cuyo valor resultante fue de 0.5 y la constante de velocidad de la transferencia de electrones (Ks) fue de 1.01 s^{-1} para GOx/NTCMP-GA sobre grafito. Con el uso del bioánodo GOx/NTCMP-GA se obtuvo el mejor rendimiento dentro de una BCH- μ F utilizando Pt/C como cátodo en presencia de glucosa 5mM en BF, logrando un valor de potencial a circuito abierto de 0.72 V, 1.43 mA cm^{-2} de densidad de corriente y una potencia de $610 \text{ } \mu\text{W cm}^{-2}$, valores mayores de los reportados en literatura para una BCH- μ F de TDE. Adicionalmente, la inmovilización de la GOx/NTCMP-GA se realizó sobre una estructura de oro electrodepositada sobre grafito logrando un valor de $\alpha=0.5$ y $Ks=2.1 \text{ s}^{-1}$. Después se construyó un diseño de electrodo formado por el ácido 3-mercaptopropiónico anclado sobre la superficie de oro en presencia de EDC/NHS (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida)/N-hidroxisuccinamida) para favorecer la inmovilización covalente de la GOx.

Palabras clave: Glucosa oxidasa, biocelda de combustible microfluídica, transferencia directa de electrones.

SUMMARY

In this work, three different glucose oxidase (GOx) immobilization methods were evaluated to be used as a bioanode inside hybrid microfluidic biofuel cell (BCH- μ F) using glucose as fuel. The GOx immobilization methods were: physical adsorption, cross-linking and covalent. The physical immobilization of GOx was characterized by cyclic voltammetry (CV); a -0.44 V oxidation peak and a -0.49 V reduction peak (vs Saturated Electrode Calomel) belonging to the FAD/FADH₂ (Flavin adenine dinucleotide) cofactor respectively, were found. On other hand, the two cross-linking agents evaluated were glutaraldehyde (GA), poly-L-lysine (PLL) and a combination of both. The highest GOx immobilization, with a 2.6865×10^{-9} mol cm⁻² cover, was obtained through GA (4.5 %). Afterwards, the deposit was optimized with multiwall carbon nanotubes (MWCNT) combined with GOx and GA (1 %), which improved direct electron transfer (DET), characterized by electrochemical methods and FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy). The coefficient electron transfer (α) was estimated at 0.5 and the constant rate of electron transfer (Ks) was estimated at 1.01 s^{-1} via Laviron's model for GOx/MWCNT-GA on a graphite electrode. The best performance of BCH- μ F with the GOx/MWCNT-GA bioanode using Pt/C as a cathode in 5 mM of glucose in BF was obtained, resulting in an open circuit potential (OCP) of 0.72 V, current density at 1.43 mA cm^{-2} and power density at $610 \text{ } \mu\text{W cm}^{-2}$; these results are the highest reported for DET GOx/MWCNT-GA. Additionally, GOx/MWCNT-GA was immobilization on architecture of golden electrodeposited on graphite carbon obtaining values of $\alpha=0.5$ y $Ks=2.1 \text{ s}^{-1}$. Afterwards, 3-mercaptopropionic acid electrode was adsorbed on gold surface and modified by a mixture of EDC/NHS (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide/ N-hydroxisuccinamide) to promote covalent immobilization of GOx.

Keywords: Glucose oxidase, microfluidic biofuel cell, direct transfer electron.

.....como en el lenguaje de los grillo,
que en las noches más profundas y calmadas nos cuentan nuestras verdades e
historias míticas de la vida en forma de sonetos;
no escucháis, no entendéis su *Cri* por estar perdidos en un sueño profundo,
intermitente de vanidad,
la droga del cansancio,
cuando descifres ese *Cri*, podrás entender esa tesitura en palabras legibles:
*“para que pueda surgir lo posible
es preciso intentar una y otra vez lo imposible”*;
*“yo no estimo tesoros ni riquezas, y así, siempre me causa más contento
poner riquezas en mi pensamiento que no en mi pensamiento en las riquezas”*
sólo cuando descifres el lenguaje de los grillos,
entenderás que el mundo es redondo,
porque tiene el mismo inicio y el mismo fin,
este donde se este.....

**A aquellas personas que colaboraron de una u otra forma e hicieron posible
el término de este proyecto con resultados favorables, ya sea académica,
anímica, emocional e intelectualmente.**

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia, agradecer a la Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental con la coordinación de la Mtra. en C. Beatriz Del Rocío Verduzco Cuéllar, a los profesores y personal, por el apoyo brindado y darme la oportunidad de estudiar la maestría en la UAQ. Al rector de la UAQ Gilberto Herrera Ruíz por el apoyo de beca los primeros meses de la maestría y apoyar incondicionalmente a la maestría desde su creación hasta la incorporación al PNPC. Un agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo de beca brindado por un año para el término de la maestría y los productos generados.

Al comité del proyecto de tesis por las observaciones oportunas para enriquecer el trabajo. Agradecer el tiempo brindado y trabajo en conjunto a mi directora de tesis Janet y codirectora de tesis Marisol, una solmene gran amiga que tengo mucho que aprender y admiro por muchos detalles. A mis compañeros de la maestría, Olga, Malú y Berenice.

A las personas, compañeros y amigos participes del proyecto que estuvieron allí para colaborar, ayudar y enriquecer el trabajo: Gerardo por sus opiniones y observaciones, Sergio por su templanza y enseñanza, Polet, Dulce, Walter, Pepe, Euth, Minerva, Sandra, Andrés, y los sentidos que si se me olvidaron anotar fue por olvido o porque no lo considero necesario.

A mi familia con sus nuevos integrantes que me han enseñado sentirme más humano al no encontrarse a la vuelta de la esquina como antes, y por nuevas etapas cada vez menos predecibles. A mi padre Ricardo y madre Rosa, hermanos Mónica, Sergio, Tania y Sinue y los nuevos frutos de la familia, Cecy, Sarení, Damián, Daniela y la pequeña célula en diferenciación que ya nacio, Samara. A mi familia adoptiva en Querétaro y Marx por todo el apoyo brindado, paciencia, respeto, etc., etc., etc., mi gratitud. Finamente, y no menos importante, a esa sensación que siempre se encuentra, acompaña e impregna de trabajo, cuidado, consejos, y una fuerza extra para terminar el día bien.

TABLA DE CONTENIDOS	Página
1. INTRODUCCIÓN	16
2. ANTECEDENTES	21
2.1 Celdas de combustible	21
2.2 Clasificación de celdas de combustible que utilizan glucosa como combustible de acuerdo al catalizador	24
2.2.1 Celdas de combustible que utilizan catalizadores abióticos	24
2.2.2 Celdas de combustible que utilizan catalizadores microbianos	25
2.2.3 Celdas de combustible que utilizan catalizadores enzimáticos	25
2.2.4 Celdas de combustible híbrida	26
2.3 Desempeño de las bioceldas de combustible	27
2.4 Bioceldas de combustible microfluídicas	29
2.5 Glucosa Oxidasa (GOx)	31
2.5.1 Propiedades de la glucosa oxidasa (GOx)	32
2.5.2 Obtención natural de GOx y su función	32
2.5.3 Sustratos utilizados por la GOx	32
2.5.4 Aplicación de la GOx	33
2.5.5 Composición de la GOx	34
2.6 Métodos para la inmovilización de la enzima GOx	35
2.6.1 Unión a un soporte	36
2.6.1.1 <i>Polímeros orgánicos sintéticos</i>	36
2.6.1.2 <i>Biopolímeros</i>	37
2.6.1.3 <i>Hidrogeles</i>	37
2.6.1.4 <i>Soportes Inorgánicos</i>	38
2.6.1.5 <i>Polímeros inteligentes</i>	39
2.6.1.6 <i>Unión covalente a partir de la activación de grupos químicos del soporte</i>	39
2.6.1.7 <i>Inmovilización por afinidad antígeno-anticuerpo</i>	41

2.6.2 Atrapamiento o encapsulación	42
2.6.2.1 Atrapamiento por medio de sol-gel	42
2.6.2.2 Atrapamiento por electropolimerización	43
2.6.2.3 Inmovilización por atrapamiento y por medio de biopolímeros	43
2.6.2.4 Atrapamiento utilizando membranas	44
2.6.3 Inmovilización por entrecruzamiento	45
3. HIPÓTESIS	47
4. OBJETIVOS	47
4.1 Objetivo General	47
4.2 Objetivos particulares	47
5. METODOLOGÍA	48
5.1 Pre-tratamiento del electrodo de grafito	48
5.2 Preparación del electrodo de grafito con GOx (inmovilización física)	48
5.3 Preparación del electrodo con GOx utilizando agentes de entrecruzamiento glutaraldehído (GA), poli-L-lisina (PLL) y GA-PLL	49
5.4 Preparación del electrodo GOx/NTCMP-GA	49
5.5 Preparación del electrodo para la inmovilización covalente de GOx	49
5.6 Síntesis de la estructura de oro	50
5.7 Evaluación de biocelda de combustible híbrida microfluídica (BCH-μF) “Y”	50
5.8 Evaluación de la BCH-μF tipo air-breathing	51
5.9 Caracterización y mediciones electroquímicas	51
5.9.1 Mediciones por voltametría cíclica (VC)	51
5.9.2 Medición por voltametría de pulso diferencial (VPD)	52
5.10 Microscopio Electrónico de barrido	52
6. RESULTADOS Y DISCUSION	53

6.1 Inmovilización de GOx unida a un soporte	53
6.1.1 Transferencia electrónica mediada por GOx	53
6.1.2 Cálculo de la densidad del área electroactiva de GOx	55
6.1.3 Oxidación de D-(+)-glucosa por GOx	56
6.1.3.1 Mecanismo de reacción en la oxidación de la glucosa por GOx	58
6.1.4 Desempeño del bioánodo a partir de GOx en una biocelda de combustible híbrida microfluídica (BCH- μ F)	61
6.4 Inmovilización de GOx por entrecruzamiento (cross-linking)	62
6.4.1 Caracterización electroquímica de GOx con glutaraldehído (GA)	63
6.4.2 Cálculo de la densidad del área electroactiva de GOx-GA	64
6.4.3 Evaluación de GOx-GA(0.2 %) en presencia de la D-(+)-glucosa	65
6.4.4 Caracterización electroquímica de GOx con poli-L-lisina	67
6.4.5 Evaluación de GOx-PLL en presencia de la D-(+)-glucosa	68
6.4.6 Caracterización electroquímica de GOx en una mezcla de GA y PLL	71
6.4.7 Evaluación de GOx/GA-PLL en presencia de la D-(+)-glucosa	72
6.4.8 Estudio de los electrodos GOx-PLL y GOx/GA-PLL a diferentes velocidades de barrido	73
6.4.9 Rendimiento del bioánodo GOx-GA(0.2%) en una biocelda de combustible híbrida microfluídica (BCH- μ F)	76
6.5 Estudio para facilitar la transferencia de los electrones de la GOx al electrodo	78
6.6 Caracterización electroquímica de GOx/NTCMP-GA	79
6.6.1 Cálculo de la densidad del área electroactiva de GOx/NTCMP-GA (1%)	81
6.6.2 Evaluación del sistema GOx/NTCMP-GA (1%) a diferentes velocidades de barrido	81
6.6.3 Efecto de GOx/NTCMP-GA a diferentes pH	82
6.6.4 Estabilidad de electrodo GOx/NTCMP-GA por	84

voltamperometría cíclica	
6.6.5 Rendimiento del bioánodo GOx/NTCMP-GA en una BCH- μ F	85
6.6.6 Combustible utilizado por las BCH- μ F en forma de "Y" y air-breathing	92
6.7 Inmovilización de GOx sobre una estructura de oro	93
6.7.1 Electrosíntesis de la estructura de oro	93
6.7.2 Caracterización electroquímica de GOx-GA y GOx/NTCMP-GA inmovilizados sobre la estructura de oro en forma de flor	96
6.7.3 Evaluación de los sistemas Au-GOx-GA y Au-GOx/NTCMP-GA a diferentes velocidades de barrido	97
6.7.4 Evaluación de Au-GOx-GA y Au-GOx/NTCMP-GA en presencia de la D-(+)-glucosa	98
6.8 Inmovilización covalente de la enzima GOx	101
6.8.1 Adsorción del ácido 3-mercaptopropionico en la estructura de oro	101
6.8.2 Activación del ácido carboxílico con EDC/NHS y la unión covalente de GOx	104
6.8.3 Evaluación del electrodo Au-S-(CH ₂) ₂ -CO-NHGOx a diferentes velocidades de barrido	108
6.8.4 Evaluación del electrodo Au-S-(CH ₂) ₂ -CO-NHGOx en presencia de la D-(+)-glucosa	109
6.8.5 Evaluación del electrodo de Au durante sus diferentes modificaciones en presencia de la β -d-glucosa	109
6.8.6 Estabilidad de electrodo Au-S-(CH ₂) ₂ -CO-NHGOx por voltamperometría cíclica	110
7. CONCLUSIONES	113
8. REFERENCIAS	115
APENDICE	127

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Acoplamiento de las reacciones de oxidación de la glucosa y reducción de oxígeno en una celda de combustible.	25
2	Oxidación completa de la glucosa a CO ₂ y H ₂ O.	25
3	Reacción de oxidación y reducción enzimáticas en una biocelda de combustible.	28
4	Curva de polarización con las tres diferentes etapas del sobrepotencial	30
5	Componentes de una biocelda de combustible microfluídica	33
6	Estructura del sitio activo de la glucosa oxidasa de <i>Aspergillus niger</i> .	37
7	Inmovilización a un soporte utilizando Eupergit [®] .	39
8	Estructura del hidrogel polivinílico	40
9	Reacción entre el polímero polyNIPAM y GOx	41
10	Unión covalente de GOx sobre una superficie de oro modificada	42
11	Inmovilización de GOx por afinidad antígeno-anticuerpo	43
12	Atrapamiento de GOx	44
13	Mecanismo general de reacción de la formación del sol-gel alrededor de GOx	45
14	Estructura del quitosano	46
15	Inmovilización de GOx por entrecruzamiento	47
16	Interacción química entre los grupos funcionales del glutaraldehído con GOx.	48
17	Voltamperogramas cíclicos tanto del electrodo de grafito sin modificar como del electrodo modificado con la enzima GOx sin inmovilizar.	56
18	Voltamperogramas cíclicos de la oxidación-reducción del cofactor por FAD/ FADH ₂ depositado sobre un electrodo de grafito (línea roja) y respuesta del electrodo sin modificar (línea azul).	57
19	Efecto del FAD/FADH ₂ de GOx en presencia de 0, 1, 5, 10, 20, 50 y 100 mM de D-(+)-glucosa.	59
20	Reacción reversible de FAD-FADH ₂ por un proceso electroquímico (A) y enzimático en presencia de glucosa (B).	60
21	Estructura química de FAD.	61

22	Mecanismo de reacción de GOx en la oxidación de glucosa en ausencia de oxígeno	62
23	Hidrólisis de la gluconolactona para la formación del ácido glucónico.	62
24	Curvas de polarización del rendimiento de la biocelda de combustible híbrida. El bioánodo de carbono fue modificado con GOx depositada en la superficie. El desempeño de la celda fue evaluada con flujos de 1.5, 3.0 y 5.0 mL h ⁻¹ los cuales se incidan en el gráfico.	63
25	VC comparativa entre GOx-GA (0.2%) vs GOx-GA (4.5%).	66
26	Mecanismo de reacción entre GOx y el GA.	67
27	VC comparativas de GOx-GA (0.2 %) a diferentes concentraciones de glucosa (A), concentración de glucosa vs picos máximos de oxidación y reducción (B).	68
28	Modelo lineal de una dependencia potencial en el proceso de GOx-GA (0.2%).	68
29	Modelo lineal de una dependencia potencial en el proceso de GOx-GA (0.2%).	69
30	VC de GOx-PLL sobre grafito.	70
31	VC del electrodo GOx-PLL a diferentes concentraciones de glucosa saturado en nitrógeno (A) y oxígeno (B).	70
32	Reacción completa de la reducción de la glucosa en presencia de oxígeno.	71
33	Mecanismo de reacción de FADH ₂ a FAD en presencia de oxígeno y formación del H ₂ O ₂ .	72
34	VC de GOx inmovilizado con una mezcla de GA y PLL.	73
35	VC comparativa de GOx/GA-PLL a diferentes concentraciones de glucosa en ausencia de oxígeno (A) y saturado en oxígeno (B).	74
36	VCs comparativo del electrodo GOx-PLL a diferentes velocidades de barrido, de 20 a 1000 mV s ⁻¹ (A), velocidades de barrido VS máximos picos de oxidación y reducción (B).	75
37	VCs comparativo del electrodo GOx/GA-PLL a diferentes velocidades de barrido, de 20 a 1000 mV s ⁻¹ (A), velocidades de barrido VS máximos picos de oxidación y reducción (B).	75
38	Logaritmo de la velocidad vs máximos picos anódicos y catódicos para los sistemas GOx-PLL (A) y GOx/GA-PLL (C); y selección de los puntos que sugieren una mejor regresión lineal de GOx-PLL (B) y GOx/GA-PLL (D).	76

39	VC comparativo de GOx-GA (0.2 %), GOx (4.5 %), GOx-PLL y GOx/GA-PLL.	77
40	Curvas de polarización comparativas del bioánodo GOx-GA (0.2 %) en una BCH- μ F a fluidos ideales y a diferentes flujos.	78
41	Transferencia de los electrones generados por la oxidación de la glucosa a partir de la enzima con la intervención del mediador para transferirlos al electrodo.	80
42	Transferencia de los electrones generados por la oxidación de la glucosa a partir de la enzima con la intervención del mediador para transferirlos al electrodo.	81
43	VCs comparativa entre los sistemas GOx/NTCMP-GA sin limpieza ácida <i>i</i> y con limpieza ácida GOx/NTCMP-GA <i>ii</i> .	82
44	VC del sistema GOx/NTCMP-GA al 1 % en BF pH 7 y 50 mV s^{-1} .	82
45	Transferencia de electrones ineficiente del centro catalítico de la enzima al electrodo (izquierda); implementación de los NTC para facilitar la transferencia de los electrones.	83
46	Velocidades de barrido del electrodo GOx/NTCMP-GA de 20 a 200 mV s^{-1} (A) y picos máximos catódicos y anódicos con respecto a la velocidad de barrido (B).	84
47	VCs comparativas de GOx/NTCMP-GA a pH 4, 5, 6, 7, 8 y 9 (A) y relación lineal del pH vs E° (B).	85
48	Análisis FT-IR comparativo de GOx puro (línea roja) y GOx/NTCMP-GA (línea negra).	86
49	Prueba de estabilidad de GOx/NTCMP-GA comparando el 2do, 50mo y 100mo ciclo.	87
50	Curvas de polarización comparativas del desempeño del bioánodo GOx/NTCMP-GA en diferentes superficies de carbono.	88
51	Curvas de polarización comparativas del desempeño del bioánodo GOx/NTCMP-GA en presencia y ausencia de oxígeno en una BCH- μ F en forma de "Y".	89
52	Curvas de polarización comparativas del bioánodo GOx/NTCMP-GA utilizando unos y dos fluidos en la BCH- μ F.	89
53	Curva de polarización del bioánodo GOx/NTCMP-GA en una BCH- μ F air-breathing.	90
54	Perfil de la estructura de oro en H_2SO_4 (0.5 M).	96
55	Imágenes de la estructura de oro tomadas por una cámara fotográfica y por MEB.	97
56	VCs comparativas del grafito, Au-coliflor, Au-GOx-GA y Au-	99

	GOx/NTCMP-GA en PB pH 7 (0.1 M) en 50 mV s ⁻¹ .	
57	Graficas de los logaritmos de las velocidades con respecto a los picos máximos de oxidación y reducción para los electrodos Au-GOx-GA (A) y Au-GOx/NTCMP-GA (C); selección de los puntos que proporcionan una mejor linealidad de ambos electrodos (B y D).	100
58	Análisis del electrodo Au-GOx-GA a diferentes concentraciones de glucosa por VC (A) y VPD (B).	101
59	Análisis del electrodo Au-GOx/NTCMP-GA a diferentes concentraciones de glucosa por VC (A) y VPD (B).	102
60	VC comparativos de la adsorción del 3-AMP disuelto en diferentes disolventes; a) EtOH b) EtOH/H ₂ O (1:3), c) acetona/H ₂ O (1:1) y d) EtOH/H ₂ O (3:1). Y tabla comparativa del punto máximo de desorción del tiol y su área de cubrimiento.	104
61	Análisis FT-IR comparativo entre el 3-AMP (línea negra) y adsorbido sobre el oro (línea azul).	105
62	VC de GOx inmovilizado covalentemente sobre una superficie de oro modificada con tiol 3-AMP.	106
63	VC comparativo del electrodo de grafito modificado en una ventana de potencial de -0.9 a 0 V (A) y de 0 a 1.1 V en BF pH 7 a 50 mV s ⁻¹ .	108
64	Mecanismo de reacción entre el 3-AMP para la formación del éster derivado de NHS.	109
65	Hidrolisis del éster derivado de la carbodiimida EDC.	109
66	Ataque nucleofílico de GOx para la formación del enlace tipo amida con el tio adsorbido sobre la estructura de Au.	110
67	GOx formando uno y dos enlaces covalentes con el tiol adsorbido en el Au.	110
68	VC del electrodo con GOx inmovilizada de forma covalente a diferentes velocidades de barrido (B) y elección de los puntos que dieron una mejor regresión lineal (B).	111
69	VC comparativo del electrodo Au-S-(CH ₂) ₂ -CO-NHGOx a diferentes concentraciones de glucosa en ausencia (A) y presencia de oxígeno (B).	112
70	VC comparativa del electrodo Au-S-(CH ₂) ₂ -CO-NHGOx en un ventana de potencial de 0 a 1.1 V (A) y de -0.9 a 0.5 V (B) y el efecto activo del FAD/FADH ₂ de GOx en presencia de glucosa.	113
71	VC comparativo entre el 2do, 50mo y 100 ciclo del electrodo Au-S-(CH ₂) ₂ -CO-NHGOx, mostrando una señal constante.	114

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página
1	Comparación de la Γ de GOx inmovilizada sobre diferentes soportes.	58
2	Resultados de la BCH- μ F a diferentes flujos y días de operación.	75
3	Comparación de las eficiencias de diferentes bioceldas de combustible híbridas.	92

1. INTRODUCCIÓN

Las celdas de combustibles (CC) son una alternativa para la producción de energía por la conversión de energía química en eléctrica, de una forma más limpia y eficiente a partir de combustibles renovables como la glucosa. Las CC consisten de un ánodo donde se oxida el combustible, aprovechando los electrones generados en la reacción y, un biocátodo donde se reduce el oxidante cerrando así el circuito. Una de las ventajas de estos sistemas es que mientras se suministre combustible de forma constante se producirá energía continuamente.

Convencionalmente, se han empleado catalizadores abióticos en las celdas de combustible que usan glucosa como combustible, pero suelen ser costosos y tienden a disminuir su eficiencia en un periodo de tiempo corto a mediano. Una de las alternativas para el remplazo de dichos catalizadores son el uso de enzimas en el ánodo y cátodo llamadas bioceldas de combustible (BCC), o un sistema enzimático y otro abiótico para sistemas híbridos (BCH).

La ventaja de las BCC o BCH es que pueden operar con los dos fluidos, combustible y oxidante, sin la necesidad de una separación física, como membranas, lo que permite su miniaturización del dispositivo permitiendo la generación de energía, su almacenamiento y la interfaz electrónica en un solo dispositivo de dimensiones micro a nanométricas. Esta última propiedad es muy importante ya que las BCC o BCH microfluídicos tienen una potencial aplicación como fuente de energía en dispositivos biomédicos implantables, como marcapasos o neuro-estimuladores, aprovechando la glucosa y oxígeno que se encuentran en la circulación sanguínea.

Para elucidar con mayor claridad la investigación del presente trabajo experimental se muestra el planteamiento del problema y su respectiva justificación, posteriormente se describen los fundamentos teóricos proporcionando información de lo que se ha investigado en BCC. En los fundamentos teóricos se podrá encontrar una breve reseña histórica de celdas de

combustible y su clasificación de acuerdo al catalizador integrado. Posteriormente, se argumenta información de los parámetros importantes a evaluar en las BCC y de los diferentes tipos de celda, centrándose en las de tipo microfluídico. Finalmente, se muestra información relevante de la enzima glucosa enzima (GOX), dedicando un apartado de las diferentes formas y métodos de inmovilizaciones aplicadas para esta enzima. Después de la revisión de los fundamentos teóricos se plantea la hipótesis del trabajo, el objetivo general y los particulares, materiales y métodos utilizados en el presente proyecto.

Los resultados y discusión se encuentran organizados de acuerdo al método de inmovilización evaluado: Primero se presenta la inmovilización por adsorción anexando los estudios electroquímicos en la identificación de GOx, su mecanismo de reacción y su incorporación en una BCH microfluídica (BCH- μ F). Se continúa con la adición de agentes de entrecruzamiento como el glutaraldehído (GA) a diferentes concentraciones, la poli-L-lisina y una mezcla de ambas, mostrando los estudios electroquímicos de los tres sistemas y por último su evaluación dentro de una BCH- μ F del bioánodo que mejor propiedades presentó. Se prosigue con los estudios realizados en la incorporación de nanotubos de carbono de multipared (NTCMP) junto con la GOx-GA, presentando sus análisis electroquímicos, espectrofotométricos y su integración como bioánodo en dos diferentes diseños de BCH- μ F comparando sus desempeños y condiciones de operación. Posteriormente, se exhiben los resultados electroquímicos obtenidos al inmovilizar la GOx y GOX/NTCMP-GA sobre una superficie de oro electrodepositada sobre grafito, caracterizando su estructura por un método microscópico. Finalmente, la misma estructura de oro se utilizó para inmovilizar de forma covalente la enzima GOx asistido por el ácido 3-mercaptopropiónico. Este último método queda como perspectiva para ser evaluado dentro de una BCH- μ F. Finalmente, es presentado las conclusiones generales y la literatura revisada durante la presente tesis experimental.

Planteamiento del problema

Las celdas que utilizan glucosa como combustible son una potencial alternativa para la producción de energía de forma constante y amigable con el medio ambiente a través del consumo de recursos renovables. No obstante, a pesar de generar energía en el orden de los mW a $W\text{ cm}^{-2}$ por el uso de catalizadores abióticos, estos son costosos, poco selectivos y suelen envenenarse, reduciendo la eficiencia de la celda de combustible en un corto o mediano tiempo.

Como sustituto a los catalizadores abióticos, se ha investigado el uso de enzimas por ser más económica su producción, poseen una alta selectividad a su sustrato, operan en condiciones suaves de reacción, son reutilizables y tienen un alto potencial al ser empleados en dispositivos biomédicos como biosensores de glucosa y de implantación dentro de un organismo como marcapasos, desfibriladores, neuro-estimuladores y sistemas liberadores de fármacos principalmente. Por otro lado, las bioceldas de combustible que utilizan glucosa conllevan ciertas inconvenientes, como una baja obtención de la potencia, (μW y mW) y corriente (mA), una ineficiente conducción de los electrones, un tiempo corto de vida de la celda y una baja reproducibilidad debido a la degradación de la proteína, a una ineficiente inmovilización de la enzima e inadecuadas condiciones de operación.

Las condiciones de operación de las bioceldas de combustible son complejas ya que varían principalmente de la enzima o enzimas a utilizar y con ello el método de inmovilización, tipo de celda de combustible, material de la celda y de los soportes, electrolitos bases, concentración del combustible y oxidante, flujos, pH, temperatura y otros medios de reacción que repercuten directamente en la eficiencia de la celda de combustible. Por ello, es necesario de un estudio más minucioso de todos los aspectos descritos anteriormente y su interacción entre ellos mismo, para un eficiente funcionamiento de las biocelda de combustible.

Justificación

Dos de los temas de mayor interés de investigación a nivel laboratorio e industrial en el presente y futuro tiempo, han sido la generación de energía a partir de recursos renovables de manera sustentable y, la implementación e innovación de nuevas tecnologías de uso biomédico para el tratamiento y diagnóstico de diversas enfermedades de forma segura, confiable y rápida. Para este propósito, se han estudiado las bioceldas enzimáticas que utilizan glucosa como combustible como una de las soluciones en la sustitución de catalizadores abióticos para la generación de energía en aparatos electrónicos. Sin embargo, donde tienen un mayor campo de aplicación es en dispositivos que puedan ser de implantación dentro del ser humano por su biocompatibilidad y versatilidad, ya que los que usan baterías de litio, como los marcapasos, suelen ser tóxicos. Además, la fuente de glucosa en el organismo podría favorecer la generación de energía constante, produciendo un estímulo que pueda reflejarse en una respuesta en la activación de sistemas neurológicos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, marcapasos o liberadores de fármacos *in situ* para un tratamiento oportuno.

Para acercarse a un eficiente funcionamiento de la biocelda de combustible que pueda ser implantada, es necesario que la enzima mantenga su actividad catalítica dentro de un espacio limitado. Para ello, se han estudiado diferentes métodos de inmovilización como la unión a un soporte por interacciones físicas, diferencia de cargas, puentes de hidrógeno, interacción electrostática y unión covalente; otro de los métodos es por encapsulación y finalmente por entrecruzamiento. Para este trabajo se compararán la inmovilización física por medio de interacciones electrostáticas, utilizando agentes de entrecruzamiento y de forma covalente sobre una superficie de oro, para establecer cuál proporciona una mejor estabilidad y preservación de la actividad catalítica de la enzima glucosa oxidasa (GOx), además de estudiar la relación de la concentración entre

enzima y reactivos, cantidad de enzima inmovilizada y constante de la transferencia de electrones.

Para establecer una mejor transferencia de electrones entre el electrodo y el sitio catalítico de GOx con el fin de obtener un mejor rendimiento en la reacción de la oxidación de la glucosa, se propone utilizar materiales biocompatibles y con una buena conductividad eléctrica como las nanopartículas de oro y por otra parte los nanotubos de carbono. Posteriormente, el o los métodos de inmovilización para GOx que exhiban mejores propiedades cinéticas, catalíticas, termodinámicas y que preserven por un mayor tiempo a la GOx, se implementarán en un biocelda de combustible como bioánodo, mientras que en el cátodo se utilizará platino para aumentar la actividad catalítica y rendimiento de la biocelda, aprovechando en mayor medida la concentración limitada de oxígeno.

Será importante la elección de la forma y tipo de la biocelda, enfocándonos principalmente en sistemas microfluídicos y que integren materiales biocompatibles. Se debe de utilizar una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0 para todas las evaluaciones experimentales por ser cercano al del cuerpo humano. La concentraciones de glucosa puede estar entre 3 y 10 mmol L⁻¹ estando en el intervalo de una persona saludable y una diabética. Finalmente, se deben de tomar en consideración todos los detalles descritos, además de una eficiente fabricación de la biocelda de combustible para la obtención de un desempeño aceptable de las bioceldas de combustible evaluadas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Celdas de combustible

En la actualidad se tiene una alta dependencia en el consumo y producción de combustibles fósiles como una fuente de energía mayoritaria, provocando un agotamiento rápido de las reservas de este combustible no renovable. Para la solución de dicho problema, se ha puesto interés en la investigación a nivel académico e industrial sobre nuevas fuentes alternativas de energía y sobre todo, que sean amigables con el medio ambiente (Moehlenbrock et al., 2009).

Los sistemas electroquímicos han sido una importante contribución y alternativa para la producción de energía, principalmente las celdas de combustible (CC) han demostrado ser efectivas a través del consumo de recursos renovables, como el metanol, etanol, glucosa, glicerol y ácido fórmico, principalmente.

El primer reporte que se tiene sobre celdas de combustible fue por Grove (1839), quien publicó en la revista *philosophical magazine and journal of the science* la producción de energía eléctrica y agua, a partir del hidrógeno y oxígeno invirtiendo la acción de la electrólisis del agua catalizado por platino. A partir de ese descubrimiento, ha aumentado considerablemente las publicaciones y tecnologías que aplican las celdas de combustible.

Una celda de combustible es un dispositivo electroquímico que transforma la energía de una reacción química de un combustible en energía eléctrica con ayuda de un agente oxidante (O_2 , aire). Una de las características especiales, es que mientras el suministro de combustible sea continuo, la producción de energía es inagotable, siempre y cuando los catalizadores sigan siendo viables.

Las ventajas que tienen estos dispositivos, es la producción de una eficiente conversión de energía, una factible manufactura, menos contaminantes,

un reducido mantenimiento, son seguras, silenciosos y producen una alta densidad de energía. Debido a esto es que las celdas son de las tecnologías con mayor crecimiento e interés a nivel industrial y de investigación, con aplicaciones potenciales en dispositivos móviles como teléfonos, computadoras portátiles, juguetes y otros artefactos; en la industria del transporte y como fuentes de energía fijas (Carter et al., 2012).

Por otro lado dentro de las desventajas se puede mencionar una operación compleja, impurezas en los gases, el funcionamiento constante disminuye el tiempo de vida útil de la celda, aún son costosas, lo que limita su viabilidad y una baja densidad de potencia por volumen (Winter y Brodd, 2004).

Las celdas pueden emplear diferentes tipos de combustibles para la producción de energía, destacándose las que utilizan glucosa por ser una fuente renovable y abundante presente en compuestos naturales, en aguas de tratamiento, manufacturada por las industrias del azúcar y en el cuerpo humano, principalmente. Teóricamente se puede obtener una alta densidad de energía durante la oxidación completa de la glucosa a CO_2 generándose 24 electrones, equivalente a 2.87 J mol^{-1} (Li et al., 2013).

El primer paso de la reacción general comprende la oxidación de la glucosa (1) catalizada en el ánodo (Figura 1), produciendo como subproductos gluconolactona que es hidrolizada a ácido glucónico (2) más dos electrones (que viajan por un circuito externo) y dos protones que fluyen a través del electrolito o membrana. Posteriormente, los electrones pasan al cátodo donde es reducido el oxígeno (3) (como oxidante) para formar agua (4) en presencia de los protones.

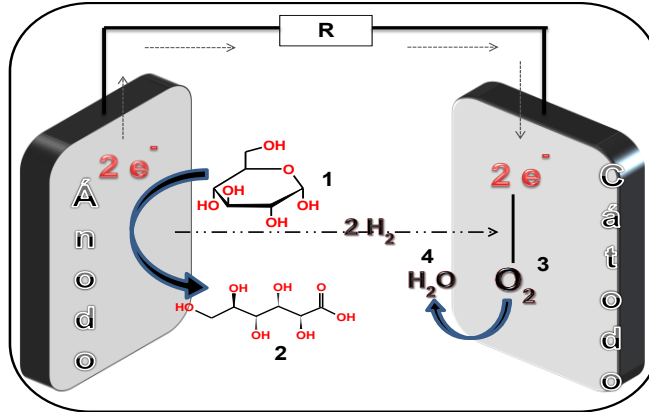


Figura 1. Acoplamiento de las reacciones de oxidación de la glucosa y reducción de oxígeno en una celda de combustible.

Kerzenmacher et al (2008) incluyeron en su revisión bibliográfica la publicación de Rao J. R y cols., de 1976 (corregido por ellos mismos un año después) la posible ruta de la oxidación completa de la glucosa y cada uno de los intermediarios generados hasta llegar a dióxido de carbono y agua como productos finales, anexando el número de electrones generados en cada paso con un total de 24 (Figura 2).

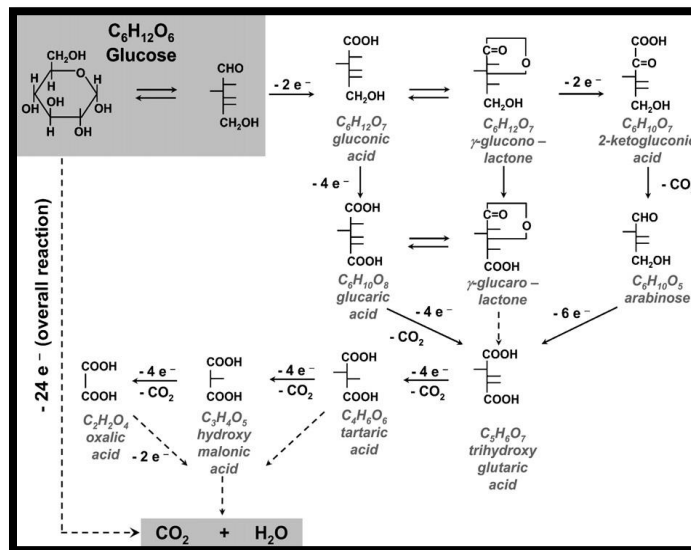


Figura 2. Oxidación completa de la glucosa a CO₂ y H₂O.

2.2 Clasificación de celdas de combustible que utilizan glucosa como combustible de acuerdo al catalizador

La conversión parcial o total de la glucosa en sus diferentes intermediarios junto con la ganancia de electrones, depende en gran medida del catalizador utilizado en el ánodo y cátodo. Por su interés, versatilidad, naturaleza y aplicación de los catalizadores para celdas de combustible, se han clasificado en tres grandes grupos: 1) catalizadores abióticos; 2) microbianos y 3) enzimáticos.

2.2.1 Celdas de combustible que utilizan catalizadores abióticos

La ventaja de emplear este tipo de catalizadores es su estabilidad, generan una alta densidad de corriente y potencia en el orden de los mW a $W(\text{cm}^2)^{-1}$ son materiales muy versátiles, poseen una alta reproducibilidad para diseños como fotolitografía e impresión por tinta y algunos son biocompatibles para una posible aplicación biomédica (Yan et al., 2010; Hu et al., 2012). Los metales más empleados e investigados para el ánodo han sido el Au, Pt, Co, Ir, Rh, Pd y algunas compuestos bimetálicos, para una mayor selectividad al sustrato como Pt-Ni, Au-Pt, Pt-Pd, Au-Pd, Pt-Zn, Ni-Cu entre otros (Becerik et al., 1999; Kerzenmacher et al., 2008; Guerra-Balcázar et al., 2010; Percival-Zhang et al.; 2011; Oncescu y Erickson 2013). Como cátodo se han utilizado Pt, Ag, carbón activado principalmente y, de igual manera, aleaciones bimetálicas como Pt-Pb, Pt-Cu, Pt-Ru, Pt-Au, Pt-Bi, Rh-Ir, Pt-W, así como trimetálicos, Pt-Ru-Os, Pt-Ru-Ir y complejos con un núcleo central de Cu, Co y Fe enlazados a ftalocianinas (Qu et al., 2010; Percival-Zhang et al., 2011; Yan., et al 2011).

No obstante, utilizar este tipo de catalizadores conlleva algunas desventajas. Varios de los catalizadores empleados en el ánodo y cátodo son metales preciosos muy costosos, no son ampliamente selectivos para la electro-oxidación de la glucosa en el ánodo o reducción de oxígeno en el cátodo, pueden ser envenenados por subproductos de la reacción, el máximo rendimiento de este

tipo de celda de combustible es en medio alcalino, disminuyendo drásticamente a pH neutro, limitando su aplicación para dispositivos biomédicos.

2.2.2 Celdas de combustible que utilizan catalizadores microbianos

Se basan principalmente en el uso de microorganismos tanto en el ánodo como en el cátodo. En base a la terminología, son llamadas bioceldas de combustible (BCC), debido a que el catalizador es un compuesto biológico, y se especifica que es microbiana (BCCM). La ventaja cuando se utilizan este tipo de catalizadores es que la oxidación de la glucosa puede llegar hasta CO_2 , con la generación de una alta densidad de corriente y potencia, dependiendo del tipo y número de microorganismos, asimismo, pueden ser empleadas aguas residuales como fuente de glucosa (Cha et al., 2010). No obstante, las desventajas al emplear este tipo de catalizadores son una disminución rápida en la baja densidad de corriente y potencia, puede haber competencia metanogénica y daño de unos microorganismos a otros, el rendimiento global de las BCCM son poco reproducibles y no son consideradas para dispositivos implantables debido a que pueden ser patógenos para el huésped (Leropoulos et al., 2010; Lyon et al., 2010).

2.2.3 Celdas de combustible que utilizan catalizadores enzimáticos

Al igual que los catalizadores microbianos, son nombrados bioceldas de combustible con la diferencia de que en este caso se emplean únicamente enzimas (BCCE) para la oxidación de glucosa. El uso de enzimas es atractivo debido a que son altamente específicas para la glucosa, en concreto la D-(+)-glucosa, pueden producir una potencia en el orden de los mW cm^{-2} , operan a temperatura ambiente, pH neutro y no generan reacciones violentas, su producción es relativamente económica y renovable, poseen la propiedad de desempeñarse bajo condiciones fisiológicas humanas ($37\text{ }^\circ\text{C}$ pH 7), por lo que su aplicación en implantes dentro del organismo como marcapasos, desfibriladores,

implantes cloqueares, neuro-estimuladores, corazones artificiales y sistemas liberadores de fármacos es viable [Calabrese et al., 2004; Mousavi et al., 2011; Falk et al., 2012).

La reacción enzimática general consiste en la oxidación de la D-(+)-glucosa (1) por en el bioánodo, produciendo ácido glucónico (2) como subproducto, más dos electrones y dos protones (Figura 3). Posteriormente, en el biocátodo el agente oxidante (usualmente oxígeno o peróxido) se reduce al reaccionar con los electrones y protones, generando agua (Kim et al, 2006).

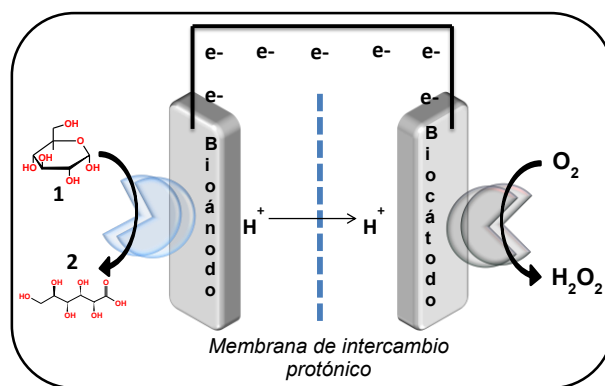


Figura 3. Reacción de oxidación y reducción enzimáticas en una biocelda de combustible.

Las enzimas más utilizadas para BCCE en el ánodo son la glucosa oxidasa (GOx), glucosa deshidrogenasa (GDH) y celobiosa deshidrogenasa CDH), mientras que en el cátodo son la lacasa (Lc) y la bilirrubin oxidasa (BOD). Por otro lado, en algunos casos se genera una baja eficiencia en la producción de la densidad de corriente y potencia, la pobre estabilidad asociada con el tiempo de vida útil y una ineficiente inmovilización, son tres factores limitantes para un eficiente funcionamiento de una BCCE (Tamaki et al., 2006; Mousavi et al., 2011; Beneyton et al., 2013).

2.2.4 Celdas de combustible híbrida

Cabe mencionar que en la literatura se ha citado un subtipo de celda de combustible que emplea, ya sea en el ánodo o cátodo, un catalizador abiótico y en

su complemento uno enzimático, conocido como biocelda de combustible híbrida. Las ventajas de emplear este tipo de biocelda híbrida son las mismas que se han mencionado con los catalizadores abióticos y enzimáticos, con la diferencia, si alguno de los catalizadores en el ánodo o cátodo no es el más óptimo, puede sustituirse por un elemento abiótico u orgánico según sea el caso, disminuyendo las desventajas mencionadas para cada catalizador de forma independiente (Choi et al., 2009; Smolander et al., 2008).

El tipo de celda en la cual nos enfocaremos en el presente proyecto son las de tipo enzimático y las híbridas, particularmente en el desarrollo de bioánodos. Para evaluar la eficiencia de los diferentes bioánodos investigados, se medirán el potencial de circuito abierto, la densidad de corriente y la potencia. En el siguiente apartado se definen estos tres parámetros.

2.3 Desempeño de las bioceldas de combustible

Para celdas de combustible, independientemente del catalizador a emplear, el desempeño ideal buscado es el mismo, con la diferencia que al emplear enzimas se ve condicionado por la estabilidad y actividad catalítica. El rendimiento de una biocelda es caracterizado en términos de potencia (W) que está dada por el producto entre el voltaje (V) y la corriente (I) (Cracknell et al., 2008).

El máximo voltaje que se obtiene en una BCC se conoce como voltaje a circuito abierto (VCA) y se obtiene cuando la celda está en equilibrio y corresponde a la diferencia de potenciales termodinámicos entre el ánodo y cátodo. El máximo voltaje está dado por la siguiente ecuación 1:

$$E_{eq} = \frac{-\Delta G_{rx}}{nF} \quad \text{Ecuación 1}$$

En donde n es el número de electrones transferidos, F es la constante de Faraday y ΔG es la energía libre de Gibbs de la reacción, siendo una importante función termodinámica que define la cantidad máxima de energía que puede

derivar de la reacción de la BCC a una cierta temperatura dada. Por lo general las BCC generan un bajo VCA o cercano al del equilibrio (Cracknell et al., 2008).

Otro parámetro importante es la polarización, que describe la caída del voltaje máximo cuando el flujo está continuo y el valor de este potencial con respecto a E_{eq} es definido como polarización, sobrepotencial o sobrevoltaje η ; está dado por la diferencia entre el potencial medido menos el potencial en equilibrio.

El sobrepotencial se considera la suma de tres pasos primarios; el sobrepotencial de activación (η_{act}), el sobrepotencial óhmico o caída óhmica (η_{iR}) y el sobrepotencial de concentración (η_{conc}). Cada tipo de sobrepotencial contribuye a la forma general de una curva voltaje vs corriente o curva de polarización para BCC (Figura 4).

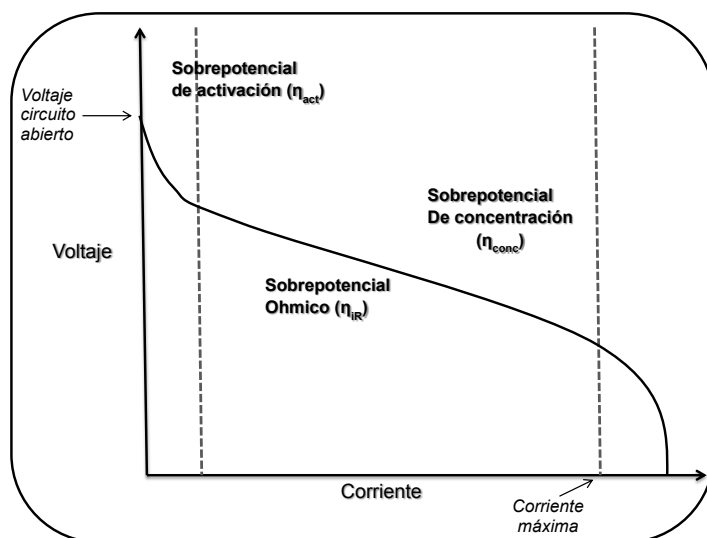


Figura 4. Curva de polarización con las tres diferentes etapas del sobrepotencial.

La pérdida del sobrepotencial de activación o polarización de activación, es provocada por la baja velocidad de reacción en la superficie de los electrodos, en otros términos, por una limitada transferencia de los electrones al electrodo. Éste puede ser resultado de un pobre acoplamiento electrónico de la enzima al electrodo, por la doble capa producida por el electrolito o por imperfecciones de la misma biocelda (Eg and G Technical Services, 2004).

El sobrepotencial óhmico, es el resultado de varias resistencias de la BCC; la resistencia del flujo de iones en el electrolito, el flujo de electrones a través del electrodo y por la conducción iónica de la membrana sí es usada. Esta pérdida óhmica es directamente proporcional a la densidad de corriente.

Sobrepotencial de concentración es causado por la disminución de la concentración del combustible u oxidante en la superficie del electrodo. Esta limitación está presente durante todo el rango de la densidad de corriente y es más importante en la región cercana a la corriente límite donde es difícil proporcionar un flujo constante de los reactantes a los sitios activos de la BCC (Larminie et al., 2003).

En resumen, los parámetros importantes del rendimiento de una biocelda de combustible están dados por el voltaje a circuito abierto que es determinado por la diferencia entre los potenciales del ánodo y el cátodo; por la densidad de corriente que puede obtenerse a bajos voltajes (V) de la BCC y la potencia (W) que es el producto de la corriente y el voltaje.

Como se mencionó en este apartado, la eficiencia de la celda comprende varios aspectos de operación, también se debe considerar otro muy importante, el tipo de celda a utilizar. La principal biocelda que emplea glucosa como combustible es la de tipo PEM (por sus siglas en inglés; Proton Exchange Membrane), sin embargo, existe otra innovadora biocelda que se ha empleado recientemente, la microfluídica que no utiliza membrana.

2.4 Bioceldas de combustible microfluídicas

Existen diferentes tipos de celdas de combustible (CC) que se diferencian por el tipo de electrolito usado y su aplicación; la alcalina, la de membrana de intercambio protónico (PEM), metanol directo, ácido fosfórico, carbonato fundido y óxido sólido. Como en la CC de glucosa se generan protones, la de tipo PEM es la más eficaz. Las desventajas de utilizar este tipo de CC es que la membrana causa

resistencia, además de hincharse y deformarse por un exceso de hidratación, limita su diseño a microescala, suele requerir una mayor cantidad de biocatalizadores, entre otras (Sayed et al., 2011).

Las microceldas de combustible (μ CC), también llamadas de flujo laminar o CC sin membrana, son definidas como una unidad con suministro y eliminación de flujo, sitios de reacción y lugar de electrodos, todo confinado a un canal microfluídico. Este tipo de celda de combustible opera sin una barrera física para separar el ánodo y el cátodo (Liu et al., 2010).

Recientemente, la implementación de novedosas tecnologías como las μ CC proporciona una alternativa factible a la miniaturización de diversos dispositivos. Se han integrado los dispositivos microfluídicos en aplicación para análisis de ADN, inmunoensayos, citometría, microreactores y recientemente en biomicroceldas de combustible ($B\mu$ CC) (Erickson y Li, 2004).

La ventaja de emplear sistemas microfluídicos con respecto a macrosistemas, es que incrementa la tasa de transferencia de masa, reduce el tiempo de consumo del combustible y el volumen de la corriente útil. Las μ CC aprovechan el flujo laminar en sentido paralelo de la celda del combustible y el oxidante a través de microcanales (dimensiones menores a 1 mm y mayores a 1 μ m) sin mezclarse, por lo que no es necesario un tipo de membrana (Ferrington et al., 2002). La interface entre ambos fluidos, combustible y oxidante, representan una membrana virtual, por lo que el intercambio de iones se da a través de los canales por migración, potenciando la reacción cinética entre en bioánodo y el biocátodo (Figura 5).

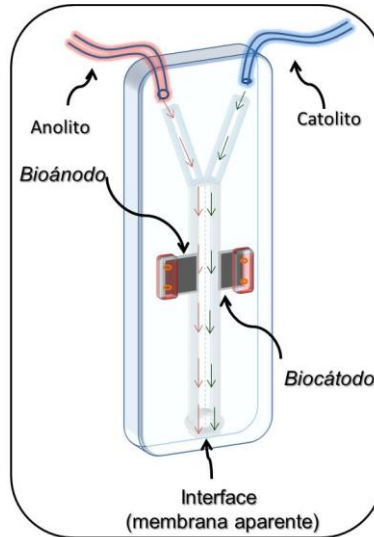


Figura 5. Componentes de una biocelda de combustible microfluídica.

En el presente trabajo se han evaluado en bioceldas de combustible microfluídicas bioánodos que emplean glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* debido su estabilidad, una mayor afinidad por el sustrato y una alta actividad catalítica en comparación con GOx de otros organismos, además, es una de las más estudiadas y de importancia en la investigación y a nivel industrial.

2.5 Glucosa Oxidasa (GOx)

La glucosa oxidasa (GOx) es una enzima perteneciente al grupo de las oxidasas, que cataliza la oxidación de la D-(+)-glucosa a D-gluconolactona y peróxido de hidrógeno en presencia de oxígeno. Si estos dos subproductos se acumulan pueden reducir el pH de la disolución e inhibir la actividad catalítica de la enzima.

Es de suma importancia conocer las características y propiedades del material biológico utilizando en el diseño de bioánodos para celdas de combustible.

2.5.1 Propiedades de la glucosa oxidasa (GOx)

Tiene un peso molecular de 150 a 186 kDa, absorbe en el espectro de luz UV – VIS a 280, 380 y 450 nm, su actividad específica (pH 5.6 y entre 25 a 37 °C) es de 80 – 172 $\mu\text{mol glucosa min}^{-1} \text{mg}^{-2}$ de enzima. El rango de temperatura al que puede operar es de 20 a 50 °C, por debajo de 20 °C se ve disminuida drásticamente su actividad catalítica, mientras que a temperaturas cercanas a 60 °C empieza a desnaturalizarse, el punto isoeléctrico (pH al cual tiene carga cero) es de 4.2. Algunos iones como Ag^+ , Hg^{2+} y Cu^{2+} , así como el arsenito, *p*-cloromercuribenzoato y el acetato fenilmercúrico suelen inhibir a la enzima (Meredith y Minter, 2011).

2.5.2 Obtención natural de GOx y su función

La GOx fue descubierta por Muller en 1928 en un extracto de *Aspergillus niger* y secuenciado su ADN por Kriechbaum en 1989. De forma natural es producido por algunos hongos como *Talaromyces flavus*, *Pleurotus ostreatus*, *Penicillium amagasakiense*, *Penicillium canescens*, *Penicillium notatum*, *Phanerochaete admetzii*, *Botrytis cinérea*, entre otros e insectos como la abeja melera (*Apis mellifera*), las larvas de *Helicoverpa zea*, *Helicoverpa armígera*, *Helicoverpa assulta*, entre otras. Su función principal es anti bacterial y anti fúngico a través de la producción de peróxido de hidrógeno. Otras funciones incluyen la asistencia en la infección en plantas, degradación de la lignina, disminuir el pH del medio, etc. (Clarke et al., 2006).

2.5.3 Sustratos utilizados por la GOx

La enzima GOx de *A. niger* tiene la capacidad de oxidar monosacáridos, nitroalcanos y compuestos hidroxilos. Tiene una preferencia por la β -D-glucosa por lo que se toma como referencia del 100 % para comparar con otros sustratos

como 2-deoxy-D-glucosa con un 20-30 %, 4-O-metil-D-glucosa (15 %), 6-deoxy-D-glucosa (10 %) y para otros sustratos es menor al 2 %.

2.5.4 Aplicación de la GOx

GOx tiene importancia a nivel industrial, comercial, académico y de investigación. GOx es generalmente considerada como segura (GRAS siglas en inglés) por la FDA (Food and Drugs Administration) por lo que es utilizada en la industria alimenticia como aditivo líquido o en polvo, como antioxidante, para preservar alimentos y estabilizar sus propiedades. Asimismo, es utilizado en las panificadoras como agente oxidante y de maduración, para preservar alimentos secos como el polvo de huevo y lácteos deshidratados (Wu et al., 2011).

En la industria farmacéutica es empleada como compuesto oxidante en formulaciones, remplazando a los tradicionales. En la industria vinícola se utiliza para disminuir la cantidad de azúcares y subsecuentemente disminuye la cantidad de alcohol en el proceso de elaboración del vino, además de reducir la actividad o crecimiento de *S. cerevisiae* usado para la fermentación del alcohol.

Como se mencionó en apartados anteriores, uno de los subproductos en la oxidación de la glucosa es el ácido glucónico; GOx es utilizada para la producción de esta molécula, ya que posee una utilidad industrial en el secado de telas, limpieza de las superficies metálicas, aditivo en alimentos, detergentes, concreto, cosméticos y en compuestos farmacéuticos (Wong et al., 2008).

Una importante aplicación que se le ha dado a GOx es como elemento de reconocimiento de la glucosa en biosensores. Newman y Turner en el 2005 estimaron el mercado mundial de biosensores cerca de 5 billones de dólares y el 85% es atribuido a biosensores de glucosa, la mayoría se basa en la actividad de GOx (Yoo y Lee, 2010). Este tipo de biosensores tienen importancia clínica en el tratamiento y cuantificación de la glucosa en pacientes con diabetes (Malhotra y Chaubey, 2003). Asimismo, son utilizados en la industria alimenticia para la

elaboración de vinos (Dzyadevych et al., 2008). Además, se ha usado GOx como biosensor para la determinación de metales pesados (Ghica y Brett, 2008).

Otra de las importantes aplicaciones no tan recientes, es el uso de GOx para celdas de combustible. A pesar de tener una eficiencia cercana del 100 %, las bioceldas aún no son factibles para una aplicación fuera de laboratorio, estando limitadas principalmente por el tiempo de vida útil corto, y una pérdida en la potencia, principalmente por su estabilidad (Minteer 2007).

2.5.5 Composición de la GOx

Esta enzima se puede obtener a partir de diferentes fuentes biológicas, existiendo una mínima variación estructural y teniendo la misma función. La enzima que más suele emplearse para el estudio de bioceldas de combustible es a partir de *Aspergillus niger*.

GOx es un dímero glicoproteico constituido de dos cadenas polipeptídicas idénticas que están unidas covalentemente entre sí a partir de uniones disulfuro. La conformación estructural es estabilizada por una variedad de interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y de complejos coordinativos (Rubenwolf et al., 2011).

El 20 % del peso de la enzima son amino azúcares y cerca de 16 a 19% de su peso por carbohidratos, de los cuales el 80 % son *N-O*-glicosilados unidos a moléculas de manosa. El centro activo consiste de seis aminoácidos Y68, E412, F414, W426, H516, H559 y la coenzima flavin adenin dinucleótido (FAD). H516 juega un papel importante como base iniciadora en la oxidación del sustrato, mientras que el resto influyen en la actividad catalítica y reconocimiento de la β -*D*-glucosa (Bankar et al., 2009; Prabhakara et al., 2003).

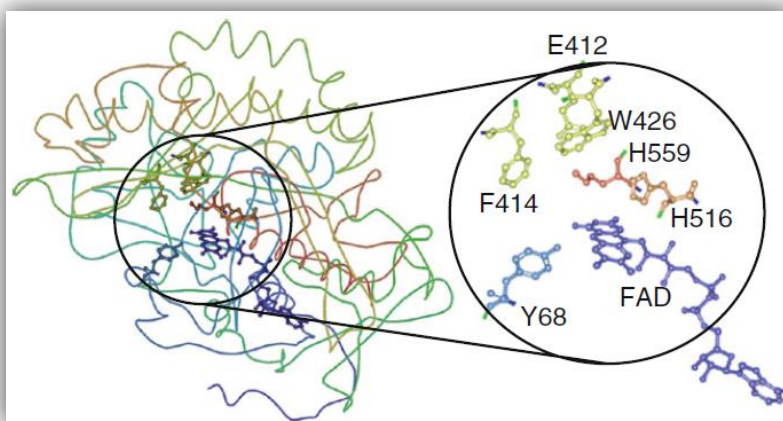


Figura 6. Estructura del sitio activo de la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*.

2.6 Métodos para la inmovilización de la enzima GOx

El término de inmovilización enzimática se refiere al confinamiento físico de alguna enzima localizada en un cierto espacio o región definida, con la conservación de su actividad catalítica y que puede ser usada repetidas veces y de forma continua. Como se mencionó en apartados anteriores, una de las limitantes para un óptimo funcionamiento de una BCCE es el reducido tiempo de vida útil de la enzima como consecuencia de una inmovilización ineficiente de la enzima (Sassolas et al., 2012).

Pero, porqué es importante la inmovilización del catalizador enzimático en la BCCE. Son tres principales beneficios; facilita la separación de los subproductos de la reacción, protege en mayor medida la desnaturalización de la macromolécula y permite el reuso de las mismas. En BCCE microfluídicas que emplean GOx disuelta en el electrolito se han alcanzado potencias altas como el trabajo de Zedba et al (2009) con 110 mWcm^{-2} , sin embargo, el excesivo gasto de enzima limita su aplicación.

Dependiendo de la forma, material, tipo de interacción y naturaleza de los reactivos, los métodos de inmovilización pueden clasificarse en tres grandes grupos; unión a un soporte, atrapamiento o encapsulación y entrecruzamiento

(mejor conocido como cross-linking por su denominación en el idioma inglés) (Sheldona, 2007).

2.6.1 Unión a un soporte

La enzima puede ser unido a un soporte por fuerzas físicas como interacciones hidrofóbicas y de Van der Waals, iónicas o de naturaleza covalente. Las uniones físicas son generalmente débiles para mantener a la enzima fijada al soporte y puede ser fácilmente removible. Mientras que la inmovilización por fuerzas iónicas y covalentes son más fuertes, manteniendo unida la enzima al soporte con una mayor estabilidad. Los soportes pueden ser resinas sintéticas, biopolímeros, polímeros inorgánicos, como sílice o zeolitas.

2.6.1.1 Polímeros orgánicos sintéticos

Algunas resinas acrílicas, como el Eupergit[®], son usadas como soportes para la inmovilización de GOx. Eupergit[®] es un co-polímero conformado por macroporos derivados del metacrilato, glicidil metacrilato, alilglicidil éter y metacrilamida. Es altamente hidrofóbico y estable, posee una buena resistencia mecánica y química (pH 0 a 14). La inmovilización de la enzima es covalente, debido a sus residuos oxiranos que interaccionan con los grupos aminos libres, confiriéndole una alta estabilidad (Figura 7). Otra resina acrílica utilizada para la inmovilización de enzimas ha sido la amberlita XAD-7, con la diferencia que la unión es por simple adsorción (Sheldona, 2007).

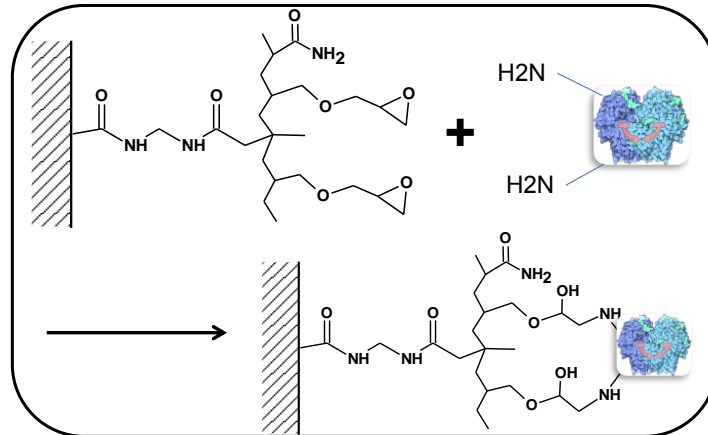


Figura 7. Inmovilización a un soporte utilizando Eupergit[®].

2.6.1.2 Biopolímeros

Se han empleado diversas variedades de biopolímeros conformados por polisacáridos insolubles en agua como la celulosa, almidón, agarosa, quitosano, además de proteínas como la gelatina y albúminas, como soportes para la inmovilización de enzimas. Un ejemplo de ello, fue la implementación de biopolímero DEAE-Sefadex para la inmovilización de GOx conservando el 70 % de su actividad catalítica (Karboune, 2005).

La idea de implementar biopolímeros es para una posible aplicación en dispositivos, ya sea biosensor o biocelda, que se puedan implantar y, ser biocompatibles. Se ha utilizado la celulosa, un polímero utilizado en la industria alimenticia, en ingeniería de tejidos y sistemas de liberación de fármacos, para la inmovilización de GOx (Won et al., 2013).

2.6.1.3 Hidrogeles

Los hidrogeles conformados por el alcohol poli vinílico son de los más empleados, debido a que pueden ser sintetizados a temperatura ambiente, poseen una buena estabilidad mecánica y química, fácil separación, son biocompatibles y le confieren hidratación a la enzima. Una de las desventajas que pudiera conllevar

este tipo de hidrogeles, si es muy laxo la enzima puede difundir fuera de la matriz del gel (Perale et., 2011).

Se ha investigado novedosas modificaciones de hidrogeles a partir del poliácido acrílico, metacrilatos, polióxido de etileno y del polietileno glicol, que le confieren una mayor estabilidad mecánica, tienen la capacidad de cambiar su configuración en pH y temperatura, similar a los polímeros inteligentes, y en algunos casos se les ha incorporado partículas de osmio para mejorar su conductividad eléctrica (Khutoryanskiy et al., 2004; Khutoryanskaya et al, 2008; Friedrich y Tieke, 2011; Irmukhametova et al, 2012).

Se han reportado el uso el uso de hidrogeles a partir de acrilamidas, hidroxiletil metacrilato, acetato de polivinilo y polietilen glicol (PEG) principalmente, para la inmovilización de GOx (Figura 8). Además, se ha empleado la técnica de fotolitografía junto con el hidrogel sobre oro para la fabricación de un biosensor de glucosa a microescala (Yan et al., 2010).

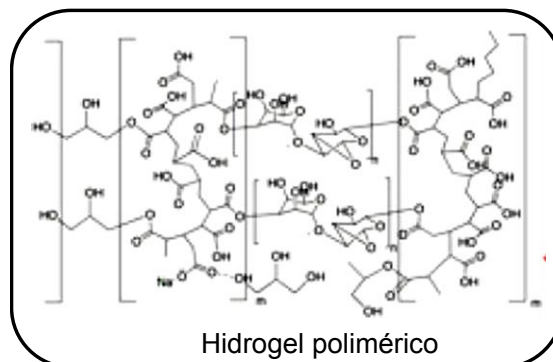


Figura 8. Estructura del hidrogel polivinílico.

2.6.1.4 Soportes Inorgánicos

Una variedad de sólidos inorgánicos pueden ser usados para la inmovilización de GOx, por ejemplo, alúmina, sílice, zeolitas y materiales mesoporosos de sílice. GOx se ha podido inmovilizar en soporte de sílice funcionalizado por unión covalente en un medio acuoso, manteniendo su actividad

hasta en un 90 % por un periodo de un mes en una hidrólisis enantioselectiva del óxido *p*-nitrotireno (Petri et al., 2005).

La ventaja de emplear materiales mesoporosos a partir de sílice, es el control del tamaño del poro, que puede incorporar a GOx sobre la superficie del mismo en un solo paso de forma física o modificando la superficie para enlazarla de manera covalente, de ambas forma se ha mantenido la actividad catalítica (Bil et al., 2005; Jara et al., 2013).

2.6.1.5 Polímeros inteligentes

Es un método muy novedoso al emplear este tipo de agentes inmovilizadores, permitiendo la unión de forma covalente y, lo más importante, le confiere un cambio conformacional de la estructura del polímero en respuesta a cambios de temperatura, pH y fuerza iónica, principalmente. El polímero más estudiado ha sido el poli-*N*-isopropil acrilamida (polyNIPAM nombre en inglés) que cambia en respuesta a la temperatura y es biocompatible (Figura 9).

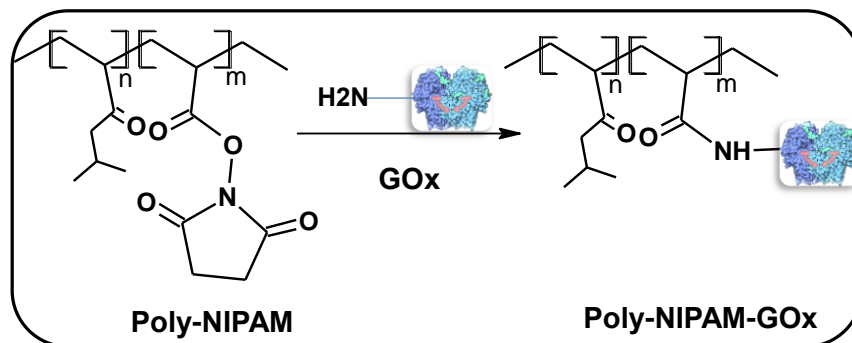


Figura 9. Reacción entre el polímero polyNIPAM y GOx.

Otro polímero que cambia su conformación en respuesta a la temperatura es el 2-(2-metoxietoxi)etil metacrilato y el oligo(etilenglicol) metacrilato (OEGMA por sus siglas en inglés) el cual no es tóxico, y no provoca respuesta auto-inmune (Sheldona, 2007).

2.6.1.6 Unión covalente a partir de la activación de grupos químicos del soporte

Esta forma de inmovilización es el método más atractivo desde el punto de vista industrial para la manufactura en serie de biosensores o de cualquier dispositivo que emplea macromoléculas, ya que tiende a ser más reproducible y repetible en comparación a otras formas de inmovilización.

Para llevar a cabo este tipo de inmovilización es necesario que el soporte posea grupos funcionales amino o carboxilo terminales, posteriormente son activas mediante algún derivado de las carbodiimidas como la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y en presencia de los grupos aminos de la enzima sustituye la carbodiimida para formar un enlace covalente tipo amida con el soporte. Para mejorar la inmovilización de la enzima, se suele utilizar la N-hydroxisuccinamida (NHS) que se asocia con la EDC formando un intermediario más estable y reactivo para la formación del enlace covalente con la enzima (Mashazi et al., 2006).

Una de las estrategias más utilizadas para la unión covalente al soporte de GOx ha sido empleando una superficie de oro, buen conductor eléctrico y biocompatible, a la cual se le adsorbe una molécula con un grupo tiol inicial y una cadena intermedia de diferente número de carbonos y un extremo carboxilo final para su posterior modificación con la carbodiimida y NHS permitiendo la unión covalente de la enzima (Figura 10) (Wasserberg et al., 2013; Claussen et al., 2011).

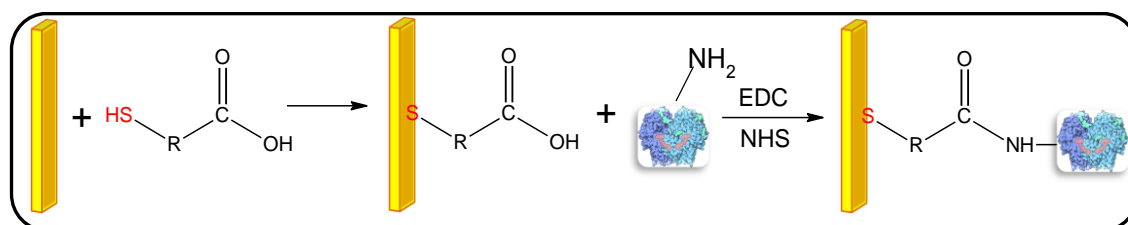


Figura 10. Unión covalente de GOx sobre una superficie de oro modificada.

Las ventajas de utilizar esta forma de inmovilización es que la carga enzimática permanece constante, posee una mayor resistencia a la desactivación por efecto de la temperatura, de disolventes orgánicos, al pH, conservando su estructura terciaria la enzima. Dentro de las desventajas de este método es que conlleva más pasos para realizarla y la cantidad de enzima está condicionada al número de uniones enzima-soporte, principalmente (Yang et al., 2012).

2.6.1.7 Inmovilización por afinidad antígeno-anticuerpo

La inmovilización de GOx por la reacción antígeno-anticuerpo son de los métodos menos estudiados y empleados. No obstante, son de los más eficientes, estables y específico. Consiste en la inmovilización de un antígeno en una superficie y se hace reaccionar con un anticuerpo, posteriormente se une un anti-anticuerpo específico para el primer anticuerpo, este segundo anticuerpo (anti-glucosa oxidasa) a su vez está fusionado de forma selectiva a la enzima (Figura 11). La desventaja de utilizar este método es el costo de los reactivos y, es muy complejo, pero por otro lado, es muy selectivo y reproducible (De Alwis et al., 1987; Tam et al., 2009).

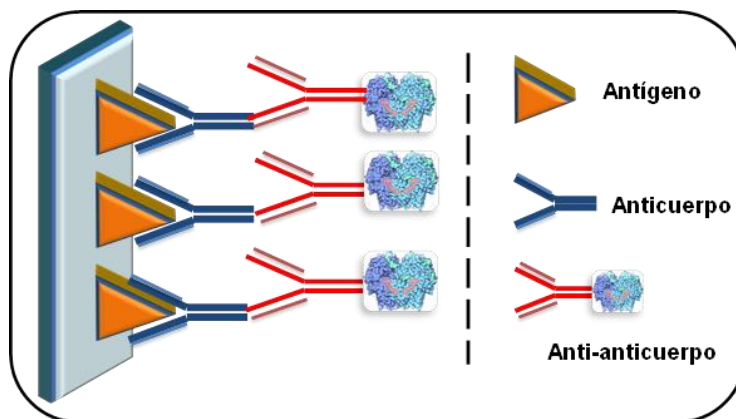


Figura 11. Inmovilización de GOx por afinidad antígeno-anticuerpo.

2.6.2 Atrapamiento o encapsulación

Este tipo de inmovilización se refiere a la inclusión de la enzima dentro de una estructura o una red polimérica (gel reticular) como algún polímero orgánico, sílice sol-gel o membrana que retenga a la enzima en fibras huecas o micro-encapsulamiento. Por lo general, este tipo de retención física es de uniones débiles, pero previenen la difusión de la enzima.

La diferencia entre este tipo de inmovilización con la de unión al soporte, es que en este último la enzima está unida al soporte, indistintamente se encuentre en el exterior o interior de la superficie, mientras que en el atrapamiento, la enzima se encuentra dentro de una red o estructuras (Figura 12) (Sheldona, 2007).

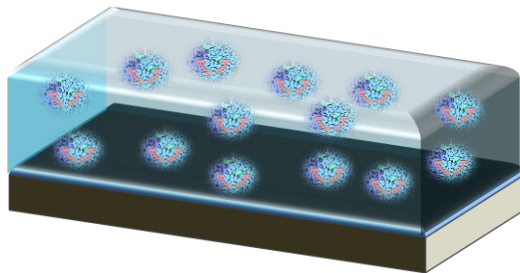


Figura 12. Atrapamiento de GOx.

2.6.2.1 Atrapamiento por medio de sol-gel

En este tipo de inmovilización se puede citar el sol-gel formado por una polimerización hidrolítica de metales alcóxido. Aditivos como el polietil glicol (PEG), el polivinil alcohol y la albúmina, pueden servir como estabilizadores en la inmovilización tipo sol-gel.

Las propiedades únicas del sol-gel a base de sílice como la alta porosidad, rigidez física, estabilidad química, estabilidad térmica y biológicamente inertes, los hacen buenos candidatos para la inmovilización de enzimas. Uno de los inconvenientes, es que durante el secado en la preparación del sol-gel, la

matriz puede fracturarse y los poros colapsarse, perdiendo área superficie y de contacto.

La formación del sol-gel comprende la hidrólisis del precursor, seguida de su condensación y finalmente su polimerización. El mecanismo por el cual queda atrapada la enzima dentro del sol-gel, ocurre cuando los silicatos se polimerizan alrededor de la biomolécula envolviéndola físicamente en la red de crecimiento de los óxidos (Yamanaka et al., 1992).

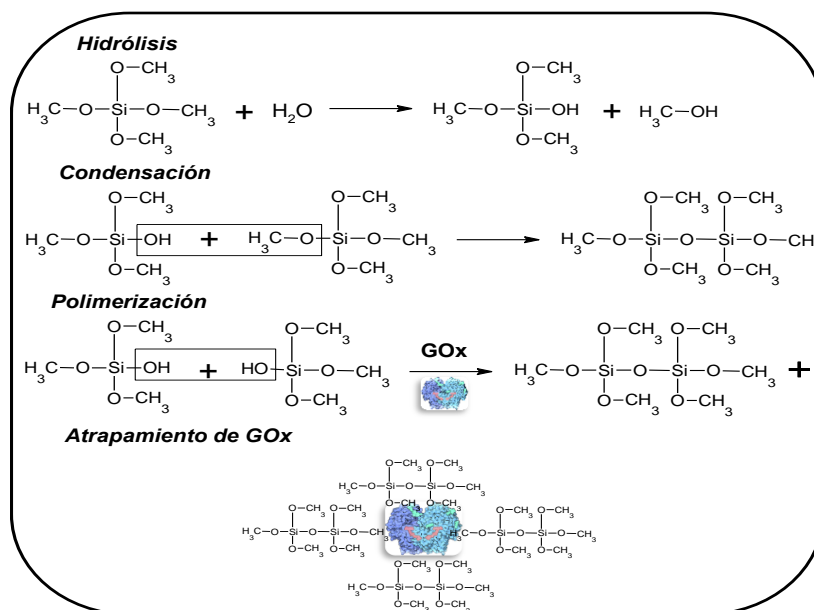


Figura 13. Mecanismo general de reacción de la formación del sol-gel alrededor de GOx.

2.6.2.2 Atrapamiento por electropolimerización

Es una forma simple y atractiva de inmovilizar la enzima en la superficie del electrodo. Consiste en la aplicación de un potencial o corriente apropiado dentro de una solución que contiene la enzima y el monómero. Posteriormente, el polímero es formado en la superficie del electrodo y la enzima se incorpora dentro del polímero. Los polímeros conductores son los que más se utilizan para facilitar la conducción eléctrica como la polianilina, polipirrol o el politiofeno (Sung y Bae, 2000).

Se ha publicado la inmovilización de GOx empleando polipirroles depositándola sobre el electrodo de manera física y por electrodeposición, para comparar la eficiencia de ambos métodos (Uang y Chou, 2003) y en otra investigación se realizó el mismo método sobre una superficie de oro (Njagi y Andreescu, 2007). De igual manera Tsai et al (2006) inmovilizaron a GOx vía electrodeposición utilizando polipirroles con la variante de la incorporación de nanotubos de carbono.

2.6.2.3 Inmovilización por atrapamiento y por medio de biopolímeros

El quitosano además de ser considerado un biopolímero como soporte para la inmovilización de GOx, se utiliza como un copolímero para atrapar a la enzima, ya que se encuentra formado por N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina (Figura 14). Estos polisacáridos pueden formar un gel en ciertas condiciones para la encapsulación de la enzima (Sheldona, 2007).

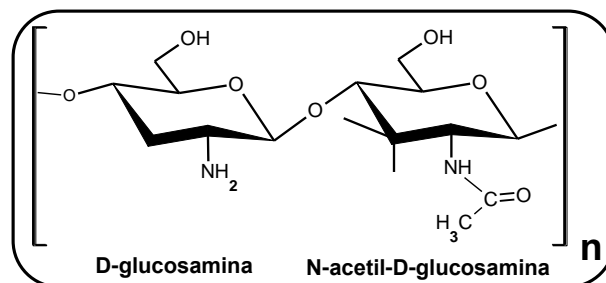


Figura 14. Estructura del quitosano.

2.6.2.4 Atrapamiento utilizando membranas

Una de las membranas más estudiadas para la inmovilización de GOx es el Nafion[®] por ser biocompatible, buen conductor eléctrico, posee una alta adhesión a la superficie, conserva la actividad catalítica de la enzima y permite la difusión selectiva de iones y cationes. Por otro lado, suele deformarse e hincharse, su función óptima no se facilita en concentraciones acuosas altas y es un reactivo costoso (Karyakin et al., 2002). Asimismo, se ha reportado el uso del Nafion[®] junto

con fenotiazinas como mediador y GOx en un mismo sistema (Sekretaryova et al., 2012).

2.6.3 Inmovilización por entrecruzamiento

Se basa en la retención de la enzima haciendo reaccionar los grupos amino con un reactivo bifuncional como el glutaraldehído (GA), que es el más utilizado por no ser costoso y disponibilidad comercial, el gluoxal o el hexametildiamina. De esta manera se mantiene a la enzima dentro de una matriz con uniones intermoleculares entre las moléculas de la enzima, protegiéndola de la solubilidad y al mismo tiempo conservando su actividad catalítica (Figura 15). Sin embargo, este método tiene ciertas desventajas como la baja retención de la actividad catalítica, una pobre reproducibilidad, baja estabilidad mecánica y en algunos casos, puede ser dificultosa la manipulación de la mezcla enzima-agente cross-linking.

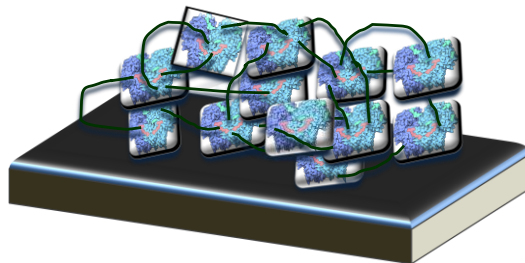


Figura 15. Inmovilización de GOx por entrecruzamiento.

El glutaraldehído ha sido el agente entrecruzador más utilizado para la inmovilización estable de GOx por medio de la reacción como base de Schiff entre los grupos aldehído del GA (**A**) y los sitios amino libres de la proteína (Figura 16). Como facilitadores para llenar los sitios no ocupados por GOx, suelen emplearse otras proteínas inocuas en la reacción, como la hemoglobina y la albúmina (Qi et al., 2009).

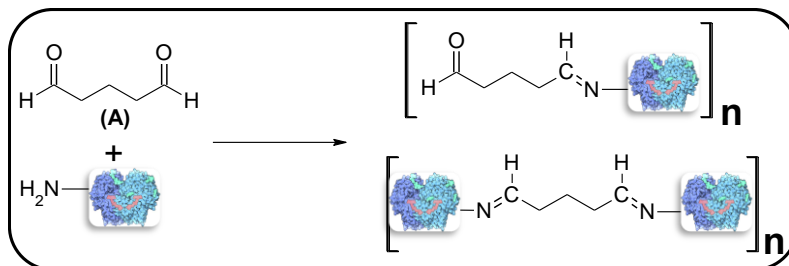


Figura 16. Interacción química entre los grupos funcionales del glutaraldehído con GOx.

Existen diversos métodos para inmovilizar a la enzima GOx. Sin embargo, se deben valorar sus ventajas y desventajas. En el presente proyecto, se evaluarán diferentes formas físicas para inmovilizar a GOx, por entrecruzamiento y unión covalente a un soporte, y se comparó la estabilidad y tiempo de vida útil de la enzima. Los métodos que proporcionen un mejor resultado, serán utilizados como bioánodos para ser evaluados en una biocelda de combustible microfluídica que utiliza glucosa como combustible.

3. HIPÓTESIS

La inmovilización de la enzima glucosa oxidasa (GOx) por adsorción simple, empleando entrecruzadores y mediante unión covalente sobre electrodos de carbono y modificados con depósitos de oro, permite su aplicación como biánodo en una biocelda híbrida de combustible microfluídica.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Desarrollar y evaluar bioánodos basados en la enzima glucosa oxidasa para su aplicación en una biocelda microfluídica que emplea glucosa como combustible.

4.2 Objetivos particulares

- Inmovilizar la enzima GOx sobre electrodos de grafito utilizando los métodos de adsorción y con los agentes entrecruzadores glutaraldehído y poli-L-lisina
- Caracterizar electroquímicamente en media celda los electrodos modificados con GOx y optimizar su desempeño para la reacción de oxidación de la glucosa.
- Modificar electrodos de grafito mediante depósito electroquímico de partículas de oro para inmovilizar la GOx mediante enlace covalente.
- Incorporar nanotubos de carbono multipared tanto a los electrodos de carbono modificados con GOx y agente entrecruzador, como a los depositados con oro para mejorar la transferencia directa de electrones.
- Evaluar el desempeño para la oxidación de la glucosa de los bioánodos propuestos en una biocelda de combustible híbrida microfluídica.

5. METODOLOGÍA

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), las placas de grafito, glutaraldehído (50 % en agua V/V), la poly-L-lisina (0.1 % W/V) y la β -*D*-glucosa fueron adquiridos de Sigma Aldrich. El HNO₃ (70 %) y el alcohol isopropílico se adquiridos de J. T. Baker. La solución de Nafion[®] 5 % es de marca Electrochem Inc. El fosfato ácido de sodio (Na₂HPO₄) y de potasio (KH₂PO₄) y el hidróxido de potasio (99 % pureza) son grado reactivo marca Merck. Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada de wáter high purity[®].

5.1 Pre-tratamiento del electrodo de grafito

Para los experimentos en media celda, el electrodo de grafito se pulió utilizando alúmina (0.05 μm) y después se sonicó durante 20 min en agua desionizada para retirarle el exceso de alúmina. Posteriormente, fue sometido a una limpieza electroquímica empleando voltamperometría cíclica, 100 ciclos a una velocidad de barrido de 100 mV s^{-1} en un rango de potencial de -0.9 a 1.3 V en una solución de ácido sulfúrico 0.5 M.

5.2 Preparación del electrodo de grafito con GOx (inmovilización física)

Para la inmovilización física de GOx se utilizó el grafito con pretratamiento electroquímico y se depositó 50 μL de una solución de GOx a una concentración de 5 mg mL^{-1} en una solución amortiguadora de fosfatos (BF) pH 7 0.1 M. Posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente. Las disoluciones de glucosa se prepararon a partir de una solución madre de 100 mM de β -*D*-glucosa y de allí se realizó diluciones de 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 20, 50 mM para evaluar el efecto sobre GOx.

5.3 Preparación del electrodo con GOx utilizando agentes de entrecruzamiento glutaraldehído (GA), poli-L-lisina (PLL) y GA-PLL

Se utilizó dos concentraciones de GA 4.5 y 0.2 % preparadas en BF a partir de GA 50 %. Posteriormente, se mezclaron con la disolución de GOx (5 mg mL⁻¹) en PB pH 7 (0.1 M) en una proporción de 1:4 V/V, se dejaron secar a temperatura ambiente, después se enjuago constantemente con BF para remover la enzima no inmovilizada. Para la inmovilización con la PLL se utilizó la concentración 0.1 % W/V mezclado con GOx (5 mg mL⁻¹) en la misma proporción que con GA 4:1 para comparar ambos métodos, se dejó secar a temperatura ambiente y se enjuago con PB para retirar la GOx que no quedo entre la PLL. La preparación del electrodo con la mezcla de GA y PLL fue en una proporción de 1:1 de ambos reactivos de entrecruzamiento, completando la proporción de 4:1 con GOx en PB. La evaluación con la D-(+)-glucosa se realizó en diferentes concentraciones de glucosa 0, 1, 5, 10, 20, 50 y 100 mM y modificada para caso, saturando las soluciones con N₂ y O₂.

5.4 Preparación del electrodo GOx/NTCMP-GA

Al electrodo de grafito pre-tratado se le depositó 50 µL de una mezcla que consistió en GOx (5 mg mL⁻¹) con GA al 1% 4:1 v/v, este disolución se agregó a una dispersión de NTCMP en *iso*-OH (1mg mL⁻¹) anteriormente sonicados por 20 min. Los nanotubos antes de ser utilizados fueron previamente tratados con HNO₃ (9 M) durante 24 h en reflujo y neutralizados con lavados de agua desionizada.

5.5 Preparación del electrodo para la inmovilización covalente de GOx

A la estructura de oro en forma de flor se dejó sumergido en una solución 1 mM del ácido 3-mercaptopropionico (3-AMP) disuelta en EtOH, EtOH/H₂O 1:3 y 3:1, acetona/H₂O 1:1 V/V durante 24 h. Pasado el tiempo, se enjuago con EtOH para remover el tiol no adsorbido, posteriormente, se sumergió el electrodo de oro

modificado en una mezcla de EDC ((N-3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) y la NHS (N-hidroxisuccinamida) en una proporción 3:1 durante 2 h. Finalmente, el electrodo se dejó sumergido en una disolución de GOx (5 mg mL^{-1}) por 24 h y después se enjuago con BP pH 7 para remover la GOx no inmovilizada en la superficie de GOx modificada con el tiol.

5.6 Síntesis de la estructura de oro

El electrodo de grafito previamente limpio se sumergió en una disolución de 4 mM de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en 0.1 M de ácido perclórico saturado con N_2 y se electrodeposito el Au por voltametría cíclica en una ventana de potencial entre 0.183 y 1.583 V (vs ENH) a una velocidad de 100 mV s^{-1} . El perfil de la estructura de Au se realizó en una disolución de H_2SO_4 0.5 M previamente nitrogenada.

5.7 Evaluación de biocelda de combustible híbrida microfluídica (BCH- μF) “Y”

La BCH- μF en forma de “Y” es de metacrilato con dimensión de los microcanales de 4.5 cm de largo, 0.3 cm de ancho y 0.1 cm de profundidad de un área para el depósito de los catalizadores de 0.45 cm^2 . El bioánodo consistió en una disolución de GOx/NTCMP-GA depositándolos sobre el canal por goteo y el cátodo fue preparado de Pt/C (30 %), disperso en Nafion[®] (5 % H_2O) y *iso*-OH, depositándolo con ayuda de un aerógrafo. El anolito fue preparado de una disolución de glucosa 10 mmol L^{-1} en BF pH 7 saturado con nitrógeno y el catolito fue una disolución de KOH (0.3 M) saturada con oxígeno.

5.8 Evaluación de la BCH- μF tipo air-breathing

La celda air-breathing consistió en un dos placas de metacrilato empalmadas con un microchanel que integra un polímero de silicona

biocompatible Arcare[®] con 3 μm de espesor y con medidas de 3.0 x 1.0 cm, con un área para depositar el bionodo de 0.1 x 0.9 cm que consistió en una mezcla de GOx/NTCMP-GA. El cátodo fue de preparado a partir de Pt/C (30 %), disperso en Nafión[®] (5 % H_2O) y *iso*-OH, depositándolo sobre papel toray de carbón (con dimensiones de 3.0 x 1.0 cm y el área para reacción fue de 0.09 cm^2) con ayuda de un aerógrafo.

5.9 Caracterización y mediciones electroquímicas

Las mediciones electroquímicas se realizaron usando un potenciostato/gasvanostato BioLogic Science Instruments modelo VMP3. En todos los estudios electroquímicos fue empleada una celda de vidrio de 25 mL empleando un electrodo de calomel saturado (ECS) como referencia, un alambre de platino como contra-electrodo y uno de grafito como trabajo.

5.9.1 Mediciones por voltametría cíclica (VC)

Para evaluar la GOx sobre el electrodo por los diferentes métodos de inmovilización, se realizó por VC en un rango de potencial de -0.8 a 0 V a una velocidad de barrido de 50 mV s^{-1} . Todas las mediciones se llevaron a cabo en BF pH 7 (0.1 M) en temperatura ambiente en saturación o ausencia de oxígeno según sea el caso.

5.9.2 Medición por voltametría de pulso diferencial (VPD)

Se utilizó la técnica DPV para evaluar el efecto de FAD/FADH₂ de GOx a diferentes concentraciones de glucosa, para ello se consideró el par de reducción de FAD en un potencial de inicio de -0.25 V y final -0.65 V (vs ECS) en BF pH 7 en una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} .

5.9.3 Analisis de FAIR-ATR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy – Attenuated Total Reflectance)

Se utilizó un espectrofotómetro Perking Elmer FTIR (Precisely Spectru, 100) para establecer la GOx inmovilizada comparando la GOx pura con respecto al sistema GOx/NTCM-GA. Asimismo, se empleó para verificar que el 3-AMP fue adsorbido sobre la estructura de oro.

5.10 Microscopio Electrónico de barrido

Para determinar la forma y tamaño de la estructura de oro electrodepositada sobre el electrodo de grafito se utilizó un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo JSM-7401F.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Inmovilización de GOx unida a un soporte

Una de las formas más simples de inmovilizar GOx a un soporte es a través del depósito directo sobre la superficie que se mantiene a través de interacciones débiles como electrostáticas, diferencia de cargas, puentes de hidrogeno, fuerzas de Van Der Waals, principalmente. En este primer apartado se presentan los resultados de la inmovilización directa al soporte, tomándolos como base comparativa para otros métodos de inmovilización utilizados en el presente trabajo.

6.1.1 Transferencia electrónica mediada por GOx

Los electrodos de grafito (Gf) previamente tratados y depositados con la solución de la enzima como se detalla en la metodología, fueron colocados en la celda electroquímica que contenía una solución amortiguadora de fosfatos (BF) (0.1 M) pH 7 previamente burbujeadada con nitrógeno. La presencia de GOx en la superficie de los electrodos modificados se verificó por voltamperometría cíclica (VC) a una velocidad de barrido de 50 mVs^{-1} en una ventana de potencial de -0.9 a 0.0 V (vs ECS). Además se prepararon electrodos de grafito sin modificar que se evaluaron en las mismas condiciones. En la Figura 17 se presentan los voltamperogramas obtenidos con un electrodo sin modificar y otro modificado con GOx, en el primero no se observó respuesta en la ventana de potencial evaluada, mientras que en el electrodo modificado se observó un pico de oxidación en -0.462 V y uno de reducción a -0.531 V (vs ECS) que coinciden con los potenciales reportados por otros autores (Ivnitski et al., 2006) para el par de picos redox atribuidos a la transición del cofactor FAD (flavín adenín dinucleotido) a FADH_2 y viceversa que se ubica en el sitio catalítico de la enzima (Goran et al., 2013). La separación entre picos (ΔE_p) fue de 69 mV y un potencial formal de (E^0) 0.486 V.

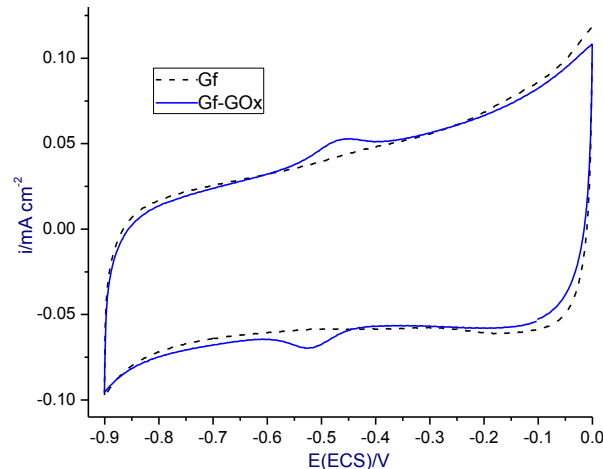


Figura 17. Voltamperogramas cíclicos tanto del electrodo de grafito sin modificar como del electrodo modificado con la enzima GOx sin inmovilizar.

Para corroborar que los picos realmente corresponden al par FAD/FADH₂, se depositó el cofactor sobre el grafito bajo las mismas condiciones de la VC antes descritas. Los voltamperogramas (Figura 18) mostraron tanto al pico de oxidación (-0.422V vs ECS) como al de reducción (-0.521V vs ECS) desplazados catódicamente y de una mayor intensidad de corriente con respecto a lo obtenido con los electrodos modificados con GOx. Como era de esperarse en estos electrodos existe una mayor facilidad para que ocurran las reacciones y la transferencia directa de electrones que cuando se deposita la enzima (Goran et al., 2013), pues de acuerdo a investigaciones cristalográficas de la estructura terciaria de GOx, la coenzima FAD se localiza en el fondo de una cavidad por lo que bajo condiciones normales existe una mayor resistencia a la transferencia directa de electrones entre el sitio activo y el electrodo (Ming et al., 2008).

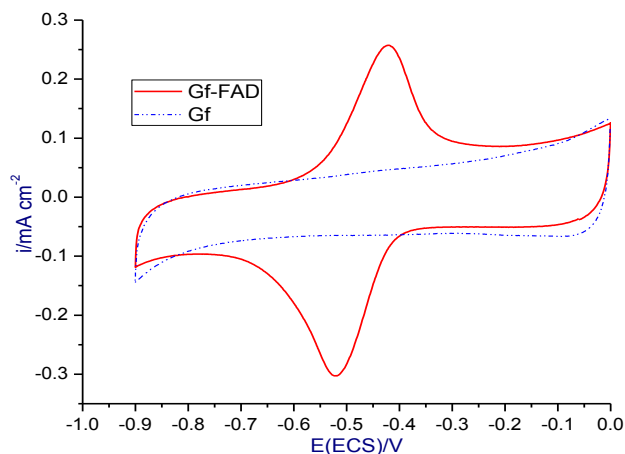


Figura 18. Voltamperogramas cíclicos de la oxidación-reducción del cofactor par FAD/ FADH₂ depositado sobre un electrodo de grafito (línea roja) y respuesta del electrodo sin modificar (línea azul).

6.1.2 Cálculo de la densidad del área electroactiva de GOx

El cálculo de la cantidad promedio de enzima activa adsorbida se realizó integrando el pico de reducción de GOx utilizando la ecuación 2:

$$\Gamma = Q/nFA \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde Γ es el promedio de enzima inmovilizada, Q es la carga de la reacción de reducción (u oxidación), n el número de electrones transferidos, en este caso es igual a 2, A el área geométrica del electrodo y F es la constante de Faraday (Wu et al., 2010). Para los electrodos de Grafito/ GOx se calculó una Γ de enzima inmovilizada de $8.28947 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$, lo que correspondería a 4.99×10^{13} moléculas cm^{-2} . Los electrodos se almacenaron a 4°C en BF y durante tres días consecutivos se evaluó su actividad, conservando el 76.4% y se pierde el 23.6% con una densidad promedio de $1.95915 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$, la disminución se atribuyó principalmente al lavado de la enzima durante cada medición.

La densidad de enzima inmovilizada fue mayor al del valor teórico de $2.86 \times 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$ para una monocapa de GOx (Fu et al., 2011). En el cuadro 1 se presentan diferentes valores de Γ reportados; en algunos casos se han utilizado materiales y métodos más complejos, y por el contrario en el presente trabajo los electrodos de grafito sólo fueron ciclados electroquímicamente con lo que

posiblemente se promovió la formación de especies oxidadas en la superficie como quinonas, carboxilos y lactonas principalmente (Yang y Lin, 1995), que pudieran haber favorecido la inmovilización de la enzima. Al comparar el valor obtenido de Γ con lo publicado podemos concluir que se alcanzó una densidad de GOx adecuada.

Cuadro 1. Comparación de la Γ de GOx inmovilizada sobre diferentes soportes.

Electrodo	Γ mol cm ⁻²	Referencia
Laponita/GOx/CV	2.66×10^{-11}	Shan et al (2010)
Fenantrolina/GOx/CV	8.5×10^{-11}	Oztekin et al (2011)
GOx/grafeno/CV	$1.3 \pm 0.3 \times 10^{-10}$	Wu et al (2010)
GOx/NPsC	$4.9 \pm 0.3 \times 10^{-10}$	Szot et al (2013)
GOx/NHC-NEC/CV	3.18×10^{-10}	Yin et al (2011)
GOx/Grafito	8.28947×10^{-11}	Este trabajo

*CV Carbón vítreo; NPsC (nanopartículas de carbono); NHC (Nanohojas de carbono); NEC (nanoesferas de carbono).

6.1.3 Oxidación de D-(+)-glucosa por GOx

Una de las maneras de evaluar el efecto de la glucosa sobre GOx es midiendo el peróxido generado en la reacción por medio de una técnica espectrofotométrica o electroquímica mediante el uso de un mediador. No obstante, se ha investigado poder evaluarlo de forma directa para prescindir de algún tipo de molécula externa.

Se propuso evaluar la actividad catalítica de GOx sobre las señales del par redox FAD/FADH₂ utilizando concentraciones crecientes de glucosa (0, 1, 5, 10, 20, 50 y 100 mM) en BF 0.1M y pH 7 bajo atmósfera de nitrógeno. En los voltamperogramas de la Figura 19 se observa una pequeña disminución en la intensidad de corriente, particularmente en el pico de reducción y para concentraciones menores a 10 mM; a concentraciones mayores el efecto no incrementó. Este efecto de FAD reducido se puede atribuir a la saturación del centro activo de GOx por la concentración de glucosa y a la transformación de

oxígeno a peróxido de hidrógeno por la enzima, disminuyendo la concentración de oxígeno en la superficie del electrodo (Su y Klinman, 2003) [11].

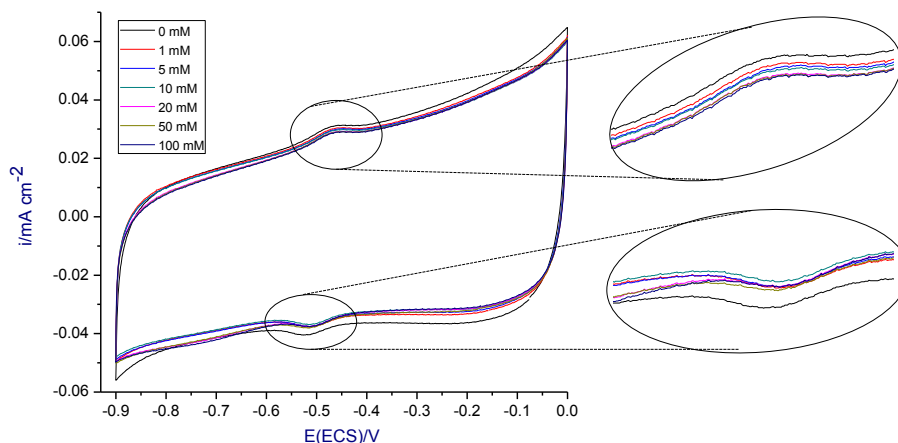


Figura 19. Efecto del FAD/FADH₂ de GOx en presencia de 0, 1, 5, 10, 20, 50 y 100 mM de D-(+)-glucosa.

La disminución de la densidad de corriente es debido a que en condiciones anaeróbicas y en ausencia de glucosa, la GOx oxidada (FAD) pasa a su estado reducido GOx' (FADH₂) por un proceso reversible electroquímico (Figura 20-A). En presencia de glucosa (1) una fracción de GOx-FAD se reduce a GOx-FADH₂ por el proceso electroquímico y el resto por la vía de la oxidación de la glucosa (además de generarse la gluconolactona 2' como subproducto). En la otra media reacción GOx-FADH₂ se reduce básicamente a través del proceso electroquímico, pues el proceso enzimático está limitado por la poca disponibilidad de oxígeno (Figura 20-B). Por lo que en el sistema están ocurriendo dos procesos competitivos, electroquímico y enzimático, viéndose limitado GOx-FADH₂ más la saturación de sitios activos de GOx a mayor concentración de glucosa, reflejándose en el VC de la Figura 19 como una disminución en la densidad de corriente en los picos de oxidación y principalmente en la reducción de GOx (Tominaga et al, 2008).

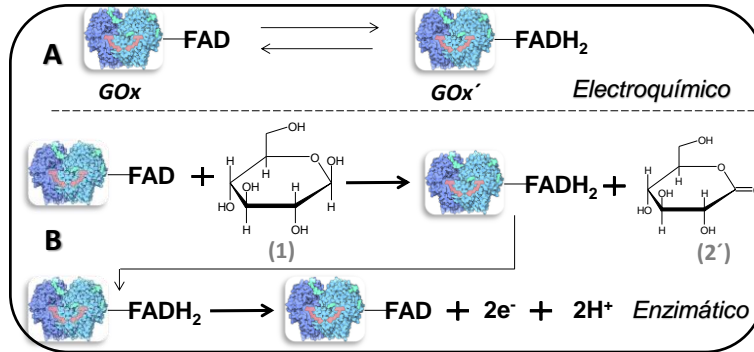


Figura 20. Reacción reversible de FAD-FADH₂ por un proceso electroquímico (A) y enzimático en presencia de glucosa (B).

La razón del porqué la enzima con las dos partes que la conforman, apoenzima y cofactor, son necesarias para la oxidación de la glucosa es que es necesario una parte de reconocimiento del sustrato y la otra de aceptor/donador protónico y de electrones, el cual se explica en su mecanismo de reacción. La investigación realizada para establecer su mecanismo de reacción comprende análisis cristalográficos, termodinámicos y computacionales (Won et al., 2013).

6.1.3.1 Mecanismo de reacción en la oxidación de la glucosa por GOx

El mecanismo para oxidación de la glucosa por GOx considera aspectos como el tamaño de la enzima de 2.3 Å, la estructura terciaria de la proteína en la que la coenzima FAD se localiza en el fondo de una cavidad dentro de la apoenzima, y la evidencia de que el centro de la reacción catalítica es el nitrógeno en la posición 5 del anillo isoaloxazina de FAD (Figura 21) que se encuentra más expuesto al área hidrofílica y es potencial aceptor de protones y electrones (Ghosla y Marrey 1986).

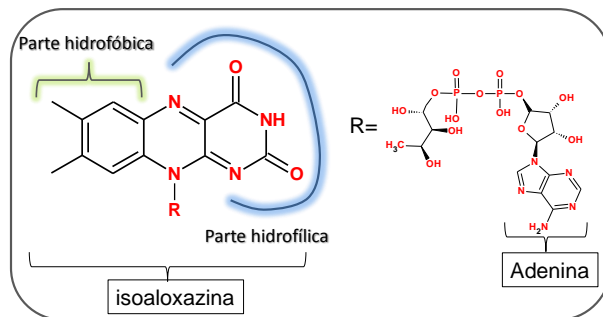


Figura 21. Estructura química de FAD.

Existen tres aminoácidos próximos al centro catalítico, Glu412, His516 y His559. Mientras que His559 está unido fuertemente por puentes hidrogeno con el N ϵ y O ϵ 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 y Klinman, 2013). 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.

El mecanismo de reacción, en ausencia de oxígeno, comienza con el acercamiento de la glucosa por el C1 a 3.42 Å de N5 de FAD, el oxígeno del hidroxilo de la glucosa (GlcO1) se encuentra posicionado equidistante a 2.78 Å entre el nitrógeno en His516N ϵ 2 y la His559N δ 1. En esta posición la His516N ϵ 2 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 22). Se vuelve a repetir el ciclo con otra molécula de glucosa para formar FADH₂ (Leskovac et al., 2005).

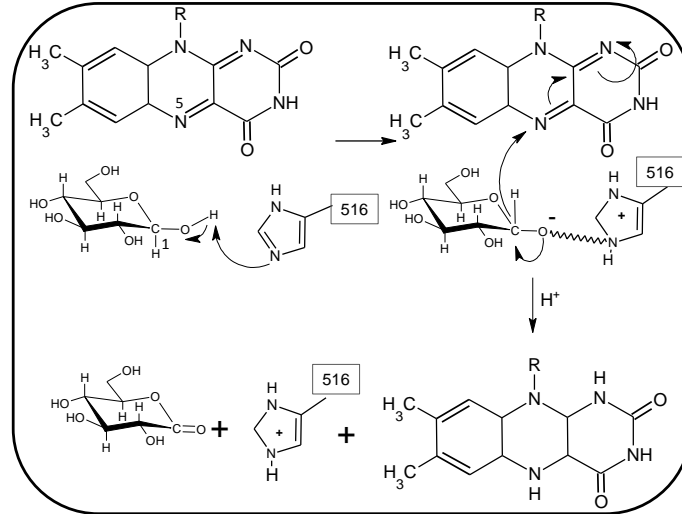


Figura 22. Mecanismo de reacción de GOx en la oxidación de glucosa en ausencia de oxígeno.

La δ -gluconolactona es hidrolizada para la formación del ácido glucónico como subproducto de la reacción (Figura 23). 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 et al., 1998). Cabe mencionar que la reacción en presencia de oxígeno se explica a través de otro mecanismo posteriormente abordado.

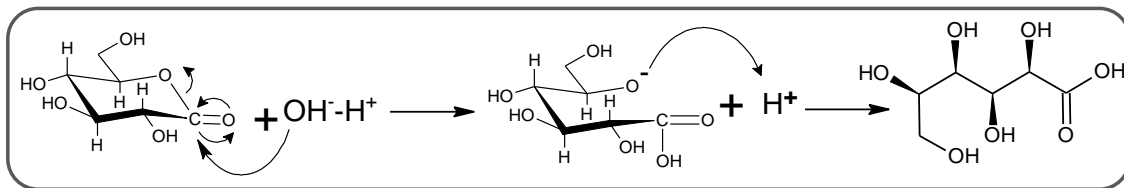


Figura 23. Hidrólisis de la gluconolactona para la formación del ácido glucónico.

6.1.4 Desempeño del bioánodo a partir de GOx en una biocelda de combustible híbrida microfluídica (BCH- μ F)

Establecidas las condiciones de inmovilización para GOx en media celda, se prosigió en evaluarla en celda completa. Para ello, se utilizó una celda microfluídica reportada anteriormente por González-Guerrero et al (2013). El bioánodo se preparó a partir de una solución de GOx (5 mg mL^{-1}) en BF (0.1 M ,

pH 7) que se depositó por goteo sobre una superficie de carbón (25 x 10 mm) de PPF (por sus siglas en inglés pyrolyzed photoresist films). El cátodo consistió de una tinta que contenía la mezcla: Pt/C 40 % (1mg), isopropanol (73 μL) y nafión[®] (7 μL) y se depositó con ayuda de un aerógrafo.

En la primera prueba se utilizó flujos ideales tanto para el bioánodo (10 mM glucosa en BF) como para el cátodo (KOH 0.3 M). Se obtuvo un potencial a circuito abierto (PCA) de 0.542 V, una densidad de corriente de 0.023 mA cm^{-2} (a una potencia máxima) y una potencia de 6.3 $\mu\text{W cm}^{-2}$ (0.49 V) a un flujo de 1.5 mL h^{-1} . Para intentar mejorar el rendimiento de la celda se aumentó el flujo a 3 mL h^{-1} mejorando la potencia a 7.8 $\mu\text{W cm}^{-2}$ (0.61 V) y significativamente la densidad de corriente en 0.032 mA cm^{-2} (Figura 24). Al aumentar el flujo a 5 mL h^{-1} el rendimiento neto de la celda decayó considerablemente, atribuyéndoselo a la débil fijación de la enzima al soporte que favorece su remoción de la superficie particularmente cuando la fuerza de arrastre aumenta.

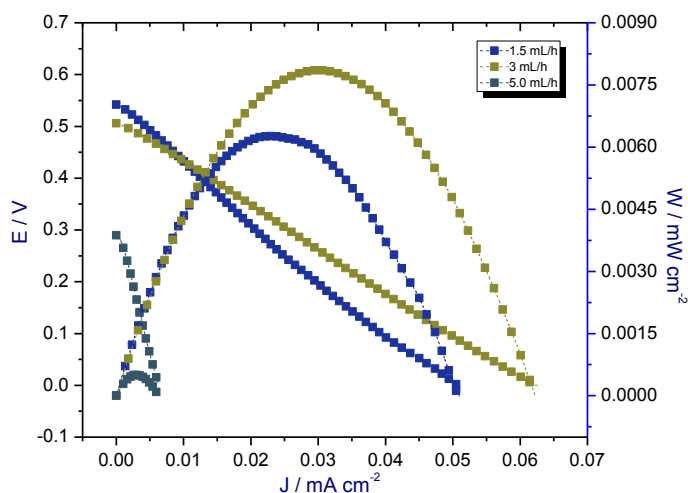


Figura 24. Curvas de polarización del rendimiento de la biocelda de combustible híbrida. El bioánodo de carbono fue modificado con GOx depositada en la superficie. El desempeño de la celda fue evaluada con flujos de 1.5, 3.0 y 5.0 mL h^{-1} los cuales se incidan en el gráfico.

Para poder comparar nuestro resultado con los de otros autores, es necesario que cumplan con condiciones similares tanto en el bioánodo y cátodo, no obstante, la mayoría de bioceldas híbridas reportadas utilizan algún tipo de mediador o promotor de transferencia de electrones, polímero iónico o fijador de la

enzima. No obstante, el rendimiento de la celda obtenida se comparará con los resultados de los otros métodos de inmovilización propuestos en el presente proyecto de investigación, que se presentaran en apartados más adelante.

En resumen, con esta serie de resultados damos evidencia de la presencia y actividad de GOx depositada en la superficie de electrodos de grafito, calculándose una cantidad promedio de $8.28947 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ de enzima inmovilizada comparable con lo publicado en otros trabajos. La transferencia directa de electrones a través de la capa de enzima depositada sobre grafito se demostró por la presencia de los picos de oxidación-reducción del par FAD/FADH₂. La actividad catalítica para la oxidación de glucosa se infiere de la disminución de los picos de FAD/ FADH₂ en presencia de glucosa. Este efecto fue mínimo y saturable desde concentraciones de 5 a 10 mM de glucosa. Finalmente, se evaluó este biánodo en una celda completa obteniendo un rendimiento máximo de $7.8 \mu\text{W cm}^{-2}$ (0.61 V), una densidad de corriente en 0.032 mA cm^{-2} y un PCA de 0.5 V cuando el flujo de alimentación en ánodo y cátodo fue de 3 mL h^{-1} . Flujos mayores favorecen la remoción de GOx de la superficie. Para solucionar este inconveniente se optó por utilizar otro método de inmovilización.

6.4 Inmovilización de GOx por entrecruzamiento (cross-linking)

El uso de glutaraldehído (GA) para la inmovilización por entrecruzamiento de GOx ha sido muy empleada debido a que es una molécula pequeña con una alta reactividad hacia los grupos aminos de la enzima, además de ser un método sencillo, la molécula es biocompatible y económicamente accesible (Gade et al., 2006). Sin embargo, una proporción de GA respecto de la cantidad de enzima utilizada puede provocar un entrelazamiento entre grupos amino de la propia enzima causando su desnaturalización y bloqueando la difusión del sustrato y subproductos de la reacción. Por otro lado, una concentración baja de GA no permite una óptima fijación de la enzima permitiendo su difusión fuera del sistema (Elkaoutit et al., 2011).

Adeloju y Lawal (2011) estudiaron el efecto de la concentración de GA sobre la actividad catalítica de enzimas oxidasas adicionando albumina de suero bovino como auxiliar inerte para la inmovilización. Reportaron una concentración óptima de 4.5 % de GA a concentraciones mayores de 4.8% observaron una disminución de la respuesta potenciométrica al parecer por alteración del sitio catalítico, cambio de la porosidad y desnaturalización de la proteína, y a concentraciones menores de 4.5 % la medición amperométrica fue baja.

6.4.1 Caracterización electroquímica de GOx con glutaraldehído (GA)

Sobre la superficie de los electrodos de grafito se depositaba la mezcla de GOx y GA a dos diferentes concentraciones 4.5 % y 0.2 %. En la Figura 25 se muestra la voltametría cíclica (VC) a 50 mV s^{-1} donde se compara la respuesta de dos electrodos en los que se depositó la enzima con ambas concentraciones de GA. La solución de la celda fue BF 0.1 M pH 7.0 previamente desoxigenada y se midió en ausencia de glucosa. Para el sistema GOx-GA 0.2 % se observaron los picos característicos de FAD/FADH₂ en -0.468 y -0.516 V (vs ECS) respectivamente, con una separación (ΔE_p) de 48 mV y un potencial formal (E°) de -0.492 V (vs. ECS). Mientras que para GOx-GA 4.5% los picos de FAD/FADH₂ se ubicaron en -0.426 y -0.504 V, con un ΔE_p y un E° de 78 mV y -0.465 V respectivamente. Una mayor densidad de corriente es observada con GA 4.5 % debido principalmente a una mayor cantidad de GOx inmovilizada, reflejándose además en la transferencia de electrones de la capa más externa a la superficie del electrodo, en consecuencia el ΔE_p es mayor con respecto a GA 0.2 %. La densidad de corriente para los picos anódicos y catódicos de GOx-GA 0.2 % fueron de 0.019 y 0.014 mA cm⁻² respectivamente, mientras que para GOx-GA 4.5% fueron de 0.026 y 0.023 mA cm⁻² un 36 % más que GOx-GA 0.2%, debiéndose a una mayor cantidad de enzima inmovilizada.

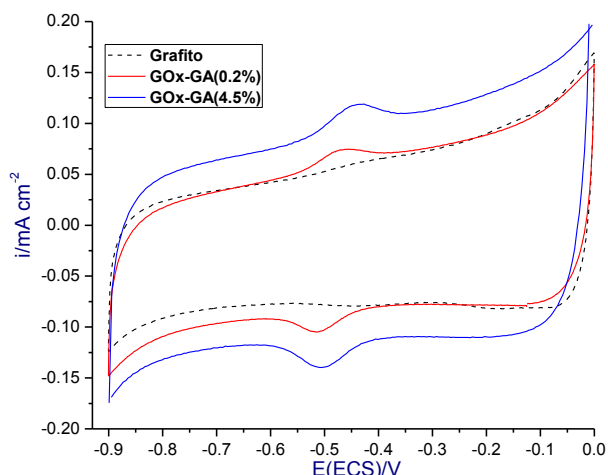


Figura 25. VC comparativa entre GOx-GA(0.2%) vs GOx-GA(4.5%).

El efecto de la concentración del GA sobre los potenciales de oxidación y reducción modificó el ΔE_p de 48 mV con GA 0.2 % y 78 mV con GA al 4.5 %, se podríamos decir entonces que las reacciones son reversible y cuasi-reversible, respectivamente e indicando en el primero de los casos una transferencia de electrones al electrodo más rápida. Por otro lado, comparando los E° con el valor teórico para FAD/FADH₂ de -0.46 V en pH 7 a 25.8 °C señalando que no existe un impedimento en la reacción oxido-reducción independientemente si se utilizó una concentración de 0.2 o 4.5 % de GA (Kausaitė-Minkstienė et al., 2011). Además en la Figura 25 se observa que la señal de GOx-GA 4.5 % obviamente es más capacitiva que GOx-GA 0.2 % ya que el GA no es un compuesto conductor.

6.4.2 Cálculo de la densidad del área electroactiva de GOx-GA

Se calculó la densidad del recubrimiento de GOx sobre la superficie (Γ) para ambas concentraciones de GA, determinándose para GOx-GA 0.2 % 1.6195×10^{-10} mol cm⁻² mientras que para GOx-GA 4.5 % de 2.6865×10^{-9} , 16.59 veces más con respecto a 0.2 % logrando una mayor inmovilización de GOx sobre el grafito. Comparándolo con otros reportes donde utilizan GA con PANI el valor de Γ 1.77×10^{-8} mol cm⁻² un 11 % menor a partir de una disolución de 15 mg mL⁻¹ de GOx (Gvozdenović et al., 2011).

Es evidente que una mayor concentración de GA puede enlazar y retener una mayor cantidad de moléculas de GOx. El mecanismo de reacción entre GOx y el GA consiste con el ataque nucleofílico de uno de los grupos aminos de la enzima sobre uno de los carbonos del aldehído provocando la deslocalización de un par de electrones del oxígeno. A continuación el oxígeno con carga negativa remueve uno de los protones de la amina excedida de carga formando un alcohol y el intermediario carbinolamina. Posteriormente, el par libre del oxígeno del grupo hidroxilo remueve uno de los protones del agua (o de algún grupo funcional ácido de otra molécula de GOx) permitiendo su remoción en forma de agua. El par de electrones libres de la amina forma un doble enlace con el carbocatión quedando con carga positiva. Finalmente, se recupera el protón removido anteriormente del agua (o de la parte ácida de la enzima) para formar la imina y una molécula de agua (Figura 26). Los fragmentos aminos libres de lisina de GOx son más probables para interactuar con el GA (Wu et al., 2004).

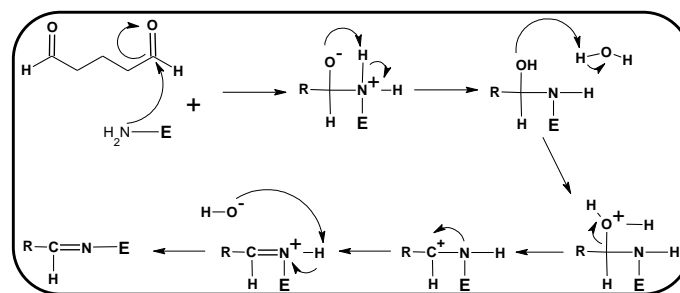


Figura 26. Mecanismo de reacción entre GOx y el GA.

6.4.3 Evaluación de GOx-GA(0.2 %) en presencia de la D-(+)-glucosa

Para evaluar el efecto de la glucosa sobre GOX-GA se eligió la concentración de 0.2 % de GA. Para ello, se empleó concentraciones crecientes de glucosa de 0, 1, 5, 10, 20, 50 y 10 mM en BF pH 7 a temperatura ambiente (entre 20 y 25 °C).

En la Figura 27-A se observan las VCs comparativas de las diferentes concentraciones de glucosa, mostrando una disminución en la densidad de corriente en la oxidación y reducción. En las Figura 27-B se muestra la relación densidad de corriente pico de oxidación y reducción vs la concentración de

glucosa, observando una relación no lineal y saturable a concentraciones mayores a 10 mM de glucosa (Figura 27-B).

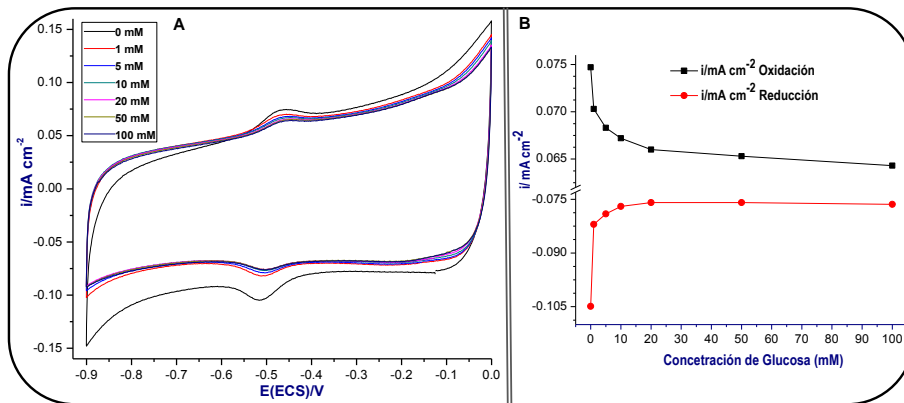


Figura 27. VC comparativas de GOx-GA (0.2 %) a diferentes concentraciones de glucosa (A), concentración de glucosa vs picos máximos de oxidación y reducción (B).

La relación que existe entre la concentración de la glucosa con respecto a la densidad de corriente de GOx-GA (0.2 %) no es lineal, pero no significa que el comportamiento sea al azar. Lo que conocemos es que la corriente disminuye al aumentar la concentración de glucosa, pero lo que no sabemos si es con la misma magnitud, por lo que podemos utilizar una dependencia potencial. Graficando el logaritmo de los picos redox podemos obtener una relación lineal para la corriente de la oxidación ($R= 0.9926$) siendo modelo propuesto para facilitar su interpretación (Figura 28). Es necesario realizar otros experimentos y compararlo con los convencionales para poder establecerlo como un método que se pudiera utilizar posiblemente en la cuantificación de glucosa.

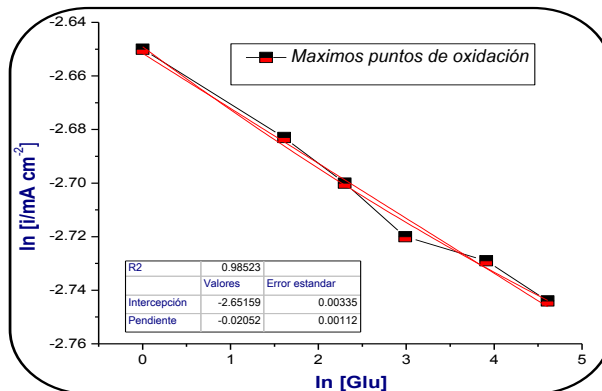


Figura 28. Modelo lineal de una dependencia potencial en el proceso de GOx-GA (0.2%).

6.4.4 Caracterización electroquímica de GOx con poli-L-lisina

Otro de los agentes cross-linking empleados para la inmovilización de GOx fue la poli-L-lisina (PLL). La PLL es un homopolímero formado por L-lisinas con propiedades anfífilas y al estar conformado por uno de los derivados de aminoácidos esenciales para el humano es de carácter biocompatible (Figura 29). Se ha empleado para la fijación de células, tejidos y enzimas justificando su uso en la inmovilización de GOx. La forma en la que interactúa la PLL es por medio de su grupo amino libre con los grupos carboxilos más disponibles de GOx derivados del aspartato y glutamato (Krikorian et al., 2002).

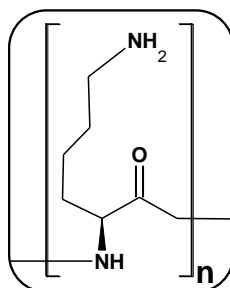


Figura 29. Estructura química de la PLL.

La preparación de GOx-PLL consistió en una solución de GOx (5 mg mL^{-1}) en BF pH 7 y PLL (0.1 w/v) completando el 25 % de la mezcla final. Posteriormente, se dejó secar durante 24 h y después se enjuagó con BF para retirar la enzima no inmovilizada. El electrodo fue evaluado por VC a 50 mV s^{-1} .

Los picos de oxidación y reducción de FAD/FADH₂ coinciden con las anteriores formas de inmovilización, -0.456 y -0.525 V respectivamente, el ΔE_p es de 69 mV similar al de 4.5 % con GA lo que indica que la transferencia de electrones no es muy efectiva y la $E^{\circ'}$ calculada fue de -0.49 V (Figura 30). La densidad de corriente para el pico anódico fue de 0.012 mA cm^{-2} y para el catódico $0.0092 \text{ mA cm}^{-2}$ valores por debajo en comparación con el GA. La Γ para GOx-PLL fue de $1.178 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$, muy similar al de 0.2 % de GA y muy por debajo del de 4.5 %. Se puede concluir parcialmente que la PLL posee una baja

conducción de los electrones al electrodo y de una limitada eficacia para inmovilizar GOx, con respecto a las diferentes concentraciones de GA evaluadas.

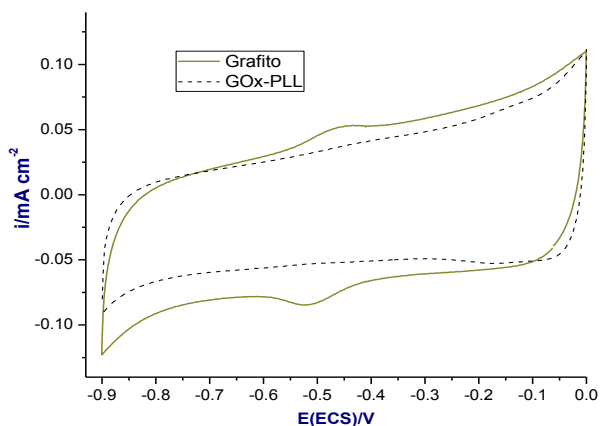


Figura 30. VC de GOx-PLL sobre grafito.

6.4.5 Evaluación de GOx-PLL en presencia de la D-(+)-glucosa

Posteriormente, se evaluó el efecto de GOx-PLL a diferentes concentraciones de glucosa sobre a 0, 1, 5, 10, 50 mM en PB (0.1 M) pH 7 saturado la disolución en N_2 y O_2 para estimar su efecto sobre FAD. En atmósfera de N_2 (Figura 31-A) se observó un comportamiento similar con respecto a las anteriores formas de inmovilización, GOx sobre grafito y GOx-GA. Por otro lado, utilizando las disoluciones de glucosa saturadas con O_2 es más evidente la disminución en las señales de $FADH_2$ (Figura 31-B).

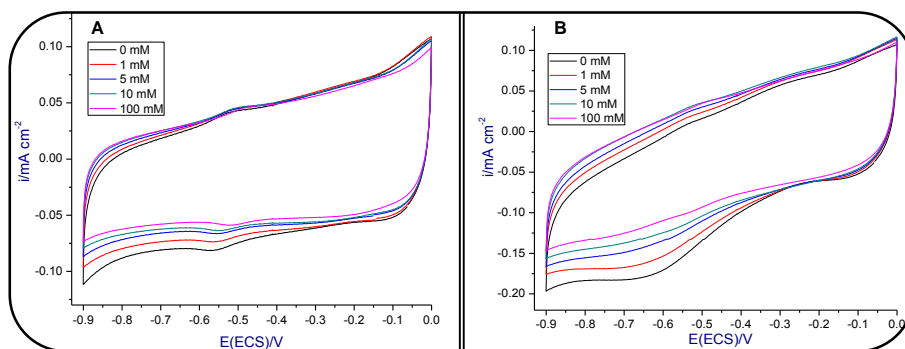


Figura 31. VC del electrodo GOx-PLL a diferentes concentraciones de glucosa saturado en nitrógeno (A) y oxígeno (B).

La razón de esta disminución más notoria sobre FAD reducido en presencia de oxígeno se puede explicar mediante el mecanismo de reacción. La His-516 se le ha asignado un importante papel como la base general en la oxidación de la glucosa como se mencionó anteriormente y entre FADH₂ puedo albergar la molécula de oxígeno.

La reacción completa está conformado en dos etapas: En la primera etapa de reducción se es transferido dos protones y electrones a FAD; en la segunda etapa o de oxidación, FADH₂ actúa como una molécula que transfiere electrones y protones al oxígeno diatómico para formar peróxido de hidrógeno y completar el ciclo catalítico (Figura 32).

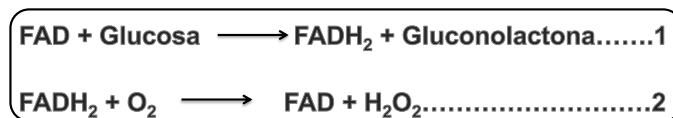


Figura 32. Reacción completa de la reducción de la glucosa en presencia de oxígeno.

En el mecanismo de reacción en atmósfera de nitrógeno (ver mecanismo de reacción con GOx) la His-516-H⁺ se encontraba de forma protonada siendo una cuestión crítica para que se lleve a cabo la reacción y la distancia entre el nitrógeno con el protón (N^ε) de His-516 y del nitrógeno N1 de FADH₂ se encuentra a una proximidad de 3.4 Å, y en este espacio es donde se alberga la molécula de oxígeno (Prabhakara et al., 2003).

En el primer paso del mecanismo un electrón es transferido del cofactor reducido FADH₂ al oxígeno que se encuentra entre la cavidad de N1 y N_ε quedando como un par radical FAD^{•+}...O₂^{•-}. La transferencia es factible debido a que el O₂ en presencia de la His-516^{H+} la afinidad es alta de 118.2 Kcal mol⁻¹ en comparación con la afinidad electrónica del oxígeno gaseoso de tan solo 10.4 Kcal mol⁻¹. Posteriormente, el ión FAD^{•+} transfiere su protón del nitrógeno N1 al radical O₂^{•-}, seguido por un acoplamiento de electrones transferidos al radical O₂H formando H₂O₂. No es necesario una energía de activación porque la atracción es fuerte entre las cargas de O₂^{•-}...H⁺ (Figura 33). Finalmente, el H₂O₂ deja su posición de la cavidad (Prabhakar et al., 2002).

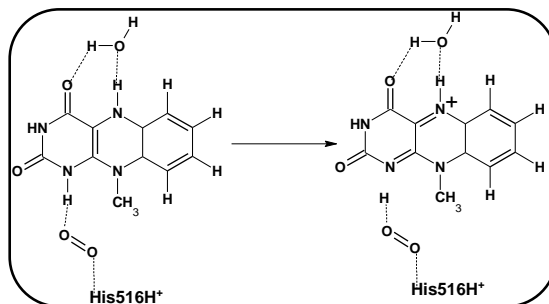


Figura 33. Mecanismo de reacción de FADH₂ a FAD en presencia de oxígeno y formación del H₂O₂.

Como se observó experimentalmente y por la explicación del mecanismo de reacción, existe una disminución en la señal de FADH₂ por la disponibilidad de oxígeno en la superficie del electrodo, además de la competencia del cofactor por la reacción acoplada electroquímica. Asimismo, si existe una alta concentración de H₂O₂ puede disminuir el pH del medio provocando un daño estructural y funcional de la enzima, viéndose reflejado en una disminución en la corriente.

Comparando los agentes de entrecruzamiento, el GA a diferentes concentraciones se encontró una buena cantidad de GOx inmovilizada sobre la superficie de grafito y los parámetros electrocinéticos de FAD indicaron una buena transferencia de los electrones con el GA al 0.2 % y en menor medida con 4.5 %. Al ser sustituido por la PPL presentó características similares que con el GA independientemente de la concentración. Posteriormente, se evaluó un tercer sistema realizando una mezcla de ambos compuestos (GA-PLL) para establecer su comportamiento con GOx.

6.4.6 Caracterización electroquímica de GOx en una mezcla de GA y PLL

Se ha reportado el uso de la PLL con otros agentes inmovilizadores sobre GOx para tratar de mejorar el efecto de la señal de la corriente y de la cantidad de enzima inmovilizada. Mizutani et al (1995) reportaron la co-adsorción de la PLL y el poli (sulfonato de 4-estireno) con GOx sobre una superficie de oro modificada con el ácido mercaptopropionico. Chung et al (2001) utilizaron los polímeros no conductores GA-PLL pero con una permeabilidad selectiva dispersos en etilen

politetrafluoro y Pt/1,3-diaminobenceno para ser utilizado como sensor de glucosa. Thangamuthu et al (2011), presentaron un trabajo interesante mezclando el GA con la PLL incorporando un mediador para la reducción de peróxido de hidrógeno y ser utilizado como compuesto antiséptico.

Para esta experimento se utilizó la PLL a una concentración de 0.1 w/v mientras que el GA fue de 4.5 % con la intención de obtener una mayor cantidad de enzima inmovilizada y mejorar sus características electrocinéticas con respecto a los anteriores métodos. El GA y la PLL se prepararon en una proporción 1:1 con una concentración total del 20 % de todo el sistema GOx/GA-PLL. El electrodo fue evaluado electroquímicamente por VC en BF en una solución nitrogenada a una velocidad de 50 mV s⁻¹.

La VC nos muestra dos picos característicos bien definidos en -0.516 V (FADH₂) y -0.447 V (FAD). La ΔE_p calculada fue de 69 mV y con una E° de 0.481 V obteniendo una Γ de 1.44552×10^{-10} (Figura 34). Comparando la Γ de nuestro resultado con respecto a otros con GOx-PLL es alto para lo reportado por Mizutani et al (1995), ellos calcularon para diferentes modificaciones de GOx de 3×10^{-12} , 7×10^{-13} y 1×10^{-12} mol cm⁻². Estos resultados de GOX/GA-PLL no denotan una mejoría en el proceso de transferencia de electrones y cantidad de GOx inmovilizada con respecto al utilizar el GA o PLL de manera separada.

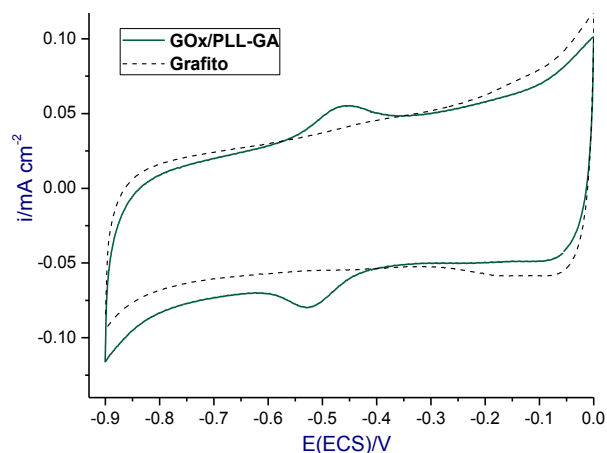


Figura 34. VC de GOx inmovilizado con una mezcla de GA y PLL.

6.4.7 Evaluación de GOx/GA-PLL en presencia de la D-(+)-glucosa

Se estudió el efecto del electrodo a diferentes concentraciones de glucosa (0, 1, 5, 10, 50 mM) en BF en una solución nitrogenada y oxigenada respectivamente, para comparar su comportamiento. En la Figura 35-A se puede observar una disminución significativa en la corriente a medida que aumenta la cantidad de la glucosa saturada la disolución con nitrógeno. De 0 a 1 mM de glucosa hay un disminución de la corriente de $6.4 \mu\text{A cm}^{-2}$, de 1 a 5 mM $3.3 \mu\text{A cm}^{-2}$, de 5 a 10 mM disminuye la $1.1 \mu\text{A cm}^{-2}$ y de 10 a 50 mM de $1.8 \mu\text{A cm}^{-2}$. Mientras que en las soluciones saturadas con oxígeno la disminución del pico de reducción fue mayor medida con los incrementos de glucosa (Figura 35-B).

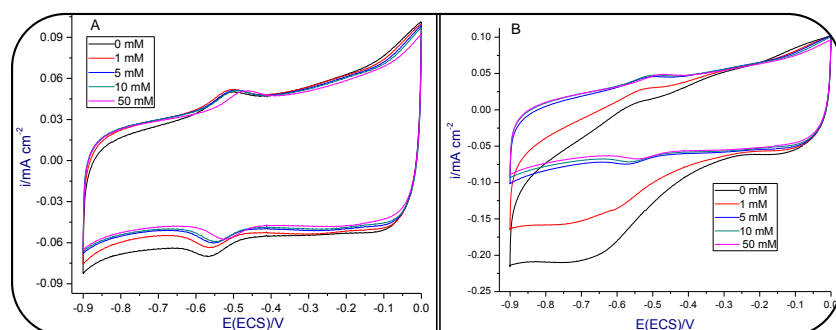


Figura 35. VC comparativa de GOx/GA-PLL a diferentes concentraciones de glucosa en ausencia de oxígeno (A) y saturado en oxígeno (B).

6.4.8 Estudió de los electrodos GOx-PLL y GOx/GA-PLL a diferentes velocidades de barrido

Adicionalmente, se estudió el efecto de los sistemas GOx-PLL y GOx/GA-PLL a diferentes velocidades de barrido de 20 a 1000 mV s^{-1} en intervalos de 40 mV s^{-1} y en ausencia de glucosa (Figura 36-A). En la Figura 36-B se graficó las diferentes velocidades de barrido con respecto a los picos máximos de oxidación en GOx-PLL ($y= 6.9466 \times 10^{-4}x + 0.0344$, $r^2= 0.9972$) y de reducción ($y= -7.3921 \times 10^{-4}x - 0.04177$, $r^2= 0.9981$) ambas con una tendencia lineal. Este tipo de comportamiento indica que la transferencia de electrones de GOx-PLL sobre grafito se lleva a cabo en la superficie por un proceso electroquímico y no por

difusión, lo cual indica que la enzima se encuentra inmovilizada y permite la transferencia de electrones.

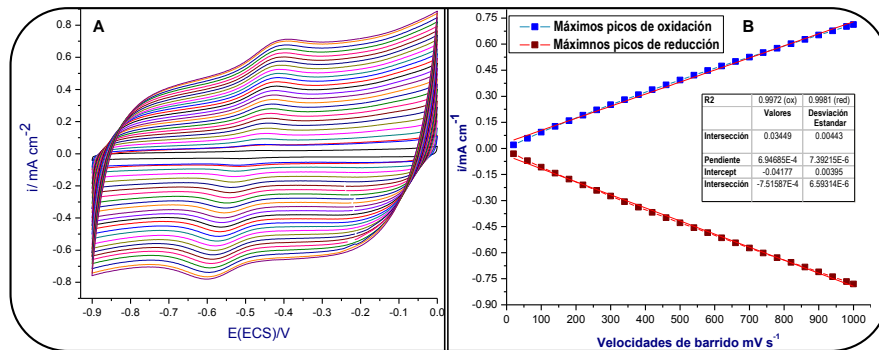


Figura 36. VCs comparativo del electrodo GOx-PLL a diferentes velocidades de barrido, de 20 a 1000 mV s^{-1} (A), velocidades de barrido VS máximos picos de oxidación y reducción (B).

Para el sistema GOx/GA-PLL se realizó el mismo procedimiento y cálculos (Figura 37-A), encontrando una tendencia lineal tanto en la oxidación como en la reducción, con una ecuación de la línea recta en la oxidación de $y = 6.9468 \times 10^{-4}x + 0.03449$ ($r^2 = 0.9972$) y para la reducción $y = -7.5158 \times 10^{-4}x - 0.04177$ ($r^2 = 0.9981$) (Figura 37-B). Por seguir una tendencia lineal a medida que aumenta la corriente con respecto a la velocidad de barrido, el proceso se lleva a cabo en la superficie del electrodo.

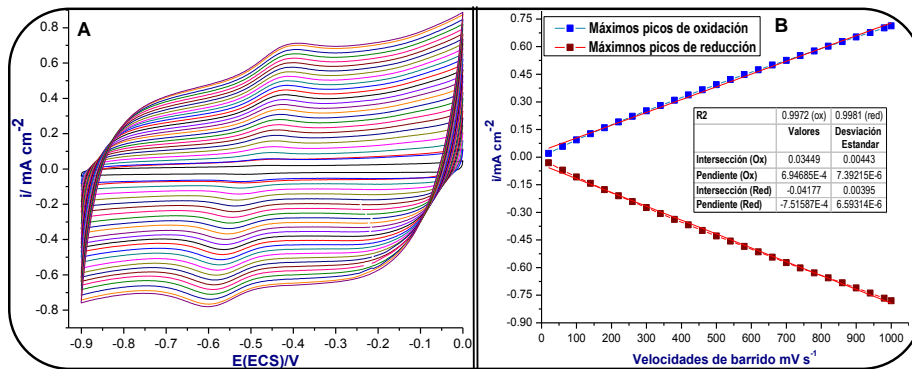


Figura 37. VCs comparativo del electrodo GOx/GA-PLL a diferentes velocidades de barrido, de 20 a 1000 mV s^{-1} (A), velocidades de barrido VS máximos picos de oxidación y reducción (B).

Adicionalmente, para ambos sistemas, GOx-PLL y GOx/GA-PLL, se calculó la constante de la velocidad de transferencia de electrones (K_s) de acuerdo al modelo de Laviron (Laviron, 1979a) para un proceso llevado a cabo

sobre el electrodo, en donde la α es el coeficiente de transferencia de carga, R constate de los gases ideales, F constante de Faraday, T temperatura, n número de electrones transferidos, V velocidad de la corriente y ΔE_p es la separación de los picos de oxidación y reducción máximos (Laviron, 1979b).

$$\log K_s = \alpha \log(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \log \alpha - \log \frac{RT}{nFV} - \frac{\alpha(1 - \alpha)nF\Delta E_p}{2.3RT}$$

Ecuación 3

En la Figura 38-A se muestra la gráfica de los logaritmos de la velocidad de barrido sobre los picos máximos de los voltajes anódicos y catódicos para el sistema GOx-PLL, de los cuales se escogen las relaciones consecutivas que permiten una mejor regresión lineal (Figura 38-B). Se calculó un α de 0.31 y tomando una velocidad de barrido de 0.3 V s^{-1} se obtuvo una K_s de 1.57 s^{-1} . Mientras que para el sistema GOx/PLL-GA la α fue de 0.43 y la K_s fue de 1.62 s^{-1} (Figura 38-C,D) muy similar con respecto a GOx-PLL. Cuando GOx se encuentra inmovilizado sin ningún otro tipo de reactivo, la K_s es de tan solo 0.1 s^{-1} debido a que la distancia entre el centro activo de la enzima y el electrodo de grafito es alrededor de 13 \AA procediendo una transferencia lenta e ineficiente y por la estructura proteica de la enzima (Ivnitsky et al., 2006).

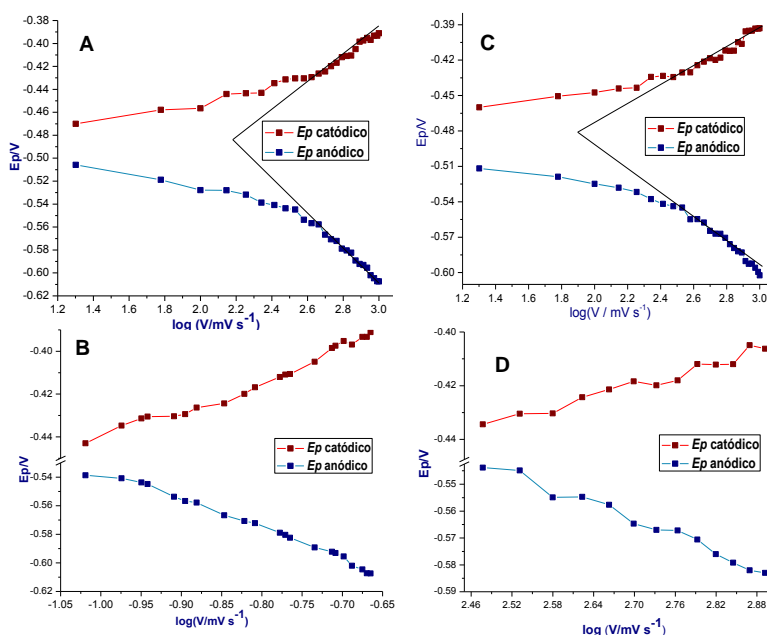


Figura 38. Logaritmo de la velocidad vs máximos picos anódicos y catódicos para los sistemas GOx-PLL (A) y GOx/GA-PLL (C); y selección de los puntos que sugieren una mejor regresión lineal de GOx-PLL (B) y GOx/GA-PLL (D).

Finalmente, se comparó los voltamperogramas de los diferentes métodos de inmovilización de GOx sobre el grafito, observando una mayor densidad de corriente para GOx-GA 4.5 % y 0.2 % en comparación cuando se utilizó PLL y GA-PLL. Asimismo, la densidad GOx en la superficie del grafito fue mayor cuando se utilizó una mayor concentración de GA, aunque con GA 0.2 % se mejoró las características electroquímicas como el ΔE_p y el E^0 (Figura 39). Por ello, se decidió evaluar el sistema GOx-GA 0.2 % en celda completa para evaluar su comportamiento.

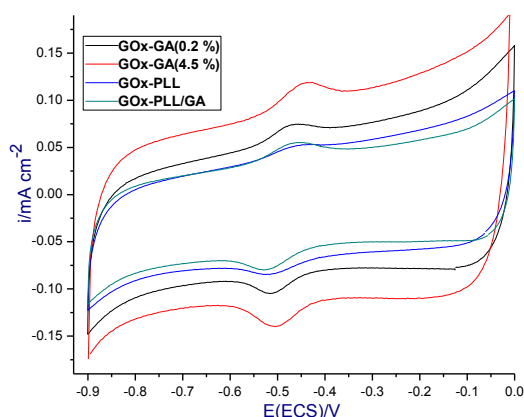


Figura 39. VC comparativo de GOx-GA(0.2 %), GOx (4.5 %), GOx-PLL y GOx/GA-PLL.

6.4.9 Rendimiento del bioánodo GOx-GA(0.2%) en una biocelda de combustible híbrida microfluídica (BCH- μ F)

Para evaluar el rendimiento del bioánodo GOx-GA (0.2 %) fue empleada la celda microfluídica de 4ta generación, depositando tanto el bioánodo como el cátodo (Pt/C) sobre los electrodos de PPF. En la primera evaluación se utilizó los fluidos ideales: el anolito consistió en una solución de glucosa 10 mM en BF pH 7 (0.1 M) saturada en nitrógeno gaseoso y el catolito fue KOH (0.3 M) en O_2 (g). A un flujo de 1.5 mL h^{-1} se alcanzó un PCA de 0.28 V con una potencia de $15 \mu\text{W cm}^{-2}$ y una densidad de corriente a una potencia máxima de 0.1 mA cm^{-2} . Posteriormente, se aumentó el flujo a 4.5, 6 y 9 mL h^{-1} encontrando un resultado

similar entre ellas: un PCA 0.22 ± 0.0035 V, una densidad de corriente de 0.016 mA cm⁻² y una potencia de 9.16 ± 0.0003 V (Figura 40).

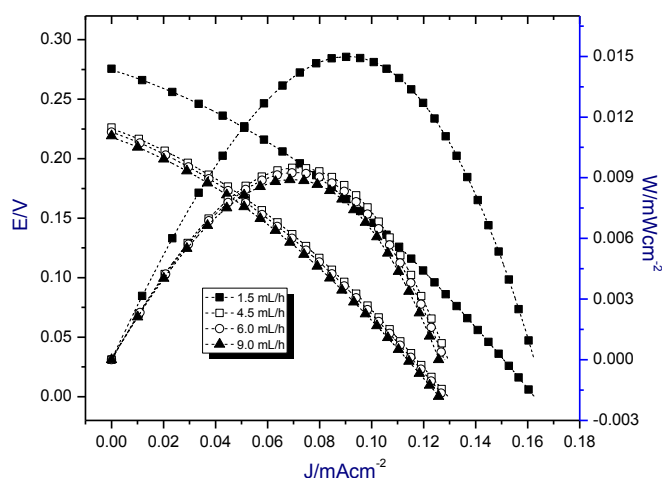


Figura 40. Curvas de polarización comparativas del biánodo GOx-GA (0.2 %) en una BCH- μ F a flujos ideales y a diferentes flujos.

La biocelda de combustible híbrida microfluídica (BCH- μ F) se continuó evaluándola por algunos días en los mismos flujos y fluidos, mostrando los resultados en la Cuadro 2. Los resultados muestran que en la mayor parte de los casos al aumentar el flujo aumentaba la potencia, siendo la máxima de $22 \mu\text{W cm}^{-2}$ a un flujo de 9 mL h^{-1} durante el octavo día de evaluación. El PCA se mantuvo constante dentro de un rango con un promedio de 0.248 ± 0.031 V y el máximo alcanzado fue de 0.283 V. Mientras que para la densidad de corriente se obtuvo una máxima de 0.142 mA cm^{-2} . No se continuó evaluando la celda debido a la remoción de los depósitos.

Cuadro 2. Resultados de la BCH- μ F a diferentes flujos y días de operación.

Flujo mL h ⁻¹	2do día			5to día			8vo día		
	PCA	mA cm ⁻²	$\mu\text{W cm}^{-2}$	PCA	mA cm ⁻²	$\mu\text{W cm}^{-2}$	PCA	mA cm ⁻²	$\mu\text{W cm}^{-2}$
1.5	0.273	0.071	11	0.249	0.073	9.95	0.207	0.112	12.8
4.5	0.265	0.07	10.5	0.254	0.108	15.7	0.191	0.112	12
6	0.251	0.082	12.3	0.275	0.121	19.1	0.206	0.003	0.36
9	0.249	0.1	15.1	0.283	0.123	20.2	0.276	0.142	22

Los resultados de la BH- μ F nos indican un funcionamiento constante de la BCH- μ F, en gran medida por la implementación del GA, logrando inmovilizar a GOx por un tiempo más prolongado permitiendo la difusión del sustrato y subproductos, más no de la enzima. Las variaciones del PCA y la potencia son de un corto rango pudiendo ser reproducibles. Por otro lado, no hay reportes que utilicen únicamente GOx con GA ya sea en celdas microfluídicas o tipo PEM para comparar resultados.

Nuestro sistema que es sencillo de preparar, puede ser comparable con lo publicado por Buckner et al (2010) empleando GOx con nanotubos de carbono fijados con quitosano y como anolito una solución de glucosa (3.8 mM) y ferroceno como mediador disuelto en la solución; el cátodo consistió en Pt haciéndole difundir aire. Obtuvieron con este método más complejo un PCA de 0.32 V, una potencia de $16 \mu\text{W cm}^{-2}$ y una densidad de corriente de 1.24 mA cm^{-2} . No especifican la celda ni el tiempo de operación.

Se logró cumplir con uno de los requerimientos de las bioceldas de combustible, prolongar el tiempo de vida útil. Por otro lado, el rendimiento global de la BCH- μ F es bajo debido principalmente a una ineficiente transferencia de electrones del centro activo de la enzima al electrodo. Para solucionar este inconveniente, fue necesario implementar una estrategia amigable para el biánodo en función a su posible aplicación.

6.5 Estudio para facilitar la transferencia de los electrones de la GOx al electrodo

Existen dos formas principales de cómo comunicar eléctricamente la enzima con el electrodo, utilizando un mediador (TEM) que es una molécula activa redox con una buena cinética de transferencia de electrones y que es inmovilizada con la enzima o en la disolución; fungen el papel como intermediario en la transferencia de electrones generados por la enzima en la reacción al electrodo (Figura 41) (Moncy et al., 2012).

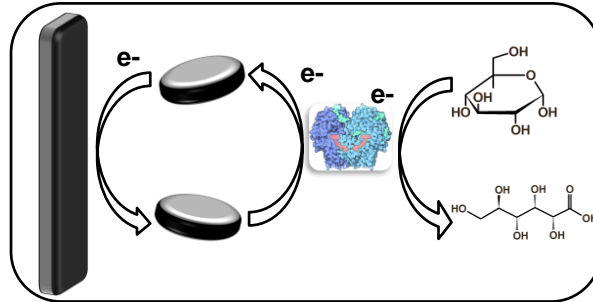


Figura 41. Transferencia de los electrones generados por la oxidación de la glucosa a partir de la enzima con la intervención del mediador para transferirlos al electrodo.

En el caso del mediador para el ánodo en celdas de combustible, es necesario un potencial redox por encima del potencial de la enzima para obtener una transferencia de electrones rápida y eficiente, pero si el potencial del mediador es para altos potenciales de la celda, disminuye la conducción y la densidad del potencial. Las principales desventajas de utilizar mediadores es el costo elevado de algunos, y la mayoría son biotóxicos limitando su posible aplicación para dispositivos implantables, y en algunos casos su uso conduce a una pérdida del voltaje por la diferencia del potencial del sitio activo de la enzima con la del mediador (Falk et al., 2012).

La otra forma de transferencia electrónica es conocida como transferencia directa de electrones (TDE), consiste en utilizar la capacidad que posee la misma enzima en dirigir los electrones generados en la reacción hacia el electrodo y sin perder su bioactividad, sin la necesidad de algún mediador o promotor dentro de la superficie del electrodo o en la disolución (Figura 42). Enzimas como pexodidasas, la lacasa e hidrogenasas es más sencillo este tipo de transferencia porqué el sitio activo está dispuesto en la periferia de la proteína. En la caso de GOx es más dificultoso ya que el sitio activo se encuentra en el interior.

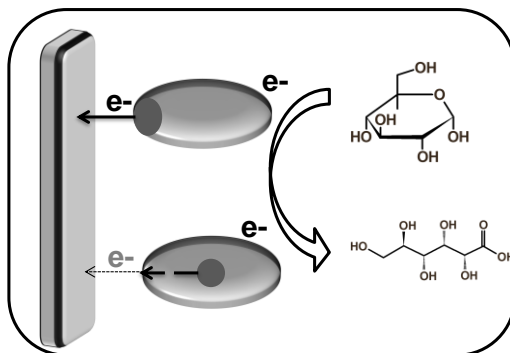


Figura 42. Transferencia de los electrones generados por la oxidación de la glucosa a partir de la enzima con la intervención del mediador para transferirlos al electrodo.

Una de las estrategias más investigadas para facilitar la transferencia de los electrones de GOx al electrodo es utilizar nanotubos de carbono (NTC). Los NTC consisten en láminas de grafeno enrolladas con forma cilíndrica con un tamaño de micrometros de longitud y más de 100 nm de diámetro. Por sus singulares propiedades mecánicas, eléctricas, térmicas y biocompatibilidad suelen utilizarse principalmente para la fabricación de biosensores y en menor medida las bioceldas de combustible (Pumera et al., 2007).

6.6 Caracterización electroquímica de GOx/NTCMP-GA

Para facilitar la transferencia de electrones se utilizaron los nanotubos de carbono de multipared (NTCMP) (Fama et al., 2011). Se evaluaron dos tipos de NTCMP; sin *i* y con tratamiento ácido *ii*. La diferencia radicaba que con tratamiento ácido se removía una mayor cantidad de hierro fijado en los NTCMP, ya que esté pudiera facilitar o no la dispersión y la transferencia de electrones. La cantidad de hierro dispuesta en los NTCMP se determinó por espectrometría de fluorescencia de rayos X.

En la Figura 43 se muestra las VCs comparativas entre los electrodos preparados con GOx/NTCMP-GA *i* y *ii* fijados con GA al 0.2 %. Los potenciales de los picos de oxidación y reducción se aprecian a -0.432 V y -0.505 V respectivamente para *ii*, mientras que *i* se encontraron desplazados a -0.368 V y -0.469 V y con una menor densidad de corriente. Por lo que se decidió utilizar los

NTCMP con el tratamiento ácido. Además, se decidió aumentar la concentración de GA a 1 % debido a que se observó desprendimiento de los NTCMP.

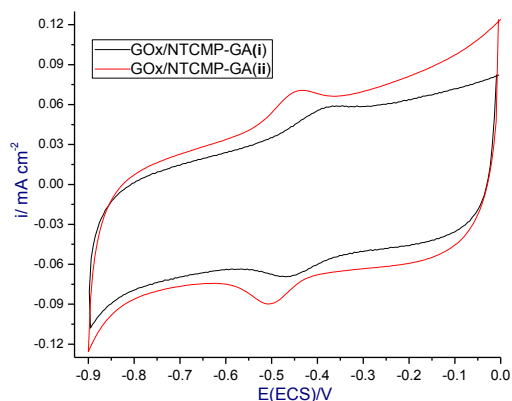


Figura 43. VCs comparativa entre los sistemas GOx/NTCMP-GA sin limpieza ácida *i* y con limpieza ácida GOx/NTCMP-GA *ii*.

Con el nuevo sistema evaluado (GOx/CNTMP-GA) con GA 1 % no se observó una diferencia significativa en el potencial de los picos redox FAD/FADH₂ (Figura 44), mostrando una ΔE_p de 70 mV a 50 mV s⁻¹ siendo un proceso cuasi-reversible y con un $E^{0'}$ de 0.47 V (vs. ECS) para un pH 7 a 25.8 °C (Wu et al., 2011). Estos valores sugieren una transferencia directa de electrones entre GOx/NTCMP-GA sobre el electrodo (Gao y Zheng, 2009).

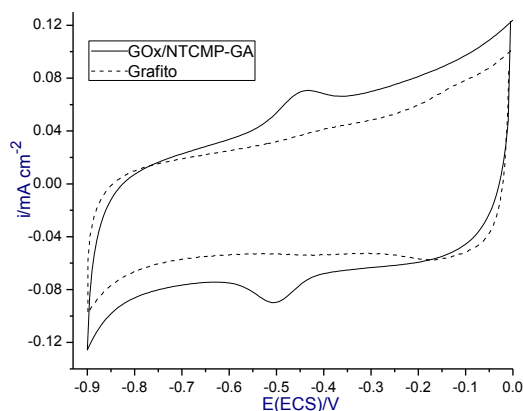


Figura 44. VC del sistema GOx/NTCMP-GA al 1 % en BF pH 7 y 50 mV s⁻¹.

Debido a que los NTCMP conectan con el centro activo de GOx a la superficie del electrodo se consiguió superar la distancia crucial de 19 Å para llevar a cabo la TDE (Figura 45). Asimismo, la velocidad de transferencia del

electrón del sitio activo es mayor a la velocidad de la fase catalítica por lo que el proceso depende directamente de la reacción enzimática en función de la velocidad de la reacción, viéndose reflejado con el aumento de la corriente (Varfolomeev y Kurochkin, 1996).

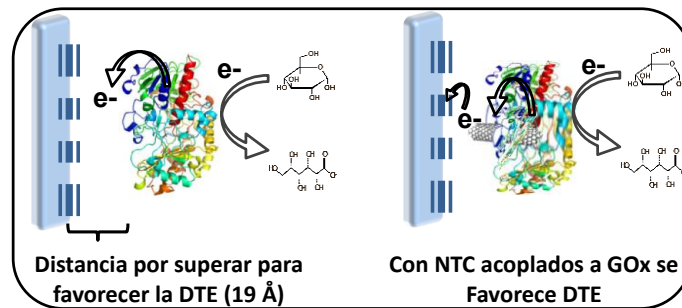


Figura 45. Transferencia de electrones ineficiente del centro catalítico de la enzima al electrodo (izquierda); implementación de los NTC para facilitar la transferencia de los electrones.

6.6.1 Cálculo de la densidad del área electroactiva de GOx/NTCMP-GA (1%)

Se calculó la densidad de GOx inmovilizada en estos electrodos siendo de $2.15 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$. Comparado con otros resultados publicados para GOx por ejemplo sobre carbón vítreo y NTC con valores de $2.35 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$; sobre NTC y nafión® de $5.93 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$; y GOx sobre NTC en nanopartículas de ZnO de $6.49 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$, pero con un método más complejo al nuestro (Hu et al., 211).

6.6.2 Evaluación del sistema GOx/NTCMP-GA (1%) a diferentes velocidades de barrido

Se estudió el sistema de GOx/NTCMP-GA bajo diferentes velocidades de barrido de 20 a 200 mV s^{-1} (Figura 46-A) encontrando un incremento lineal en los picos máximos anódicos (ecuación de ajuste $y = 0.00142x - 0.00687$, $r^2 = 0.9989$) y catódicos (ecuación de ajuste $y = 0.00151x + 0.00301$, $r^2 = 0.9998$) (Figura 46-B), indicando que el proceso de transferencia de los electrones es promovido por GOx/NTCMP-GA sobre el grafito por un proceso electroquímico y no por difusión (Feng y Ji, 2011). La separación de los picos a los diferentes velocidades de 20,

40, 60, 80, 100, 150 y 200 mV s^{-1} fue de 50, 64, 75, 84, 84, 90 y 99 mV respectivamente, indicando que la GOx adsorbida sobre los NTCMP es un proceso cuasi-reversible.

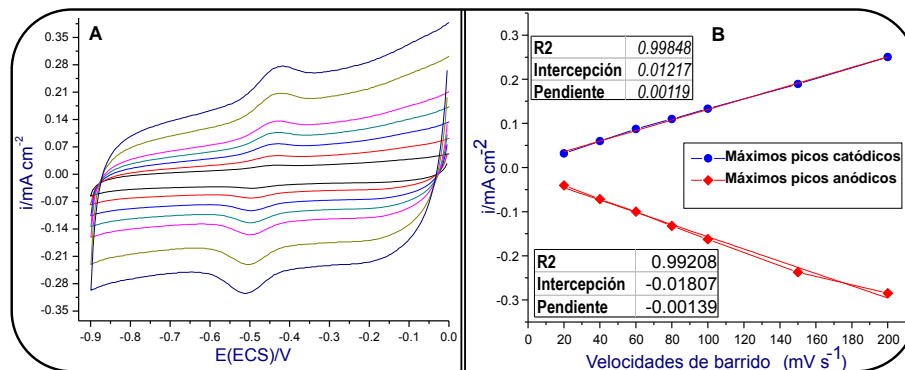


Figura 46. Velocidades de barrido del electrodo GOx/NTCMP-GA de 20 a 200 mV s^{-1} (A) y picos máximos catódicos y anódicos con respecto a la velocidad de barrido (B).

Con esta información fue calculada la K_s acorde al modelo de Laviron para procesos controlados en la superficie, considerando un coeficiente de transferencia de carga de 0.5 el valor de K_s fue de 1.011 s^{-1} , similar a lo reportado por otros autores (Feng y Ji, 2011; Hu et al., 2011) indicando que nuestra propuesta de utilizar NTCMP benefició la TDE de GOx al electrodo.

6.6.3 Efecto de GOx/NTCMP-GA a diferentes pH

El cambio de pH juega un papel importante sobre la enzima provocando su inhibición catalítica, desnaturalización o incrementa su actividad sobre el sustrato. Además, la posible transferencia de dos portones y electrones de FAD es dependiente al pH (Wong et al., 2008). Por ello, se estudió el efecto del pH sobre GOx/NCTMP-GA utilizando varias soluciones amortiguadoras de 4 a 9 en ausencia de oxígeno. En el voltamperograma (Figura 47-A) se observa un desplazamiento a potenciales más negativos de los picos de oxidación y reducción (FAD/FADH_2) con una diferencia de $0.054 \pm 5 \times 10^{-3} \text{ V}$. Al graficar el pH vs. E° (Figura 47-B) sigue una tendencia lineal ($R^2= 0.9992$) con una pendiente de -55 mV pH^{-1} siendo un valor muy cercano al teórico de -58.6 mV pH^{-1} a $22 \text{ }^\circ\text{C}$ para

sistemas reversibles, esto indica que dos protones y dos electrones están comprometidos en la TDE en la reacción electroquímica de GOx/NTCMP-GA inmovilizados sobre el grafito, descrito en la siguiente reacción (1) (Wang et al., 2009).

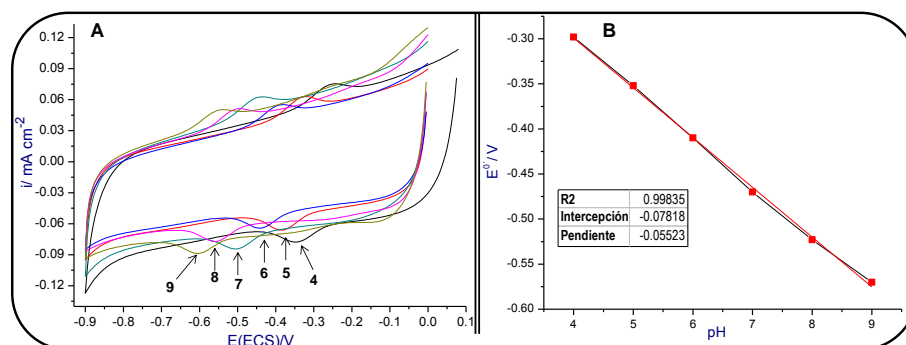
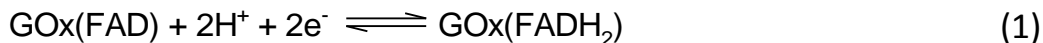


Figura 47. VCs comparativas de GOx/NTCMP-GA a pH 4, 5, 6, 7, 8 y 9 (A) y relación lineal del pH vs $E^{\circ'}$ (B).

Para corroborar la presencia de GOx inmovilizada sobre el grafito se utilizó la espectrofotometría de infra rojo (FT-IR), realizando un análisis comparativo de la GOx de forma pura y en la placa de grafito modificada con GOx/NTCMP-GA. En la Figura 48 se observa una similitud de los principales grupos funcionales detectados para GOx y GOx/NTCMP-GA; alrededor de 3284 cm^{-1} , 2880 cm^{-1} , 2163 cm^{-1} pertenece a los enlaces de tipo hidrogeno con $-\text{OH}$, $-\text{NH}$, $-\text{CH}$ y $-\text{SH}$ respetivamente, característicos de los diferentes aminoácidos que conforman a GOx. Se realizó una acotación del espectrograma entre 1750 y 900 cm^{-1} donde se encuentran dos principales picos característicos de absorción para GOx en 1610 y 1537 cm^{-1} de las aminas I y II. La señal a 1610 cm^{-1} es causada por los enlaces de tipo $\text{C}=\text{O}$ de las uniones peptídicos del esqueleto de la proteína y el del 1537 cm^{-1} resulta de una combinación del enlace N-H de las flexiones en el plano y del estiramiento de C-N de los grupos peptídicos (Haouz et al., 1998; Herec et al., 2008). Por la alta similitud en ambos análisis IR se pudo corroborar la presencia de GOx inmovilizada en la superficie del grafito.

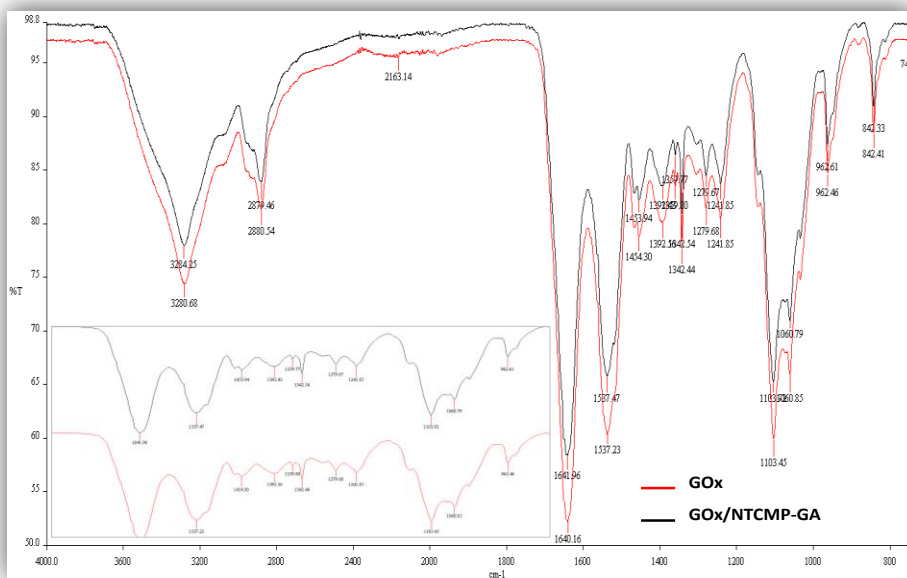


Figura 48. Análisis FT-IR comparativo de GOx puro (línea roja) y GOx/NTCMP-GA (línea negra).

GOx al interactuar con el GA no hay cambios o modificaciones en la estructura, por lo que su interacción es de tipo superficial, a diferencia que con los NTC. La GOx con carga negativa, por tener en su periferia aminoácidos como la lisina, al interactuar con los NTC con la enzima, esta se pliega envolviendo al NTC sin modificar el sitio activo y de esta manera funge como un tipo cable comunicando a GOx y la superficie de electrodo. Por IR y UV-VIS se puede observar cambios en la absorbancia por IR en la región del la amina I (Zhao et al., 2010).

6.6.4 Estabilidad de electrodo GOx/NTCMP-GA por voltamperometría cíclica

Uno de los métodos utilizados para evaluar la estabilidad del electrodo GOx/NTCMP-GA fue realizándole 100 ciclos a una ventana de potencial de -0.9 a 0 V, con una velocidad de barrido de 50 mV s^{-1} en BF. Comparando la señal de reducción del ciclo 2 con el 50 se encontró una disminución en la corriente de $6.1 \mu\text{A cm}^{-2}$ (33.3 %), y del ciclo 50 al 100 fue solamente de $1.5 \mu\text{A cm}^{-2}$ (12.3 %), siendo diferencias en el rango de los microamperios, por lo que podemos concluir que bajo este esquema de inmovilización GOx se mantiene estable (Figura 49).

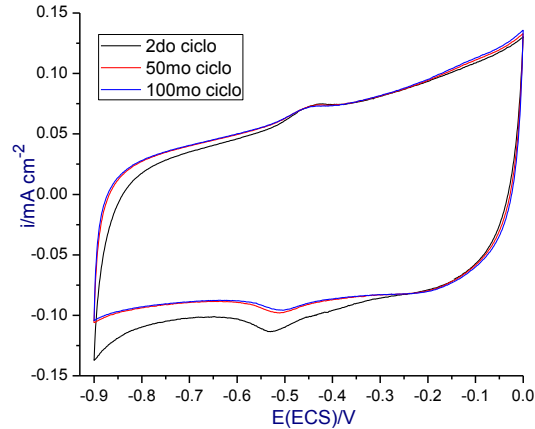


Figura 49. Prueba de estabilidad de GOx/NTCMP-GA comparando el 2do, 50mo y 100mo ciclo.

6.6.5 Rendimiento del bioánodo GOx/NTCMP-GA en una BCH- μ F

Establecido los estudios en media celda, se prosiguió en evaluar el bioánodo GOx/NTCMP-GA en una celda completa híbrida y para ello se utilizó la celda de cuarta generación microfluídica. Se utilizó como anolito una disolución de glucosa 0.1 M en BP nitrogenado y como catolito KOH (0.3 M) saturado con oxígeno gaseoso. En estas condiciones se obtuvo un PCA de tan solo 0.04 V una corriente a una potencia máxima de 0.077 mA cm^{-2} y una potencia de $1.45 \text{ } \mu\text{W cm}^{-2}$. Como se obtuvo un desempeño muy bajo de la BCH- μ F se cambió el PPF por otras superficies de carbón como un carbón adhesivo y dos papeles carbón Toray, uno con más perfluoración (1) y otro con menos (2), con el fin de favorecer la conductividad eléctrica.

Utilizando las tres modificaciones en las mismas condiciones experimentales con respecto al PPF se mejoró el resultado. El PCA y la densidad de corriente a la máxima potencia alcanzados fue con el carbón adhesivo, con valores de 0.195 V y 0.17 mA cm^{-2} respectivamente. Mientras que la mejor potencia se obtuvo con el papel Toray (1) y $18 \text{ } \mu\text{W cm}^{-2}$ como se muestran en la Figura 50.

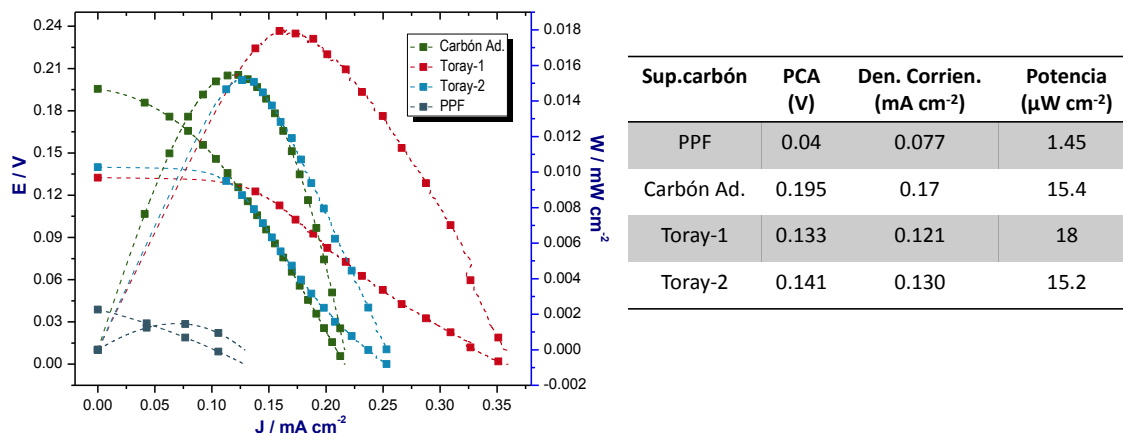


Figura 50. Curvas de polarización comparativas del desempeño del bioánodo GOx/NTCMP-GA en diferentes superficies de carbono.

A pesar de haber mejorado los resultados con el cambio de superficie de carbono, aún no se obtuvieron rendimientos de la BCH-μF comparables con lo reportado en la literatura. Se decidió cambiar la celda en donde los catalizadores se depositaron sobre las paredes, utilizando una celda microfluídica en forma de Y reportada anteriormente por Morales-Acosta et al (2010). Las condiciones experimentales fueron las mismas con respecto a la celda anterior.

En la primera evaluación de la BCH-μF a un flujo de 25 μL min⁻¹ y con la disolución de glucosa (10 mM) nitrogenada se logró obtener un PCA de 1.2 V con una densidad de corriente de 0.3 mA cm⁻² y una alta potencia de 200 μW cm⁻² (1.4 V) sin observar una caída drástica en el potencial. La explicación de esta mejora en los parámetros es por operar en sus óptimas condiciones de fluidos. Posteriormente, se evaluó la BCH-μF saturando la disolución de glucosa en oxígeno obteniendo una ligera disminución de PCA a 1.16 V y en la densidad de corriente a 0.2 mA cm⁻² (Figura 51). La potencia es la que más se vio afectada disminuyendo en 145 μW cm⁻² (0.95 V), debido a que el oxígeno parasita la forma reducida del FADH₂ produciendo peróxido de hidrógeno sin ganancia de electrones (Mano et al., 2003; Szot et al., 2013).

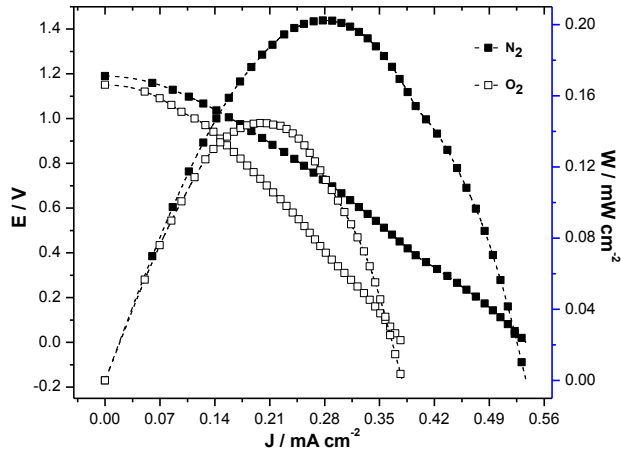


Figura 51. Curvas de polarización comparativas del desempeño del bioánodo GOx/NTCMP-GA en presencia y ausencia de oxígeno en una BCH- μ F en forma de "Y".

Después de cuatro días se volvió a evaluar la BCH- μ F con las condiciones de operación óptimas y utilizando la disolución de glucosa saturada en oxígeno. Se obtuvo un PCA de 0.93 V con una densidad de corriente de 0.13 mA cm⁻² y una potencia máxima de 77 μ W cm⁻² equivalente a 46.6 % menos que en la primera evaluación. Finalmente, en la BCH- μ F se utilizó un solo fluido consistiendo en glucosa 0.01 M en BF saturado de oxígeno, alcanzando una potencia de 72 μ W cm⁻² a un PCA de 1.06 V y con una densidad de corriente de 0.11 mA cm⁻² similar al anterior experimento con dos fluidos (Figura 52).

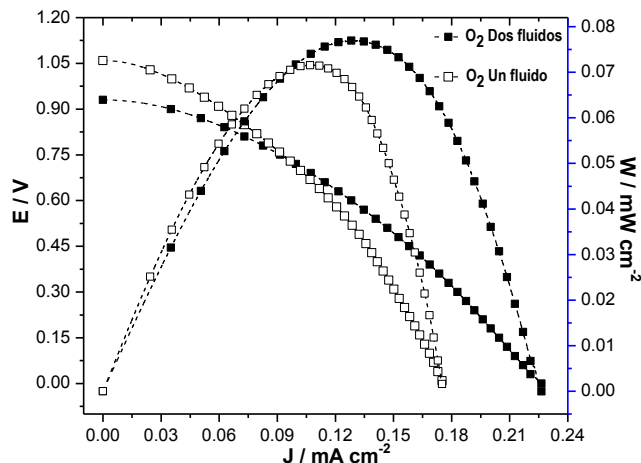


Figura 52. Curvas de polarización comparativas del bioánodo GOx/NTCMP-GA utilizando unos y dos fluidos en la BCH- μ F.

El desempeño del bioánodo en esta BCH- μ F que utiliza la TDE es comparable con lo reportado por otros autores, pero con la ventaja de prescindir de algún tipo membrana, pudiendo ser aplicada en dispositivos biomédicos. Para

acercarnos a este último propósito, se reemplazó la celda por una de tipo air-breathing que consiste en un flujo constante de oxígeno por el cátodo, simulando la circulación continua de este gas en la sangre.

Para utilizar esta celda se realizaron algunas modificaciones a las condiciones de reacción que se habían estado utilizando. El bioánodo se mantuvo constante, GOx/NTCMP-GA, y como anolito se empleó una disolución de glucosa 5 mmol L⁻¹ en BF pH 7 estando en el rango de concentración que se encuentra comúnmente en el cuerpo en un individuo sano, de 3 a 5 mmol L⁻¹ (Zedba et al., 2013). El cátodo se mantuvo constante con la modificación de reemplazar el KOH (0.3 M) por la solución amortiguadora de fosfatos como catolito, con la finalidad de acercarse más a condiciones fisiológicas del ser humano.

Los flujos óptimos encontrados para el anolito y catolito fueron 0.5 y 1.5 mL h⁻¹ respectivamente. El máximo PCA alcanzado para este tipo de celda BCH- μ F air-breathing fue de 0.72 V, con una densidad de corriente de 1.43 mA cm⁻² y una potencia de 610 μ W cm⁻² valores muy por encima en comparación con la celda en forma de "Y", a excepción del PCA, la razón es que el Pt/C en medio básico es más electroactivo que en neutro (Figura 53). Al utilizar un solo fluido el resultado no variaría significativamente.

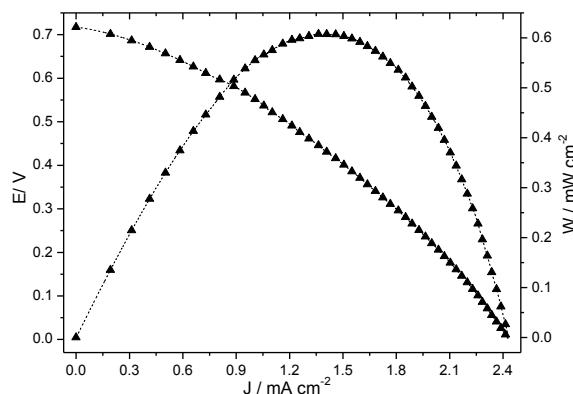


Figura 53. Curva de polarización del bioánodo GOx/NTCMP-GA en una BCH- μ F air-breathing.

La disminución de los rendimientos de ambas BCH- μ F (air-breathing y tipo Y) se debe a que los subproductos de la oxidación de la glucosa pueden atravesar por la interface de ambos flujos y bloquear los sitios activos del cátodo. Además, la

acumulación de H_2O_2 producida por la disolución de glucosa saturada con O_2 pudiera dañar la estructura conformacional y actividad catalítica de GOx (Mano et al., 2013).

El desempeño global conseguido para la BCH- μF tipo “Y” (PCA de 1.2 V; densidad de corriente de 0.3 mA cm^{-2} ; potencia de $200 \mu\text{W cm}^{-2}$) y principalmente de la BCH- μF tipo air-breathing (PCA de 0.71 V; densidad de corriente de 0.3 mA cm^{-2} ; potencia de $200 \mu\text{W cm}^{-2}$) ha sido los valores más altos para bioceldas híbridas microfluídicas sin membrana que utilizan GOx/NTCMP a partir de la transferencia directa de electrones. En la Cuadro 3 se muestran los diferentes tipos de BCH- μF publicados en diferentes artículos que utilizan NTC con GOx en el bioánodo y Pt en el cátodo; algunos utilizan un tipo de mediador, ya sea junto a la GOx o en la disolución, y otros son de tipo PEM.

Se destaca el trabajo por Chena et al (2011) reportaron una potencia de $1600 \mu\text{W cm}^{-2}$ con un procedimiento más complejo y es de tipo PEM limitando su diseño para miniaturización y su aplicación para dispositivos biomédicos. Fischback et al (2012) utilizaron una BCH- μF air-breathing tipo PEM utilizando GOx/NTCMP-GA y Pt/C comparando dos diferentes formas de inmovilización de GOx; por unión covalente (UC) comparado con el recubrimiento de la enzima precipitada: para esta última obtuvieron una potencia de $250 \mu\text{W cm}^{-2}$ (0.18 V) 5 veces más con respecto UC usando una concentración de glucosa de 200 mM y *p*-benzoquinona (BQ) como mediador.

Además de GOx, se ha utilizado otras enzimas en conjunto como el piruvato deshidrogenasa (PDH) y la celobiosa deshidrogenasa (CDH) con un polímero de osmio en el bioánodo y obtuvieron un menor PCA de 0.52 y una potencia de tan solo $135 \mu\text{W cm}^{-2}$ (0.31 V) con respecto a GOx para bioceldas de combustible híbridas (Tasca et al., 2010). Xu y Minteer (2012) reportaron un interesante trabajo de la completa oxidación de la glucosa a CO_2 utilizando seis enzimas diferentes aunque obtuvieron un rendimiento bajo de la celda.

Comparado las bioceldas híbridas con una microcelda abiótica que utilizaron AuAg/C como ánodo y PtAg/C en el cátodo utilizando un fluido simulado fisiológico en KOH 0.3M y 1.8 g L⁻¹ de glucosa saturada en O₂ y un flujo de 400 μL min⁻¹ obtuvieron una potencia de 270 μW cm⁻² ya que ambos catalizadores pudiera haber sido pasivados (Cuevas-Muñiz et al., 2012).

Cuadro 3. Comparación de las eficiencias de diferentes bioceldas de combustible híbridas.

Tipo de transferencia	Bioánodo (anolito)	Cátodo (catodito)	PCA (V)	P _{max} /μWcm ⁻² (Voltaje de operación)	Flujo (μL min ⁻¹)	Tipo de celda	Referencia
Ánodo: MTE Cátodo: abiótico	GOx/NTC-GA (Glu 200 mM)	Pt (air-breathing)	0.33	120 (0.1 V)	68	PEM	Fischback et al., (2006)
Ánodo: MTE Cátodo: abiótico	GOx/NTC-NF (Glu 100 mM/BQ 10 mM)	Pt-wire (O ₂ gas)	0.57	77 (0.51 V)	1 x 10 ⁵ (cathode)	PEM	Zhao et al., (2009)
Ánodo: MTE Cátodo: abiótico	GOx/NTCMP-CS (Glu 3.8 M/FCHP)	Pt (difusión con gas)	0.32	16 (0.2 V)	N.A	PEM	Buckner et al., (2010)
Ánodo: MTE Cátodo: abiótico	GOx/Au-CS/DA (Glu 100 mM/BQ 4 mM)	Ácido KMnO ₄	1.09	1600 (0.55 V)	N.E	PEM	Chena et al., (2011)
Ánodo: MTE Cátodo: abiótico	GOx-SF/NTC-Fc-GA (Glu 70 mM)	Pt-carbón (acetato buffer O ₂ depurado)	0.48	50.7 (0.15 V)	N.E	PEM	Lia et al., (2012)
Ánodo: TDE Cátodo: abiótico	GOx/NTC-GA (Glu 200 mM)	Pt-carbón (difusión de gas 200 mM)	N.E	180	N.E	PEM	Dudzik et al., (2013)
Ánodo: MTE Cátodo: abiótico	GOx/NTC-GA (Glu 200 mM/ 10 mM BQ)	Pt (air-breathing)	0.51	250 (0.18)	N.A	PEM	Fischback et al., (2012)
Ánodo: MTE Cátodo: abiótico	PDH/CDH-PEGDGE/CN T(Os polímero (15 mM)	Pt black (BFS O ₂ depurado)	0.52	135 (0.31 V)	N.E	Sin membrana	Tasca et al., (2010)
Anode: TDE Cathode: Abiotic	GOx/NTCMP-GA (Glu 10 mM)	Pt (KOH 0.3 M O ₂ purging)	1.2	200 (1.4 V)	25	Sin membrana microfluidica	Este trabajo
Ánodo: TDE Cátodo: abiótico	GOx/NTCMP-GA (Glu 10 mM)	Pt (air-breathing)	0.72	610 (0.7 V)	8.33	Sin membrana microfluidica	Este trabajo

NF: Nafion; BQ: *p*-benzoquinona; PEGDGE: poli(ethilenglicol) diglucidileter; CS: quitosan; Glu: glucosa; N.A: no aplicable; N.E: no específica; DA: dopamina; SF: superficie de seda; Fc: ferrocencarboxaldehído; FCHP: ferroceniumhexafluorofosfato

El rendimiento de las microceldas obtenidas no es lo más adecuado para ser utilizados como sustituto de baterías en aparatos electrónicos que requieren de 20 a 240 V y entre 1 y 3.25 A, pero si en dispositivos que puedan ser implantables dentro del cuerpo humano que requieren una menor cantidad de energía; un marcapasos demanda entre 5-10 μW una célula requiere un potencial de activación de 60 mV y una fibra nerviosa de 90 mV (Dermer, 2006). Ambos resultados obtenidos en el presente trabajo son alentadores para posteriores estudios simulando condiciones más cercanas a las del cuerpo humano para que en un futuro cercano puedan ser evaluadas dentro de un organismo vivo.

Para posicionar nuestro resultado dentro de lo ya reportado para bioceldas implantables nos dimos a la tarea de proporcionar información acerca de los dispositivos que ya se han implantado. Se ha investigado el uso de materiales abióticos para dispositivos implantables. El primer reporte que se tiene sobre celdas de combustible que utilizan glucosa como combustible fue en 1970 implantada en un perro, generando una potencia estable en $2.2 \mu\text{W cm}^{-2}$ con un PCA de 0.5 V (Drake et al., 1970) y tres años más tarde se reportó otra celda implantada en la vena de una oveja que delibero $40 \mu\text{W cm}^{-2}$ pero decreció rápidamente en el margen de una hora (Giner et al., 1973). Su bajo rendimiento de la celda y activación del sistema inflamatorio del organismo redujo su investigación. Actualmente, se sigue estudiando catalizadores selectivos para la oxidación de glucosa y reducción de oxígeno como el PtCu que puedan ser utilizados en marcapasos (Kloke et al., 2012).

Por otro lado, existen investigaciones en bioceldas de combustible enzimáticas que han sido implantadas dentro de un organismo vivo. Miyake et al (2011) consiguieron introducir un bioánodo como aguja dentro de la vena en una oreja de un conejo, mientras que el biocátodo air-breathing fue externo. No obstante, su aplicación se limita a un tipo de dispositivo intradérmico y no para su implantación total. El grupo de trabajo de Crespilho (Sales et al., 2013) implantaron en la vena yugular de una rata una biocelda híbrida que consistió en un bioánodo de GOx y cátodo nanopartículas de Pt obteniendo una potencia de 95

$\mu\text{W cm}^{-2}$. Kats et al (2013) depositaron los bioelectrodos en el tejido dentro la cavidad de una rata. Cosnier et al (2013) consiguieron implantar dentro de una rata un dispositivo biocompatible de Dacron® dentro del espacio retroperitoneal de una rata y el monitoreo fue por la conexión de dos cables que salían del cuello de la rata. Este dispositivo generó un PCA entre 0.51 y 0.66 V, con una densidad de corriente entre $150 \mu\text{A cm}^{-2}$ y produciendo 9.3×10^{-3} J. Un LED, con un consumo de 1.31×10^{-3} y un termómetro digital pudieron ser conectados a la parte terminal del cuello del mamífero y hacerlos funcionar por un lapso de tiempo (Zedba et al., 2013), tres años atrás ya habían reportado resultados preliminares de sus primeros estudios de dispositivos implantables en ratas (Cinquin et al., 2010).

Otros estudios han utilizado algún tipo de dispositivo implantable en organismos vivos que como en una cucaracha (Rasmussen et al., 2012), una almeja (Szczipak et al., 2012), un caracol (Halámková et al., 2012), una langosta (MacVittie et al., 2013) utilizando principalmente como enzima de glucosa oxidasa en el bioánodo y bilirrubina oxidasa en el biocátodo (Cosnier et al., 2014).

6.6.6 Combustible utilizado por las BCH- μF en forma de “Y” y air-breathing

Finalmente, se calculó el combustible utilizado (FU) en las BCH- μF en un solo paso, que es definido como la corriente de salida dividido por el flujo del reactante al entrar al canal descrito en la ecuación 4:

$$FU = \frac{I}{nFCQ} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde n es el número de electrones intercambiados, F la constante de Faraday y C la concentración del combustible en la entrada del canal. Se calculó un FU de 0.3 % utilizando un flujo bajo de $25 \mu\text{L min}^{-1}$ para la BCH- μF en forma de “Y” mientras que en la air-breathing se obtuvo un buen aprovechamiento de 1.81 % a un flujo de $8.33 \mu\text{L min}^{-1}$, se ha estimado que en microceldas el FU es alrededor de 1 %. Zedba et al., (2011) realizaron un estudio del FU en función de la velocidad del flujo de 100 a $1000 \mu\text{L min}^{-1}$ obteniendo el valor más alto de FU de 0.2 % a una concentración de 10 mM a $100 \mu\text{L min}^{-1}$.

El método de inmovilización con la GOx/NTCMP-GA utilizado hasta el momento nos proporcionó un muy buen resultado y prometedor para bioceldas de combustible híbridas con el potencial de poder ser implantables dentro de un organismo. No obstante, al igual que los reportados por otros autores, disminuyó el rendimiento global de la BCH- μ F, además de ser un método poco específico para retener a la enzima. Por ello, se decidió evaluar otras formas de inmovilización para compararlas y poder establecer con mayor claridad, cuál nos proporciona un mayor desempeño, tiempo de vida útil y estabilidad para BCH- μ F.

6.7 Inmovilización de GOx sobre una estructura de oro

Otra de las formas utilizadas para facilitar la TDE, además de utilizar los nanotubos de carbono, es incorporar materiales conductores junto con la enzima como el Pt, Cu, Au, Ag, Os, Ru, entre otros; ya sea como nanopartículas dentro del sistema o como soporte (Hinterwirth et al., 2012). Para este trabajo se utilizó como soporte una superficie de oro electrosintetizada.

6.7.1 Electrosíntesis de la estructura de oro

Para la electrosíntesis de la superficie de oro sobre grafito se tomó como referencia el artículo publicado por Arjona et al (2012) donde consiguieron diferentes estructuras de oro, dependiendo de la técnica electroquímica implementada, sobre carbón vítreo. Brevemente, la metodología a seguir fue utilizar una disolución 4 mM de la sal ácida de oro ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) en 0.1 M de ácido perclórico, posteriormente se sumergió el electrodo de grafito previamente modificado en la solución de Au. Posteriormente, fue utilizada la técnica de voltametría cíclica a una ventana de potencia de -0.1 a 1.3 V (vs. ECS) a 0.1 V s^{-1} para 20 ciclos. Ellos reportan una estructura homogénea en forma de flechas.

El aspecto físico de la placa fue una superficie homogénea de color característico del oro. Se prosiguió en realizar el perfil en ácido sulfúrico 0.5 M a la

estructura de oro observando en el área de oxidación un pico notorio en 0.77 V y dos superpuestos entre 0.9 y 0.95 V. El primero se debe a una fuerte electroadsorción de iones hidroxilo; el segundo y tercero a la formación de los óxidos de oro AuO y Au₂O₃ en la superficie (Figura 54). Se calculó el área superficial electroactiva (ASE) de la superficie de oro a partir de la integración del pico de reducción (0.47 V) asociado con la reducción de los óxidos de oro; se consideró el valor teórico de 348 $\mu\text{C cm}^{-2}$ para sistemas policristalinos, consiguiendo un ASE de 2.080 cm^{-2} lo cual es alto para este tipo de sistemas.

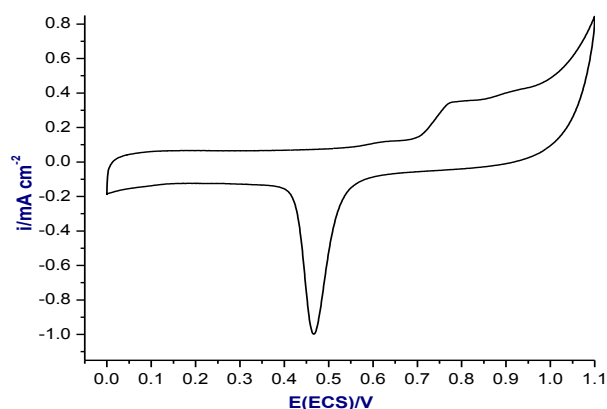


Figura 54. Perfil de la estructura de oro en H₂SO₄ (0.5 M).

En la Figura 55 se muestran imágenes comparativas, entre la placa de oro tomada por una cámara fotográfica, y por microscopía electrónica de barrido (MEB) en ampliaciones de x30,000 y x100,000 pudiendo observar una forma semejante a una flor con tamaños de partícula entre 100 y 400 nm.

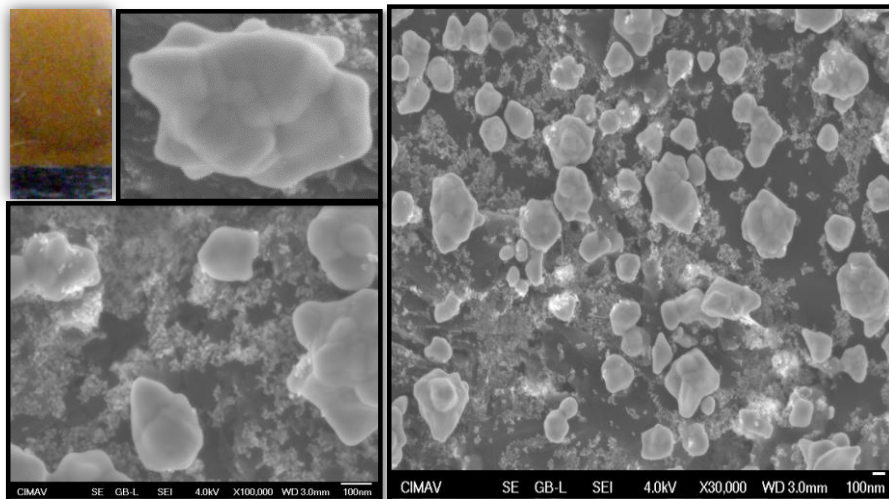
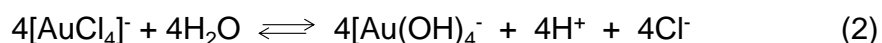


Figura 55. Imágenes de la estructura de oro tomadas por una cámara fotográfica y por MEB.

La forma característica de la estructura por electrosíntesis, sin otro tipo de reactivos como surfactantes o agentes reductores, se encuentra ligado por el pH de la solución, el potencial redox aplicado, el tiempo de exposición y la técnica electroquímica empleada principalmente. La formación de la estructura comienza con la desplazamiento de los cloruros del $[\text{AuCl}_4]^-$ y por hidroxilos quedando la forma final de $[\text{Au}(\text{OH})_4]^-$ como se muestra en la reacción (2). Esta última estructura requiere potenciales más bajos para su reducción que la sal precursora y junto con el tiempo de exposición permite la nucleación y crecimiento del proceso (Wang et al., 2012).



El interés de obtener nuevas formas del oro es para mejorar sus propiedades electrónicas, ópticas, térmicas, catalíticas, mecánicas, superficiales para utilizarlas en aparatos electrónicos, biomédicos, química, biológica, entre otras (Gou y Wang, 2007). Se han reportado la síntesis vía electroquímica de formas de oro como nanobarras (Tu et al., 1997; Dong et al., 2006; Lin et al., 2008), óvalos (Prakash et al., 2009), nanodumbbells (Huang et al., 2006), partículas en forma de flores (Wang et al., 2012), nanopirámides y nanoesferas (Tian et al., 2006), nanocristales (Huang et al., 2005), formación de mesoporos de

oro (Nagaraju y Lakshminarayanan, 2009), nanoestructuras dendríticas (Xu et al., 2010), flor astillada y rehilete (Arjona et al., 2012).

6.7.2 Caracterización electroquímica de GOx-GA y GOx/NTCMP-GA inmovilizados sobre la estructura de oro en forma de flor

La estructura de oro (Au-flor) se utilizó como soporte para evaluar dos diferentes sistemas: GOx-GA y GOx/NTCMP-GA, la concentración del glutaraldehído utilizado fue al 1 %. La preparación de los dos diferentes sistemas fue igual a lo descrito anteriormente en los métodos anteriores, con la variante de utilizar Au como soporte en vez del grafito para mejorar la conductividad de los electrones generados durante la oxidación de la glucosa.

En la Figura 56 se puede observar las VCs comparativas entre el grafito, Au-flor, Au-GOx-GA y Au- GOx/NTCMP-GA en PB pH 7 a 50 mV s^{-1} . El grafito al ser modificado por el Au existe un ligero aumento en su capacitiva. En el VC de Au-GOx-GA se muestran los picos característicos del par redox FAD/FADH₂ en -0.495 y -0.554 V ($\Delta E_p = 59 \text{ mV}$) respectivamente y con una densidad de corriente para el pico anódico (I_{pa}) de $6.6 \mu\text{A cm}^{-2}$ y $8.15 \mu\text{A cm}^{-2}$ del pico catódico (I_{pc}). Para el sistema GOx/NTCMP-GA el par redox su ubicación fue similar al anterior sistema en 0.486 y 0.554 V ($\Delta E_p = 68 \text{ mV}$), y las densidades de corriente del I_{pa} y I_{pc} fueron de 13.5 y $16.9 \mu\text{A cm}^{-2}$ el doble de corriente al utilizar los NTCMP. Además se determinó la Γ para cada sistema a partir del área bajo la curva de FADH₂ encontrando para Au-GOx-GA una densidad de área activa inmovilizada de $6.23 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ y mayor para Au-GOx/NTCMP-GA fue de $1.18 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$. Este resultado indica que al utilizar los NTC aumenta el área electroactiva de GOx.

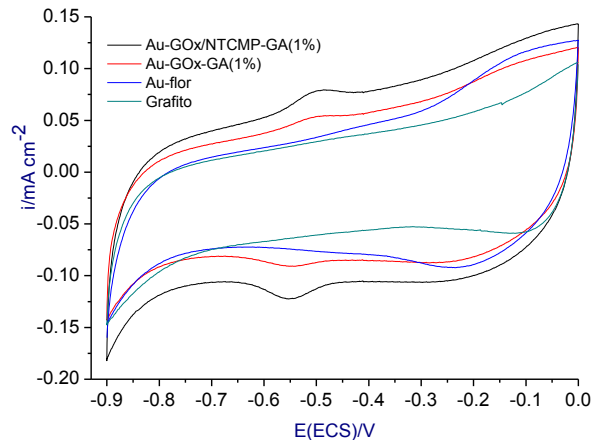


Figura 56. VCs comparativas del grafito, Au-flor, Au-GOx-GA y Au-GOx/NTCMP-GA en PB pH 7 (0.1 M) en 50 mV s^{-1} .

6.7.3 Evaluación de los sistemas Au-GOx-GA y Au-GOx/NTCMP-GA a diferentes velocidades de barrido

Para establecer sí con la implementación de una superficie de oro la transferencia de los electrones se realizó de una forma más eficiente, se calculó el coeficiente de transferencia electrónica (α) y la constante de velocidad de transferencia electrónica (K_s) por medio del modelo de Laviron. A cada sistema se realizaron velocidades de barrido entre 20 y 1000 mV s^{-1} en BF en ausencia de oxígeno.

Se graficó el logaritmo de las velocidades contra los picos máximos anódicos y catódicos para los sistemas Au-GOx-GA y Au-GOx/NTCMP-GA (Figura 57 A y C) respectivamente, y posteriormente los puntos que proporcionan una mejor linealidad se consideraron para el cálculo de los parámetros electrocinéticos α y K_s para cada sistema (Figura 57 B y D).

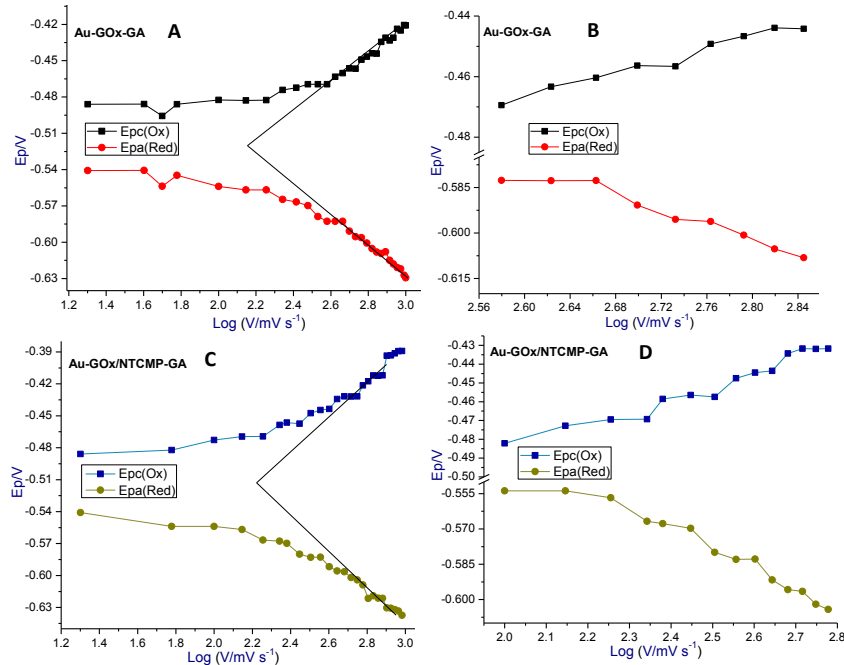


Figura 57. Graficas de los logaritmos de las velocidades con respecto a los picos máximos de oxidación y reducción para los electrodos Au-GOx-GA (A) y Au-GOx/NTCMP-GA (C); selección de los puntos que proporcionan una mejor linealidad de ambos electrodos (B y D).

En el caso de Au-GOx-GA la α fue de 0.3 y el K_s de 1.8 s^{-1} . Mientras que para el sistema Au-GOx/NTCMP-GA que mostró una mejor linealidad la α fue de 4.2 y K_s 2.1 s^{-1} . Éste último indica una buena transferencia electrónica por la presencia conjunta de la superficie de Au y los NTC, con respecto a todos los sistemas que se habían evaluado hasta el momento, mientras que para el electrodo Au-GOx-GA se mejoró considerablemente con respecto a solo utilizar el grafito. Jose et al (2012) calcularon un α de 0.5 y un K_s 1.1 s^{-1} utilizando una fibra de oro y NTC con GOx; Zhao et al (2006) inmovilizando a GOx con nanopartículas de oro en carbón vítreo y cubierto con Nafion[®] obtuvieron una K_s de 1.3 s^{-1} utilizando un α de 0.5.

6.7.4 Evaluación de Au-GOx-GA y Au-GOx/NTCMP-GA en presencia de la D-(+)-glucosa

Se prosiguió en evaluar el efecto de Au-GOx-GA en presencia de glucosa, para ello se realizaron 10 adiciones de 10 μL de glucosa en BF (0.1 M) pH 7 a una

concentración de 10 mM y 10 adiciones de 10 μ L 50 mM analizando el cambio de FAD/FADH₂ por VC y por voltametría de pulso diferencial (VPD) en el rango de la reducción (FADH₂) entre -0.75 y -0.35 V (vs ECS).

Por VC se observó una disminución poco notoria entre cada adición de glucosa (Figura 58 A), mientras que por VPD (Figura 58 B) el cambio es evidente entre 0 y 0.005 mM de glucosa, y en mayor proporción al adicionar los primeros 10 μ L de 50 mM. La última adición de glucosa corresponde a una concentración total de 0.3 mM 10 veces menos a la concentración en el cuerpo humano en ausencia de enfermedades relacionadas con altos o bajos niveles de azúcar como la diabetes (Sales et al., 2013).

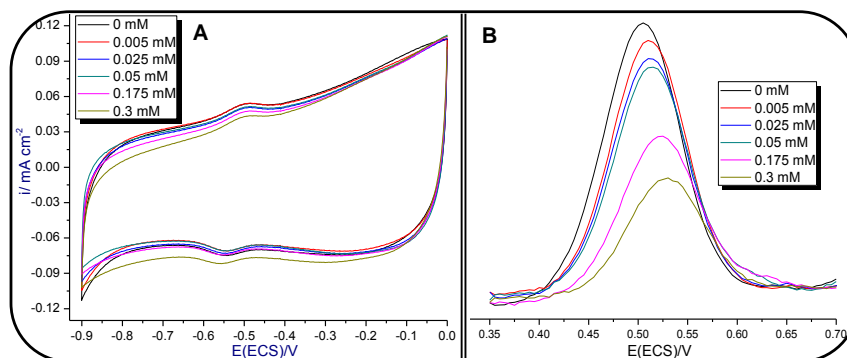


Figura 58. Análisis del electrodo Au-GOx-GA a diferentes concentraciones de glucosa por VC (A) y VPD (B).

Cabe destacar que se pudo cuantificar concentraciones de glucosa muy pequeñas, pudiendo ser útil para la cuantificación de glucosa en lágrimas, una opción estudiada como un método no invasivo, ya que las concentraciones de glucosa son muy bajas, en un promedio entre 0.110 y 0.280 mM para personas saludables (Baca et al., 2003; Taormina et al., 2003).

Para el sistema Au-GOx/NTCMP-GA en la VC se observó la disminución en la corriente del FADH₂ por una reacción competitiva descrita anteriormente, siendo más notoria en las primeras adiciones de glucosa (Figura 59 A). Por otro lado, en la técnica de VPD no es muy evidente una tendencia entre las primeras cinco adiciones de glucosa. Al llegar a una concentración de 0.025 mM hasta 0.3 mM mostró una disminución lineal en el área de reducción de GOx (Figura 59 B).

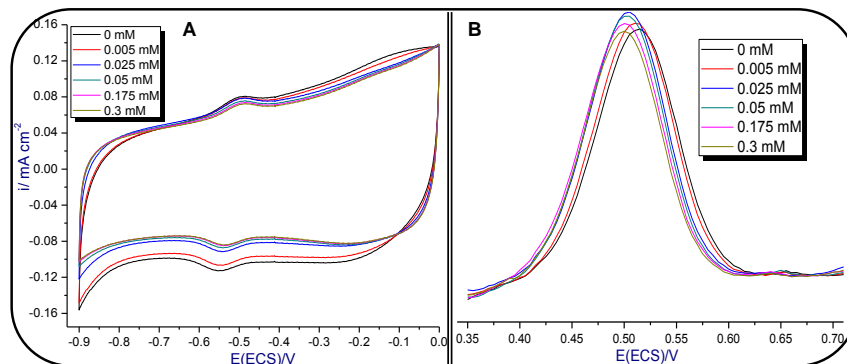


Figura 59. Análisis del electrodo Au-GOx/NTCMP-GA a diferentes concentraciones de glucosa por VC (A) y VPD (B).

Implementando la técnica electroquímica VDP permitió visualizar con mayor claridad el efecto del cofactor reducido de la enzima a concentraciones crecientes de glucosa. Para el sistema Au-GOx-GA se observó con mayor claridad una tendencia lineal a concentraciones crecientes de glucosa mediante VPD en el rango de FADH_2 por tener una interacción más íntima con la glucosa en ausencia de otro material. Este sistema es prometedor para ser evaluado como biosensor.

Por otro lado, con el sistema Au-GOx/NTCMP-GA la disminución de la señal de FADH_2 es menos evidente, ya que los NTCMP permiten una eficiente comunicación entre la enzima y el electrodo de oro por lo que concentraciones pequeñas de glucosa la señal no fue muy notoria hasta 0.025 mM. Aparentemente este último sistema pudiera tener un rango elevado en el límite de cuantificación a concentraciones mayores de glucosa, aunque tiene un mayor potencial para ser utilizado dentro de una biocelda de combustible.

La implementación de una estructura electrosintetizada sobre una superficie de grafito para la inmovilización de GOx auxiliado con el GA (1 %) en los sistemas Au-GOx-GA y Au-GOx/NTCMP-GA mejoró la transferencia de los electrones corroborándolo por el cálculo de α y K_s con el modelo de Laviron, principalmente al utilizar los NTCMP. Además, se pudo establecer un modelo para la cuantificación de glucosa de forma directa sin el requerimiento de algún mediador con perspectivas a utilizarse como biosensor. Asimismo, se pudo

aprovechar de manera eficiente los electrones generados en la oxidación de la glucosa para ser aplicado en bioceldas de combustible.

6.8 Inmovilización covalente de la enzima GOx

Una de las estrategias más empleadas para generar un enlace covalente entre la enzima y la superficie de oro es utilizar una molécula intermediaria con un extremo tiolado que interaccionará directamente con el Au y otro terminal carboxílico u amino para reaccionar con la proteína. De manera convencional, es utilizado un compuesto tiolado ya que tiene una alta afinidad por el oro y su unión es fuerte, además, la superficie de oro es inerte a la oxidación, provee una buena superficie para el tiol sin que haya competencia por otros compuestos adsorbentes y es una excelente estrategia por las diversas modificaciones de la cadena intermedio y terminal del tiol (Srisombat et al, (2011).

8.8.1 Adsorción del ácido 3-mercaptopropionico en la estructura de oro

La estructura de oro en forma de flor fue utilizada como soporte y se dejó reaccionar con una solución de 1mM del ácido 3-mercaptopropionico (AMP) en 4 diferentes disoluciones; a) EtOH (grado reactivo), b) EtOH/H₂O (1:3), c) acetona/H₂O (1:1) y d) EtOH/H₂O (3:1) para establecer cuál favorecía una mayor adsorción del 3-AMP sobre el Au.

En la Figura 60 se observa los perfiles de la estructura de oro modificada entre -1.2 y 0 V (vs ECS) de las diferentes disoluciones de 3-AMP en KOH 0.1 M encontrando en los 4 casos un pico máximo entre -1.03 V (vs ECS) debido a la desorción del enlace Au-S, lo cual nos indicó la presencia del 3-AMP sobre el Au. Después de 5 ciclos aún se observó el pico de desorción del tiol, lo que indicó una buena estabilidad, de lo contrario después del primer ciclo desaparece la señal (Liu et al., 2005). Asimismo, se encontró dos picos entre -0.55 y -0.622 V debido a la adsorción y desorción del compuesto 3-AMP presente en la disolución. Además,

se calculó la cantidad de AMP adsorbida sobre el Au para cada caso utilizando la fórmula $\Gamma = Q/nFA$ donde Q es la carga de la reacción, n el número de electrones transferidos, F la constante de Faraday y A el área de la estructura de oro.

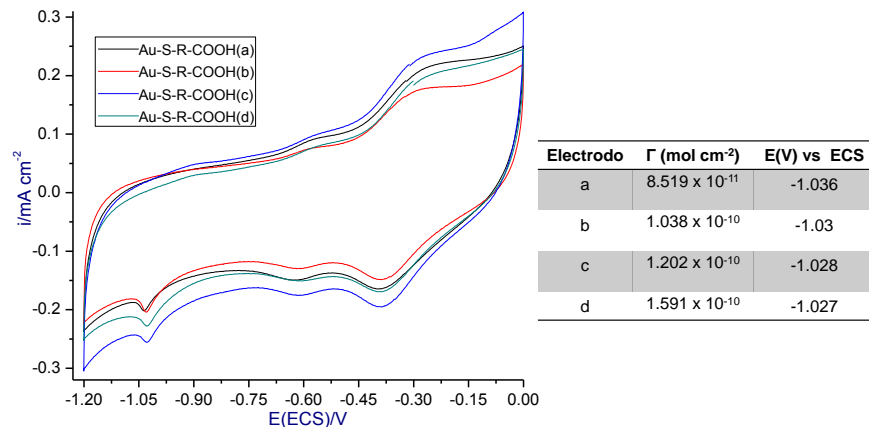


Figura 60. VC comparativos de la adsorción del 3-AMP disuelto en diferentes disolventes; a) EtOH b) EtOH/H₂O (1:3), c) acetona/H₂O (1:1) y d) EtOH/H₂O (3:1). Y tabla comparativa del punto máximo de desorción del tiol y su área de cubrimiento.

Como se puede observar en la tabla de la Figura 60 al utilizar la mezcla de los disolvente EtOH/H₂O a una proporción de 3:1 se obtuvo una Γ de 1.511×10^{-10} mol cm⁻² del 3-AMP, mayor a lo reportado por diferentes autores: Ledesma-García (et al., 2003) de 0.75×10^{-10} mol cm⁻² utilizando el mismo tiol; Mizutani et al (1999) con el mismo tiol consiguieron una densidad de 2×10^{-10} y 7×10^{-10} mol cm⁻²; Mendes et al (2008) evaluaron la adsorción de diferentes tioles, para el 3-AMP reportaron un valor de 2.3×10^{-11} mol cm⁻².

De igual manera, la adsorción del 3-AMP se analizó por FT-IR comparando el electrodo modificado con el tiol y de forma pura (Figura 61). Para el 3-AMP los principales picos de absorción encontrados fueron en 2944 cm⁻¹ típico para enlaces -OH de grupos carboxílicos, el pico pronunciado en 1737 cm⁻² del carbono carboxílico y en 1247 cm⁻² del enlace C-O; la señal en 2660 cm⁻¹ pertenece al enlace C-H de la cadena alifática y 1404 cm⁻² de los metilos asimétricos; en 2570 cm⁻² es la señal más característica del compuesto por ser del enlace S-H (Dongxiang et al., 2007). Mientras que para el electrodo modificado por el compuesto tiolado, se destaca la ausencia de la señal de S-H por la pérdida del protón para su unión con el oro Au-S, los picos de las señales del carbono

carbonílico, C-O, -OH y carbonos alifáticos, son similares con respecto a la descripción del 3-AMP (Ghiaci et al., 2013).

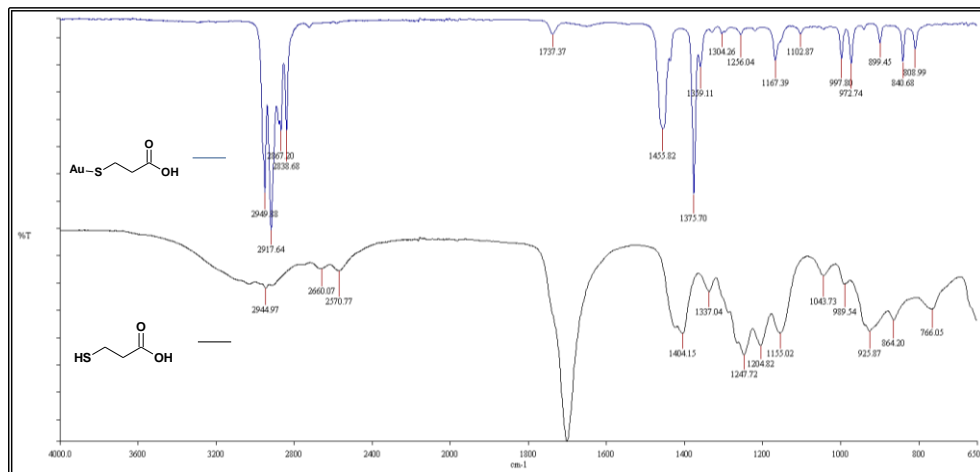


Figura 61. Análisis FT-IR comparativo entre el 3-AMP (línea negra) y adsorbido sobre el oro (línea azul).

Al utilizar una disolución de EtOH/H₂O (3:1) favoreció la desprotonación del 3-AMP beneficiando la cantidad adsorbida sobre el Au, al igual que las condiciones de tiempo y temperatura (Matthiesen et al., 2012). Además, cuando el número de átomos de Au es lo suficientemente grande por la disposición de la estructura del Au, el protón del tiol se remueve más fácilmente y el tiol puede unirse a la superficie del Au (Smit y Hamilton, 2013). En el mismo sentido, el 3-AMP por tener una cadena hidrofílica facilita con mayor rapidez su adsorción (Mazur y Krysinski, (2001).

La forma de la estructura de oro electrosintetizada le confiere una mayor interacción con el tiol por la formación de puentes con el Au contiguo y la cadena del tiol es rígida y pequeña confiriéndole una mayor estabilidad y formación de una monocapa sobre el Au (Ciriaco et al., 2013).

6.8.2 Activación del ácido carboxílico con EDC/NHS y la unión covalente de GOx

De la estructura con una mayor cantidad del tiol adsorbida, se prosiguió con la activación del grupo carboxílico utilizando una mezcla de la carbodimina EDC ((N-3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodimida) y la N-hidroxisuccinamida (NHS) en una relación 3:1 dejándola durante una hora. Posteriormente, se enjuago y se hizo reaccionar con 5 mg mL^{-1} de GOx y después de 24 h se retiró el electrodo y se enjuago con PB para remover la enzima no inmovilizada de forma covalente. Con el grupo carboxílico activado por medio de EDC/NHS y en presencia de alguno de los grupo amino de le enzima, se forma un enlace de tipo amida.

La presencia de la enzima se pudo corroborar mediante la VC del electrodo modificado. Se observó el par de picos de FAD/FADH₂ en -0.469 y -0.527 V (vs ECS) respectivamente, con una buena ΔE_p 58 mV y el $E_p^{0'}$ de 0.498 V a una velocidad de 50 mV s^{-1} en PB pH 7 (Figura 62). La Γ calculada de GOx inmovilizada fue de $2.71 \times 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$. Cabe destacar el haber conseguido identificar la señal de GOx de forma directa sobre el electrodo, ya que el tamaño del compuesto tiolado puede interferir con la transferencia de los electrones, sobre todo si separa a más de 19 Å de distancia la GOx del electrodo.

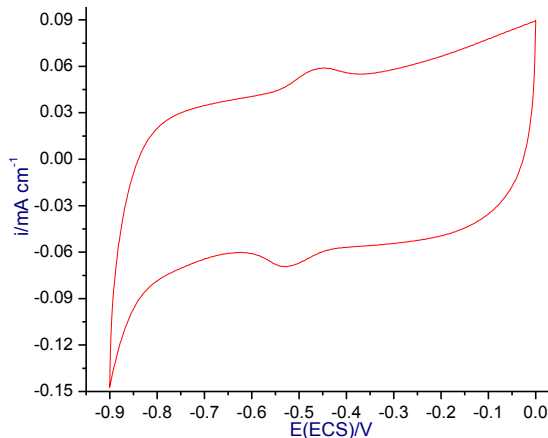


Figura 62. VC de GOx inmovilizado covalentemente sobre una superficie de oro modificada con tiol 3-AMP.

El grupo de trabajo de Miscoria et al (2006) reportaron una alta concentración de GOx inmovilizada de 9.46×10^{-11} mol cm^{-2} de varias capas de GOx con nafion y quitosan con 3-AMP. Mizuntani et al (1999) utilizando el mismo tiol consiguieron cantidades de GOx inmovilizada de 3×10^{-13} mol cm^{-2} con una interacción directa entre el 3-AMP y GOx y de 5×10^{-13} mol cm^{-2} utilizando poli-L-lisina. Vesali-Naseh et al (2013) reportaron una densidad de 1.87×10^{-10} mol cm^{-2} utilizando un tiol de cadena larga; Losic et al (2002) calcularon por medio de STM (siglas en inglés scanning tunneling microscopy) 1.92×10^{-12} mol cm^{-2} de GOx; Willner et al (1996) utilizando otra estrategia de unión covalente con pirrolquinolina quinona y N^{ϵ} -2-aminoetileno consiguieron una densidad de GOx inmovilizada de 1.7×10^{-12} mol cm^{-2} .

Las modificaciones de la superficie del electrodo fue analizada utilizando dos estrategias para cada uno de las modificaciones realizadas; en la primera se utilizó la VC a un rango de -0.9 a 0 V (vs ECS) en BF pH 7 donde teóricamente se encuentra el potencial de FAD/FADH². El voltamperograma muestra un aumento en la capacitiva del grafito modificado por la estructura del Au y del tiol adsorbido. Al ser modificado con GOx se observó los picos redox de FAD pero la capacitiva disminuye, pudiera deberse a una transferencia eficiente de los electrones (Figura 63 A). La segunda estrategia consistió en medir por VC cada modificación del electrodo a una ventana de potencial entre 0 y 1.1 V en PB pH 7 donde se encuentra la reducción del oro (Gooding et al., 1998). Al comparar cada VC del electrodo modificado muestra una disminución en el pico de reducción del oro debido a la ocupación de la superficie por el AMP y la GOx (Figura 63 B).

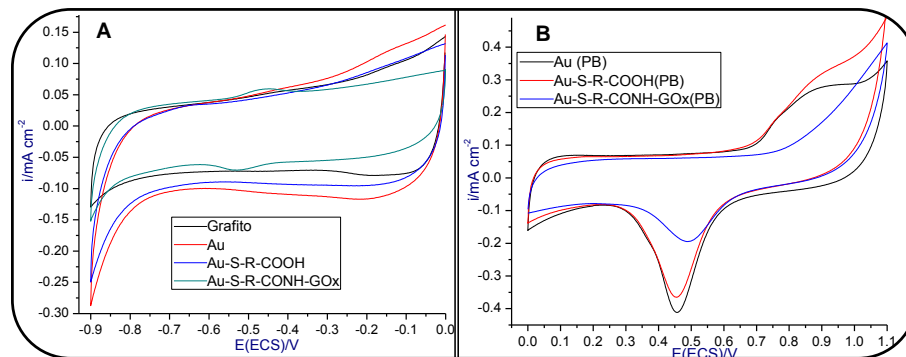


Figura 63. VC comparativo del electrodo de grafito modificado en una ventana de potencial de -0.9 a 0 V (A) y de 0 a 1.1 V en BF pH 7 a 50 mV s^{-1} .

El mecanismo de reacción propuesto del cómo se consiguió el enlace covalente tipo amida entre el grupo carboxilo del 3-AMP y GOx consta de tres etapas (Yang, 2012): en la primera etapa, el par de electrones libres del hidroxilo del ácido carboxílico del 3-AMP **1** atacan al carbón de la EDC **3** deslocalizando el enlace del nitrógeno de cadena alifática más corta, produciendo un intermediario en donde el nitrógeno de carga negativa remueve un protón del oxígeno estabilizando su carga para formar la molécula precursora **4** (sulfanilacetil-N'-[3-(dimetilamino)propil]-N-etilcarbodiimato) de la reacción. En la segunda etapa, el oxígeno del hidroxilo de la NHS **5** realiza un ataque nucleofílico al carbono carbonilo de **4** deslocalizando un par de electrones del oxígeno, al regenerar el enlace carbonílico promueve la salida del éster, derivado de la carbodiimida. Éste último recupera el protón para neutralizar cargas, quedando los compuestos **6** (1-[sulfanilacetil]oxi]pirrolidina-2,5-diona) y **7** (ácido N'-[3-(dimetilamino)propil]-N-etilcarbodiimídico) (Figura 64).

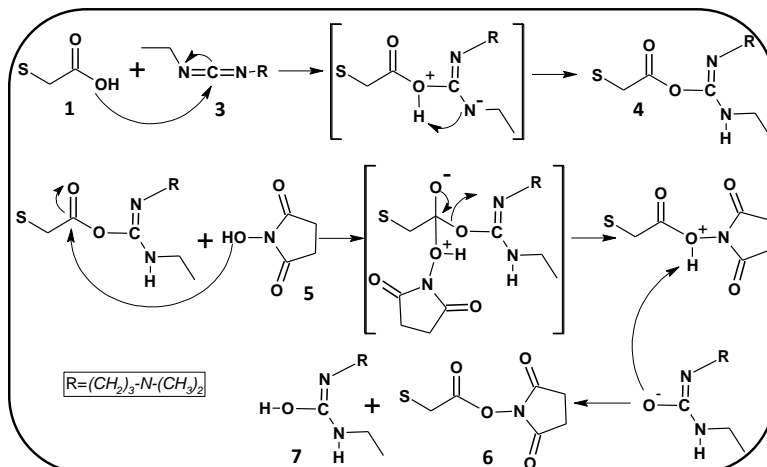


Figura 64. Mecanismo de reacción entre el 3-AMP para la formación del éster derivado de NHS.

La estrategia de utilizar la NHS es para formar el éster **6** más estable y reactivo que el de la EDC **4** ya que este último es muy propenso a sufrir hidrolisis permitiendo la regeneración del compuesto carbonilo del 3-AMP reduciendo directamente los sitios de unión disponibles para la GOx (Figura 65) (O'Shannessy et al., 1992).

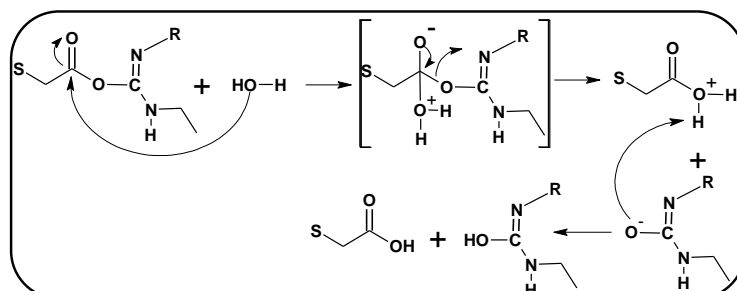


Figura 65. Hidrolisis del éster derivado de la carbodiimida EDC.

En la tercera etapa, uno de los grupos amino de la enzima realiza un ataque nucleofílico al éster **6** formando un intermediario donde se regenera el enlace del oxígeno del compuesto carboxílico promoviendo el rompimiento del enlace del anillo derivado de la pirrolidina, que a su vez recuperará un protón para neutralizar su carga y regenerar la NHS, finalmente queda formado un enlace tipo amida entre GOx y el tiol **8** (Figura 66).

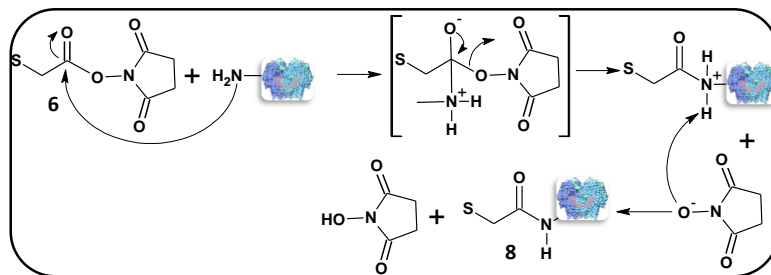


Figura 66. Ataque nucleofílico de GOx para la formación del enlace tipo amida con el tío adsorbido sobre la estructura de Au.

El grupo amino de los aminoácidos de GOx más disponibles para reaccionar con **6** son los de naturaleza hidrofílica principalmente la lisina, ya que se encuentra más expuesta, en menor medida la arginina por tener una cadena unida la amino más corta, el resto de los aminoácidos no se encuentra expuesto por su naturaleza hidrofóbica (Wu et al., 2004; Riter et al., 2013).

El enlace covalente entre la enzima y el grupo carbonilo del 3-AMP puede comprometer uno o más cadenas del tiol orientando la enzima perpendicular o paralelo al plano (Figura 67). Este último es más estable, al igual que una acumulación de GOx dentro de un grupo con respecto a un doble enlace de GOx con el tiol (Guiomar et al., 1999; Losic et al., 2002).

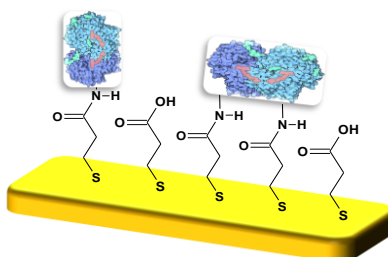


Figura 67. GOx formando uno y dos enlaces covalentes con el tiol adsorbido en el Au.

6.8.3 Evaluación del electrodo Au-S-(CH₂)₂-CO-NHGOx a diferentes velocidades de barrido

Con la disminución de la capacitiva del electrodo al incorporar la enzima, dio indicios de una buena transferencia electrónica, para corroborarlo se utilizó el

modelo de Laviron sometiendo el electrodo a diferentes velocidades de barrido de 20 a 1000 mV s^{-1} con aumento de 40 mV s^{-1} (Figura 68). Se calculó una α de 0.44 cercana al 0.5 idóneo para sistemas cuasi reversibles y una K_s de 1.6 s^{-1} , muy similar al utilizar los NTCMP, lo que indicó que la estructura de oro facilitó la transferencia de los electrones y que la cadena del compuesto tiolado no interfiere con la transferencia directa entre el electrodo y GOx, por lo que la enzima tendría que haber adaptado su forma conformacional para poder conseguirlo. Vesali-Naseh et al (2013) reportaron un α de 0.48 y una K_s de 1.13 s^{-1} .

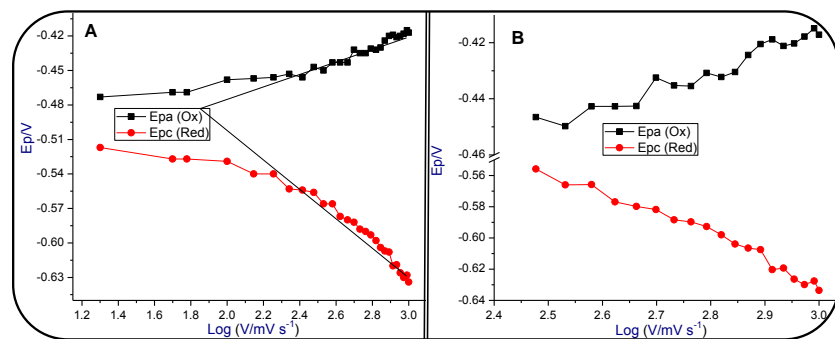


Figura 68. VC del electrodo con GOx inmovilizada de forma covalente a diferentes velocidades de barrido (A) y elección de los puntos que dieron una mejor regresión lineal (B).

6.8.4 Evaluación del electrodo Au-S-(CH₂)₂-CO-NHGOx en presencia de la D-(+)-glucosa

El efecto de la glucosa sobre el electrodo se evaluó utilizando concentraciones de glucosa de 0, 1, 5 10 y 50 mM en el BF pH 7 en ausencia y saturado con oxígeno. En el sistema sin oxígeno (Figura 69 A) se observó una típica disminución en el proceso de reducción a causa del efecto de FADH₂. Mientras que saturado con oxígeno (Figura 69 B) es más notoria la diferencia al aumentar la concentración de glucosa. En ausencia de glucosa, en la solución nitrogenada se observa un pico anódico de 10 mA cm^{-2} , mientras que saturada con O₂ es de 17.5 mA cm^{-2} ; por otro lado, en 50 mM de glucosa la densidad de corriente disminuye a 0.75 mA cm^{-2} (25 %) en ausencia de O₂, pero aumenta a 24 mA cm^{-2} (73 %) saturándola con oxígeno. El efecto es debido a que la enzima necesita al O₂ para regenerarse a su estado oxidado. El efecto de las concentraciones de glucosa sobre FAD/FADH₂ indicó que la enzima unida

covalente no sufrió modificaciones contraproducentes en el sitio activo conservando su actividad catalítica.

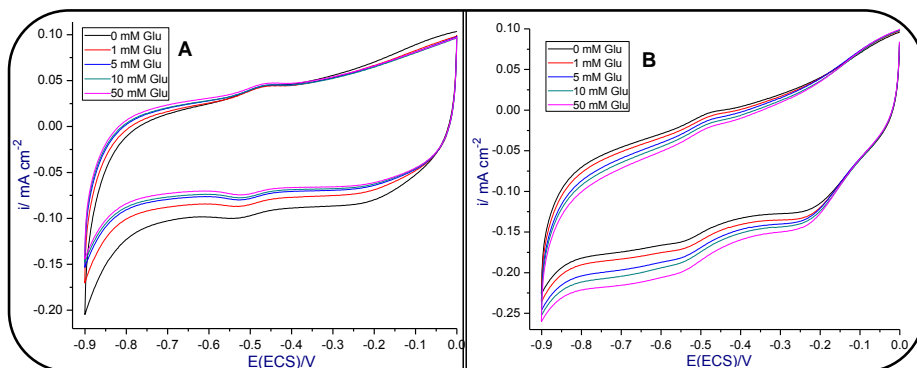


Figura 69. VC comparativo del electrodo Au-S-(CH₂)₂-CO-NHGOx a diferentes concentraciones de glucosa en ausencia (A) y presencia de oxígeno (B).

6.8.5 Evaluación del electrodo de Au durante sus diferentes modificaciones en presencia de la D-(+)-glucosa

Es conocido que el oro puede oxidar a la glucosa principalmente en medio básico o alcalino, aunque se ha reportado también a pH neutro con la adición de hidróxido de sodio o potasio (Basu y Basu, 2012). Para descartar el efecto del oro en la oxidación de la glucosa se adicionó una concentración de 5 mM de glucosa durante cada modificación de la estructura de oro y se evaluó su comportamiento.

En la ventana de potencial de 0 a 1.1 V (vs ECS) el voltograma cíclico del oro en BF pH 7 mostró un típico perfil del oro con un pico de reducción en 0.44 V, al añadirle la glucosa presentó un pico en 0.27 V perteneciente a la oxidación de la glucosa y de regreso a la oxidación de gluconolactona en ácido glucónico. De igual manera, el electrodo modificado con el tiol presentó la misma señal de oxidación de la glucosa pero en menor intensidad debido a la ocupación de sitios activos del Au. Al unirle la enzima de forma covalente ya no se encontró la señal de oxidación de la glucosa por el Au y de esta forma se descartó su efecto catalítico activo (Figura 70 A). Evaluando la señal a una ventana de potencial entre -0.9 y 0.5 V (vs ECS) se observaron los mismos picos de oxidación del electrodo de Au y modificado con el tiol en 0.27 V mientras que con GOx inmovilizado se encontraron los picos del cofactor FAD/FADH₂ en 0.447 y 0.528 V

respectivamente, sin la señal de oxidación del oro (Figura 70 B). Finalmente, el VC del electrodo con la enzima reveló la disminución de la densidad de corriente de FAD/FADH₂ en presencia de glucosa lo que indicó que GOx se encontró catalíticamente activa (Figura 71 C).

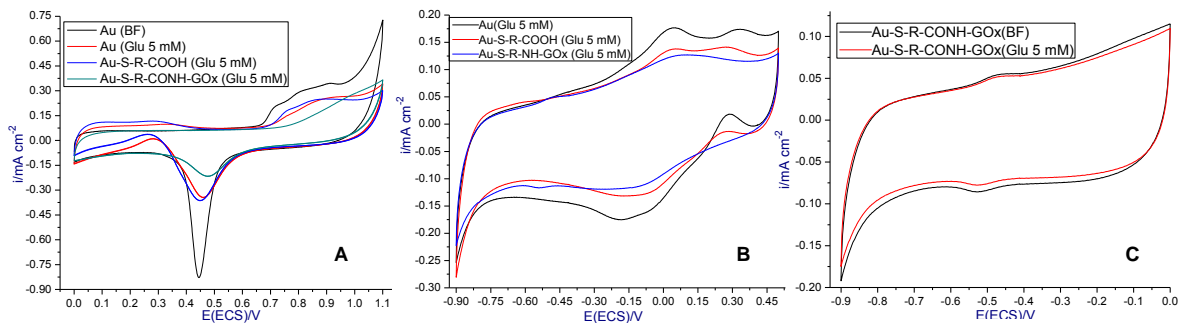


Figura 70. VC comparativa del electrodo Au-S-(CH₂)₂-CO-NHGOx en un ventana de potencial de 0 a 1.1 V (A) y de -0.9 a 0.5 V (B) y el efecto activo del FAD/FADH₂ de GOx en presencia de glucosa.

6.8.6 Estabilidad de electrodo Au-S-(CH₂)₂-CO-NHGOx por voltamperometría cíclica

La estabilidad de electrodo se evaluó realizándole 100 ciclos a un ventana de potencial de -0.9 a 0 V (vs ECS). La Figura 71 se muestra el VC comparativo del 2do, 5vo y 100 ciclos del electrodo Au-S-R-CONH-GOx encontrando una disminución de la capacitiva del 2do al 50vo ciclo y manteniéndose después constante hasta el 100mo ciclo. La densidad de corriente de los picos de FAD no cambio entre cada número de ciclos, siendo de 4.4 mA cm⁻² para FAD oxidado y de 4.2 mA cm⁻² de FAD reducido, indicando que la señal producida por el cofactor no varía con el aumento de ciclos permaneciendo funcional el cofactor.

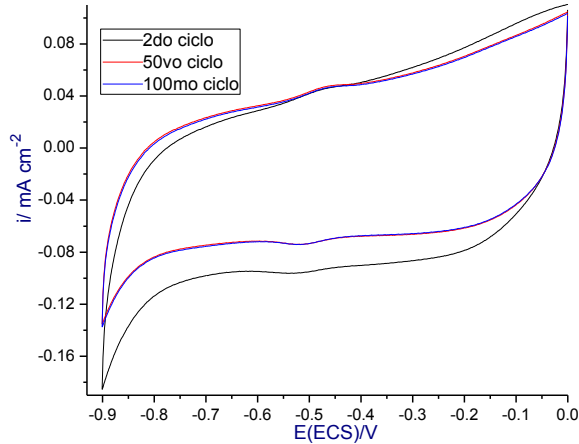


Figura 71. VC comparativo entre el 2do, 50mo y 100 ciclo del electrodo Au-S-(CH₂)₂-CO-NHGOx, mostrando una señal constante.

En resumen, se pudo modificar la estructura de oro en forma de flor con el tiol 3-AMP obteniendo una alta densidad del tiol adsorbido verificándolo por voltametría cíclica y FT-IR. La parte terminal del tiol de ácido carboxílico se activó utilizando una mezcla de EDC/NHS para posteriormente formar un enlace covalente de tipo amida con la GOx, pudiendo corroborarlo por VC encontrando los picos característicos de del cofactor FAD/FADH₂. La enzima conservó su actividad catalítica al evaluar su efecto a diferentes concentraciones de glucosa en atmosfera de nitrógeno y oxígeno; a su vez se calculó una Ks de 1.6 s⁻¹ indicando una buena transferencia de los electrones del sitio activo al electrodo de oro. Finalmente, esta forma de inmovilización de GOx proporcionó resultados muy interesantes para poder ser implementado en una biocelda de combustible, pero por ser más complejo el sistema se deben de realizar otros estudios.

7. CONCLUSIONES

1. La adsorción de GOx sobre electrodos de grafito se identificó por VC por los picos de oxidación y reducción a -0.422 V y -0.521 V (vs ECS) respectivamente, característicos del par FAD/FADH₂. La densidad promedio de enzima inmovilizada fue de 8.3×10^{-11} mol cm⁻². En una BCH- μ F y bajo condiciones ideales (anolito 10 mM de glucosa, pH 7 y usencia de oxígeno; catolito KOH 0.3 M y saturado con oxígeno) empleando este bioánodo se obtuvo un PCA de 0.54 V, una densidad de corriente de 0.032 mA cm⁻² y una potencia de 7.8 μ W cm⁻².

2. Con los agentes entrecruzadores utilizados: GA al 0.2 y 4.5%; PLL al 0.1 w/v y la mezcla de GA-PLL 1:1 v/v aumentó la Γ a 1.6×10^{-10} , 2.7×10^{-9} , 1.2×10^{-10} mol cm⁻² y 1.4×10^{-10} mol cm⁻² respectivamente. Sin embargo por sus propiedades electrocinéticas sólo se evaluó el bioánodo GOx-GA al 0.2% en una BCH- μ F bajo condiciones ideales, obteniéndose un PCA de 0.28 V, una densidad de corriente y potencia de 0.1 mA cm⁻² y 20 μ W cm⁻² respectivamente. Es decir, el empleo de GA al 0.2% mejoró el rendimiento y el tiempo de vida útil de la BCH- μ F con respecto al utilizar únicamente la GOx. De manera general, el mayor porcentaje del GA en la mezcla incrementa la corriente capacitiva, el ΔE_p y el E^0 .

3. La modificación de los electrodos de grafito con GOx/NTCMP-GA al 1% favoreció la inmovilización de la mezcla y un aumento de la respuesta de la corriente del 19 % con respecto GOx-GA, sin observar cambio de la Γ (2.15×10^{-10} mol cm⁻²). Los potenciales de oxidación-reducción del par FAD/FADH₂, así como el ΔE_p y el E^0 no se modificaron al incorporar los NTCMP respecto de los valores encontrados con los electrodos modificados con GA. El análisis de curvas obtenidas por VC a diferentes velocidades de barrido mediante la ecuación Laviron permitió el cálculo de α siendo de 0.5 y de $K_s = 1.01$ s⁻¹, lo cual indica que se mejoró la transferencia directa de electrones respecto del valor de K_s reportado para la GOx sola (0.1 s⁻¹). El bioánodo GOx/NTCMP-GA 1% se evaluó en una BCH- μ F air-breathing utilizando un fluido de BF (0.1 M) pH 7 con 5 mM de glucosa, lográndose un alto rendimiento caracterizado por un PCA de 0.72 V, una

densidad de corriente de 1.43 mA cm^{-2} y una potencia de $610 \text{ } \mu\text{W cm}^{-2}$, que lo hace potencial candidato para una aplicación en un dispositivo biomédico.

4. Electrodo de grafito fueron electrodepositados con $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ por VC (20 ciclos, 100 mVs^{-1} , de -0.1 a 1.3 V vs ECS). El análisis por SEM indicó la formación de partículas de entre 100 a 400 nm con forma de flor. La evaluación del área bajo el pico de reducción del oro permitió calcular un área superficial electroactiva de 2.080 cm^2 . Sobre estas estructuras se inmovilizó GOx-GA 1% y GOx/NTCMP-GA 1% observándose un aumento de la corriente capacitiva, un corrimiento anódico de los picos FAD/FADH₂ sin cambio en el ΔE_p . Con el electrodo modificado Au-GOx/NTCMP-GA 1% se incrementó la $\Gamma = 1.18 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$, aumentó la densidad de corriente anódica y catódica, y se mejoraron las constantes electrocinéticas $\alpha = 4.2$ y $K_s = 2.1 \text{ s}^{-1}$. Resultados preliminares por VPD con ambos electrodos para la determinación de glucosa en PB pH 7, indican una buena respuesta del electrodo Au-GOx-GA 1%, sin embargo, sería necesario completar el estudio para valorar su posible aplicación en un sistema de biosensor de glucosa.

5. Sobre la misma estructura de oro se adsorbió el tiol ácido 3 mercaptopropiónico y por VC se cuantificó una Γ de $1.591 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ corroborando la incorporación del tiol por FT-IR. La activación del ácido carboxílico terminal del tiol con una mezcla de EDC/NHS permitió la formación de un enlace tipo amida con la GOx. La presencia de la enzima se verificó por VC mediante los picos del par FAD/FADH₂ en -0.469 y -0.527 V (vs ECS) respectivamente, un ΔE_p de 58 mV , el $E^{0'}$ de 0.498 V , y una Γ de GOx inmovilizada covalentemente de $2.71 \times 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$. Utilizando la ecuación de Laviron se calculó una α de 0.44 y una K_s de 1.6 s^{-1} , similar a lo calculado con los GOx/NTCMP-GA 1%, lo que indica que la estructura de oro facilita la transferencia directa de electrones sin que al parecer la cadena del compuesto tiolado interfiera con la transferencia electrónica entre el electrodo y la enzima. El sistema no fue evaluado en celda completa quedando como perspectiva para un trabajo próximo.

8. Referencias

- Adelaju, S. B., and A. T. Lawal. 2011. Fabrication of a bilayer potentiometric phosphate biosensor by cross-link immobilization with bovine serum albumin and glutaraldehyde. *Anal. Chim. Acta.* 691:89-94.
- Alwis, U. W., B. S. Hill, B. I. Meiklejohn, and G. S. Wilson. 1987. Reversibly Immobilized Glucose Oxidase in the Amperometric Flow-Injection Determination of Glucose. *Anal. Chem.* 59: 2688-2691.
- Arjona, N., M. Guerra-Balcázar, G. Trejo, J. Ledesma-García, and L. G. Arriaga. 2012. Electrochemical growth of Au architectures on glassy carbon and their evaluation toward glucose oxidation reaction. *New. J. Chem.* 36:2555-2561.
- Baca, J. T., D. N. Finedold, and S. A. Asher. 2007. Tear glucose analysis for the noninvasive detection and monitoring of diabetes mellitus. *Clin. Sci.* 5:280-293.
- Bankar, S. B., M. V. Bule, R. S. Singhal, L. Ananthanarayan. 2009. Glucose oxidase- An overview. *Biotechnol. Adv.* 27:489–501.
- Basu, D., and S. Basu. 2012. Performance studies of Pd-Pt and Pt-Pd-Au catalyst for electro-oxidation of glucose in direct glucose fuel cell. *Int. J. Hydrogen Energy.* 37:4678-4684.
- Becerik, I., Ş. Süzer, F. Kadirgan. 1999. Platinum–palladium loaded polypyrrole film electrodes for the electrooxidation of D-glucose in neutral media. *J. Electroanal. Chem.* 476:171–176.
- Beneyton, T., W. I. P. Mahendra, C. B. Salem, A.D. Griffiths and V. Taly. 2013. Membraneless glucose/O₂ microfluidic biofuel cells using covalently bound enzymes. *Chem. Commun.* 49:1094.
- Blin, J. L., C. Gérardin, C. Carteret, L. Rodehüser, C. Selve, and M. J. Stébé. 2005. Direct one-step immobilization of glucose oxidase in well-ordered mesostructured silica using a nonionic fluorinated surfactant. *Chem. Mater.* 17:1479-1486.
- Buckner, S. W., P. A. Jelliss, A. Nukic, E. R. Zalocusky, and J. Schumacher. 2010. A metallacarborane redox mediator for an enzyme-immobilized chitosan-modified bioanode. *Bioelectrochem.* 78:130–134.
- Calabrese, B. S., J. Gallaway, and P. Atanassov. 2004. Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices. *Chem. Rev.* 104:4867-4886.
- Carter, M., M. Ryan, and J. Wing. 2012. The fuel cell today industry review. *Fuel Cell. Ind. Rev.* 2012:1-52.

- Cha, J., S. Choi, H. Yu, H. Kim, and C. Kim. 2010. Directly applicable microbial fuel cells in aeration tank for wastewater treatment. *Bioelectrochem.* 78:72–79.
- Choi, Y., G. Wang, M. H. Nayfeh, and S. T. Yau. 2009. A hybrid biofuel cell based on electrooxidation of glucose using ultra-small silicon nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* 24:3103–3107.
- Chung, T. D., R. A. Jeong, S. K. Kang, and H. C. Kim. Reproducible fabrication of miniaturized glucose sensors: preparation of sensing membranes for continuous monitoring. *Biosens. Bioelectron.* 16: 1079–1087.
- Ciriaco, F., F. Mavelli, and L. Cassidei. 2013. Benchmark calculations of density functionals for organothiol adsorption on gold surfaces. *Comput. Theoretical Chem.* 1009:60-69.
- Clarke, K. G., M. Johnstone-Robertson, B. Price, and S. T. L. Harrison. 2006. Location of glucose oxidase during production by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70:72–77.
- Claussen, J. C., M. M. Wickner, T. S. Fisher, and D. M. Porterfield. 2011. Transforming the fabrication and biofunctionalization of gold nanoelectrode arrays into versatile electrochemical glucose biosensors. *Appl. Mater. Interfaces.* 3:1765-1770.
- Cracknell, J. A., K. A. Vincent, and F. A. Armstrong. 2008. Enzymes as working or inspirational electrocatalysts for fuel cells and electrolysis. *Chem. Rev.* 108:2439-2461.
- Dong, Y.-P., H. Cui, and C.-M. Wang. 2006. Electrogenerated chemiluminescence of luminol on a gold-nanorod-modified gold electrode. *J. Phys. Chem. B.* 110:18408-18414.
- Dongxiang, L., H. Qiang, C. Yue, D. Li, and L. Junbai. 2007. Immobilization of glucose oxidase onto gold nanoparticles with enhanced thermostability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355:488-493.
- Dzyadevych, S.V., V. N. Arkhypova, A.P. Soldatkin, A.V. El'skaya, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault. 2008. Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. *ITBM-RBM.* 29:171–180.
- Eg and G. Technical Services. 2004. *Fuel Cell Handbook (7th Ed.)*. Department of Energy Office of Fossil Energy National Energy Technology Laboratory. Morgantown, West Virginia.
- ElKaoutita, M., I. Naranjo-Rodríguez, M. Domínguez, and J. L. Hidalgo-Hidalgo-De-Cisneros. 2011. Bio-functionalization of electro-synthesized polypyrrole surface by heme enzyme using a mixture of Nafion and glutaraldehyde as synergetic immobilization matrix: Conformational characterization and electrocatalytic studies. *Appl. Surf. Sci.* 257:10926–10935.

- Erickson, D. Li, and D. 2004. Integrate microfluidic devices. *Anal. Chim. Acta.* 507:11-26.
- Falk, M., Z. Blum, and S. Shleev. 2012. Direct electron transfer based enzymatic fuel cells. *Electrochim. Acta.* 82:191-202.
- Ferrington, R., A. D. Strook, T. D. Clark, M. Mayer, and G. M. Whitesides. 2002. Membraneless vanadium redox fuel cell using laminar flow. *J. Am. Chem. Soc.* 124:12930-12931.
- Friedrich, T., and B. Tiede. 2011. Copolymer hydrogels of acrylic acid and a nonionic surfmer: pH-induced switching of transparency and volume and improved mechanical stability. *Langmuir.* 27:2997–3005.
- Gade, V.K., D. J. Shirale, P. D. Gaikwad, P. A. Savale, K. P. Kakde, H. J. Kharat, and M. D. Shirsat. 2006. Immobilization of GOD on electrochemically synthesized Ppy–PVS composite film by cross-linking via glutaraldehyde for determination of glucose. *React. Funct. Polym.* 66:1420-1426.
- Ghiaci, M., N. Dorostkar, M. V. Martínez-Huerta, J. L. G. Fierro, and P. Moshiri. 2013. Synthesis and characterization of gold nanoparticles supported on thiol functionalized chitosan for solvent-free oxidation of cyclohexene with molecular oxygen. *J. Mol. Catal. A: Chem.* 379:340-349.
- Ghica, M. E., and C. M. A. Brett. 2008. Glucose oxidase inhibition in poly(neutral red) mediated enzyme biosensors for heavy metal determination. *Microchim. Acta.* 163:185–193.
- Ghosla, S., and V. Marrey. 1986. New flavins for old: artificial flavins as active site probes of flavoproteins. *Biochem. J.* 239:1-12.
- González-Guerrero, M. J., J. P. Esquivel, D. Sánchez Molas, P., F. X. Muñoz, F. J. Del Giroud., S. D. Minteer, and N. Sabaté. 2013. Membraneless glucose/O₂ microfluidic enzymatic biofuel cell using pyrolyzed photoresist film electrodes. *Lab Chip.* 13:2972-2979.
- Gooding, J. J., V. G. Praig, and E. A. H. Hall. 1998. Platinum-catalyzed enzyme electrodes immobilized on gold using self-assembled layers. *Anal. Chem.* 70:2396-2402.
- Goran, J. M., M. Mantilla, and K. J. Stevenson. 2013. Influence of surface adsorption on the interfacial electron transfer of flavin adenine dinucleotide and glucose oxidase at carbon nanotube and nitrogen-doped carbon nanotube electrodes. *Anal. Chem.* 85:1571-1581.
- Grove, W. R., 1839. On voltaic series and the combination of gases by platinum. *Philos. Mag. Ser. 3:*127.

- Guerra-Balcazar M., A. D. Morales., F. Castañeda, J. Ledesma-García, and L.G. Arriaga. 2010. Synthesis of Au/C and Au/Pani for anode electrodes in glucose microfluidic fuel cell. *Electrochem. Commun.* 12:864–867.
- Guiomar, A. J., J. T. Guthrie, and S. D. Evans. 1999. Use of mixed self-assembled monolayers in a study of the effect of the microenvironment on immobilized glucose oxidase. *Langmuir.* 15:1198-1207.
- Guo, S., and E. Wang. 2007. Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. *Anal. Chim. Acta.* 598:181-192.
- Gvozdenović, M. M., B. Z. Jugović, D. I. Bezbradica, M. G. Antov, Z. D. Knežević-Jugović, and B.N. Grgur. 2011. Electrochemical determination of glucose using polyaniline electrode modified by glucose oxidase. *Food Chem.* 124:396-400.
- Hinterwirth, H., W. Lindner, and M. Lämmerhofer. 2012. Bioconjugation of trypsin onto gold nanoparticles: Effect of surface chemistry on bioactivity. *Anal. Chim. Acta.* 733:90-97.
- Hu, C., X. Bai, Y. Wang, W. Jin, X. Zhang, and S. Hu. 2012. Inkjet printing of nanoporous gold electrode arrays on cellulose membranes for high-sensitive paper-like electrochemical oxygen sensor using ionic liquid electrolytes. *Anal. Chem.* 84:3745-3750.
- Huang, C.-J., P.-H. Chiu, Y.-H. Wang, and C.-F. Yang. 2006. Synthesis of the gold nanodumbbells by electrochemical method. *J. Colloid Interface Sci.* 303:430-436.
- Huang, S., H. Ma, X. Zhang, F. Yong, X. Feng, W. Pan, X. Wang, Y. Wang, and S. Chen. 2005. Electrochemical synthesis of gold nanocrystals and their 1D and 2D organization. *J. Phys. Chem. B.* 109:19823-19830.
- Irmukhametova, G. S., B. J. Fraser, J. L. Keddie, G. A. Mun, and V. V. Khutoryanskiy. 2012. Hydrogen-bonding-driven self-assembly of PEGylated organosilica nanoparticles with poly(acrylic acid) in aqueous solutions and in layer-by-layer deposition at solid surfaces. *Langmuir.* 28:299–306.
- Ivnitski, D., B. Branch, P. Atanassov, and C. Apblet. 2006. Glucose oxidase anode for biofuel cell based on direct electron transfer. *Electrochem. Commun.* 8:1204-1212.
- Jara, N. C., R. M. Uribe, C. Zaror-Zaror, J. Carpinelli-Pavisic, M. Aranda-Bustos, and C. Peça-Farfal. 2013. Development of a bienzymatic amperometric glucose biosensor using mesoporous silica (MCM-41) for enzyme immobilization and its application on liquid pharmaceutical formulations. *Electroanalysis.* 25:308–315.

- Jose, M. V., S. Marx, H. Murata, R. R. Koepsel, and A. J. Russell. 2012. Direct electron transfer in a mediator-free glucose oxidase based carbon nanotube-coated biosensor. *Carbon*. 50:4010-4020.
- Karboune, S., A. Archelas, R. Furstoss, and J. Barratti. 2005. Immobilization of epoxide hydrolase from *Aspergillus niger* onto DEAE-cellulose: enzymatic properties and application for the enantioselective resolution of a racemic epoxide. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 32:175-184.
- Karyakin A. A., E. A. Kotel'nikova, L. V. Lukachova, and E. E. Karyakina. 2002. Optimal environment for glucose oxidase in perfluorosulfonated ionomer membranes: improvement of first-generation biosensors. *Anal. Chem.* 74:1597-1603.
- Kausaite-Minkstimienea, A., V. Mazeikoa, A. Ramanavicienea, and A. Ramanavicius. 2011. Evaluation of amperometric glucose biosensors based on glucose oxidase encapsulated within enzymatically synthesized polyaniline and polypyrrole. *Sens. Actuators, B.* 158:278-285.
- Kerzenmacher, S., J. Ducreé, R. Zengerle, and F. V. Stetten. 2008. Energy harvesting by implantable abiotically catalyzed glucose fuel cells. *J. Power Sources.* 182:1-17.
- Khutoryanskaya, O. V., Z. A. Mayeva, G. A. Mun, and V. V. Khutoryanskiy. 2008. Designing temperature-responsive biocompatible copolymers and hydrogels based on 2-Hydroxyethyl(meth)acrylates. *Biomacromolecules.* 9:3353-3361.
- Khutoryanskiy, V. V., A. V. Dubolazov, Z. S. Nurkeeva, and G. A. Mun. 2004. pH effects in the complex formation and blending of poly(acrylic acid) with poly(ethylene oxide). *Langmuir.* 20:3785-3790.
- Kim, J., H. Jia, and P. Wang. 2006. Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells. *Biotechnol. Adv.* 24:296-308.
- Krikorian, V., M. Kurian, M. E. Galvin, A. P. Nowak, T. J. Deming, and D. J. Pochan. 2002. *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.* 40:2579-2586.
- Larminie, J., A. Dicks, and Chichester. 2003. *Fuel Cell Systems Explained* (2nd Ed.). John Wiley & Sons. England.
- Laviron, E. 1979. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *Electroanal. Chem.* 101:19-28.
- Laviron, E. 1979. The use of linear potential sweep voltammetry and of A. C. voltammetry for the study of the surface electrochemical reaction of strongly absorbed systems and redox modified electrodes. *J. Electroanal. Chem.* 100:263-270.

- Ledesma-García, J., J. Manríquez, S. Gutiérrez-Granados, and L. A. Godínez. 2003. Dendrimer modified thiolated gold surfaces as sensor devices for halogenated alkyl-carboxylic acids in aqueous medium. A promising new type of surfaces for electroanalytical applications. *Electroanalysis*. 15:659-666.
- Leropoulos, I., J. Greenman, and C. Melhuish. 2010. Improved energy output levels from small-scale Microbial Fuel Cells. *Bioelectrochem*. 78:44–50.
- Leskovac, V., S. Trivić, G. Wohlfahrt, J. Kandrač, and D. Peričin. 2005. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 37:731-750.
- Li, L., K. Scott, K., and E. H. Yu. 2013. A direct glucose alkaline fuel cell using MnO₂ carbon nanocomposite supported gold catalyst for anode glucose oxidation. *J. Power Sources*. 221:1e5.
- Lin, C.-C., T.-J. Juo, Y.-J. Chena, C.-H. Chiou, H.-W. Wang, and Y.-L. Liu. 2008. Enhanced cyclic voltammetry using 1-D gold nanorods synthesized via AAO template electrochemical deposition. *Desalination*. 233:113-119.
- Liu, C., S. Alwarappan, Z. Chen, X. Kong, and C. Z. Li. 2010. Membraneless enzymatic biofuel cells based on graphene nanosheets. *Biosens. Bioelectronic*. 25:1829-1833.
- Liu, S. F., X. H. Li, Y. C. Li, Y. F. Li, J. R. Li, and L. Jiang. 2005. The influence of gold nanoparticle modified electrode on the structure of mercaptopropionic acid self-assembly monolayer. *Electrochim. Acta*. 51:427-431.
- Losic, D., J. G. Shapter, and J. J. Gooding. 2002. Scanning tunneling microscopy studies of glucose oxidase on gold surfaces. *Langmuir*. 18:5422-5428.
- Lyon, D. Y., F. Buret, T. M. Vogel, and J. M. Monier. 2010. Is resistance futile? Changing external resistance does not improve microbial fuel cell performance. *Bioelectrochem*. 78:2–7.
- Malhotra, B. D., and A. Choubey. 2003. Biosensors for clinical diagnostics industry. *Sens. Actuators, B*. 91:117–127.
- Mashazi, P. N., K. I. Ozoemena, and T. Nyokong. 2006. Tetracarboxylic acid cobalt phthalocyanine SAM on gold: Potential applications as amperometric sensor for H₂O₂ and fabrication of glucose biosensor. *Electrochim. Acta*. 52:177–186.
- Matthiesen, J. E., J. Deepa, C. M. Sorensen, and K. J. Klabunde. 2012. Loss of hydrogen upon exposure of thiol to gold clusters at low temperature. *J. Am. Chem. Soc.* 134:9376–9379.

- Mazur, M., Krysinski Paweł. 2011. Bulk and surface-initiated chemical in situ polymerization of 2,5-dimethoxyaniline and 2-methoxyaniline on thiol-coated gold electrodes. *Electrochim. Acta.* 46:3963-3971.
- Mendes, R.K., R.F. Carvalhal, and L.T. Kubota. 2008. Effects of different self-assembled monolayers on enzyme immobilization procedures in peroxidase-based biosensor development. *J. Electroanal. Chem.* 612:164-172.
- Meredith, M. T., and S. D. Minteer. 2011. Inhibition and activation of glucose oxidase bioanodes for use in a self-powered EDTA sensor. *Anal. Chem.* 83:5436–5441.
- Meyer, M., G. Wohlfahrt, J. Knäblein, and D. Schomburg. 1998. Aspects of the mechanism of catalysis of glucose oxidase: A docking, molecular mechanics and quantum chemical study. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 12:425-440.
- Ming, W. C., W. K. Hei, and C. X. Dong. 2008. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78:927–938.
- Minteer, S. D., B. Y. Liaw, and M. J. Cooney. 2007. Enzyme-based biofuel cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18:228-234.
- Miscoria, S. A., J. Desbrieres, G. D. Barrera, P. Labbé, and G. A. Rivas. 2006. Glucose biosensor based on the layer-by-layer self-assembling of glucose oxidase and chitosan derivatives on a thiolated gold surface. *Anal. Chim. Acta.* 578:137-144.
- Mizutani, F., Y. Sato, S. Yabuki, and Y. Hirata. 1996. Enzyme ultra-thin layer electrode prepared by the co-adsorption of poly-L-lysine and glucose oxidase onto a mercaptopropionic acid acid-modified gold surface. *Chem. Lett.* 1996:251-252.
- Mizutani, F., Y. Sato, S. Yabuki, T. Sawaguchi, and S. Iijima. 1999. Enzyme electrodes based on self-assembled monolayers of thiol compounds on gold. *Electrochim. Acta.* 44:3833-3838.
- Moehlenbrock, M. J., R. L. Arechederra, K. H. Sjöholm, and S. D. Minteer. 2009. Analytical techniques for characterizing enzymatic biofuel cells. *Anal. Chem.* 81:9538-9545.
- Mousavi, S. S. A., N. T. Nguyen, and S. H. Chan. 2011. A review on membraneless laminar flow-based fuel cells. *Int. J. Hydrogen Energy.* 36:5675-5694.
- Nagaraju, D. H. and V. Lakshminarayanan. 2009. Electrochemically grown mesoporous gold film as high surface area material for electro-oxidation of alcohol in alkaline medium. *J. Phys. Chem. C.* 113:14922-14926.

- Njagi, J., and S. Andreescu. 2007. Stable enzyme biosensors based on chemically synthesized Au–polypyrrole nanocomposites. *Biosens. Bioelectron.* 23:168-175.
- O’Shannessy, D. J., Brigham M., and Peck K. 1992. *Anal. Biochem.* 205:132-136.
- Oncescu, V., and D. Erickson. 2013. High volumetric power density, non-enzymatic, glucose fuel cells. *Sci. Rep.* 3:1-6.
- Oztekin, Y., A. Ramanaviciene, Z. Yazicigil, A. O. Solak, and A. Ramanavicius. 2011. Direct electron transfer from glucose oxidase immobilized on polyphenanthroline-modified glassy carbon electrode. *Biosens. Bioelectron.* 26:2541-2546.
- Perale, G., F. Rossi, E. Sundstrom, S. Bacchiega, M. Masi, G. Forloni, and P. Veglianesi. 2011. Hydrogels in Spinal Cord Injury Repair Strategies. *Chem. Neurosci.* 2:336–345.
- Percival, Z. Y. H. 2011. What is vital (and not vital) to advance economically-competitive biofuels production. *Proc. Biochem.* 46:2091–2110.
- Petri, A., P. Marconcini, and P. Salvadori. 2005. Efficient immobilization of epoxide hydrolase onto silica gel and use in the enantioselective hydrolysis of racemic para-nitrostyrene oxide. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 32:219–224.
- Prabhakar, R., P. E. M. Siegbahn, B. F. Minaev, and H. Ågren. 2002. Activation of triplet dioxygen by glucose oxidase: spin-orbit coupling in the superoxide ion. *J. Phys. Chem. B.* 106:3742-3750.
- Prabhakara, R., P. E. M. Siegbahna, and B. F. Minaev. 2003. A theoretical study of the dioxygen activation by glucose oxidase and copper amine oxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1647:173– 178.
- Prakash, S., C. R. K. Rao, and M. Vijayan. 2009. Polyaniline–polyelectrolyte–gold(0) ternary nanocomposites: Synthesis and electrochemical properties. *Electrochim. Acta.* 54:5919-5927.
- Qi, W., X. Yan, L. Duan, Y. Cui, Y. Yang, and J. Li. 2009. Glucose-sensitive microcapsules from glutaraldehyde cross-linked hemoglobin and glucose Oxidase. *Biomacromolecules.* 10:1212–1216.
- Qu, L., Y. Liu, J-B. Baek, and L. Dai. 2010. Nitrogen-doped graphene as efficient metal-free electrocatalyst for oxygen reduction in fuel cells. *Nano.* 4:1321-1326.
- Ritter, D. W., J. R. Roberts, and M. J. McShane. 2013. Glycosylation site-targeted PEGylation of glucose oxidase retains native enzymatic activity. *Enzyme Microb. Technol.* 52:279-285.

- Roth, J. P., and J. P. Klinman. 2003. Catalysis of electron transfer during activation of O₂ by the flavoprotein glucose oxidase. 100:62-67.
- Rubenwolf, S., S. Kerzenmacher, R. Zengerle, and F. V. Stetten. 2011. Strategies to extend the lifetime of bioelectrochemical enzyme electrodes for biosensing and biofuel cell applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89:1315-1322.
- Sales, F. C. P. F., R. M. Lost, M. V. A. Martins, M. C. Almeida, and F. N. Crespilho. 2013. An intravenous implantable glucose/dioxygen biofuel cell with modified flexible carbon fiber electrodes. *Lab. Chip.* 13:468-474.
- Sassolas, A., L. J. Blum, and B. D. Leca-Bouvier. 2012. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol. Adv.* 30:489–511.
- Sekretaryova, A. N., D. V. Vokhmyanina, T. O. Chulanova, E. E. Karyakina, and A. A. Karyakin. 2012. Reagentless biosensor based on glucose oxidase wired by the mediator freely diffusing in enzyme containing membrane. *Anal. Chem.* 84:1220-1223.
- Seyed, A. M. S., N. T. Nguyen, and S. H. Chan. 2011. A review on membraneless laminar flow-based fuel cells. *Int. J. Hydrogen Energy.* 36:5675-5694.
- Shana, D., J. Zhang, H. G. Xuea, S. N. Dinga, and S. Cosnier. 2010. Colloidal laponite nanoparticles: Extended application in direct electrochemistry of glucose oxidase and reagentless glucose biosensing. *Biosens. Bioelectron.* 25:1427-1433.
- Sheldona, A. R. 2007. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Adv. Synth. Catal.* 349:1289 – 1307.
- Smith, S.C., I.P. Hamilton. 2013. Hydrogen atom transfer in alkane thiol-gold cluster complexes: A density functional theory study. *Comput. Theoretical Chem.* 1021:171-176.
- Smolander, M., H. Boer, M. Valkiainen, R. Roozeman, M. Bergelin, J.-E. Eriksson, C. Zhang, A. Koivula, L. Viikari. 2008. Development of a printable laccase-based biocathode for fuel cell applications. *Enzyme Microb. Technol.* 43:93102.
- Srisombat, L., A. C. Jamison, and T. Randall Lee. 2011. Stability: A key issue for self-assembled monolayers on gold as thin-film coatings and nanoparticle protectants. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 390:1-19.
- Su, Q., and J. P. Klinman. 1999. Nature of oxygen activation in glucose oxidase from *Aspergillus niger*: The Importance of electrostatic stabilization in superoxide formation. *Biochem.* 38:8572-8581.

- Sung, W. J., and Y. H. Bae. 2000. A glucose oxidase electrode based on electropolymerized conducting polymer with polyanion-enzyme conjugated dopant. *Anal. Chem.* 72:2177-2181.
- Szot, K., M. Jönsson-Niedziolka, E. Rozniecka, F. Marken, and O. Marcin. 2013. Direct electrochemistry of adsorbed proteins and bioelectrocatalysis at film electrode prepared from oppositely charged carbon nanoparticles. *Electrochim. Acta.* 89:132-138.
- Tam, T. K., G. Strack, M. Pita, and E. Katz. 2009. Biofuel cell logically controlled by antigen-antibody recognition: towards immune-regulated bioelectronic devices. *J. Am. Chem. Soc.* 131:11670–11671.
- Tamaki, T., and T. Yamaguchi. 2006. High surface area three-dimensional biofuel cell electrode using redox polymer grafted carbon. *Ind. Eng. Chem. Res.* 45:3050-3058.
- Taormina, C. R., J. T. Baca, S. A. Asher, and J. J. Grabowski. 2007. Analysis of tear glucose concentration with electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 18:332-336.
- Thangamuthu, R., Y. C. Pan, and S. M. Chen. 2011. Electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide and its determination in antiseptic and soft-glass cleaning solutions at phosphotungstate-doped-glutaraldehyde-cross-linked poly-L-lysine film electrodes. *Sens. Actuators B.* 151:377-383.
- Tian, Y., H. Liu, and Z. Deng. 2006. Electrochemical growth of gold pyramidal nanostructures: toward super-amphiphobic surfaces. *Chem. Mater.* 18:5820-5822.
- Tominaga, M., S. Nomura, and I. Taniguchi. 2008. Bioelectrocatalytic current based on direct heterogeneous electron transfer reaction of glucose oxidase adsorbed onto multi-walled carbon nanotubes synthesized on platinum electrode surfaces. *Electrochem. Commun.* 10:888–890.
- Tsai, Y. C., S. C. Li, S. W. Liao. 2006. Electrodeposition of polypyrrole–multiwalled carbon nanotube–glucose oxidase nanobiocomposite film for the detection of glucose. *Biosens. Bioelectron.* 22:495-500.
- Uang, Y. M., and T. C. Chou. 2003. Fabrication of glucose oxidase/polypyrrole biosensor by galvanostatic method in various pH aqueous solutions. *Biosens. Bioelectron.* 19:141-147.
- Vesali-Naseh, M., Y. Mortazavi, A. A. Khodadadia, P. Parsaeian, and A. A. Moosavi-Movahedi. 2013. Plasma thiol-functionalized carbon nanotubes decorated with goldnanoparticles for glucose biosensor. *Sens. Actuators B.* 188:488-495.

- Wang, L., X. Chen, X. Wang, X. Han, S. Liu, and C. Zhao. 2011. Electrochemical synthesis of gold nanostructure modified electrode and its development in electrochemical DNA biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 30:151-157.
- Wasserberg, D., C. Nicosia, E. E. Tromp, V. Subramaniam, J. Huskens, and P. Jonkheijm. 2013. Oriented protein immobilization using covalent and noncovalent chemistry on a thiol-reactive self-reporting surface. *J. Am. Chem. Soc.* 135:3104-3111.
- Willner, Itamar., V. Heleg-Shabtai, R. Blonder, E. Katz, and G. Tao. 1996. Electrical wiring of glucose oxidase by reconstitution of FAD-modified monolayers assembled onto Au-electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* 118:10321-10322.
- Winter, M., R. J. Brodd. 2004. What Are Batteries, Fuel Cells, and Supercapacitors?. *Chem. Rev.* 104:4245-4269.
- Wohlfahrt, G., S. Trivi, J. Zeremski, D. Pericvin, and Vladimir Leskovac. 2004. The chemical mechanism of action of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Mol. Cell. Biochem.* 260: 69-83.
- Won, K., Y. H. Kim, S. An, H. J. Lee, S. Park, Y. K. Choi, J. H. Kim, H. I. Hwang, H. J. Kim, H. Kim, and S. H. Lee. 2013. Glucose oxidase/cellulose-carbon nanotube composite paper as a biocompatible bioelectrode for biofuel cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 171:1194-1202.
- Wong, C. M., K. H. Wong, and X. D. Chen. 2008. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78:927-938.
- Wu, B., G. Zhang, S. Shuang, and M. M. F. Choi. 2004. Biosensors for determination of glucose with glucose oxidase immobilized on an eggshell membrane. *Talanta* 64:546-553.
- Wu, P., Q. Shao, Y. Hu, J. Jin, Y. Yin, H. Zhang, and C. Cai. 2010. Direct electrochemistry of glucose oxidase assembled on graphene and application to glucose detection. *Electrochim. Acta.* 55:8606-8614.
- Wu, Q., L. Wang, H. Yu, J. Wang, and Z. Chen. 2011. Organization of glucose-responsive systems and their properties. *Chem. Rev.* 111:7855-7875.
- Xu, X., J. Jia, X. Yang, and S. Dong. 2010. A templateless, surfactantless, simple electrochemical route to a dendritic gold nanostructure and its application to oxygen reduction. *Langmuir.* 26:7627-7631.
- Yamanaka, S. A., F. Nishida, L. M. Ellerby, C. R. Nishida, B. Dunn, J. S. Valentine, and J. I. Zink. 1992. Enzymatic activity of glucose oxidase encapsulated in transparent glass by the sol-gel method. *Chem. Mater.* 4:495-497.

- Yan, J., V. A. Pedrosa, A. L. Simonian, and Alexander Reavzin. 2010. Immobilizing enzymes onto electrode arrays by hydrogel photolithography to fabricate multi-analyte electrochemical biosensors. *Appl. Mater. Inter.* 2:748-755.
- Yan, X., X. Ge, and C. Songzhi. 2011. Pt-decorated nanoporous gold for glucose electrooxidation in neutral and alkaline solutions. *Nano. Res. Lett.* 6:1-6.
- Yang, C. 2012. Enhanced physicochemical properties of collagen by using EDC/NHS-crosslinking. *Bull. Mater. Sci.* 35:913-918.
- Yang, X. Y., G. Tian, N. Jiang, and B. L. Su. 2012. Immobilization technology: a sustainable solution for biofuel cell design. *Energy Environ. Sci.* 5:5540–5563.
- Yin, H., Y. Zhoub, X. Meng, K. Shang, and S. Ai. 2011. One-step “green” preparation of graphene nanosheets and carbon nanospheres mixture by electrolyzing graphite rob and its application for glucose biosensing. *Biosens. Bioelectron.* 30:112–117.
- Yoo, E. H., and S. Y. Lee. 2010. Glucose biosensors: An overview of use in clinical practice. *Sens.* 10:4558-4576.
- Yu, Y.-Y., S.-S. Chang, C.-L. Lee, and C. R. C. Wang. 1997. Gold nanorods: electrochemical synthesis and optical properties. *J. Phys. Chem. B.* 101:661-664.
- Zebda, A., L. Renaud, M. Cretin, C. Innocent, F. Pichot, R. Ferrigno, and S. Tingry. 2009. Electrochemical performance of a glucose/oxygen microfluidic biofuel cell. *J. Power Sources.* 193:602-606.
- Zhao, S., K. Zhang, Y. Bai., W. Yang, and C. Sun. 2006. Glucose oxidase/colloidal gold nanoparticles immobilized in Nafion film on glassy carbon electrode: Direct electron transfer and electrocatalysis. *Bioelectrochem.* 69:158-163.

APÉNDICE

Cráterios de titulaci3n

- 1. Extenso en revista de congreso**
- 2. Puntaje de examen TOEFL**
- 3. Horas de difusi3n (Compromisos Fomix)**
- 4. Extancias**
- 5. Constancias**

**Inmovilización de la glucosa oxidasa para su evaluación como catalizador anódico en una biocelda
microfluidica de glucosa**

R.A. Escalona-Villalpando¹, M. Galván-Valencia², L.G. Arriaga-Hurtado³, S.M. Durón-Torres², J. Ledesma-García^{4*}

¹Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental, Centro Académico Multidisciplinario, Campus Aeropuerto
Carr. A Chichimequillas S/N, Terranos Ejidales Bolaños, Querétaro, Qro. 76140, UAQ.

²Unidad Académica de Ciencias Químicas, Campus Siglo XXI, Km 6 Carretera Zacatecas-Guadalupe
Ejido la Escondida 98160, Zacatecas, Zac. UAZ.

³Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica, Parque Tecnológico Querétaro, Sanfandila,
Pedro Escobedo, 76703, Querétaro, Qro.

⁴Ingeniería en Nanotecnología, Centro Académico Multidisciplinario, Campus Aeropuerto
Carr. A Chichimequillas S/N, Terranos Ejidales Bolaños, Querétaro, Qro. 76140, UAQ.

*Tel. + (442) 192 12 00 EXT 65411, mail: jmg@ledesma@uaq.mx

Resumen

Los catalizadores enzimáticos para bioceldas de combustible han sido ampliamente estudiados en los últimos años por sus aplicaciones en baterías para dispositivos electrónicos, diseño e implantación de marcapasos, desarrollo de estimuladores neuronales y biosensores. No obstante, el corto tiempo de vida útil y baja producción de energía constante son algunas de las limitaciones de una biocelda de combustible, básicamente debido a la dificultad para inmovilizar la enzima y pérdida de su actividad. En el presente trabajo, se evaluó un método para inmovilizar glucosa oxidasa (GOx) sobre grafito para su uso como bioanodo en una celda de combustible de microflujo (CCMF). El procedimiento consistió en adsorción directa de la enzima a partir de una solución de GOx en BF 0.1 M pH 7 sobre grafito (área geométrica entre 0.6 a 0.8 cm²) y el co-deposito de mezclas de glutaraldehído o poli-L-lisina con GOx. La actividad catalítica de GOx se evaluó por voltamperometría cíclica con 0 a 100 mM de β-D-glucosa, usando un electrodo de calomel saturado (ECS) como referencia y platino como contraelectrodo. La densidad de corriente de los bioanodos se evaluó en una CCMF con soporte de carbono tipo PPF (pyrolyzed photoresist film). En el rango de potencial de -0.9V a 0V respecto al ECS, en ausencia de glucosa se observaron picos de oxidación y reducción cercanos a -0.45V y -0.47V respectivamente, los cuales se atribuyen a la transferencia de electrones del cofactor FAD. En presencia de glucosa ambas señales disminuyen y en presencia de oxígeno los voltamperogramas se modificaron. La estabilidad de la GOx adsorbida se favoreció con glutaraldehído y poli-L-lisina. La densidad calculada de enzima adsorbida fue de 3.55X10⁻¹² hasta 4.21X10⁻¹¹ mol/cm². Los resultados indican que utilizando esta metodología es posible optimizar la inmovilización de la GOx para su uso como bioanodo en una CCMF híbrida.

1. Introducción

Las celdas de combustible representan una prometedora alternativa para la producción de energía a partir de reacciones químicas por medio de catalizadores metálicos en el cátodo y ánodo como el oro, paladio, platino y plata, siendo costosas, además de sufrir envenenamiento catalítico y requieren condiciones de reacción específicas para su

óptimo funcionamiento [1]. Una de las propuestas más estudiadas en los últimos años para el remplazo de dichos catalizadores ha sido la implementación de enzimas que operan a temperatura ambiente y pH neutro, lo que representa ventajas para su potencial aplicación como fuente de energía en dispositivos electrónicos, diseño e implantación de marcapasos, desarrollo de estimuladores neuronales y biosensores [2]. Sin embargo, una baja producción de energía eléctrica y un corto tiempo de vida útil son algunos inconvenientes para el buen funcionamiento de una biocelda de combustible, debido principalmente a la deficiente inmovilización e inestabilidad enzimática [3]. Para la inmovilización de GOx se han empleado métodos físicos, utilizando principalmente agentes microencapsuladores y de atrapamiento como polímeros de polipirroles o hidrogeles de poli(acrilamida) [4], así como agentes químicos que permiten la adsorción de la enzima al electrodo. En este último caso se han empleado compuestos entrecruzadores como el glutaraldehído y quitosano [5] o moléculas que favorecen la unión covalente por medio de interacción entre grupos funcionales de la enzima y del agente inmovilizador [6]. En esta primera parte del proyecto, se planteó la inmovilización de GOx por adsorción física y la inmovilización usando compuestos entrecruzadores como el glutaraldehído (GA) y la poli-L-lisina (PL-ly) sobre grafito. Las evaluaciones fueron realizadas en media celda y celda completa en un dispositivo microfluidico tipo película fotoresistente pirolizada (PPF, del inglés pyrolyzed photoresist film) que utiliza glucosa como combustible [7].

2. Sección Experimental

Materiales

La Glucosa Oxidasa (GOx) de *Aspergillus Niger* (E.C.1.1.3.4) con $\geq 100,000$ unidades/g, el cofactor flavin adenin dinucleótido (FAD), las placas de grafito, glutaraldehído (50 % en agua V/V), la poly-L-lisina (0.1 % W/V) y la β -D-glucosa fueron adquiridos de Sigma Aldrich. El fosfato ácido de sodio (Na_2HPO_4) y de potasio (KH_2PO_4) y el hidróxido de potasio (99 % pureza) son grado reactivo marca Merck. Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada.

Pre-tratamiento del electrodo de grafito

Para los experimentos en media celda, el electrodo de grafito se pulió utilizando alumina ($0.05 \mu\text{m}$) y después se sonicó durante 20 min en agua desionizada para retirarle el exceso de alumina. Posteriormente, fue sometido a una limpieza electroquímica empleando voltamperometría cíclica, 100 ciclos a una velocidad de barrido de 100 mV s^{-1} en un rango de potencial de -0.9 a 1.0 V en una solución de ácido sulfúrico 0.5 M .

Preparación del electrodo con GOx

Para la adsorción física de GOx sobre el grafito previamente tratado, se preparó una solución de la enzima a una concentración de 5 mg/mL en un amortiguador de fosfatos (BF) 0.1 M pH 7 y se depositó sobre el grafito incubándolo a 4°C por 1 y 24 h. Después de este tiempo, se secó a temperatura ambiente y fue estudiada la respuesta

de GOx a diferentes concentraciones de glucosa: 0, 1, 5, 10, 20, 50 y 100 mM. Para la evaluación del glutaraldehído (GA) con GOx se utilizaron las concentraciones de 0.05 % y 1.12 % en BF utilizando dos métodos: a) mezcla de la solución de GOx con GA que se depositó sobre el grafito dejándolo incubar por 1 h, posteriormente se secó a temperatura ambiente y se enjuagó con BF antes de evaluar la actividad enzimática a diferentes concentraciones de glucosa. b) la solución de GOx se depositó sobre el grafito dejándolo secar a temperatura ambiente y después se cubrió con GA. Para la evaluación con la poli-L-lisina (PL-hy) se emplearon concentraciones de 0.1 y 10 % y se siguieron los mismos métodos descritos para el GA.

Sistema electroquímico

En todos los estudios electroquímicos fue empleada una celda de vidrio de 25 mL empleando un electrodo de calomel saturado (ECS) como referencia y un alambre de platino como contra-electrodo. Las mediciones se realizaron a través de un potencióstato-galvanostato (BioLogic Science Instruments modelo VMP3) y todos los potenciales expresados en este trabajo se refieren al ECS.

Celda de combustible microfluidica híbrida

Se utilizó una celda de combustible microfluidica tipo PPF para la evaluación de biocodos a partir de GOx. Para la inmovilización de GOx se emplearon dos métodos de adsorción. En el primero se depositó GOx en solución de BF sobre el PPF y en el otro GOx con GA 0.05 %. En todas las mediciones se utilizó como fluido anódico glucosa 10 mM en BF. Como cátodo se preparó una tinta de platino al 30 % con isopropanol y Nafion, depositándolo sobre el PPF con ayuda de un aerógrafo y como fluido catódico se usó una solución 0.3 M de KOH.

3. Resultados y Discusión

Adsorción de GOx sobre grafito

La caracterización de la adsorción de GOx se realizó por voltamperometría cíclica (VC) a una velocidad de barrido de 50 mV/s en una ventana de potencial de -0.9 a 0.0 V en BF 0.1 M y atmósfera de nitrógeno. Se observó un pico de oxidación característico a -0.462 V y uno de reducción a -0.531 vs ECS (Figura 1 A) que coincide con los resultados reportados por otros autores [8]. Estos picos son atribuidos a la transición de FAD a FADH₂ y viceversa, dentro del sitio catalítico de la enzima [9]. Para corroborar que los picos corresponden a lo descrito, se realizaron experimentos empleando solo al cofactor sobre grafito bajo las mismas condiciones de reacción. Los voltamperogramas cíclicos obtenidos muestran un pico de oxidación a -0.422 V y otro de reducción a -0.521 V (Figura 1 B), desplazados catódicamente y de mayor intensidad con respecto a los observados con GOx, lo que pudiera estar relacionado a la estructura de GOx que además de FAD contiene residuos de aminoácidos, amino azúcares e hidratos de carbono, que le pudieran conferir más resistencia a la transferencia de electrones desde el sitio catalítico de la enzima al electrodo,

a diferencia de FAD en la que ocurre un transferencia directa de electrones [10].

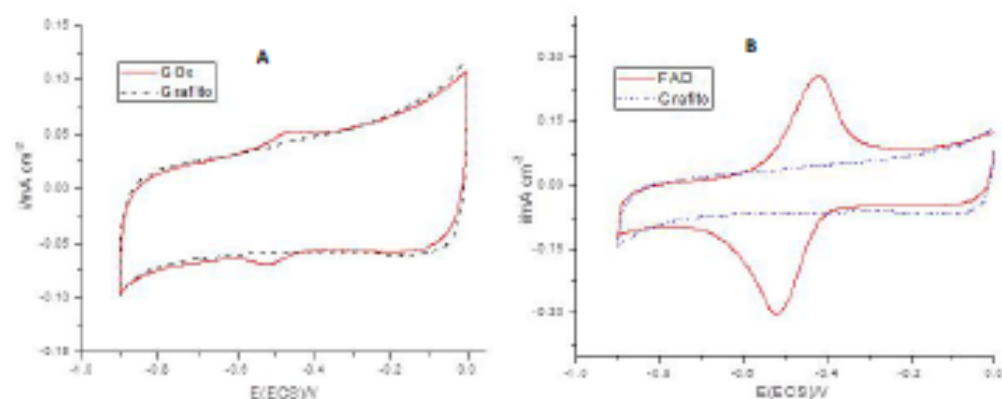


Figura 1. A) Voltamperometría cíclica comparativa del grafito vs GOx inmovilizada B) FAD adsorbido sobre grafito

Actividad catalítica de GOx en presencia de β -D-glucosa

La determinación del efecto catalítico de GOx inmovilizada se llevó a cabo en presencia de concentraciones crecientes de glucosa 0, 1, 5, 10, 20, 50 y 100 mM en BF bajo atmósfera de nitrógeno. Los resultados se muestran en la Figura 2 donde se observa una disminución en la intensidad de corriente de los picos redox a medida que aumenta la concentración de la glucosa. Este efecto se puede atribuir a la saturación del centro activo de GOx y a la transformación de oxígeno a peróxido de hidrógeno por la enzima, disminuyendo la concentración de oxígeno en la superficie del electrodo [11].

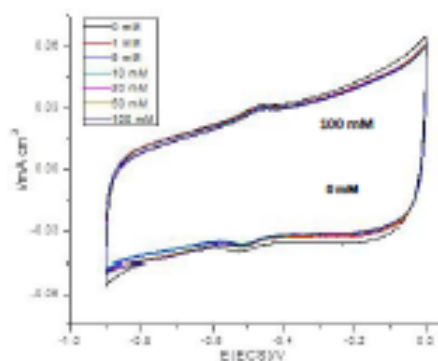


Figura 2. Actividad catalítica de GOx a diferentes concentraciones de glucosa

Adsorción de GOx con GA y su actividad catalítica a diferentes tiempos

La respuesta de la mezcla de GOx con GA se evaluó por VC observándose un par redox a -0.515 y -0.461 V (Figura 3A) que en comparación con los potenciales observados para GOx sobre grafito muestran un desplazamiento poco

significativo. De igual manera se aprecia un aumento en la pseudo-capacitancia del voltamperograma al incorporar GA. Además se evaluó la actividad catalítica en presencia de diferentes concentraciones de glucosa (0, 1, 5, 10, 20, 50 y 100 mM) presentándose una disminución de la intensidad de la corriente al aumentar la concentración del azúcar (Figura 3B).

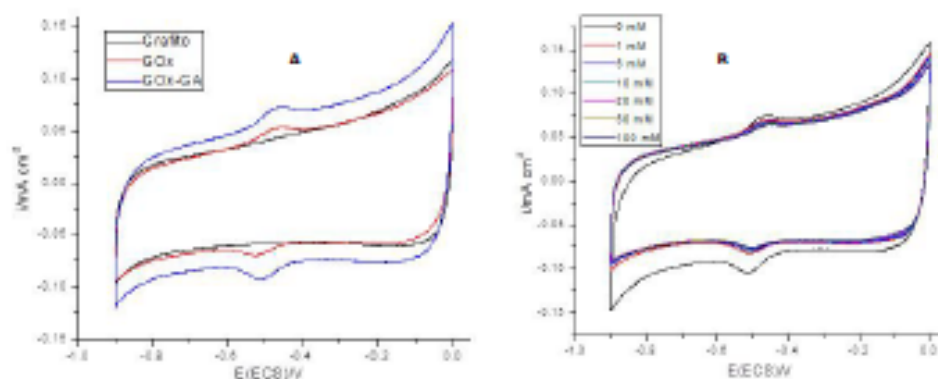


Figura 3. A) VC comparativos entre los electrodos de grafito, grafito/GOx y grafito/GOx-GA. B) Actividad de grafito/GOx-GA a diferentes concentraciones de glucosa

Finalmente, se evaluó la actividad de los electrodos de grafito/GOx con diferentes concentraciones de GA (0.05 y 1.12 %) a 1 h, 24 h, 1, 2 y 4 semanas en 10 mM de glucosa bajo atmósfera de nitrógeno, con la finalidad de ensayar su estabilidad. Se encontró que al emplear el método b) de inmovilización para las dos concentraciones de GA se prolongó la actividad enzimática hasta 4 semanas. Cuando se empleó el método a) utilizando una concentración de GA de 0.05% la actividad se conserva durante cuatro semanas, sin embargo, a mayor concentración (1.12%) su estabilidad se reduce a una semana. En ausencia de agente entrecruzante la estabilidad se ve drásticamente reducida a 72 h (Tabla 1).

Tabla 1. Tiempo de operación de los electrodos de grafito modificados con GOx con y sin GA. El depósito del agente entrecruzante (GA) se realizó por lo métodos a) y b)

Método	Concentración de GA (%)	Tiempo de operación
--------	-------------------------	---------------------

GOx	0	72 h
GOx-GA (a)	0.05	4 semanas
GOx-GA (a)	1.12	1 semana
GOx-GA (b)	0.05	4 semanas
GOx-GA (b)	1.12	4 semanas

Inmovilización de GOx con PL-ly

La GOx fue inmovilizada con PL-ly a concentraciones de 0.1 y 10% por los métodos a) y b) descritos anteriormente para GA. La evaluación de la actividad de la enzima se llevó a cabo en media calda utilizando como electrodo de referencia el ECS y como contra-electrodo un alambre de platino. Utilizando ambos métodos de inmovilización y para las dos concentraciones de PL-ly, se observó un par redox alrededor de -0.539 y -0.497 V (Figura 4). Estos resultados coinciden en la posición de los picos redox con los encontrados al utilizar el GA lo que confirma la presencia y actividad de GOx sobre el grafito. Sin embargo, las pruebas de estabilidad y la actividad catalítica en presencia de glucosa se encuentran en proceso de experimentación.

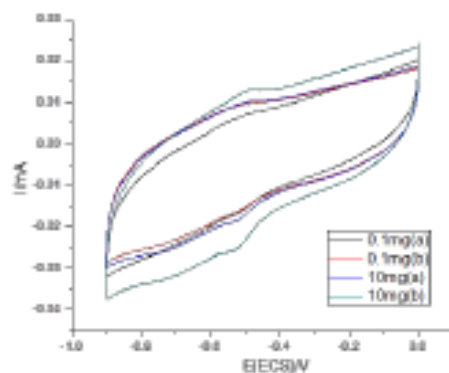


Figura 4. VC del electrodo Grafito/GOx-PL-ly al 0.1 y 10% por ambos métodos de depósito del agente entrecruzante.

Cantidad adsorbida de GOx y GOx-GA sobre grafito

El cálculo de la cantidad promedio de enzima activa adsorbida se realizó integrando el pico de reducción de varios electrodos utilizando la ecuación 1 en donde Γ es el promedio de enzima inmovilizada, Q es la carga durante la reacción de reducción, n el número de electrones transferidos, en este caso es igual a 2, A el área geométrica del electrodo y F es la constante de Faraday [12].

$$\Gamma = Q/nFA \quad (1)$$

Para el electrodo de Grafito/GOx se calculó una cantidad promedio de enzima inmovilizada de 8.28947×10^{-11} mol cm^{-2} , lo que correspondería a 4.99×10^{13} moléculas cm^{-2} . Después de medir la actividad catalítica durante tres días consecutivos en los cuales el electrodo se almacenaba en BF a 4 °C, la evaluación de la cantidad de enzima inmovilizada disminuyó a 1.95915×10^{-11} mol cm^{-2} (Tabla 2) debido principalmente al lavado de la enzima. Al emplear el agente entrecruzante GA se mejoró la retención de GOx sobre el grafito impidiendo su remoción de la superficie, cuantificándose una cantidad promedio de GOx adsorbida de 1.61948×10^{-10} mol cm^{-2} que es similar o mayor a lo reportado por otros autores por ejemplo: 1.3×10^{-10} mol cm^{-2} utilizando grafito; 2.35×10^{-11} mol cm^{-2} con carbón vitreo (CV) y nanotubos de carbono (NTC); y 5.93×10^{-11} mol cm^{-2} con nafion-CV-NTC [12].

Tabla 2. Cantidad de enzima adsorbida sobre grafito

Electrodo	Cantidad mol cm^{-2}
Grafito-GOx (1ra determinación)	8.28947×10^{-11}
Grafito-GOx (3ra determinación)	1.95915×10^{-11}
Grafito-GOx-GA (0.05%)	1.61948×10^{-10}

Evaluación de GOx en una biocelda microfluidica tipo PPF

En una celda de microflujo tipo PPF se utilizó como bioánodo a GOx depositada sobre el carbón PPF con un área geométrica de 0.03 cm^2 y como cátodo platino, empleando una velocidad de flujo (VF) de 1.5 mL h^{-1} obteniendo un potencial a circuito abierto (PCA) de 0.5 V y una densidad de corriente (DC) de $6.2 \mu\text{W cm}^{-2}$. Al aumentar la velocidad del flujo a 3 mL h^{-1} se observó un incremento de la densidad de corriente a $7.9 \mu\text{W cm}^{-2}$ pero al aumentar la VF a 5 mL h^{-1} disminuyó considerablemente la DC debido posiblemente a la remoción de la enzima puesto que ningún agente entrecruzante fue utilizado (Figura 5).

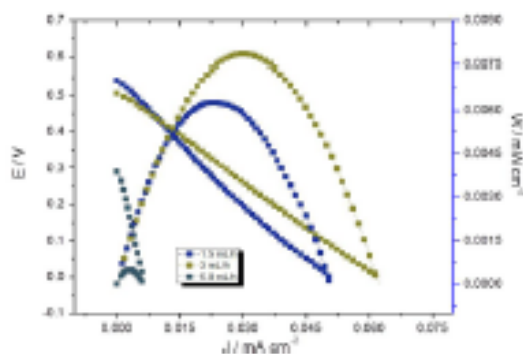


Figura 5. Curvas de descarga de GOx sobre carbón tipo PPF

Para evitar la remoción de la enzima sobre el PPF (área geométrica de 0.03 cm^2) por el aumento del flujo se empleó GA y se observó una disminución del PCA de 0.3 V (Figura 6), con una densidad de corriente máxima de $20 \mu\text{W cm}^{-2}$ a 0.29 V y una VF de 9 mL h^{-1} manteniéndose un desempeño constante de la celda de microflujo durante 15 días. Si bien la potencia y la densidad de corriente obtenidas aún son pequeñas para una aplicación práctica, la densidad de corriente se encuentran por encima de algunas reportadas por ejemplo: 1.38 a 18 mW cm^{-2} empleando la misma enzima pero un método de adsorción diferente, pero la potencia es baja en comparación a los $760 \mu\text{W cm}^{-2}$ reportado como máxima hasta el momento [13].

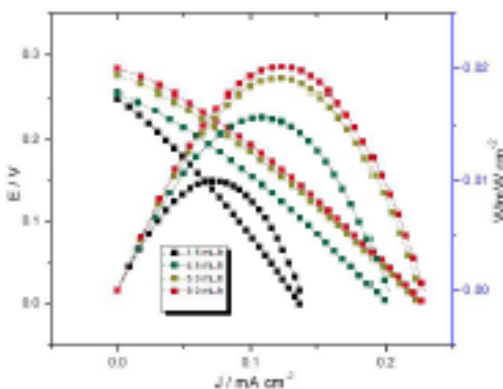


Figura 6. Curvas de descargas de GOx con GA a diferentes velocidades de flujo

4. Conclusiones

Se logró la inmovilización de la GOx sobre grafito por adsorción simple, con un tiempo de vida útil de hasta 72 h, con una cantidad de enzima adsorbida de $8.28947 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$. La señal voltamperométrica corresponde a la oxidación-reducción del cofactor FAD-FADH₂ la cual es una función inversa de la concentración de glucosa. La densidad de corriente máxima conseguida en la biocelda microfluidica cuando se empleó únicamente GOx fue de $6.2 \mu\text{W cm}^{-2}$ con un flujo de 9 mL h^{-1} . Al agregar GA como inmovilizador se mejoró el tiempo de vida útil del electrodo de Grafito/GOx hasta 4 semanas con una cantidad de GOx adsorbida de $1.61948 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ en media celda, y en la celda de microflujo se alcanzó una densidad de corriente de $20 \mu\text{W cm}^{-2}$ a 0.29 V a un flujo de 9 mL h^{-1} , con un tiempo de operación de hasta 15 días. Finalmente, los resultados preliminares con la PL-ly como agente inmovilizador son prometedores.

5. Agradecimientos

Se agradece a la Universidad Autónoma de Querétaro por la beca otorgada y se agradece a ANR-CONACYT por el financiamiento obtenido a través del proyecto 163114.

6. Referencias:

- [1] D. Imitaki, B. Branch, P. Atanassov, C. Apblet, *Electrochem. Commun.*, 8, 1204–1212 (2006).
- [2] W. C. Ming, W. K. Hei, C. Dong, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 78, 927–938 (2008).
- [3] Z. Zhu, C. Momen, M. Zakhartsev, U. Schwaneberg, *Biosensors and Bioelectronics* 2, 2046–2051 (2006).
- [4] Q. Wu, L. Wang, H. Yu, J. Wang, Z. Chen, *Chem. Rev.*, 111, 7855–7875 (2011).
- [5] Y-G. Zhou, S. Yang, Q-Y. Qian, X-H Xia, *Electrochem. Commun.*, 11, 216–219 (2009).
- [6] D. Wan, S. Yuan, G. L. Li, K. G. Neoh, E. T. Kang, *electrode Appl. Mater. Interf.*, 2, 3083-3091 (2010).
- [7] M. J. Gonzalez, J. P. Esquivel, D. Sanchez, P. Godignon, F. X. Muñoz, F. J. Campo, F. Giroud, S. D. Minteer, N. Sabaté, *Lab on a Chip*, 1-9 (2013).
- [8] G. Wang, N. M. Thai, S. T. Yan, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 2158–2164 (2007).
- [9] J. M. Goran, M. Mantilla, K. J. Stevenson, *Anal. Chem.* 85, 1571-1581. (2013).
- [10] W. C. Ming, W. K. Hei, C. X. Dong, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 78, 927–938 (2008).
- [11] K. Won, Y-H Kim, S. An, J. H. Lee, S. Park, Y-K Choi, J. H Kim, H-I Hwang, H. J. Kim, H Kim, S. H Lee, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 11, 1-9 (2013).
- [12] P. Wu, Q. Shao, Y. Hu, J. Jin, Y. Yin, H. Zhang, C. Cai, *Electroch. Act.*, 55, 8606–8614 (2010).
- [13] M. Holzinger, A. L. Goff, S. Cosmier, *Electrochem Act.* 82, 179-190. 2012.



SUPERIOR TEACHING
CENTRO DE ENSEÑANZA SUPERIOR DEL IDIOMA INGLÉS

A QUIEN CORRESPONDA:

El que suscribe Mtro. Jesús Manuel Salman Tagle, Director de éste Centro de Enseñanza Superior del Idioma Inglés, Superior Teaching, incorporado a la Secretaría de Educación como Centro de Capacitación para el Trabajo bajo la clave 32PBT0098G hace

C O N S T A R

Que Ricardo Antonio Escalona Villalpando presentó el examen TOEFL para valoración en nuestra Institución dando como resultado:

520 Puntos

Cabe mencionar que el resultado anterior corresponde a la siguiente formula:


LISTENING COMPREHENSION	51 PTS
WRITTEN EXPRESSION	52 PTS
READING COMPLEHENSSION	53 PTS

Se suman los puntos los cuales se dividirán entre tres para después multiplicarlos por diez.

Se extiende la presente a solicitud del interesado para los fines y usos legales inherentes al mismo.

Ciudad de Zacatecas a los veintiún días del mes de Julio del año 2014.

Atentamente


Mtro. Jesús Manuel Salman Tagle
Director General



SECRETARIA DE EDUCACION
CENTRO DE ENSEÑANZA
SUPERIOR DEL IDIOMA
INGLES
"SUPERIOR TEACHING"
CLAVE 32PBT0098G
ZACATECAS, ZAC

Calzada Francisco García Salinas No. 335 A, Zona Conurbana, Guadalupe, Zac. Tel. 9 98 01 80

Querétaro, Querétaro 5 de Junio del 2013

M. en C. Beatriz Del Rocío Verduzco Cuéllar

PRESENTE

Por medio de la presente nos dirigimos a usted agradeciendo la exposición impartida por el alumno de la Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental Ricardo Antonio Escalona Villalpando y titulada: *“Diseño de bioánodos a partir de la glucosa oxidasa (GOx) para su aplicación en biomicroceldas que usan glucosa como combustible”* impartida el día 28 de mayo del 2013.

Con la finalidad de dar a conocer las nuevas tendencias en biomateriales utilizados en microceldas de combustible.

Esperando que se continúe enriqueciendo el vínculo entre instituciones educativas.



Dr. Luis Gerardo Arriaga Hurtado
Coordinador de Sistemas
Electroquímicos de Energía
CIDETEQ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE FILOSOFÍA

Querétaro, Querétaro 03 de Junio del 2013

M. en C. Beatriz Del Rocío Verduzco Cuéllar
Coordinadora Académica y Administrativa Campus Aeropuerto
PRESENTE

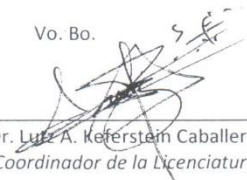
Por medio de la presente me permito informarle que el alumno Ricardo Antonio Escalona Villalpando, de la Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental, impartió el tema "Contaminación en agua y suelo; panorama actual y nuevas tecnologías para su tratamiento" en la Licenciatura en Desarrollo Humano para la Sustentabilidad. Dicha exposición se llevó a cabo como parte de la materia de Gestión Ambiental el día 22 de mayo del 2013, con una duración de dos horas.

Esta actividad contribuyó a cumplir el objetivo del alumno en el programa de difusión de la Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental y fortaleció el proceso de enseñanza - aprendizaje en la materia de Gestión ambiental.

Sin más por el momento quedo de usted en espera de seguir fortaleciendo el vínculo entre ambos programas educativos dentro de nuestra institución.

ATTE.


Dra. Mónica Ribeiro Palacios
Docente de la Materia

Vo. Bo. 
Dr. Luis A. Keferstein Caballero
Coordinador de la Licenciatura





SECRETARÍA
DE EDUCACIÓN



GOBIERNO DE
SOLUCIONES

La Secretaría de Educación del Poder Ejecutivo del Estado de Querétaro a través de su Consejo de Ciencia y Tecnología (CONCYTEQ) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

Otorgan la presente

Constancia

A Ricardo Antonio Escalona Villalpando

Facultad de Química

Por su participación como expositor en la 27ª Exposición de Ciencia y Tecnología del Estado de Querétaro (EXPOCYTEQ 2013) del 01 al 05 de octubre en el marco de la 20ª Semana Nacional de Ciencia y Tecnología.

Querétaro, Qro. 05 de Octubre del 2013

L.C. GABRIELA BERMEJO CHÁVEZ
Subdirectora Regional Centro Norte del CONACYT

ING. ANGEL RAMÍREZ VÁZQUEZ
Director General del CONCYTEQ



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Químicas
Instituto de Investigaciones en Físicoquímica de Córdoba
Departamento de Físico Química
Ciudad Universitaria, 5000 Córdoba,
FAX 54-351-4334188; TE 54-351-4334169/80
E-mail: grivas@mail.fcq.unc.edu.ar
ARGENTINA
Prof. Gustavo A. Rivas

INFIQC

CONICET
U N C

Córdoba, 2 de mayo de 2014

Para ser presentado ante quien corresponda-----

El Lic. Ricardo Antonio Escalona Villalpando ha trabajado en el INFIQC, Departamento de Físico Química, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba bajo mi dirección desde el 3 de marzo de 2014 al 2 de mayo de 2014. En ese período realizó tareas de investigación relacionadas con el desarrollo de nuevas estrategias de preparación de biosensores electroquímicos basados en el empleo de glucosa oxidasa, nanotubos de carbono de pared múltiple y óxido de grafeno funcionalizados no covalentemente.

El desempeño del Lic. Escalona fue muy bueno, demostrando una gran habilidad para enfrentar nuevos desafíos y para planificar y llevar adelante sus actividades; así como una notable integración al grupo. Personalmente, ha sido un placer trabajar con el Lic. Escalona.

Dr. Gustavo A. Rivas

Profesor Titular UNC

Investigador Superior CONICET



Escuela de Verano 2013
La Universidad Autónoma de Zacatecas
"Francisco García Salinas"
 a través de la **Secretaría Académica** y el
Sindicato del Personal Académico



Otorgan la presente

CONSTANCIA


A: **RICARDO ANTONIO ESCALONA VILLALPANDO**

Por su participación como **Asistente** del curso denominado

"Técnicas electroquímicas aplicadas a corrosión, producción y sistemas biológicos" (45 HRS)


impartido en el Marco de la Escuela de Verano UAZ-SPAUAZ 2013, del 17 de junio al 5 de julio, para los efectos de la cláusula 60 Fracción V párrafo segundo del Contrato Colectivo de Trabajo UAZ-SPAUAZ.


 Dr. Miguel Rodríguez Jaquez
 Secretario Académico UAZ


 M. en C. Raquel Jiménez Díaz
 Coordinadora de Docencia UAZ




 Dr. Antonio Guzmán Fernández
 Secretario General del SPAUAZ


 Dr. Tonatiuh Saucedo Anaya
 Coord. de Asuntos Académicos del SPAUAZ

Libro: 2 Hoja: 74 Folio: 10894

La Universidad Autónoma de Querétaro
a través del Centro de Estudios Académicos sobre
Contaminación Ambiental de la Facultad de Química

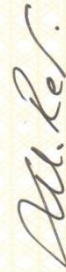
Otorgan la presente

CONSTANCIA

A: Ricardo Antonio Escalona Villalpando

Por su participación en el "Curso de Efectos Biológicos de Tóxicos"
de 40 h. impartido del 5 al 15 de Diciembre de 2012 en las instalaciones
de la Facultad de Química.

Santiago de Querétaro, Qro., 13 diciembre de 2012



Dr. Miguel Angel Rea López
Coordinador del CEACA



Dr. Robert H. Rice
Instructor



CEACA



La Universidad Politécnica de Aguascalientes y la Sociedad Mexicana del Hidrógeno otorgan el presente

RECONOCIMIENTO

a: **R.A. Escalona-Villalpando, M. Galván-Valencia, L.G. Arriaga-Hurtado, S.M. Durón-Torres, J. Ledesma-García.**

Por su valiosa participación con el tema

Inmovilización de la glucosa oxidasa para su evaluación como catalizador anódico en una biocelda microfluidica de glucosa.

XIII Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana del Hidrógeno

Realizado en la ciudad de Aguascalientes, Ags., del 29 de julio al 2 de agosto de 2013.



M. en C. Eulogio Monreal Ávila
Rector de la Universidad Politécnica de Aguascalientes



Dr. Javier Rodríguez Varela
Presidente de la Sociedad Mexicana del Hidrógeno



ABREVIATURAS

μW	Microwatts
3-AMP	3-mercaptopropiónico
A	Área geométrica del electrodo
Å	Armstrong
ASE	Área superficial electroactiva
Au	Oro
BCC	bioceldas de combustible
BCCE	bioceldas de combustible enzimáticas
BCCM	bioceldas de combustible microbianas
BCH-μF	Biocelda de combustible híbrida microfluídica
BF	Solución amortiguadora de fosfatos
BOD	Bilirrubin oxidasa
BQ	<i>p</i> -benzoquinona
C	Concentración del combustible
CC	Celdas de combustible
CDH	Celobiosa deshidrogenasa
CDH	Celobiosa deshidrogenasa
CS	Quitosan
CV	Carbón vítreo
DA	Dopamina
E^0	Potencial formal
ECS	Electrodo Calomel Saturado
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ENH	Electrodo normal de hidrógeno
F	Constante de Faraday
FAD	Flavín Adenín Dinucleótido
FADH₂	Flavín Adenín Dinucleótido (reducido)
Fc	Ferrocencarboxaldehído

FTIR	Espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier
FU	Combustible utilizado
GA	Glutaraldehído
GDH	glucosa deshidrogenasa
Gf	Electrodo de grafito
Glu	Glucosa
GOx	Glucosa Oxidasa
h	Horas
I	corriente
Ipa	Máximo pico anódico
Ipc	Máximo pico catódico
iso-OH	Iso-propanol
KH₂PO₄	Fosfato de potasio monobásico
Ks	constante de velocidad de la transferencia de electrones
Lc	lacasa
M	Molaridad
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mV	Molivolts
n	Número de electrones transferidos
Na₂HPO₄	Fosfato de sodio dibásico
NEC	Nanoesferas de carbono
NF	Nafion
NHC	Nanohojas de carbono
NHS	N-hidroxisuccinamida
NPsC	Nanopartículas de carbono
NTCMP	Nanotubos de carbono de multipared
PCA	Potencial a circuito abierto
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PEGDGE	Poli(ethilenglicol) diglucidileter
PEM	Proton Exchange Membrane

Poli-L-lisina	PLL
Pt	Platino
Q	Carga de la reacción de reducción u oxidación
s	Segundos
SF	Superficie de seda
STM	Scanning tunneling microscopy
TDE	Transferencia directa de electrones
TEM	Transferencia de electrones con mediador
UC	Unión covalente
V	Volts (voltaje)
VC	Voltamperometría cíclica
VCA	voltaje a circuito abierto
VPD	Voltametría de pulso diferencial
W	Watts (potencia)
α	coeficiente de transferencia de electrones
Γ	Promedio de enzima inmovilizada
ΔE_p	Separación de los picos de oxidación y reducción
ΔG	Energía libre de Gibbs