

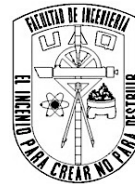
2015

Estudio electrocatalítico de la enzima lacasa
inmovilizada en estructuras de carbón tridimensional
para su aplicación en celdas microfluídicas.

**Autora: Ana Cristina
Martínez Maciel**



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería



TESIS

**“Estudio electrocatalítico de la enzima lacasa
inmovilizada en estructuras de carbón
tridimensional para su aplicación en celdas
microfluídicas”**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Ingeniero en Nanotecnología

Presenta:

Ana Cristina Martínez Maciel

Centro Universitario abril 2015



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Ingeniería en Nanotecnología



C.A. Abril de 2015.

Estudio electrocatalítico de la enzima lacasa inmovilizada
en estructuras de carbón tridimensional para su aplicación
en celdas microfluídicas.

Tesis para obtener el grado de:
Ingeniera en Nanotecnología

Presenta:
Ana Cristina Martínez Maciel

Director de la tesis: Dra. Minerva Guerra Balcázar

Co-director de la tesis: Dra. Janet Ledesma García

Sinodal: Dra. Vanessa Vallejo Becerra

RESUMEN

En este trabajo se evaluó a la enzima lacasa de *Trametes versicolor* inmovilizada en estructuras nano/micro porosas de carbón para desarrollar biocátodos que funcionen en una celda híbrida y una biocelda de combustible. Estos biocátodos fueron evaluados en configuración de media celda con la técnica electroquímica de voltamperometría cíclica. Primero la evaluación de la inmovilización de la Lc se realizó sobre materiales de carbón 2D carbón vítreo y carbón grafito y luego en estructuras 3D, nanofoam y toray; encontrando que estos materiales presentan alta capacitividad y es complicado identificar la reducción de la lacasa sin ayuda de mediadores. El método de inmovilización que se eligió fue el de inmersión por ser el que mejor definió el efecto de la reacción de reducción del oxígeno en presencia de la lacasa. También en media celda se hicieron adiciones de ABTS y de H₂O₂ para evaluar la bioelectroactividad de la lacasa dentro de las estructuras 3D en presencia y ausencia de oxígeno en el catolito, encontrando que existen competitividad por la reducción del oxígeno en presencia de peróxido.

Con la celda híbrida se obtuvieron resultados superiores respecto a otros reportados anteriormente en este tipo de celdas, siendo el de la celda con electrodos de toray el más alto, con valores de voltaje de 0.91 V, densidad de corriente de 33 $\mu\text{A cm}^{-2}$ y potencia de 17 mW cm^{-2} .

Por otro lado en la biocelda de combustible se obtuvieron resultados máximos de 0.44 V, 11 mA cm^{-2} y 2.7 mW cm^{-2} en nanofoam y 0.60 V, 0.35 mA cm^{-2} y 0.12 mW cm^{-2} en toray.

Por medio de los experimentos en celda completa se encontró que la incorporación de glutaraldehído como agente de entrecruzamiento favorece a evitar la lixiviación de las enzimas y los nanotubos de carbono favorecen la transferencia electrónica dentro de la estructura porosa, viéndose reflejado en una mejor eficiencia de las celdas tipo *air-breathing*.

Palabras clave: Lacasa, celda híbrida, biocelda, nanofoam, toray.

*Dedicada a mi familia y a aquellas personas que
siempre han sido mi apoyo incondicional.*

*I built my past as if it was going to lead me the next step for
self-enlightenment. I am building my present as if it is
going to take me to the best opportunity of my life.*

ACMM

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer el constante apoyo de Ricardo Escalona a lo largo de todo el desarrollo de la tesis que inclusive en nuestros días libres y vacaciones no dejabas de apoyarme, no lo habría logrado sin tu continua guía. También agradecer a mi comité de tesis: Dra. Minerva Guerra, Dra. Janet Ledesma y Dra. Vanessa Vallejo por su ayuda con la revisión de mi tesis y sus valiosos comentarios que siempre me han hecho mejorar. Al grupo de trabajo UAQ y CIDETEQ, donde cada uno me aportó ideas y aprendizajes muy valiosos para mi.

A mis mejores amigos Luis Adrián, Samantha, Liliana, Fernando y Selene por su apoyo emocional y formativo, sin mencionar el tiempo invertido juntos para conservar nuestra cordura durante nuestras respectivas carreras. Así como a mis nuevas amistades a lo largo de la universidad cuyos nombres me llevarían un par de hojas, pero que siempre conservo en mi mente.

A los amigos, compañeros y hermanos que encontré dentro de la carrera, a esta primera generación de Ingenieros en Nanotecnología que hicieron muy llevaderos estos casi cinco años dentro de la universidad con sus bromas, pláticas y todas las experiencias que pasamos juntos; así como a todos los involucrados en la creación de la carrera y en nuestro desarrollo dentro de ella.

A Rafael Quezada, la persona que sin importar cómo o dónde, me ha apoyado con su inspiración, atención y amor. Gracias también por tu comprensión durante mi tesis y tu ayuda incondicional en cada proyecto que logré.

Finalmente y muy importante, a mi familia que me impulsaron a creer que todo es posible si le pongo suficiente empeño; a mi mamá Tere por los buenos consejos, a mi papá Otho por su esfuerzo con mi educación y a mi hermana Diana por sus pláticas infinitas. Así mismo al resto de mi familia que aunque no todos están cerca, siempre han sido parte de mi desarrollo.

Tabla de contenidos	Página
1. Introducción.	12
2. Hipótesis.	14
3. Objetivos.	14
3.1. General.	14
3.2. Específicos.	14
4. Antecedentes	15
4.1. Nanotecnología y fuentes renovables de energía.	15
4.2. Enzimas.	16
4.2.1. Generalidades de las enzimas	16
4.2.2. Factores que afectan la actividad enzimática.	18
4.2.3. Métodos de inmovilización enzimática.	18
4.2.4. La lacasa (Lc) y sus aplicaciones.	22
4.3. Celdas de combustible.	25
4.3.1. Generalidades de las celdas de combustible.	25
4.3.2. Celdas de combustible microfluídicas.	26
4.3.2.1. Biológicas.	26
4.3.2.2. Híbridas.	28
4.3.2.3. Aplicaciones.	28
4.4. Mecanismos de transferencia electrónica (TE)	29
4.4.1. Transferencia electrónica directa.	31
4.4.2. Transferencia electrónica con mediadores.	32
4.5. Agentes que ayudan al desempeño de las celdas de combustible.	34
4.5.1. Materiales nano/micro porosos.	34
4.5.2. Nanotubos de carbono.	34
4.5.3. Otros agentes conductores.	35
4.5.4. Referencias.	35
5. Capítulo I - Configuración de media celda.	38

5.1. Metodología.	38
5.1.1. Preparación de los electrodos.	38
5.1.2. Inmovilización de la Lc en diferentes estructuras de carbón.	39
5.1.2.1. Tres metodologías de inmovilización física.	39
5.1.2.2. Uso de glutaraldehído 1% como agente de entrecruzamiento.	40
5.1.2.3. Uso de nanotubos de carbono para favorecer la TE.	40
5.2. Resultados y discusión.	40
5.2.1. Evaluación bioelectrocatalítica de los bioelectrodos.	40
5.2.1.1. Inmovilización con GA y NTC en electrodos de grafito y carbón vítreo.	41
5.2.1.2. Identificación de las señales de la Lc en electrodos de nanofoam y toray.	43
5.2.1.3. Usando mediador ABTS en solución.	45
5.2.1.4. Adiciones de ABTS con electrolito soporte BA saturado en N ₂ y O ₂ .	48
5.2.1.5. Adiciones de H ₂ O ₂ con electrolito soporte ABTS saturado en N ₂ y O ₂ .	50
5.3. Conclusiones preliminares.	56
5.4. Referencias.	57
6. Capítulo II - Celda híbrida de combustible.	59
6.1. Metodología.	59
6.1.1. Electrodeposición de oro (Au) en ánodo toray.	59
6.1.2. Preparación y aplicación de tintas electrocatalíticas en ánodos.	59
6.1.3. Inmovilización de la enzima Lc en nanofoam y toray.	59
6.1.4. Armado de la celda.	60
6.2. Caracterización electroquímica.	61
6.3. Resultados y discusión.	61
6.3.1. Evaluación del biocátodo en la celda híbrida air-breathing, en nanofoam.	61
6.3.2. Evaluación del biocátodo en la celda híbrida air-breathing, en toray.	63
6.4. Conclusiones preliminares.	69
6.5. Referencias.	70
7. Capítulo III - Biocelda de combustible.	71
7.1. Metodología.	71

7.1.1. Electrodepósito de Au en electrodos de nanofoam.	71
7.1.2. Inmovilización de la enzima Lc en nanofoam y toray.	71
7.1.3. Variaciones en la BCC.	71
7.2. Caracterización electroquímica.	71
7.3. Resultados y discusión.	72
7.3.1. Evaluación del biocátodo en la biocelda nanofluídica air-breathing, en nanofoam.	72
7.3.2. Evaluación del biocátodo en la biocelda nanofluídica air-breathing, en toray.	73
7.3.3. Variaciones en las condiciones estándar de la μ BCC.	75
7.4. Conclusiones preliminares.	78
7.5. Referencias.	79
8. Capítulo IV.	78
8.1. Conclusiones generales.	78
8.2. Anexos.	82
8.2.1. Voltametría.	82
8.2.1.1. Referencias.	84
8.2.2. Fotografías de los experimentos.	84
8.2.3. Perspectivas.	86
8.2.4. Abreviaturas.	87

Índice de figuras.

1. Representación esquemática del centro activo de una enzima.	17
2. Cinética enzimática Michaelis-Menten.	18
3. Representación esquemática de los métodos de inmovilización.	21
4. Esquema de las tecnologías de inmovilización.	22
5. Sitios activos de la Lc de <i>Trametes versicolor</i> .	23
6. Esquema del funcionamiento general de una CC.	25
7. Esquema general de una BCC.	27
8. Aplicaciones enzimáticas de la TE mediada.	30
9. Mecanismos de TE. (a) directa DTE y (b) con mediador MTE.	31
10. Mecanismo de TE directa de la Lc un electrodo.	32
11. Estructura del mediador ABTS en su forma reducida ($ABTS^{2-}$) y oxidada ($ABTS^{\cdot-}$).	33
12. Estructura gruesa de la Lc y mecanismo de TE mediada de Lc-ABTS.	33
13. Voltamperograma de la inmovilización Lc-GA en BA N ₂ , a dos ventanas de potencial y ambos comparados contra el perfil del electrodo de grafito.	42
14. Voltamperogramas Lc-GA-NTC en condiciones aerobias y anaerobias, e inmovilizado en carbón vítreo a dos ventanas de potencial.	43
15. Voltamperogramas a 10 mV/s. a) nanofoam y b) toray en BA N ₂ y O ₂ .	44
16. VC de la inmovilización por inmersión de Lc a 10 mV/s, en un electrolito de BA N ₂ y O ₂ .	45
17. Comparación Lc-GA-NTC/Nanofoam en ABTS N ₂ y O ₂ a dos concentraciones.	46
18. Voltamperograma Lc-GA-NTC/Toray en ABTS.	48
19. Voltamperograma de adiciones de ABTS a BA con un electrodo de Lc-GA-NTC/toray.	49
20. Voltamperograma de adiciones de H ₂ O ₂ a ABTS O ₂ con un electrodo de Lc-GA-NTC sobre nanofoam.	51
21. Voltamperograma de adiciones de H ₂ O ₂ a ABTS N ₂ con un electrodo de Lc-GA-NTC sobre nanofoam.	52
22. Voltamperograma de adiciones de H ₂ O ₂ a ABTS O ₂ con un electrodo de Lc-GA-NTC/toray.	54
23. Voltamperograma de adiciones de H ₂ O ₂ a ABTS N ₂ con un electrodo de Lc-GA-NTC/toray.	55
24. Esquema de una CC nanofluídica con respiradero.	60
25. Evaluación de Lc en el nanofoam en celda completa híbrida a diferentes flujos.	62

26. Lc-GA-NTC/nanofoam, a diferentes flujos.	63
27. Curvas de polarización correspondientes a la inmovilización de Lc-GA y Lc-GA-NTC con ánodo Au/Ag y flujo de 10mL hr ⁻¹ .	65
28. Voltamperograma de toray electrodepositado Au en 0.5 mM H ₂ SO ₄ a 50 mV s ⁻¹ .	66
29. Curva de polarización de inmovilización de Lc-GA-NTC/toray con ánodo Au/toray electrodepositado y flujo de 10 mL hr ⁻¹ .	67
30. Curva de polarización correspondiente a la BCC de Lc-Gox/nanofoam.	73
31. Curva de polarización correspondiente a la μBCC de Lc-Gox/toray.	74
32. Voltametría cíclica.	83
33. Acomodo de media celda.	84
34. Cambio de coloración al realizar las adiciones de ABTS.	85
35. Electrodepósito de Au a un electrodo de nanofoam.	85
36. Experimentos en celda completa con dos flujos.	86

Índice de tablas.

1. Evaluación de Lc en el nanofom en celda completa híbrida a diferentes flujos.	63
2. Resultados de la celda híbrida a diferentes flujos de entrada.	64
3. Desempeño de celdas de combustible híbridas reportadas que utilizan lacasa en el cátodo.	68
4. Resumen de la operación de la μ BCC en condiciones estándar en nanofoam y toray.	74
5. Variaciones de los reactivos de entrada de la μ BCC.	76
6. Variaciones en la mezcla de inmovilización de las enzimas para los electrodos de la μ BCC.	77

1. Introducción.

Dentro de las opciones para el aprovechamiento e implementación de fuentes alternativas de energía son varias, entre las que se encuentran el aprovechamiento de la energía química contenida en diversas sustancias por medio del uso de celdas de combustible (CC) que transforman el combustible a partir de la energía química en eléctrica. Las enzimas tienen un alto potencial de aplicación en CC como catalizadores por sus características intrínsecas como una alta actividad catalítica a pH cercano al neutro y temperatura ambiente, alta selectividad, bajo costo de producción y versatilidad (gran variedad de combustibles), pueden reutilizarse y la reacción no produce subproductos tóxicos (como el CO y CO₂). Sin embargo, tienen ciertas desventajas como la desnaturalización proteica, baja transferencia electrónica (TE), inactividad debida a ciertos iones y un ineficiente acoplamiento entre enzima y electrodo.

Las CC se diferencian la generación tradicional de energía en forma de calor de combustión, ya que funcionan combinando químicamente las moléculas de un combustible y un oxidante para producir la energía, prescindiendo de las ineficiencias y la contaminación de la combustión tradicional. Cuando la CC incorpora un elemento biológico en un electrodo (enzimas o bacterias) y uno abiótico en el otro se le llama celda de combustible híbrida (CCH) y cuando se utilizan enzimas en ambos electrodos se le llama biocelda de combustible (BCC). Este tipo de celdas tienen una alta aplicación en el área de producción de energía y dispositivos implantables; además de que el uso de biocatalizadores las hace muy atractivas desde el punto de vista ambiental y biomédico.

En BCC y CCH anteriormente reportadas, se utilizan mediadores redox para transferir los electrones entre el sitio activo de la enzima y la superficie del electrodo, sin embargo estos mediadores limitan la aplicación de las BCC como dispositivos implantables por la estabilidad y la toxicidad de estos. Es por ello que en la búsqueda de mejorar la TE directa, se utilizan como electrodos dos tipos de materiales de carbón nano/micro porosos, favoreciendo así el aprovechamiento de los electrones del sitio catalítico de la enzima al electrodo.

La tesis se divide en tres capítulos; en el capítulo uno se aborda la forma en que las enzimas se incorporan a los electrodos nano/micro estructurados por diversas metodologías y su análisis en

configuración de media celda. Se identifica a la Lc de forma electroquímica y se mencionan las ventajas de utilizar el agente entrecruzante glutaraldehído (GA) y los nanotubos de carbono (NTC) para favorecer la TE.

El segundo capítulo trata de los experimentos en una celda de combustible microfluídica (μ CC) híbrida utilizando en el cátodo a la Lc-GA-NTC, mientras que en el ánodo se usan dos materiales inorgánicos, Au y Au/Ag.

En el tercer capítulo aborda todo respecto a la BCC, los tipos de enzimas empleadas, las condiciones y las variaciones que se le pueden hacer a este tipo de dispositivos.

La combinación de entidades biológicas y dispositivos bioelectrónicos induce a un área multidisciplinaria de bioelectrónica, dentro de ello las BCC representan una forma interesante de generar energía en o para microdispositivos. Este estudio otorga evidencia acerca de las ventajas de inmovilizar enzimas en materiales de alta área superficial, además de que contribuirá en el estudio electrocatalítico de la Lc en la RRO y a la información actualmente reportada respecto al uso BCC y CCH incluyendo el concepto de CC nano/micro fluídicas que toman el oxígeno del aire.

2. Hipótesis.

La enzima Lc de *Trametes versicolor* inmovilizada con un agente entrecruzante dentro de estructuras tridimensionales de carbono de alta área superficial, favorecerá la reacción de reducción del oxígeno tomado del aire, mejorando el desempeño de una biocelda o celda híbrida que usa glucosa como combustible.

3. Objetivos.

3.1. General.

- Desarrollar y evaluar biocátodos basados en la enzima Lc para su aplicación dentro de una biocelda y una celda híbrida de combustible.

3.2. Específicos.

- Inmovilizar la enzima Lc dentro de dos tipos de estructuras de carbón nano/micro estructurado por diferentes metodologías, utilizando glutaraldehído como agente de entrecruzamiento.
- Incorporar nanotubos de carbón multipared junto con la enzima Lc, para favorecer la transferencia de electrones.
- Caracterizar electroquímicamente en media celda los electrodos de carbón nano/micro porosos con la enzima Lc inmovilizada, con y sin mediador y optimizar su desempeño en la reacción de reducción de oxígeno.
- Evaluar el desempeño de los biocátodos para la reacción de reducción de oxígeno en una celda de combustible híbrida y enzimática que usa glucosa como combustible.

4. Antecedentes.

4.1. Nanotecnología y fuentes renovables de energía.

La frase “*There’s plenty of room at the bottom*” (en español: "hay mucho espacio en el fondo") generalmente es considerada como el primer reconocimiento del potencial de Nanotecnología. El físico Richard Feynman en 1959 exteriorizó en una famosa conferencia la posibilidad de manipulación y control de la materia a pequeña escala. A partir de ello se aceleraron los novedosos avances en la ciencia de la nanoescala y la tecnología en el sector de energía.

En 2014, una publicación del *World Energy Outlook*, estimó que la producción global de energía se duplicará en los próximos veinte años. Dentro de esta cifra, se espera que la producción de energía renovable crezca en un 57 %. La mayor parte de las tecnologías de fuentes de recursos renovables, como celdas de combustible, celdas solares, hidrógeno como combustible, biotecnología y nuevos materiales, son todo un campo creciente y una industria de investigación, tecnología y fabricación. La ciencia en nanoescala y la tecnología acelerarán la puesta en práctica de esta nueva industria. Sin embargo, el mayor desafío es identificar las oportunidades únicas en la creación de una generación sustentable de energía, almacenamiento y distribución, ya que existe un desequilibrio en el uso de la energía fósil y energía de fuentes renovables.

Particularmente en México, el manejo de la investigación en energía es una de las cuestiones que definirán el curso de las reformas políticas en los años venideros. Las buenas noticias son que los productos emergentes proveerán mucho en el crecimiento económico.

En la actualidad, la demanda crece rápidamente para utilizar sistemas de energía que impulsen dispositivos cada vez más grandes. La investigación debe hacer un progreso substancial en la electroquímica y la ciencia de materiales para imitar y aumentar, el empleo y el suministro actual de energía, hasta que las técnicas de nano-producción se conviertan en procesos diarios en manufactura de materiales para el sector energético. Comparado con los materiales tradicionalmente usados en una sola estructura, los nanomateriales ofrecen propiedades únicas como alta área superficial, realzan la reactividad electroquímica y mejoran la eficacia y la flexibilidad estructural.

La comercialización de la nanotecnología ya ha comenzado, ha habido un aumento significativo de interés en materiales y tecnologías que contienen elementos nanométricos con funciones específicas, los cuales abarcarán todos los sectores industriales, desde electrónica hasta medicina. Las expectativas en el crecimiento del sector energía, sólo pueden ser comprendidas a través de aplicaciones cuya complejidad y especificaciones demanden esfuerzos estratégicos, integrados y multidisciplinarios.

4.2. Enzimas.

4.2.1. Generalidades de las enzimas.

Los enzimas son proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones químicas celulares. Los pesos moleculares de las proteínas enzimáticas oscilan desde unos 12 kD hasta más de un millón. Son muy eficaces como catalizadores ya que son capaces de aumentar la velocidad de las reacciones químicas más que cualquier catalizador artificial conocido, y además son altamente específicas (Ansari & Husain, 2011). Sin embargo, los enzimas pierden su actividad catalítica cuando sufren desnaturalización. Además, las enzimas, al igual que otras muchas clases de proteínas, presentan un centro activo a través del cual interactúan con las moléculas del sustrato (Talbert & Goddard, 2012), mediante un acoplamiento espacial y químico de interacciones débiles. Tanto la actividad catalítica como el elevado grado de especificidad química que presentan los enzimas residen en esta interacción específica entre el enzima y su sustrato.

El centro activo es una cavidad existente en la superficie del enzima que está cubierta interiormente por una serie de aminoácidos (**Figura 1**). En cuanto al resto de los aminoácidos que no forman parte del centro activo, tienen la función de mantener la conformación tridimensional catalíticamente activa del enzima.

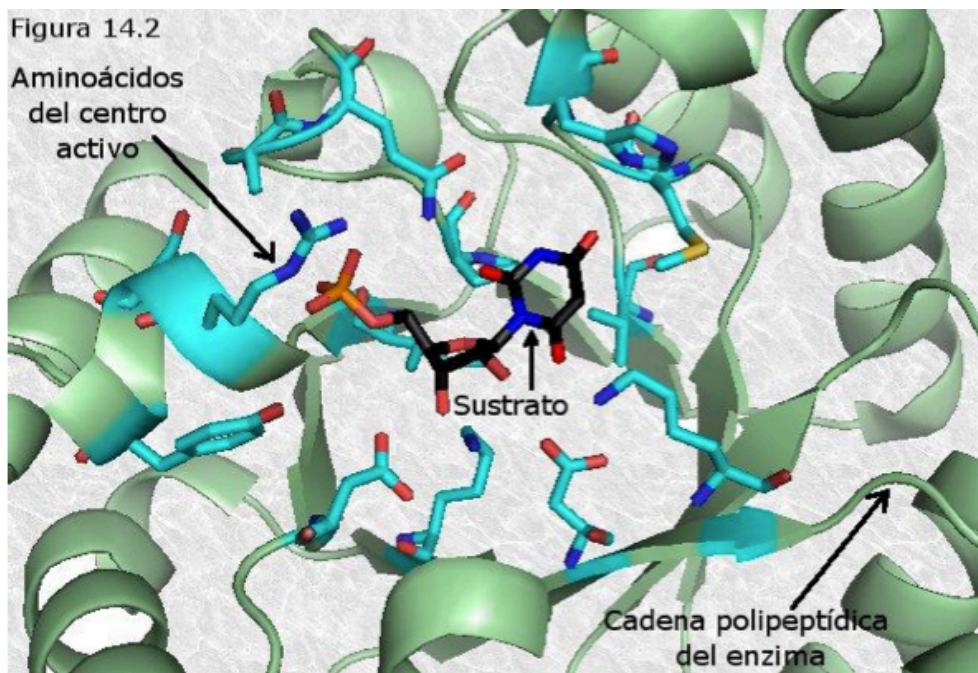


Figura 1. Representación esquemática del centro activo de una enzima.

Adaptado de <http://www.bionova.org.es>.

Las enzimas aumentan la velocidad de las reacciones químicas combinándose transitoriamente con los reactivos de manera que estos alcanzan un estado de transición con una energía de activación menor que el de la reacción no catalizada. Uno de los métodos desarrollados en el estudio de la cinética enzimática fue por Leonor Michaelis y Maud Menten, que en la actualidad sigue siendo de gran utilidad. Consiste en analizar como varía la velocidad de las reacciones catalizadas enzimáticamente en función de algunos parámetros experimentales como la concentración del sustrato o la de la propia enzima (**Figura 2**). En este método, cuando se mide la velocidad inicial de la reacción catalizada enzimáticamente se observa que para concentraciones de sustrato bajas la velocidad de reacción es proporcional a dicha concentración, pero a medida que la concentración de sustrato aumenta la velocidad de reacción deja de ser proporcional hasta que llega a ser totalmente independiente de la concentración del sustrato y se aproxima asintóticamente a un valor máximo que es característico de cada enzima y que se conoce como velocidad máxima (V_{max}). Entonces la enzima se halla saturada por el sustrato. La concentración de sustrato a la cual la reacción alcanza la mitad de su velocidad máxima se conoce con el nombre de constante de Michaelis-Menten (K_m). K_m es un valor característico de cada enzima y constituye una medida de la afinidad de la enzima por el

sustrato: valores bajos de K_m indican una alta afinidad mientras que valores altos representan una baja afinidad.

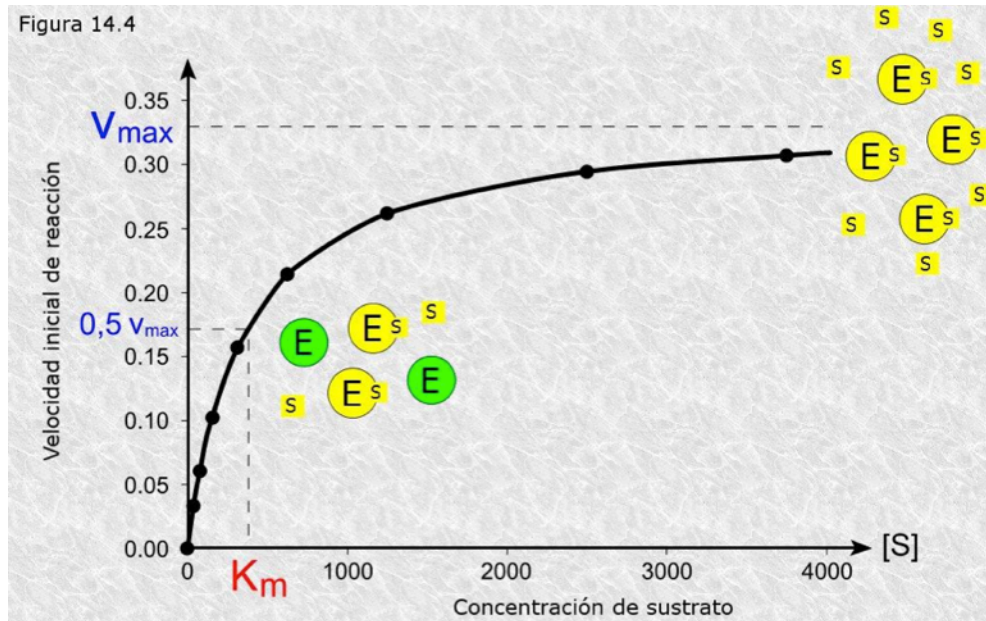


Figura 2. Cinética enzimática Michaelis-Menten.

Adaptado de <http://www.bionova.org.es>.

➤ Clasificación.

El sistema de clasificación enzimática divide a las enzimas en seis clases principales, cada una de las cuales se divide a su vez en subclases y éstas en sub-subclases atendiendo al tipo de reacción catalizada. Cada enzima es designada de tres modos: 1) un nombre recomendado, generalmente corto y apropiado para su uso habitual, 2) un nombre sistemático que identifica la reacción que cataliza, y 3) un número de clasificación, que se emplea cuando se precisa una identificación inequívoca de la enzima. En el número de clasificación EC, el primer dígito indica la clase a la que pertenece la enzima, el segundo dígito indica la subclase; el tercer dígito la sub-subclase y el cuarto dígito identifica inequívocamente a la enzima.

4.2.2. Factores que afectan la actividad enzimática.

➤ pH.

La mayoría de los enzimas presentan un pH óptimo para el cual su actividad es máxima; por encima o por debajo de ese pH la actividad disminuye bruscamente, con lo que se desnaturalizan y pierden su actividad. En la mayor parte de los casos el pH óptimo está próximo a la neutralidad, pero existen enzimas con pH óptimo muy diverso según sea el pH del medio en el que habitualmente actúan y algunas otras a las que el pH no les afecta en lo absoluto.

➤ **Temperatura.**

Al igual que ocurre con la mayoría de las reacciones químicas, la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas se incrementa con la temperatura. La variación de la actividad enzimática con la temperatura es diferente de unas enzimas a otras en función de la barrera de energía de activación de la reacción catalizada. Sin embargo, cuando se alcanza una temperatura crítica en una reacción enzimática se produce un brusco descenso de la actividad. Este efecto no es más que un reflejo de la desnaturalización térmica de la enzima.

➤ **Inhibición.**

Existen una serie de sustancias, llamadas inhibidores, que inhiben o anulan la acción de los enzimas sin ser transformados por ellos. La inhibición enzimática puede ser irreversible o reversible, esta última comprende a su vez tres tipos: inhibición competitiva (el inhibidor ocupa el centro activo), acompetitiva (el inhibidor afecta el complejo enzima-sustrato) y no competitiva (el inhibidor puede combinarse con el enzima libre o bien con el complejo enzima-sustrato) (Yang X. Y., Tian, Jiang, & Su, 2012).

4.2.3. Métodos de inmovilización enzimática.

El concepto de inmovilización enzimática representa un importante avance para las BCC. Dependiendo la naturaleza del apoyo, y las propiedades y la estabilidad de la biomolécula, varios métodos pueden ser usados para inmovilizar la enzima en un electrodo, recordando que el funcionamiento de TE depende fuertemente del procedimiento de inmovilización (Kjeang, Djilali, & Sintona, Microfluidic fuel cells: A review, 2008). Por lo general estos métodos conducen a la formación de una capa al azar orientada, sobre la superficie de un electrodo o en las cavidades

formadas debido a la porosidad de la matriz (Sheldon, 2007). De forma general, existen tres métodos de inmovilización (**Figura 3**).

1. Adsorción. La adsorción en un soporte es un proceso simple y reversible, permitiendo la reutilización tanto de enzimas como del soporte. Los sustratos son diferentes estructuras preformadas, como esponjas, fibras, hojas, espumas. La eficacia de esta inmovilización depende de las características fisicoquímicas de los procedimientos (como el valor de pH y la fuerza iónica) y soportes (como el tamaño de poro y la forma, así como propiedades hidrófilas e hidrófobas). Este proceso de adsorción puede ser usado para inmovilizar muchas proteínas activas. Sin embargo, la fácil lixiviación limita el desarrollo y su uso práctico y funcional en BCC.

2. Por atrapamiento. El atrapamiento a un soporte es un método prometedor para conservar las entidades biológicas, ya que las matrices poliméricas o inorgánicas son formadas directamente en la presencia de las enzimas. Las ventajas del método de atrapamiento incluyen un proceso de síntesis fácil, buena estabilidad, porosidad variable y buena resistencia al ataque microbiano. Además, las estructuras porosas generadas, por ejemplo con el método de sol-gel, pueden proporcionar un buen entorno acuoso y buena estabilidad fisiológica para la especie atrapada.

3. La unión covalente. Las enzimas activas son conectadas a un soporte (como nanoporos, nanopartículas o nanofibras) por enlaces covalentes. En general, la estabilidad de las enzimas puede ser mejorada por la unión covalente en el proceso. Sin embargo, la unión covalente de proteínas inmovilizadas muestra actividad catalítica inferior que las proteínas individuales, debido a las limitadas conformaciones manteniendo su actividad, en la interacción química con el soporte. El glutaraldehído (GA) es generalmente el agente de entrecruzamiento más usado porque es de bajo costo y comercialmente muy disponible. El GA es una molécula pequeña y reactiva que puede entrar en la estructura interna de una proteína y reaccionar con los residuos amino de la enzima. Si se usa muy poco reactivo entrecruzante, la enzima estará muy flexible en la estructura; mientras que si se usa en grandes cantidades se pierde la flexibilidad mínima que se requiere para conservar la actividad catalítica (Matijosyte, Arends, de Vries, & Sheldon, 2010).

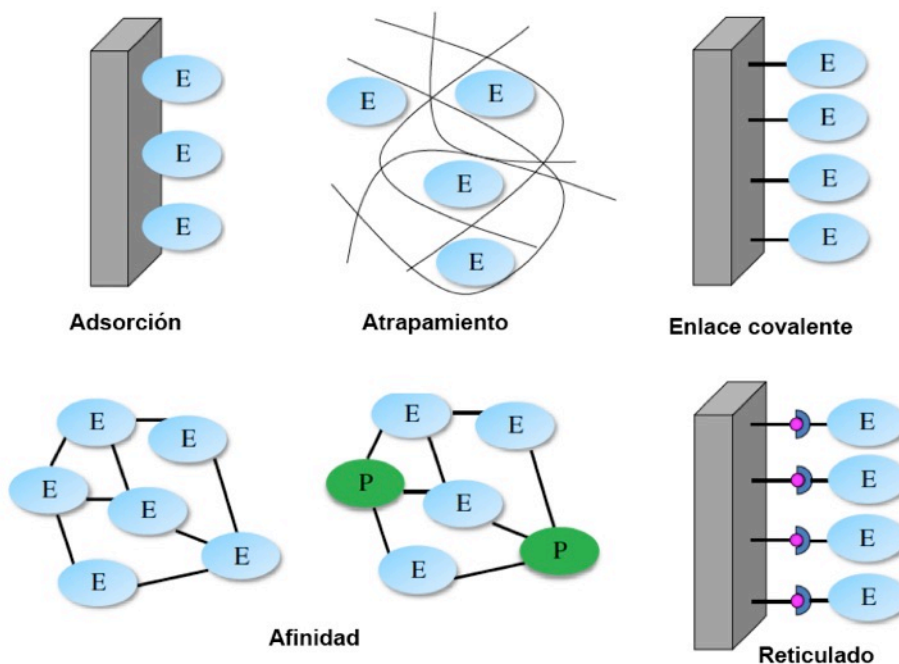


Figura 3. Representación esquemática de los métodos de inmovilización.

Adaptado de (Sassolas, Blum, & Leca-Bouvier, 2011).

Una configuración de electrodo óptimamente diseñada tiene que asegurar que la distancia de transferencia de electrones entre una biomolécula redox inmovilizada y la superficie del electrodo es hecha tan corta como posible. Además, la biomolécula inmovilizada debe tener una orientación apropiada, que también debería facilitar la comunicación entre el centro activo de la biomolécula y la superficie de electrodo. Para conseguir alta estabilidad de las enzimas inmovilizadas, lo más importante es el acoplamiento de tamaños entre el tamaño de poro y diámetro molecular de la enzima o complejo enzimático (Jungbae, Ji, & Wang, 2007); aunque también influye el pH del medio, el tipo de soporte y los grupos funcionales que contenga (Poulpiquet, Ciaccafava, & Lojou, 2013). Más particularmente, la inmovilización puede proteger la Lc de la desnaturalización por co-disolventes orgánicos, extendiendo así su vida media (**Figura 4**).

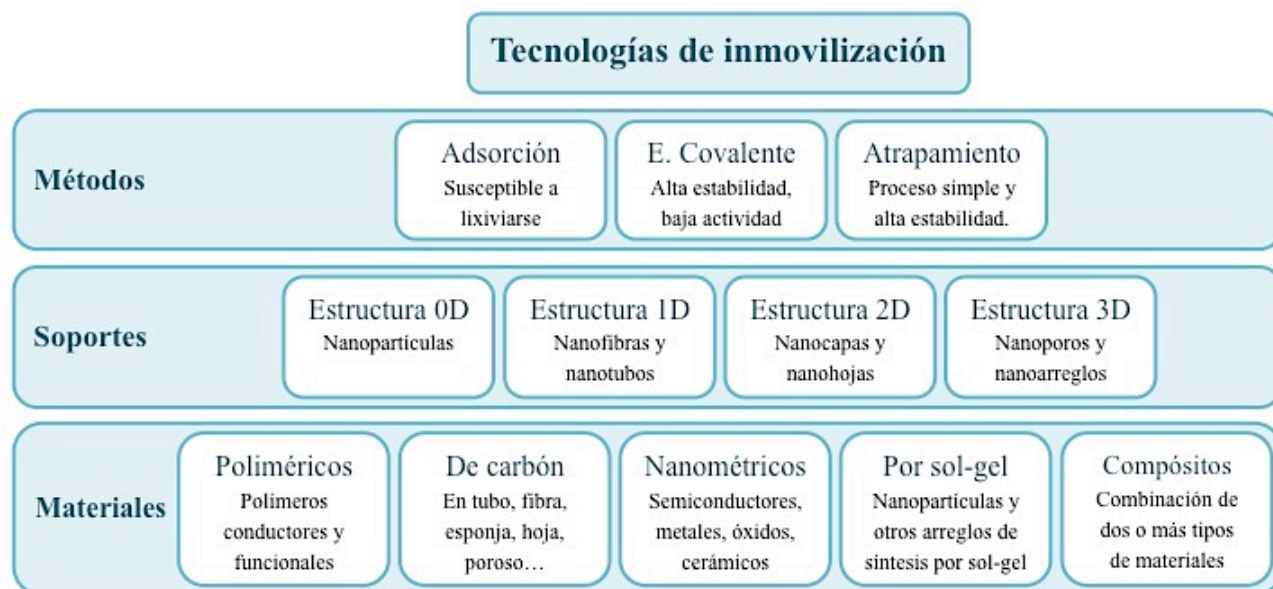


Figura 4. Esquema de las tecnologías de inmovilización.

Adaptado de (Yang X.-Y. , Tian, Jiang, & Su, 2012).

La técnica de entrecruzamiento de proteínas, vía reacción de un agente bifuncional como el GA, a los grupos NH₂ en la superficie de la proteína, fue inicialmente desarrollado por Doscher en 1963 (Doscher & F.M., 1963). Desde ese entonces se han investigado fuertemente las propiedades derivadas del entrecruzamiento para conservar la actividad y favorecer la estabilidad de una enzima inmovilizada.

4.2.4. La lacasa (Lc) y sus aplicaciones.

La primera Lc descrita fue en 1883, siendo una de las primeras enzimas descritas. Las Lc son enzimas oxidoreductasas multicobre que catalizan la oxidación de fenoles sustituidos, anilinas y tioles aromáticos con la reducción simultánea de oxígeno a agua. Las Lc han sido clasificadas en dos grupos conforme a su fuente, de planta y de hongos. Sin embargo algunas otras también han sido identificadas en la bacterias (Givaudan et al., 1993; Martins et al., 2002) e insectos (Barrett, 1991). Las funciones biológicas de la Lc se extienden desde la síntesis de quitina o lignina (en los insectos y plantas superiores, respectivamente), degradación de los ácidos húmicos y síntesis de melanina (en hongos) hasta a papeles relacionados con la pigmentación, resistencia de esporas y patogénesis (en bacterias). La característica clave de las Lc es el potencial redox estándar del sitio T1. En todas las

oxidasas multicobre se ha encontrado que la distancia entre el centro T1 y el sitio T2/T3 está en el rango entre 12 - 14 Å. Los valores de este potencial redox en diferentes tipos de Lc han sido encontrados estando entre 430 y 790 mV contra el electrodo normal de hidrógeno (NHE) (Shleeva, et al., 2005).

Por otro lado, el cobre es un elemento esencial en seres vivos, está presente en concentración de partes por millón. Es un cofactor clave en una serie de diversas reacciones biológicas redox y en el transporte de oxígeno (Lewis y Tolman, 2004). Un rasgo muy notable de las proteínas con cobre es que funcionan casi exclusivamente en el metabolismo de O₂ o compuestos NO_x y con frecuencia son asociados con la oxidación de radicales orgánicos/inorgánicos. Aunque el centro de cobre sea similar para todas las Lc, hay significativas diferencias en las propiedades termodinámicas y cinéticas observadas, dependiendo la fuente de la enzima (Freire, Pessoa, Mello, & Kubota, 2003).

La Lc de *Trametes versicolor* (E.C. 1.10.3.2) posee un tamaño aproximado de 6.5 x 5.5 x 4.5 nm y una masa molecular de 70 kDa (Shervedani & Amini, 2012). A partir de estudios espectroscópicos y cristalografía de rayos x se sabe que dentro de su estructura (**Figura 5**) posee cuatro átomos de cobre que se organizan en tres sitios: T1, T2 y T3. El cobre T1 se encuentra a unos 0.65 nm por debajo de la superficie de la enzima y los centros T2 y T3 se encuentran muy juntos y forman un clúster de cobre trinuclear (T2/T3). El sitio T2/T3 se encuentra a unos 1.2 nm dentro de la molécula. El cobre T1 está conectado al sitio T2/T3 trinuclear por un tripéptido de histidina-cisteína-histidina (Ivnitski & Atanassov, 2007).

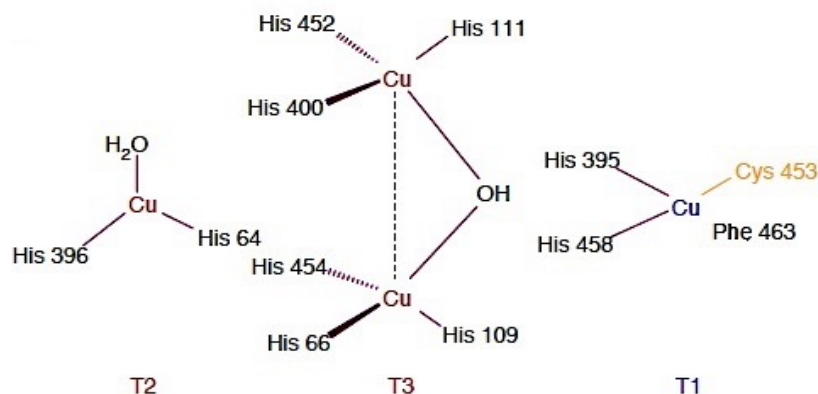
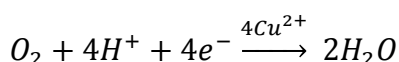


Figura 5. Sitios activos de la Lc de *Trametes versicolor*.

El mecanismo aceptado para la Lc sugiere que los electrones intramoleculares son transferidos desde el grupo donante al aceptor a través de un mecanismo de salto. Los iones de cobre contenidos dentro de la estructura de la proteína llevan a cabo las reacciones de transferencia de electrones al cambiar sus estados de oxidación entre Cu(II) y Cu(I). El T1 transfiere intramolecularmente los electrones desde el sustrato o mediador al clúster redox T2/T3. Luego, el T2/T3 desempeña un papel clave en la reducción del oxígeno a agua, ya que entre los dos átomos de cobre T3 hay un ligando de oxígeno, ya sea OH^- ó O^{2-} , que se coordina con los iones de cobre en el T2 y T3. Posteriormente, el oxígeno entra al clúster T2/T3 a través de cualquiera de dos canales en la molécula para que el centro de cobre trinuclear, totalmente reducido, reaccione con el oxígeno molecular para generar un peróxido intermediario y finalmente, el oxígeno molecular ser reducido a agua (Riva, 2006):



El sitio T1 es el aceptor de electrones producto del analito reducido, por lo tanto la Lc sólo reducirá analitos con potenciales similares o ligeramente mayores que el potencial redox del sitio T1 (García-Arellano, Fink, Muñoz-Hernández, Vacík, Hnatowicz, & Alfonta, 2014).

La gran especificidad por un sustrato, el uso de oxígeno molecular como aceptor de electrones y la generación de agua como único producto de reacción, son los responsables de la alta aplicabilidad de la Lc. Por su alta especificidad en los procesos de oxidar muchos compuestos (principalmente de tipo fenólico) pueden ser utilizadas para la desintoxicación de xenobióticos y residuos de aguas industriales, así como para el tratamiento biotecnológico de productos industriales y en la manufactura de plásticos, papel, colorantes, pesticidas y antioxidantes. En los hongos, las Lc catalizan reacciones de desmetilación, un importante paso inicial del proceso de biodegradación de la cadena de polimerización de la lignina, donde los productos de degradación son fenoles. Sin embargo en presencia de mediadores, las Lc también pueden intervenir en la oxidación de sustratos no fenólicos. En otra aplicación, las Lc se han inmovilizado en distintos tipos de soporte para la elaboración de bioelectrodos, con el fin de ser usados como biosensores o como componentes de una BCC.

4.3. Celdas de combustible.

4.3.1. Generalidades de las celdas de combustible.

Una CC genera energía eléctrica por medio de reacciones electroquímicas entre un combustible y un oxidante. Para acelerar las reacciones, son comúnmente usados catalizadores metálicos como el platino. En el lado de ánodo, el combustible es consumido y oxidado para liberar electrones que fluyen por un cable externo, mientras reducen el oxidante aceptando electrones en el cátodo. Para reducir al mínimo la mezcla de reactante, los compartimentos anódico y catódico son separados por una membrana protónica o iónica, comúnmente llamada membrana intercambiadora de protones PEM (por sus siglas en inglés) (**Figura 6**). Durante la operación de CC, los iones son transferidos por esta membrana y finalmente alcanzan el cátodo para completar la reacción. Una amplia gama de usos de las CC incluye el transporte, electrónica de uso doméstico, y sistemas de poder inmóviles. Por ejemplo, las CC pueden ser una fuente de poder para vehículos eléctricos como una alternativa limpia y eficiente a motores de combustión internos.

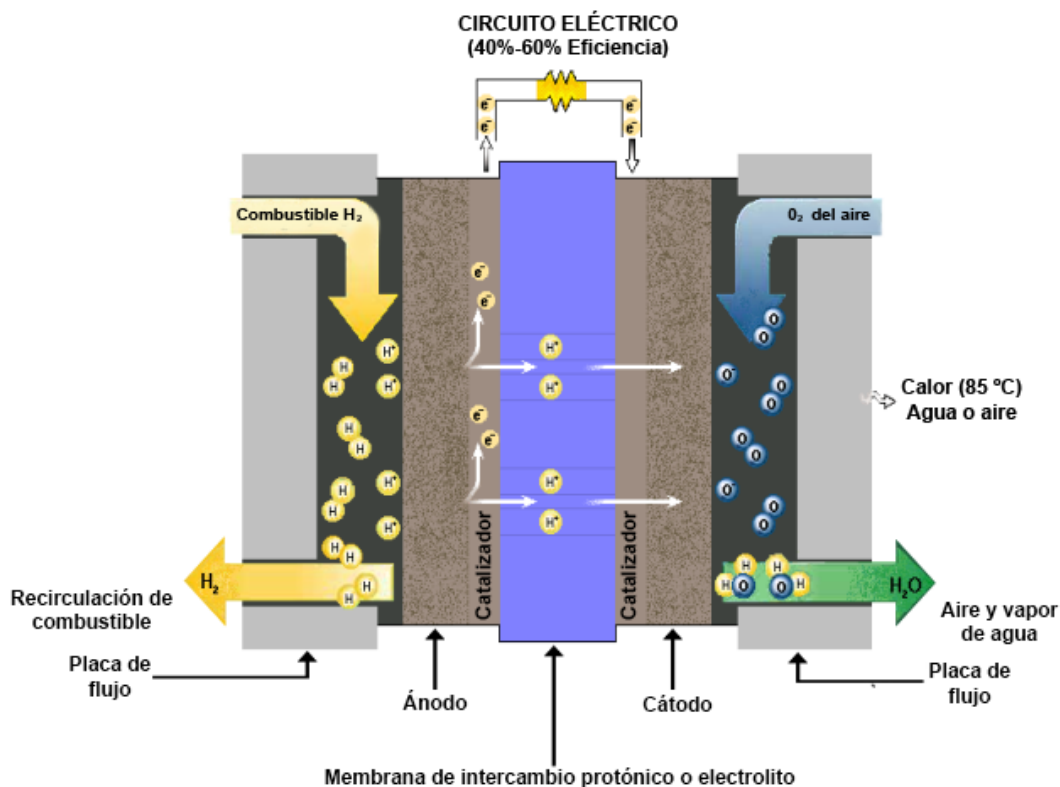


Figura 6. Esquema del funcionamiento general de una CC.

Cuando ambos electrodos son enzimáticos se le llama biocelda de combustible (BCC); mientras que si uno de los electrodos es de un material inorgánico y el otro enzimático se le llama celda de combustible híbrida (CCH). Las BCC y CCH usan a las enzimas como catalizadores para producir dicha energía eléctrica.

4.3.2. Celdas de combustible microfluídicas.

Una celda microfluídica (μ CC) se define como un dispositivo que incorpora los componentes fundamentales de una CC en un canal microfluídico y sus paredes. Las celdas microfluídicas o las celdas de flujo laminar, representan un tipo relativamente nuevo de tecnología basada en métodos y materiales de bajo costo que operan sin membrana y su configuración consigue que el microflujo laminar natural mantenga la separación suficiente entre el flujo del combustible y el flujo del oxidante (Kjeang, Raphaelle, Harrington, Djilali, & Sinton, 2008). Las celdas microfluídicas proveen ventajas únicas: el flujo del combustible y oxidante se pueden combinar en un mismo microcanal, con lo que se reduce la demanda de flujo y su estancamiento. Este tipo de celdas aprovechan el área superficial de los soportes nano/micro estructurados y así el combustible es oxidado por los catalizadores no sólo en la superficie, sino también en su interior, algunas celdas de este tipo han sido reportadas anteriormente (Zebda, et al., 2009), (Zebda, Gondran, Le Goff, Holzinger, Cinquin, & Cosnier, 2011), (Kjeang, Djilali, & Sinton, Microfluidic fuel cells: A review, 2008), (Lee & Kjeang, 2010), (Beneyton, Wijaya, Salem, Griffiths, & Taly, 2013)).

Hay otras que aprovechan el área interior de los electrodos, éstas se llaman celdas microfluídicas tridimensionales (μ CC) (Ortiz-Ortega, et al., 2014). Sin embargo, hay tres problemas principales para las enzimas como electrocatalizadores: (i) las enzimas son moléculas por lo general muy grandes, de modo que la densidad catalítica puede ser baja; (ii) los sitios catalíticamente activos por lo general están ocultos; y (iii) enzimas son a menudo inestables bajo ciertas condiciones ambientales de pH y temperatura, es decir, la durabilidad a largo plazo es difícil de alcanzar.

4.3.2.1. Biológicas - BCC.

Desde los años 1970, la investigación de electrocatálisis por enzimas ancladas a electrodos atrajo creciente atención sobre los estudios básicos del mecanismo catalítico y sus aplicaciones en BCC. Con los avances en la tecnología de inmovilización, sobre todo la ciencia de materiales, otras innovaciones fueron desarrolladas en el diseño de BCC a lo largo de los años 1980 y 1990.

Con estas características, las BCC podrían ocupar mercados tecnológicos importantes, por ejemplo como fuentes de poder implantables, o para sensores autoimpulsados. Una serie de avances incluyendo que las enzimas pueden ser inmovilizadas en un polímero conductor, o covalentemente adjuntas a materiales inorgánicos, o atrapadas por el método de sol-gel han sido reportados. Progresos más recientes en BCC han usado electrodos con materiales de carbón de alta área superficial para aumentar la corriente catalítica.

El compartimento anódico consiste en un bioelectrodo con entidades biológicas activas, que oxida el sustrato de combustible, transfiriendo los electrones al electrodo. El compartimento catódico incluye un bioelectrodo con entidades biológicas activas que reducen el combustible oxidante, transfiriendo electrones del electrodo al oxidante. El flujo de electrones por el circuito externo es acompañado por el transporte de protones por el electrolito (**Figura 7**).

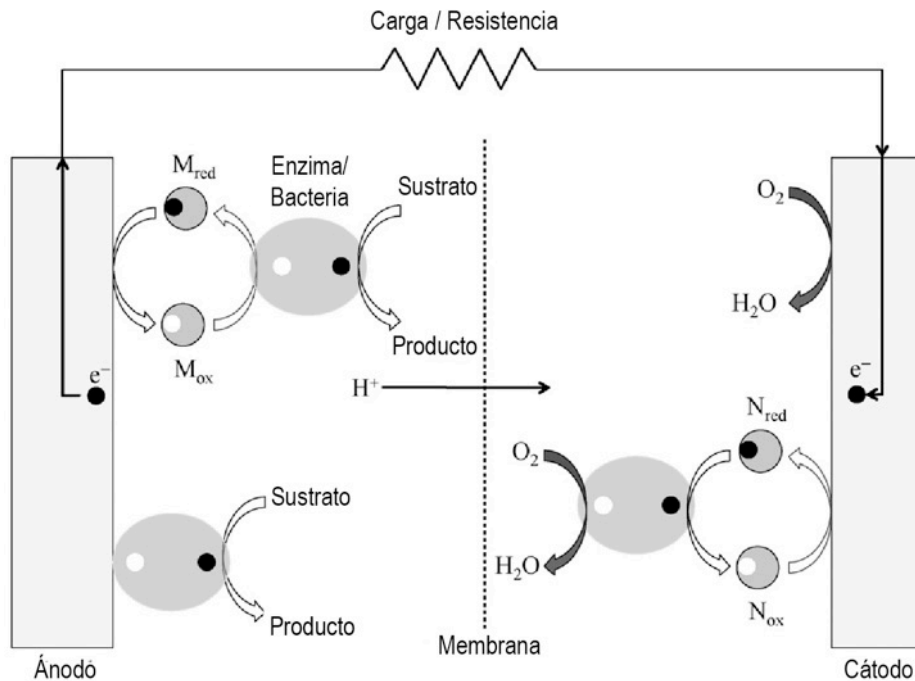


Figura 7. Esquema general de una BCC.

Adaptado de (Osman, Shah, & Walsh, 2011).

Las BCC generalmente son divididas en dos categorías: BCC microbianas y BCC enzimáticas. Las BCC microbianas emplean células vivas para catalizar la oxidación de combustibles en la superficie de ánodo de la BCC. Tienen la superioridad de ser capaces de catalizar la oxidación completa de biocombustibles y tener la vida útil larga (hasta 3-5 años), pero tiene densidad de potencia baja (0.0010 - 0.09 mW cm). Las BCC enzimáticas emplean enzimas para catalizar la oxidación de combustibles en la superficie de ánodo. Tienen la ventaja de que presentan densidades de potencias más altas (1.65 - 4.1 mW cm), pero son limitadas por la oxidación incompleta de combustible y la baja vida útil.

4.3.2.2. Híbridas - CCH.

La tecnología BCC tiene varias ventajas sobre las CC basada en catalizadores nobles metálicos, como la posibilidad de funcionar en temperaturas ambientes o en condiciones fisiológicas, la flexibilidad de combustible, y el empleo de un catalizador limpio y renovable. Para mejorar la tasa de transferencia de electrones entre la enzima y la superficie de electrodo, la tendencia se fue al diseño de electrodos que incluyen la incorporación de partículas inorgánicas en la estructura del bioelectrodo (Soukharev, Mano, & Heller, 2004). La integración de nanopartículas metálicas y biomoléculas puede resultar en nanobiomateriales híbridos con nuevas propiedades, mejorando el contacto eléctrico con los sitios activos de la enzima. Este tipo de dispositivos es la llamada CCH, análoga en componentes a una BCC, donde puede que el ánodo y/o el cátodo incorporen materiales inorgánicos. De esta forma combinan las mejores propiedades de ambos tipos de catalizadores, en general aumentando las propiedades electroquímicas (Aquino Neto, Almeida, Palma, Minteer, & Andrade, 2014).

Anteriormente ejemplos de CCH han sido reportados por (Soukharev, Mano, & Heller, 2004), (Higgins, Lau, Atanassov, Minteer, & Cooney, 2011), (Aquino Neto, Almeida, Palma, Minteer, & Andrade, 2014) y (López-González, et al., 2014).

4.3.3. Aplicaciones.

Las BCC operando con combustibles de alta densidad energética tienen el potencial para hacer funcionar dispositivos portátiles electrónicos, aunque las densidades de potencia actuales están todavía lejanas de las objetivo. El uso *in vivo* de las BCC, para impulsar pequeños dispositivos implantables o como biosensores, son más prometedores a corto plazo debido a su demanda energética baja. Sin embargo el tiempo de vida aún es una problema fundamental.

4.4. Mecanismos de transferencia electrónica (TE).

Por lo general, la TE ocurre de forma natural en muchos organismos a través de la energía de activación. Más específicamente, en electroquímica la TE entre los analitos y la superficie de un electrodo es un proceso fundamental de análisis y, dentro de la electroquímica, las moléculas redox como las proteínas, conforman un campo que ofrece un gran potencial para aplicaciones. Estas moléculas con TE mediada o directa son fenómenos fundamentales, no sólo en procesos celulares, pero también en las reacciones de interés biotecnológico (**Figura 8**). El marco teórico de la TE de forma biológica es cada vez mejor entendido, de forma que varias propiedades de los centros redox biológicos, como reacciones muy selectivas, pueden ser aprovechadas en dispositivos que realizan reacciones de importancia biológica y tecnológica. Entre las enzimas electrocatalíticamente activas, las Lc y peroxidasas son de especial interés. La diferencia fundamental entre un mecanismo mediado y uno directo es que para definirse como mediador es indispensable que esta molécula presente oxidación y reducción del sustrato de la lacasa.

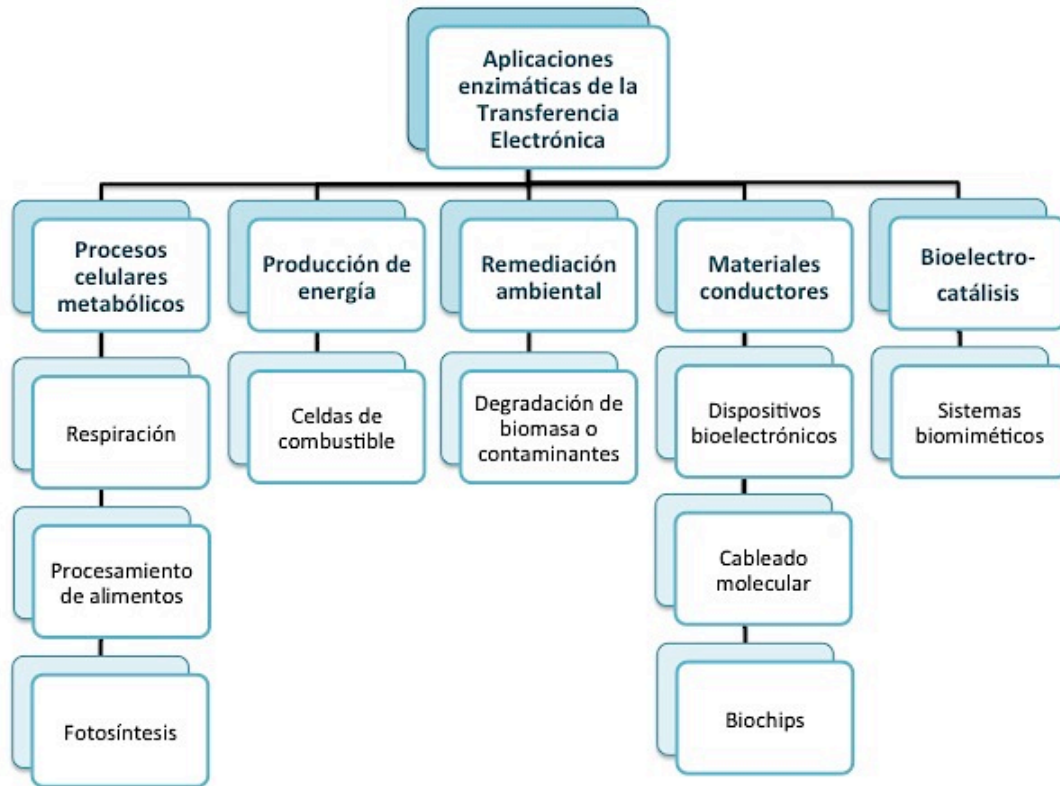


Figura 8. Aplicaciones enzimáticas de la TE mediada.
Adaptado de (Freire, Pessoa, Mello, & Kubota, 2003).

La TE directa en la Lc de forma directa es complicada debido a que la inmovilización puede colocar los centros de cobre en posiciones distintas (Trohalaki, Pachter, Luckarift, & Johnson, 2012). La alternativa más común es hacer uso de ciertos compuestos de pequeño peso molecular, que actúan como mediadores redox, que amplían la actividad catalítica de la Lc y facilitan el transporte de electrones desde el sitio activo de la enzima a la superficie del electrodo (Talbert & Goddard, 2012) En la **Figura 9** se ilustran los dos tipos de TE para las enzimas.

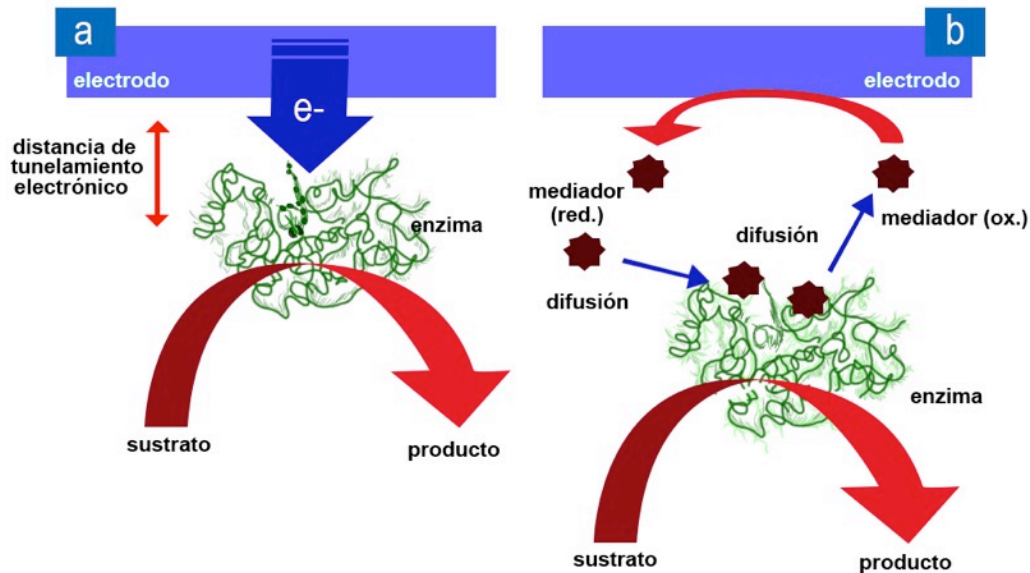


Figura 9. Mecanismos de TE. **(a)** directa DTE y **(b)** con mediador MTE.
 Adaptado de (Barton, Gallaway, & Atanassov, 2004).

4.4.1. Transferencia electrónica directa (DTE).

Varias enzimas son capaces de catalizar de forma directa (sin mediador) las reacciones. A este fenómeno se le llama bioelectrocatalisis. Los rasgos principales que caracterizan la TE sin mediador, están asociados con: (i) la TE del electrodo a la molécula de sustrato, o viceversa vía el sitio activo de la enzima; y (ii) la naturaleza catalítica del proceso entero (Ghindilis, 2000) (**Figura 10**). En el caso de bioelectrocatalisis la enzima reduce catalíticamente el sobrevoltaje, que en términos de energía, esto reduce la energía de activación para la transformación electroquímica del sustrato en un producto.

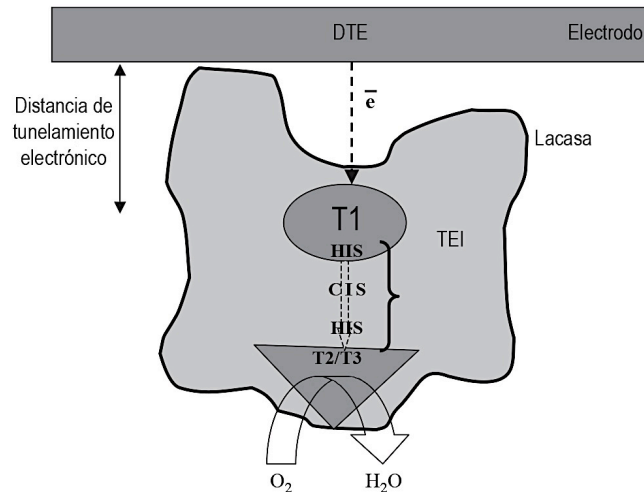


Figura 10. Mecanismo de TE directa de la Lc un electrodo.

Tomado de (Shleevea, et al., 2005).

En principio hay dos acercamientos experimentales respecto a si la TE directa ocurre entre las enzimas redox y los electrodos: 1. Pruebas indirectas basadas en la observación de la corriente de respuesta catalítica en presencia del sustrato. 2. Prueba directa de observación de actividad electroquímica independiente del cofactor redox en el sitio activo en ausencia del sustrato (Qiu, Xu, Huang, Ding, Qu, & Gao, 2008).

4.4.2. Transferencia electrónica con mediadores.

Los mediadores ayudan en la oxidación de sustratos complejos que no entran en el sitio activo debido a impedimentos estéricos o alto potencial redox, formando radicales más o menos estables para luego difundir los electrones (Ivnitski & Atanassov, 2007). Típicamente son colorantes orgánicos o complejos organometálicos que pueden estar en solución o inmovilizados junto con la enzima en el electrodo. Como es sabido, la tasa de TE depende de la distancia de tunelamiento (Kuznetsov, Shumakovich, Koroleva, & Yaropolov, 2001). Lamentablemente, los mediadores redox usados con enzimas redox facilitan no sólo la TE entre el electrodo y la enzima, sino también favorecen varias reacciones no deseadas (Freire, Pessoa, Mello, & Kubota, 2003). Uno de los más ampliamente utilizados con la Lc, es el ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS)) (Figura 11, 12).

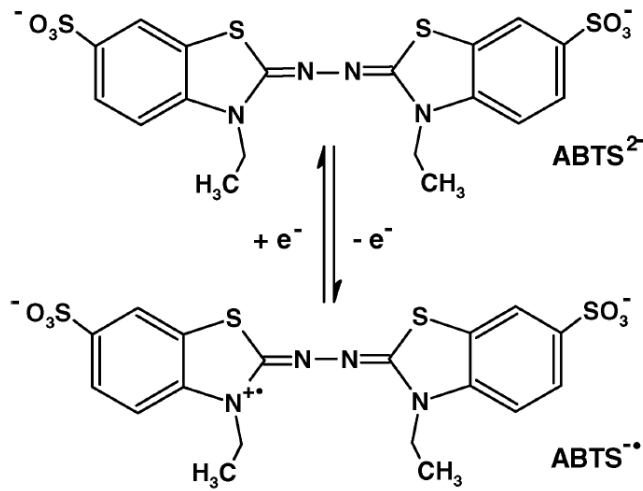


Figura 11. Estructura del mediador ABTS en su forma reducida ($ABTS^{2-}$) y oxidada ($ABTS^{\bullet-}$). Tomado de (Barton, Gallaway, & Atanassov, 2004).

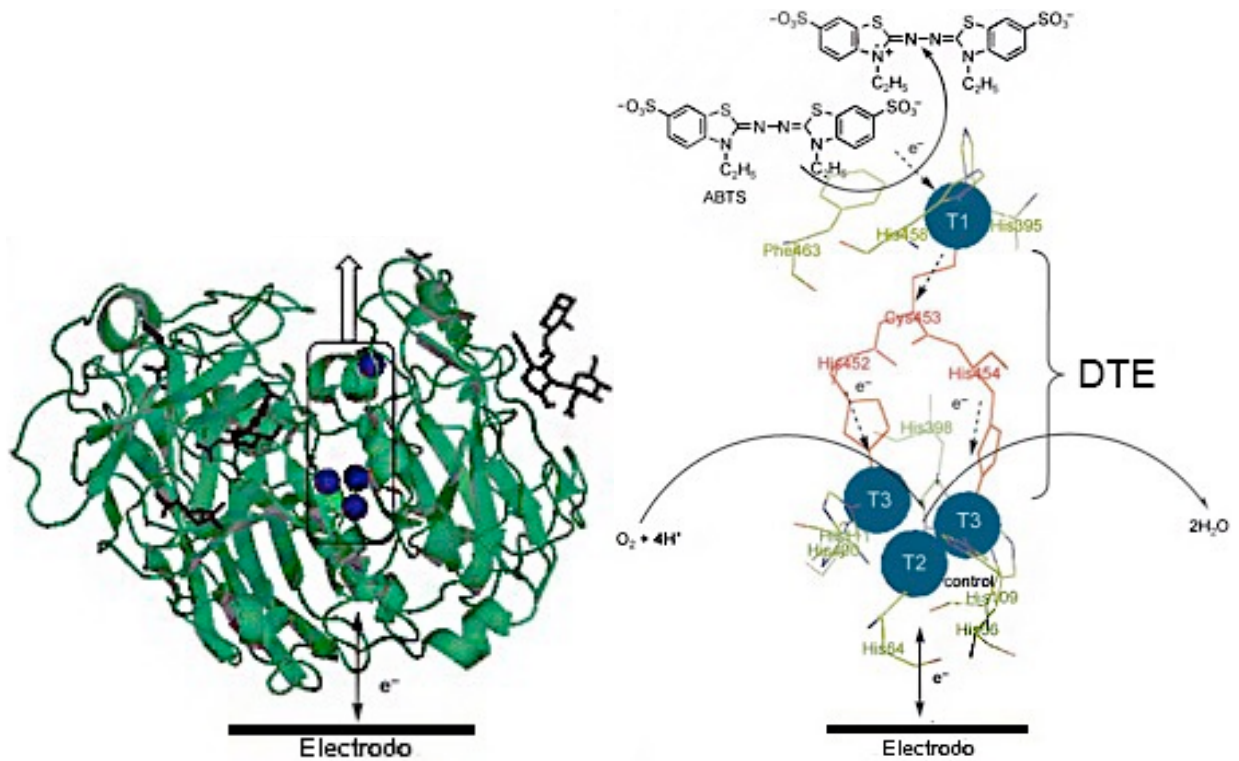


Figura 12. Estructura gruesa de la Lc (a) Mecanismo de TE mediada de Lc-ABTS (b).

4.5. Agentes que ayudan al desempeño de las celdas de combustible.

4.5.1. Materiales nano/micro porosos.

Los materiales nanoporosos poseen altas áreas superficiales, porosidad variable y específica, interconectividad y superficie e interior químico susceptible a ser modificados. Estos materiales son una gran promesa, en biocatálisis y en procesos de bioadsorción/bioseparación, donde requieren regiones de confinamiento y de difusión. El soporte en el que se inmovilizan enzimas, para fines de CC, suele ser de grafito o carbón vítreo, sin embargo para que sea un electrodo funcional se debe equilibrar el transporte en tres fases diferentes: la fase gaseosa (la fuente de sustrato), la fase acuosa (donde se libera el agua del producto y el transporte iónico se lleva a cabo), y la fase sólida (donde se produce el transporte electrónico). Los avances más recientes involucran no sólo inmovilizar en la superficie de estos materiales, sino dentro de ellos, para así conseguir electrodos nano/micro estructurados, que pueden ser utilizados en CC. Las paredes de carbón conductoras sirven como colectores de corriente 3D mientras que la red porosa facilita el transporte molecular e iónico de los reactivos necesario para el funcionamiento de la BCC (Prasad, Chen, & Chen, 2014). El toray tiene grosor de 260 μm , densidad de 0.49 g cm^{-3} y 78% de porosidad (Kjeang, Proctor, Brolo, Harrington, Djilali, & Sinton, 2007), mientras que el nanofoam tiene una capacitancia específica de aprox. 40 $F g^{-1}$, espesor de 100 μm y tamaño de poro de 50 nm (Lytle, et al., 2011).

4.5.2. Nanotubos de carbono.

Los nanotubos de carbono (NTC) generalmente son considerados como un cilindro de grafeno, formado por una hoja sola o varias hojas de grafeno, a lo largo de un vector (Zheng, Li, Su, Yan, Zhang, & Mao, 2006). Esta clase de nanomateriales puede representar un nuevo tipo de material a base de carbón y poseer propiedades únicas estructurales y electrónicas, distintas de otras clases de materiales a base de carbón comúnmente usados en la electroquímica, como el carbón vítreo (CV), el grafito pirolítico, el fullereno y el diamante. Además de sus usos potenciales en otros campos industriales y de investigación, las propiedades únicas de los NTC los han dotado con excelentes propiedades electroquímicas que son útiles para estudios electroanalíticos, como la electrocatálisis, la electroquímica de proteínas, sensores electroquímicos y biosensores. Sin embargo, los NTC se tiende

a agregar, siendo relativamente difíciles de separar y lo que los hace poder dispersarse homogéneamente en la mayor parte de solventes, debido a la fuerte interacción de Van der Waals entre nanotubos. Tal propiedad ha dado dificultado su manipulación y ha obstaculizado sus usos potenciales.

4.5.3. Otros agentes conductores.

Las nanopartículas metálicas tienen dimensiones similares a las de las biomoléculas, como las enzimas. Las nanopartículas que muestran propiedades electrónicas y catalíticas únicas, combinadas con biomateriales, que muestran reconocimiento catalítico único y propiedades de inhibición, forman nano biomateriales híbridos funcionales de propiedades sinérgicas útiles. Por ejemplo, el empleo de nanopartículas de Au y de Ag favorece a la TE, y funciona sin necesidad de mediadores.

Hay varios ejemplos acertados de comunicación eléctrica muy eficiente observada por la incorporación de enzimas sobre nanoplacas asociadas a los electrodos y otros de nanohojas como el grafeno han mostrado eficiente TE entre los biositios redox y el electrodo.

4.6. Referencias.

- Ansari, S. A., & Husain, Q. (2011). Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnology Advances*, 12.
- Aquino Neto, S., Almeida, T., Palma, L., Minter, S., & Andrade, A. (2014). Hybrid nanocatalysts containing enzymes and metallic nanoparticles for ethanol/O₂ biofuel cell. *Journal of Power Sources*, 25-32.
- Barton, S. C., Gallaway, J., & Atanassov, P. (2004). Enzymatic Biofuel Cells for Implantable and Microscale Devices. *Chemical Reviews*, 26-32.
- Beneyton, T., Wijaya, P. M., Salem, C. B., Griffiths, A. D., & Taly, V. (2013). Membraneless glucose/O₂ microfluidic biofuel cells using covalently bound enzymes. *Chemistry Communications*, 16.
- Freire, R. S., Pessoa, C. A., Mello, L. D., & Kubota, L. T. (2003). Direct Electron Transfer: An Approach for Electrochemical Biosensors with Higher Selectivity and Sensitivity. *J. Braz. Chem. Soc.*, 230-243.
- García-Arellano, H., Fink, D., Muñoz-Hernández, G., Vacíck, J., Hnatowicz, V., & Alfonta, L. (2014). Nuclear track-based biosensors with the enzyme laccase. *Applied Surface Science*, 66-76.
- Ghindilis, A. (2000). Direct electron transfer catalysed by enzymes: application for biosensor development. *Biochemical Society Transactions*, 84-89.

- Higgins, S. R., Lau, C., Atanassov, P., Minteer, S. D., & Cooney, M. J. (2011). Hybrid Biofuel Cell: Microbial Fuel Cell with an Enzymatic Air-Breathing Cathode. *ACS Catalysis*, 994-997.
- Ivnitski, D., & Atanassov, P. (2007). Electrochemical Studies of Intramolecular Electron Transfer in Laccase from *Trametes versicolor*. *Electroanalysis*, 2307 – 2313.
- Jungbae, K., Ji, H., & Wang, P. (2007). Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells. *Biotechnology Advances*.
- Kjeang, E., Djilali, N., & Sinton, D. (2008). Microfluidic fuel cells: A review. *Journal of Power Sources*, 17.
- Kjeang, E., Proctor, B. T., Brolo, A. G., Harrington, D. A., Djilali, N., & Sinton, D. (2007). High-performance microfluidic vanadium redox fuel cell. *Electrochimica Acta*, 4942-4946.
- Kjeang, E., Raphaele, M., Harrington, D. A., Djilali, N., & Sinton, D. (2008). A Microfluidic Fuel Cell with Flow-Through Porous Electrodes. *Journal of American Chemical Society*, 4000-4006.
- Kuznetsov, B., Shumakovich, G., Koroleva, O., & Yaropolov, A. (2001). On applicability of laccase as label in the mediated and mediatorless electroimmunoassay: effect of distance on the direct electron transfer between laccase and electrode. *Biosensors & Bioelectronics*, 73-84.
- Lee, J. W., & Kjeang, E. (2010). A perspective on microfluidic biofuel cells. *AIP Biomicrofluidics*, 13.
- López-González, B., Dector, A., Cuevas-Muñiz, F., Arjona, N., Cruz-Madrid, C., Arana-Cuenca, A., y otros. (2014). Hybrid microfluidic fuelcell based on Laccase/C and AuAg/C electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 221-226.
- Lytle, J. C., Wallace, J. M., Sassin, M. B., Barrow, A. J., Long, J. W., Dysart, J. L., y otros. (2011). The right kind of interior for multifunctional electrode architectures: carbon nanofoam papers with aperiodic submicrometre pore networks interconnected in 3D. *Energy & Dynamic Environmental Science*, 1913-1925.
- Matijosyte, I., Arends, I., de Vries, S., & Sheldon, R. A. (2010). Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 142-148.
- Ortiz-Ortega, E., Goulet, M. A., Lee, J. W., Guerra-Balcázar, M., Arjona, N., Kjeang, E., y otros. (2014). A nanofluidic direct formic acid fuel cell with a combined flow-through and air-breathing electrode for high performance. *Lab On a Chip*.
- Osman, M., Shah, A., & Walsh, A. (2011). Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part I: Enzymatic cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 3087-3102.
- Poulpiquet, A. d., Ciaccafava, A., & Lojou, E. (2013). New trends in enzyme immobilization at nanostructured interfaces for efficient electrocatalysis in biofuel cells. *Electrochimica Acta*, 11.
- Prasad, K. P., Chen, Y., & Chen, P. (2014). Three-Dimensional Graphene-Carbon Nanotube Hybrid for High- Performance Enzymatic Biofuel Cells. *Appl. Mater. Interfaces*, 3387-3393.
- Qiu, H., Xu, C., Huang, X., Ding, Y., Qu, Y., & Gao, P. (2008). Adsorption of Laccase on the Surface of Nanoporous Gold and the Direct Electron Transfer between Them. *Journal of Physics Chemistry*, 14781-14785.
- Riva, S. (2006). Laccases: blue enzymes for green chemistry. *TRENDS in Biotechnology*, 8.

- Sassolas, A., Blum, L. J., & Leca-Bouvier, B. D. (2011). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advance*.
- Shleeva, S., Jarosz-Wilkolazkab, A., Khaluninac, A., Morozovac, O., Yaropolovc, A., Ruzgasd, T., y otros. (2005). Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes. *Bioelectrochemistry*, 115-124.
- Sheldon, R. A. (2007). Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Advanced Synthesis and Catalysis*.
- Shervedani, R. K., & Amini, A. (2012). Direct electrochemistry of dopamine on gold-Agaricus bisporus laccase enzyme electrode: Characterization and quantitative detection. *Bioelectrochemistry*, 25-31.
- Soukharev, V., Mano, N., & Heller, A. (2004). A Four-Electron O₂-Electroreduction Biocatalyst Superior to Platinum and a Biofuel Cell Operating at 0.88 V. *JACS Communications*, 8368-8369.
- Talbert, J. N., & Goddard, J. M. (2012). Enzymes on material surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 12.
- Trohalaki, S., Pachter, R., Luckarift, H. R., & Johnson, G. R. (2012). Immobilization of the Laccases from Trametes versicolor and Streptomyces coelicolor on Single-wall Carbon Nanotube Electrodes: A Molecular Dynamics Study. *Fuell Cells*, 9.
- Yang, X.-Y., Tian, G., Jiang, N., & Su, B.-L. (2012). Immobilization technology: a sustainable solution for biofuel cell design. *Energy & Environmental Science*, 5540-5563.
- Zebda, A., Gondran, C., Le Goff, A., Holzinger, M., Cinquin, P., & Cosnier, S. (2011). Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes. *Nature Communication*, 6.
- Zebda, A., Renaud, L., Cretin, M., Innocent, C., Pichot, F., Ferrigno, R., y otros. (2009). Electrochemical performance of a glucose/oxygen microfluidic biofuel cell. *Journal of Power Sources*, 5.
- Zheng, W., Li, Q., Su, L., Yan, Y., Zhang, J., & Mao, L. (2006). Direct Electrochemistry of Multi-Copper Oxidases at Carbon Nanotubes Noncovalently Functionalized with Cellulose Derivatives. *Electroanalysis*, 587-594.

5. Capítulo I - Media celda.

5.1. Metodología.

La Lc de *Trametes versicolor* (E.C. 1.10.3.2), las placas de grafito, de carbón vítreo, el GA (50 % en agua V/V) y la β -*D*-glucosa fueron adquiridos de Sigma Aldrich. El HNO₃ (70 %) y el alcohol isopropílico se adquirió de J. T. Baker. La solución de Nafión[®] 5 % es de marca Electrochem Inc. El acetato de sodio (CH₃COONa), el ácido acético (CH₃COOH) y el hidróxido de potasio (KOH 99 % pureza) son grado reactivo marca Merck. El nanofoam y el toray se obtuvieron de marketech inc. Todas las soluciones se prepararon a partir de reactivos grado analítico y con agua desionizada de wáter high purity[®].

5.1.1. Preparación de los electrodos.

- Limpieza de los electrodos de carbón vítreo.

Primero los electrodos se lavaron con agua desionizada y a continuación se pulieron con alúmina (5 μ m, Buehler[®]) en un paño para pulido Buehler[®] por 5 minutos. Se enjuagaron y a continuación se limpiaron electroquímicamente por voltametría cíclica (VC) en un potenciostato/galvanostato BioLogic Science Instruments modelo VMP3, por 20 ciclos a 100 $mV s^{-1}$ en una ventana de potencial de $-0.1 \rightarrow 1.3 V$. Estos electrodos se usaron para la identificación superficial de las señales características de la Lc.

- Limpieza de los electrodos de grafito.

Primero los electrodos se lavaron con agua desionizada y a continuación se pulieron en dos tipos de lijas, haciendo 20 vueltas en cada una. Se enjuagaron y posteriormente se pulieron con alúmina 0.05 M en un paño para pulido Buehler[®] por 5 minutos. Se enjuagaron de nuevo y a continuación se limpiaron electroquímicamente. Al igual que los electrodos de carbón vítreo, los de grafito se utilizaron para identificar a la Lc, sola y en presencia de un mediador.

- Limpieza electroquímica de los electrodos de nanofoam y toray.

Un electrodo de nanofoam o toray, se sumerge en 15 mL de solución electrolito de H_2SO_4 0.5 M en una celda electroquímica de tres electrodos (configuración de media celda), el contraelectrodo es una barra de grafito y el electrodo de referencia es de Hg/HgSO_4 en sulfato de potasio. Luego se repite la técnica pero ahora en 15 mL de electrolito KOH 0.3 M con una ventana de $-0.5 \rightarrow 0.5 \text{ V}$.

5.1.2. Inmovilización de la Lc en diferentes estructuras de carbón.

5.1.2.1. Tres metodologías de inmovilización física.

1. Incubación del electrodo en solución de Lc por 24 hrs.

El electrodo de nanofoam de área superficial 9.1 mm^2 , se sumergió a temperatura ambiente, por 24 horas en una solución de Lc preparada a partir de la relación 5 mg mL^{-1} (adaptación de (Karaskiewicz, Majdecka, Wieckowska, Biernat, & Bilewicz, 2014)). Se espera que con este tipo de inmovilización física el electrodo retenga por enlaces débiles las moléculas de Lc en el interior.

2. Sonicado del electrodo en solución de Lc.

El electrodo de nanofoam de área superficial 9.1 mm^2 , se sumergió en un vaso de precipitados de 5 mL con solución de Lc en cantidad 5 mg mL^{-1} y se expuso a sonicated por 15 minutos. Al sonicar el electrodo en la solución de Lc, se podrá favorecer su entrada en los poros de la nano/micro estructura, pero tomando en cuenta que quizá no se retenga porque el movimiento podría no permitir establecer algún tipo de interacción química.

3. Inmovilización por inmersión.

Un electrodo de nanofoam o toray (dependiendo del experimento) de área superficial 9.1 mm^2 , se sumergió en una solución de 1 mL de Lc en cantidad 5 mg mL^{-1} por un par de segundos, luego se agitó por otro par de segundos y por último se dejó secar por un par de segundos más. Esta acción se repite por 35 minutos. Al introducir por repetidas veces se espera que el electrodo se impregne por completo de la solución y que por la compatibilidad entre tamaños la enzima se quede atrapada en el interior.

Para evaluar la presencia de la Lc en las estructuras, los experimentos de voltametría cíclica (VC) se llevaron a cabo con un potenciostato/gasvanostato BioLogic Science Instruments modelo VMP3, con un arreglo de celda de tres electrodos. Como electrodo de referencia se usó un electrodo de calomel saturado (ECS) y como contraelectrodo un alambre de platino. Los experimentos electroquímicos se hicieron a velocidad de 10 mV s^{-1} , pero como la ventana no está definida para esta inmovilización en este tipo de estructuras, se probaron dos ventanas distintas: $-0.5 \rightarrow 0.5 \text{ V}$ y $0 \rightarrow 1 \text{ V}$.

5.1.2.2. Uso de glutaraldehído 1% (GA) como agente de entrecruzamiento.

Una vez que se eligió a la inmersión como la mejor inmovilización física, se procedió a la incorporación de un agente entrecruzante, para constituir la inmovilización por entrecruzamiento y con enlaces covalentes.

En este caso, sobre un electrodo de grafito, previamente limpiado de acuerdo a la metodología **5.1.1.**, se colocaron $50 \mu\text{L}$ de una solución de Lc 5 mg mL^{-1} en búfer acetatos (BA) pH 5 y Lc con GA (1%) en una proporción 1:3 v/v respectivamente. El electrodo se dejó secar y posteriormente la identificación electroquímica se realizó por VC con velocidad de 10 mV s^{-1} , a las ventanas $-0.5 \rightarrow 0.5 \text{ V}$ y $0 \rightarrow 1 \text{ V}$.

5.1.2.3. Uso de nanotubos de carbono (NTC) para favorecer la TE.

Sobre un electrodo de carbón vítreo, limpiado previamente de acuerdo a la sección **5.1.1.**, se colocaron $50 \mu\text{L}$ de una solución de $200 \mu\text{L}$ de NTC secos, Lc 5 mg mL^{-1} en BA pH 5 y GA (1 %) en una proporción 1:3 v/v respectivamente. El electrodo se dejó secar y posteriormente la identificación electroquímica se realizó por VC con velocidad de $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, a dos ventanas: $-0.5 \rightarrow 0.5 \text{ V}$ y $0 \rightarrow 1 \text{ V}$.

5.2. Resultados y discusión.

5.2.1. Evaluación bioelectrocatalítica.

5.2.1.1. Inmovilización de la Lc y uso de GA y NTC sobre electrodos de grafito y carbón vítreo.

Para la identificación de la enzima Lc, primero estratégicamente se inmovilizó sobre superficies de carbón grafito y vítreo que ya se han utilizado anteriormente por el grupo de trabajo (López-González, et al., 2014), (Arjona, et al., 2014), (Cuevas-Muñiz, Guerra-Balcázar, Esquivel, Sabaté, Arriaga, & Ledesma-García, 2012). Sobre el carbón grafito se depositaron 50 μL de una solución de Lc 5 mg mL^{-1} en BA pH 5 y GA (1%) en una proporción 1:3 v/v respectivamente. La incorporación de GA en la solución junto con Lc fue para promover no sólo la inmovilización por adsorción, sino también por entrecruzamiento.

En la **Figura 13** se presentan los voltamperogramas comparativos del electrodo de Lc vs Lc-GA a dos ventanas de potencial **(a)** $-0.5 \rightarrow 0.5 \text{ V}$ y **(b)** $0 \rightarrow 1 \text{ V}$ en BA 0.1 M oxigenado. La razón de usar dos ventanas de potencial es para poder identificar las señales del sitio activo de la Lc **(b)** y para observar en mayor medida su efecto en la reducción de oxígeno **(a)**. En la ventana $0 \rightarrow 1 \text{ V}$ se puede observar mejor el proceso de reducción del O_2 en 0.7 V (*vs ECS*) con Lc-GA con respecto a Lc sola, debido a un mejor acoplamiento de la enzima a la estructura porosa del carbón por efecto del GA, mientras que en la ventana $-0.5 \rightarrow 0.5 \text{ V}$ (*vs ECS*) se observó con mayor claridad la reducción del oxígeno a un potencial de 0.3 V (*vs ECS*) con respecto a Lc sin GA; la forma en que esto se afirma es por el pequeño cambio en la capacitancia del material. Así mismo, el electrodo de Lc con GA se observa más capacitivo, ya que no es un polímero conductor.

Ambos valores de potencial de reducción están muy cerca con respecto al del sitio T1, lo que podría sugerir que al la Lc se encuentra orientada en el sitio T1 hacia la superficie del electrodo permitiendo una DTE hacia el sitio T1, pero no es posible saberlo con estos estudios, aunque sí se fundamenta en trabajos previos (Salwielikowska, Gniadek, & Palys, 2013); pero como la corriente es relativamente pequeña, es probable que una buena proporción de las moléculas se encuentren en posiciones aleatorias o la TE no es muy buena.

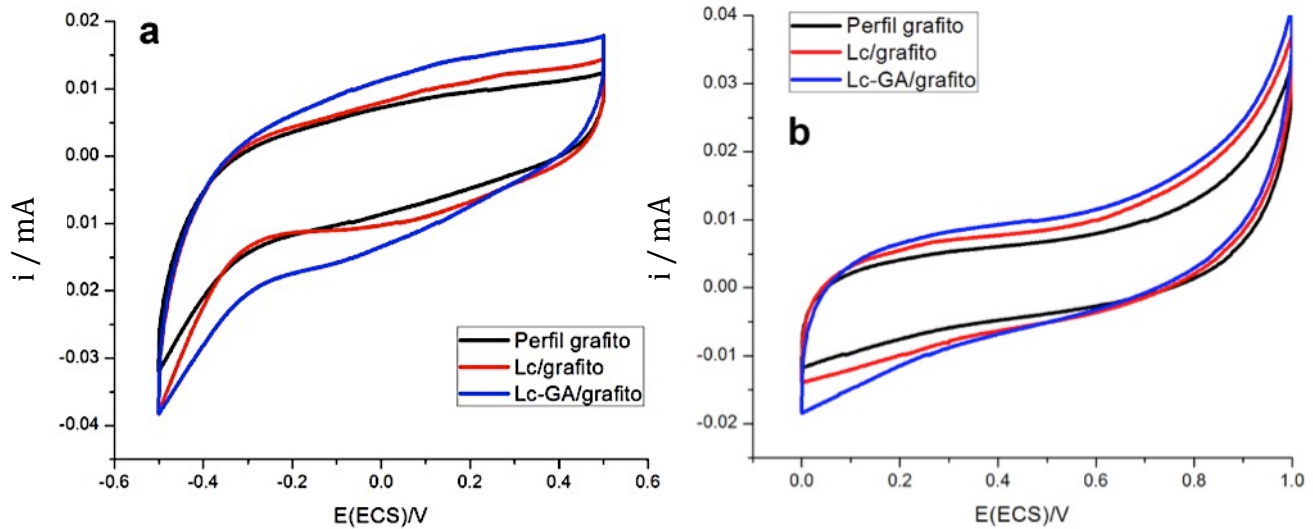


Figura 13. Voltamperograma de la inmovilización Lc-GA/grafito en BA N₂, a dos ventanas de potencial y ambos comparados contra el perfil del electrodo sin enzima. **a)** $-0.5 \rightarrow 0.5 V$ **b)** $0 \rightarrow 1 V$.

La inmovilización por entrecruzamiento hace que la enzima se enlace de forma química con otras enzimas adyacentes y se fije a la estructura soporte, de esta manera se reduce la probabilidad de lixiviarse al tener contacto con el electrolito soporte, además de que en presencia del GA, la Lc tiene una mejor retención dentro de las estructuras de carbón por efecto de los enlaces covalentes que se forman entre los aminoácidos libres de la Lc con el GA. La Lc comercial que se usó contiene residuos de 5 lisina y 15 arginina que son sitios potenciales para el entrecruzamiento (Uniprot, 2002).

Por otro lado, para definir con mayor claridad las señales de la Lc se usaron placas de carbón vítreo para la inmovilización de Lc, debido a que en la literatura se reporta una mayor conductividad eléctrica y disminución de la capacitancia. Para este caso, se incorporaron los NTC a la mezcla Lc-GA de acuerdo a lo descrito en la metodología, para promover la TE entre la estructura y el sitio activo de la enzima, para conformar una inmovilización de tipo adsorción/entrecruzamiento. En la **Figura 14** se muestra el voltamperograma correspondiente a la identificación de la Lc en presencia de condiciones anaerobia (BA saturado de N₂) y aerobia (BA saturado de O₂), a dos ventanas de potencial, **(a)** $-0.5 \rightarrow 0.5 V$ (*vs ECS*) y **(b)** $0 \rightarrow 1 V$ (*vs ECS*). Se observa que la reducción de oxígeno comienza en $0.4 V$ (*vs ECS*) y alcanza su máximo en $-0.5 V$ (*vs ECS*), como en ausencia de oxígeno no se puede observar, este efecto se le puede atribuir directamente a la actividad de la

enzima. Otros trabajos han reportado valores semejantes de potencial de reducción de Lc adsorbida en materiales similares y sin usar mediadores (Salwielikowska, Gniadek, & Palys, 2013), lo que coincide con el potencial estándar de reducción de la Lc que se ubica entre 430 - 790 mV.

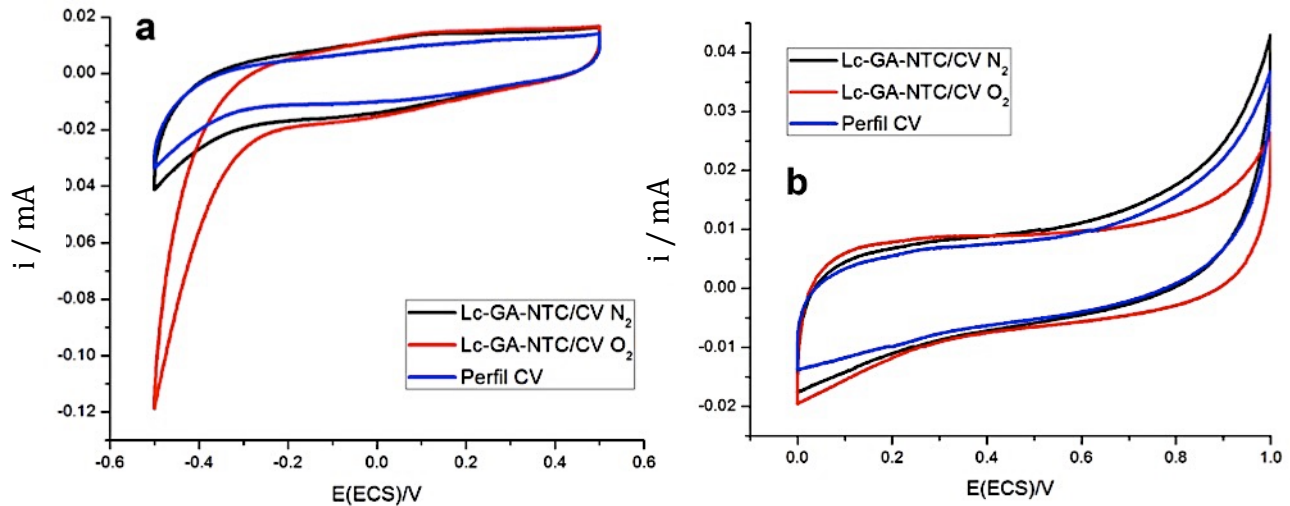


Figura 14. Voltamperogramas Lc-GA-NTC en condiciones aerobias y anaerobias, e inmobilizado en carbón vítreo a dos ventanas de potencial y ambos comparados contra el perfil del electrodo sin enzima.

a) $-0.5 \rightarrow 0.5 \text{ V}$ b) $0 \rightarrow 1 \text{ V}$.

Con los experimentos de inmovilización física/entrecruzamiento sobre electrodos de grafito y carbón vítreo se identificó de una forma simple la reducción de oxígeno debido a la presencia de Lc en condiciones aerobias y rectificándolo en ausencia de oxígeno. Considerando los resultados de la inmovilización de Lc sobre superficies de carbono se tomaron como base para su evaluación en estructuras de carbón nano y micro porosas, a continuación se presentan los resultados de la inmovilización en este tipo de materiales.

5.2.1.2. Identificación de las señales de la Lc en electrodos de nanofoam y toray.

Los dos tipos de nano/micro estructuras usadas como electrodos fueron el nanofoam y el toray, que se diferencian principalmente en que el nanofoam posee poros de $\leq 90 \text{ nm}$ y el toray $\leq 100 \mu\text{m}$. En la **Figura 15** se muestran los perfiles del nanofoam y toray respectivamente, en presencia de BA N_2 y BA O_2 con el fin de evaluar si presenta reducción de oxígeno como se ha reportado para

compuestos de carbono por diferentes autores. Como se muestra en los voltamperogramas del nanofoam (a) y toray (b), no existe una diferencia significativa en condiciones aerobias vs anaerobias por lo que estas estructuras de carbón no reducen oxígeno en este medio. Además, ambos presentan alta resistividad y son muy capacitivos, aunque en el nanofoam esta característica es más evidente.

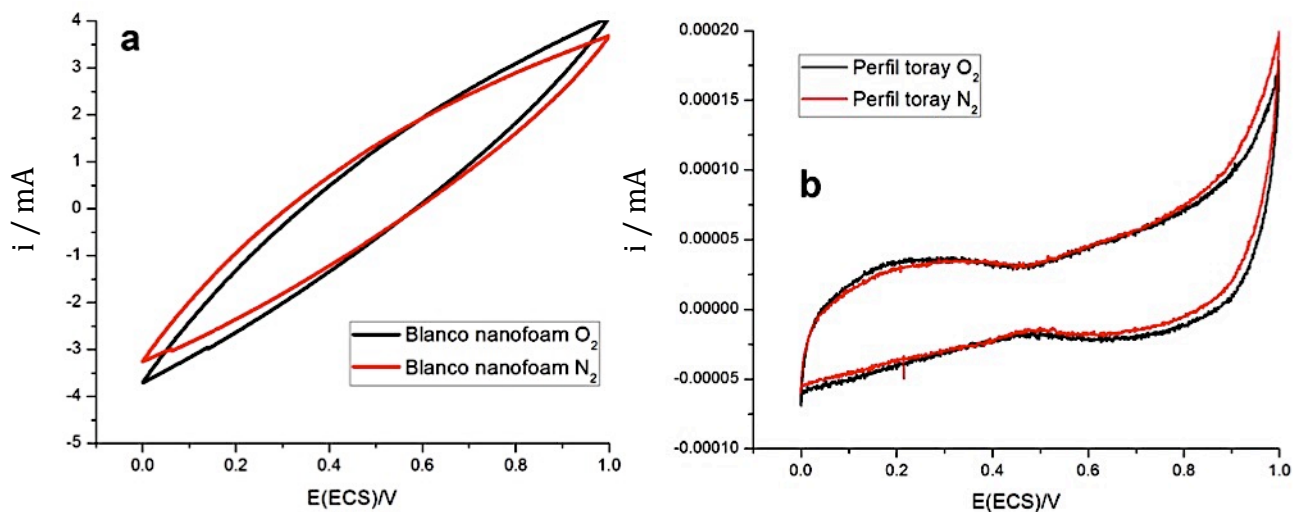


Figura 15. Voltamperogramas a 10 mV/s. a) nanofoam y b) toray en BA N₂ y O₂.

Confirmando que las estructuras de carbón no participan en la RRO, se prosiguió en evaluar tres diferentes formas de inmovilización de la Lc dentro de una estructura de carbón tridimensional: sonicado, inmersión e incubación del electrodo. Por el método de inmersión se observó en la VC (Figura 16) una corriente de $-0.6 \text{ mA} \rightarrow -0.8 \text{ mA}$ (potencial de 0 V) cuando el electrodo con la Lc se sumergió en BA pH 5 saturado con N₂ y con O₂. En este último se identificó el inicio de la RRO a un potencial de 0.5 V (*vs ECS*) debido a la actividad de la Lc principalmente por el sitio T3 del sitio catalítico de la enzima (Jensen, et al., 2012). Mientras que con los métodos de sonicado e incubación de los electrodos, no se observó una reducción de oxígeno significativa por parte de la Lc, debido a la ausencia de enzima dentro de la estructura porosa. Por lo descrito en este párrafo, para las subsecuentes evaluaciones se utilizó únicamente el método de inmersión.

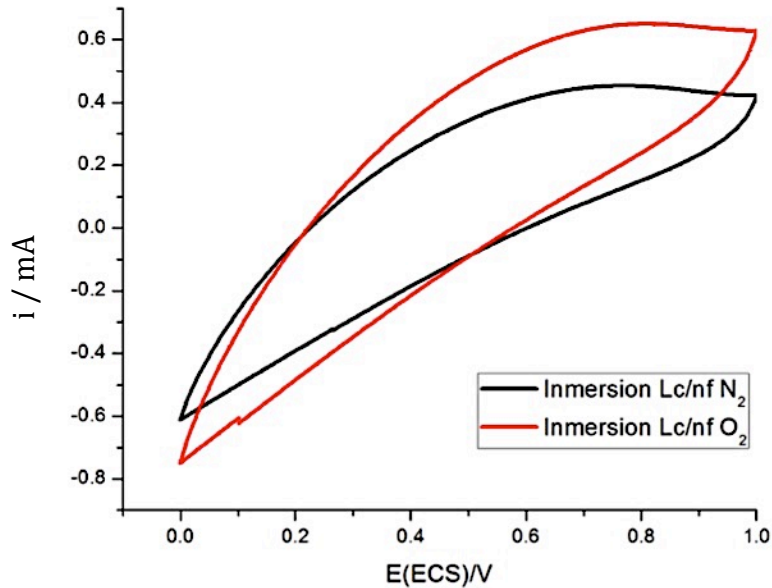


Figura 16. VC de la inmovilización por inmersión de Lc/nanofoam a 10 mV/s, en un electrolito de BA nitrogenado (-----) y oxigenado (-----).

Una gran ventaja de la inmovilización de la Lc es que la puede proteger de la desnaturalización por solventes orgánicos contenidos en el flujo de entrada, extendiendo por lo tanto su vida media; además de que permite reusarla y se puede separar con facilidad los productos de reacción.

5.2.1.3. Uso del mediador ABTS en solución.

El mediador más comúnmente usado con la Lc es el ABTS, debido a que sus potenciales redox igualan casi por completo los de la Lc. Usar un mediador en las pruebas de media celda da altos valores de corriente catalítica, no obstante, usar mediadores puede resultar en la pérdida progresiva de potencial, debido a la lixiviación que le puede ocurrir al ABTS (Munteanu, Basto, Gübitz, & Cavaco-Paulo, 2007).

➤ Electrodo de nanofoam

Como se pudo observar en el experimento anterior, no se pudieron definir los picos correspondientes a los cobres de la Lc reportados alrededor de 0.7 V (*vs ECS*) únicamente el inicio de la RRO que se debe a la presencia de la Lc dentro de la estructura. Por ello, se usó un mediador redox en la solución

electrolito. De acuerdo con (Roy & Abraham, 2006), de entre varios mediadores estudiados (catecol, pirogalol, siringaldazina, ABTS) para identificar la Lc en un soporte de carbón, el mejor sustrato es el ABTS con una $K_m = 0.859 \text{ mM}$ y eficiencia catalítica mejor que los otros de $k_{cat}/K_m = 3.73 \times 10^3$.

En la literatura se ha reportado el uso de diferentes concentraciones de ABTS que se puede utilizar para evaluar la actividad de la Lc (Dogan, Bayram, Uzun, Senel, & Denizli, 2015), (Freixo, Karmali, Frazao, & Arteiro, 2008), (Pang, Li, & Zhang, 2015). En la **Figura 17** se muestran los voltamperogramas comparativos de dos concentraciones de ABTS 0.25 mM y 2.5 mM en BA pH 5 para evaluar la RRO de la Lc-NTC-GA en ausencia y presencia de O_2 . Con la concentración de 0.25 mM de ABTS en N_2 se observó una meseta de oxidación en 0.5 V (*vs ECS*) y una de reducción en 0.3 V (*vs ECS*), con un ΔE_p (separación de pico de oxidación y reducción) de 0.2 V mientras que en presencia de oxígeno los picos son más evidentes por la actividad de la Lc, además del aumentar corriente (*de 0.03 a 0.045 mA cm⁻²*). Por otro lado, al aumentar la concentración de ABTS en 2.5 mM el par de picos redox es más evidente; el de oxidación en 0.58 V (*vs ECS*) y el de reducción en 0.2 V (*vs ECS*) (ΔE_p 0.38 V) en ausencia de O_2 . Mientras que saturado en oxígeno el pico de oxidación se observó desplazado en 0.62 V y el de reducción en 0.19 V (ΔE_p 0.43 V) y con un aumento en la corriente de -0.06 a -0.1 mA cm^{-2} , tanto en el proceso de oxidación como en el de oxidación debido al efecto de la reducción de O_2 por la Lc.

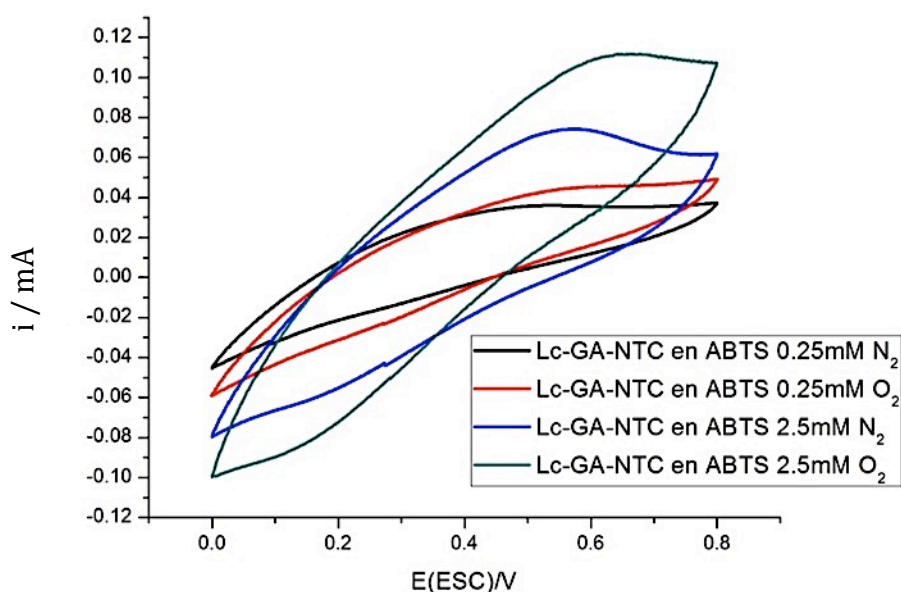


Figura 17. Comparación Lc-GA-NTC/nanofoam en ABTS N₂ y O₂ a dos concentraciones.

A pesar que los picos de oxidación y reducción del ABTS están reportados en 0.53 y 0.42 V (*vs ECS*) a pH 5 respectivamente y con una ΔE_p de 0.11 V sobre una superficie de carbón vítreo, en nuestro caso se encuentran más desplazados atribuyéndolo a una lenta difusión del ABTS dentro de la estructura nanoporosa. En este mismo sentido, los picos de oxidación y reducción presentan una forma de meseta debido a la lenta oxidación y reducción, así como difusión, por lo descrito en este mismo párrafo.

➤ Electrodo de toray.

Se procedió en realizar la misma metodología con el carbón toray[®] para establecer su comportamiento y compararlo con respecto al nanofoam. Cuando se usa un material como el toray de poros más grandes que el nanofoam, se pudiera favorecer los procesos de difusión dentro de los poros y cantidad de enzima inmovilizada, pero se podría ver comprometido la estabilidad y la actividad en la RRO de la proteína.

De acuerdo con (Zheng, Li, Su, Yan, Zhang, & Mao, 2006), de entre varios tipos de enzimas inmovilizadas en superficies de electrodos, las que tienen el tamaño adecuado para permanecer en los poros, son las que presentan TE directa. En este caso, el toray tiene un tamaño de 100 μm , y la enzima de apenas 7 nm, por lo que se requiere que la enzima se mantenga estable dentro de la estructura aún cuando haya flujo de por medio. En este sentido, los NTC y el GA no sólo favorecen la DTE, sino que también funcionan como elementos que permiten que no haya tanto espacio libre.

En la **Figura 18**, se observa con mayor claridad los picos de oxidación y reducción del ABTS 2.5 mM en BA pH 5 a potenciales 0.48 V (oxidación) y 0.34 V (reducción) con una ΔE_p de 0.14 V muy similar a lo reportado por otro autores (Tortolini, Rea, Carota, Cannistraro, & Mazzei, 2012), lo cual indica que la difusión del ABTS es más permisible con respecto al nanofoam. Cuando la Lc-GA-NTC se encuentra en presencia de un medio oxigenado, la corriente en el proceso de oxidación del ABTS es mayor debido a la actividad de reducción de oxígeno de la Lc con respecto a la solución

nitrogenada, con una diferencia de $2 \mu A$. A pesar de identificar con mayor claridad los picos de oxidación y reducción, las densidades de corriente son menores con respecto a las del nanofoam.

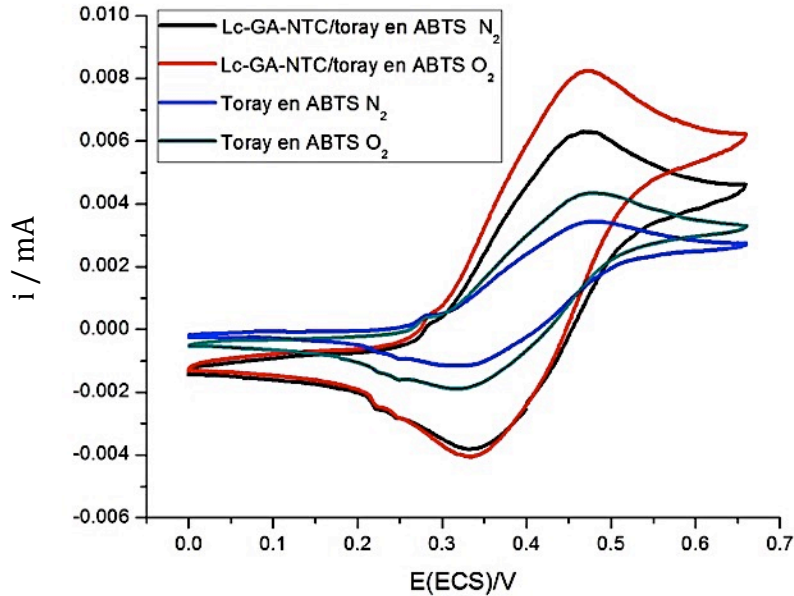


Figura 18. Voltamperograma Lc-GA-NTC/Toray en ABTS.

5.2.1.4. Adiciones de ABTS con electrolito soporte BA 0.1M saturado en N_2 y O_2 .

Una de las formas reportadas para evaluar la actividad bioelectrocatalítica de la Lc en la RRO es por medio la adición de ABTS hasta llegar a su saturación (Pang, Li, & Zhang, 2015). Por ello, se realizaron adiciones de ABTS en presencia del electrodo de toray con la enzima inmovilizada, Lc-GA-NTC, cada adición fue de 0.017 mM de ABTS evaluando por VC la corriente los picos de oxidación y reducción a una ventana de potencial de $-0.25 \rightarrow 0.8 \text{ V}$ y con una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} . De acuerdo con la **Figura 19**, con cada adición hay un aumento en la corriente, tomando como referencia que la línea negra que corresponde al blanco sin ABTS no presenta ninguna señal. Los picos de oxidación y reducción del ABTS se encuentran en 0.48 V (*vs. ECS*) y 0.38 V (*vs. ECS*) respectivamente. Se comprueba que estas señales pertenecen al ABTS porque los valores de reducción y oxidación del ABTS en BA a pH 5 coinciden de forma casi exacta con otros trabajos reportados anteriormente de ABTS con carbón vítreo (Solís-Oba, Ugalde-Saldívar,

González, & Viniegra-González, 2005) donde también indican que estas señales corresponden a un sistema quasi reversible $ABTS/ABTS^{\cdot+}$.

Adicionalmente, se graficó la corriente de anódica y catódica vs concentración de ABTS, observando una disminución en la corriente de oxidación, pero un aumento en la de reducción a mayor concentración de ABTS. A la concentración de 0.14 mM de ABTS se observa una mayor corriente en los picos de oxidación y reducción de ABTS, pero no en la reducción de oxígeno en $-0.2 V$ (*vs. ECS*) por lo que se puede concluir parcialmente que llegó a su saturación la reducción de oxígeno por efecto de la Lc.

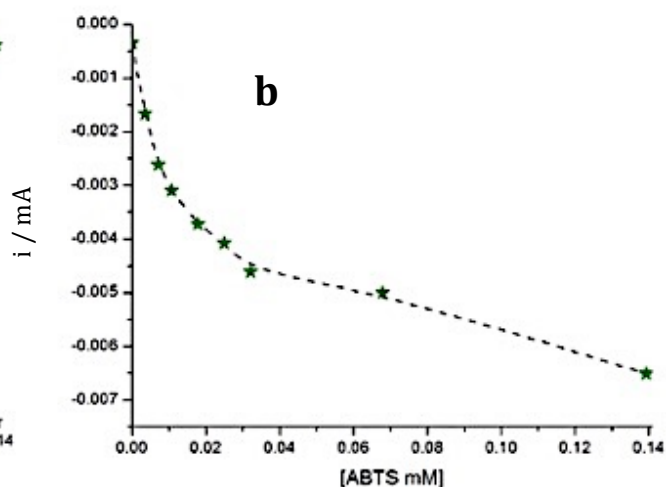
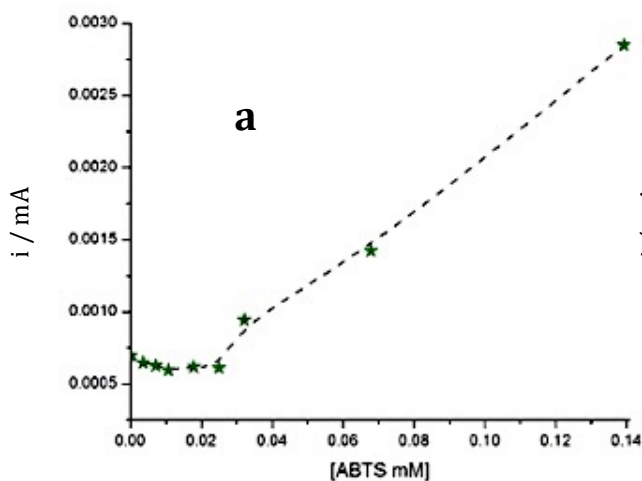
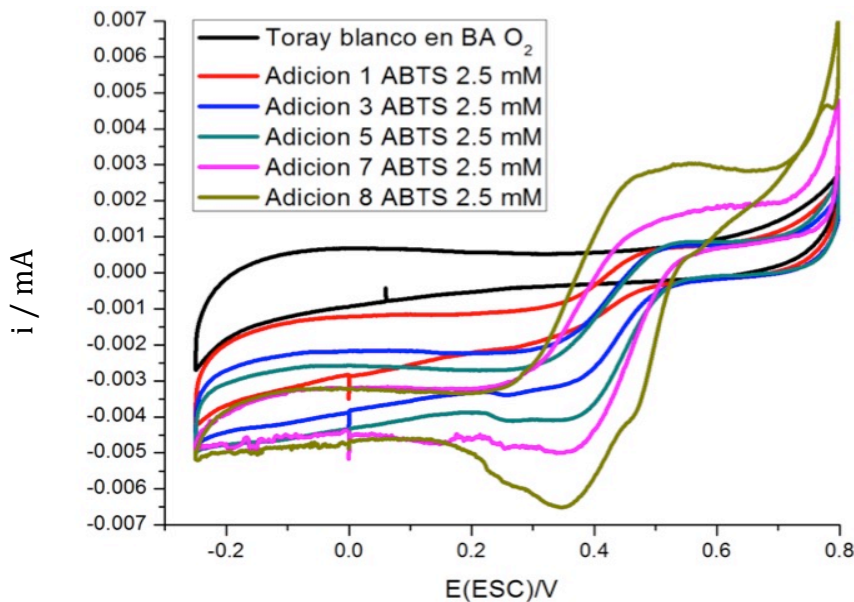


Figura 19. Voltamperograma de adiciones de ABTS a BA con un electrodo de Lc-GA-NTC/toray, a) Oxidación b) reducción.

5.2.1.5. Adiciones de H₂O₂ con electrolito soporte ABTS 2.5 mM saturado en N₂ y O₂.

Uno de los métodos reportados para evaluar la actividad bioelectrocatalítica de la enzima es utilizar H₂O₂ como sustrato de reducción (Milton, Giroud, Thumser, Minteer, & Slade, 2013), por medio de la eventual saturación de la enzima; ya que controlar concentraciones de oxígeno gaseoso resulta ser complicado e inexacta la medición. Por ello, se relazaron adiciones de H₂O₂ en BA 0.1 M en presencia de ABTS 2.5 M saturado en nitrógeno y oxígeno para una mejor identificación de la actividad de la Lc inmovilizado en nanofoam y toray.

➤ Electrodo de nanofoam.

Partiendo de una solución madre de 0.5 M de H₂O₂ se realizaron 10 adiciones consecutivas de 1 mM de H₂O₂. En la **Figura 20** se muestra las voltametrías cíclicas para cada adición en donde la actividad de reducción de H₂O₂ de la Lc se ve reflejado en las corrientes del ABTS principalmente en el pico de oxidación a 0.62 V (*vs ECS*) con respecto a las de reducción a 0.30 V (*vs ECS*) debido a una saturación de la actividad de la enzima que se ve comprometida la reducción del ABTS, como se mostró anteriormente en el mecanismo de la interacción enzima-mediador. Graficando la concentración de H₂O₂ vs corriente de los picos anódicos y catódicos respectivamente. En el lado anódico/oxidación debajo de los 2 mM no hay una tendencia de la actividad de la enzima a una mayor concentración de H₂O₂ indicando que el electrodo no es muy sensible a bajas concentraciones, pero con un comportamiento lineal entre 2.1 y 3.5 mM (R² de 0.99995) y calculando una sensibilidad de 0.0057 mA mM⁻¹; mientras que para el lado catódico/reducción, hay un comportamiento lineal en el mismo intervalo (R² de 0.995), con una sensibilidad de 0.004 mA mM⁻¹. Por otro lado, concentraciones mayores de 4 mM existe un aumento en las corriente desde 0.243 mA llegando a su saturación alrededor de los 13 mM de H₂O₂ ya que la corriente comienza a disminuir.

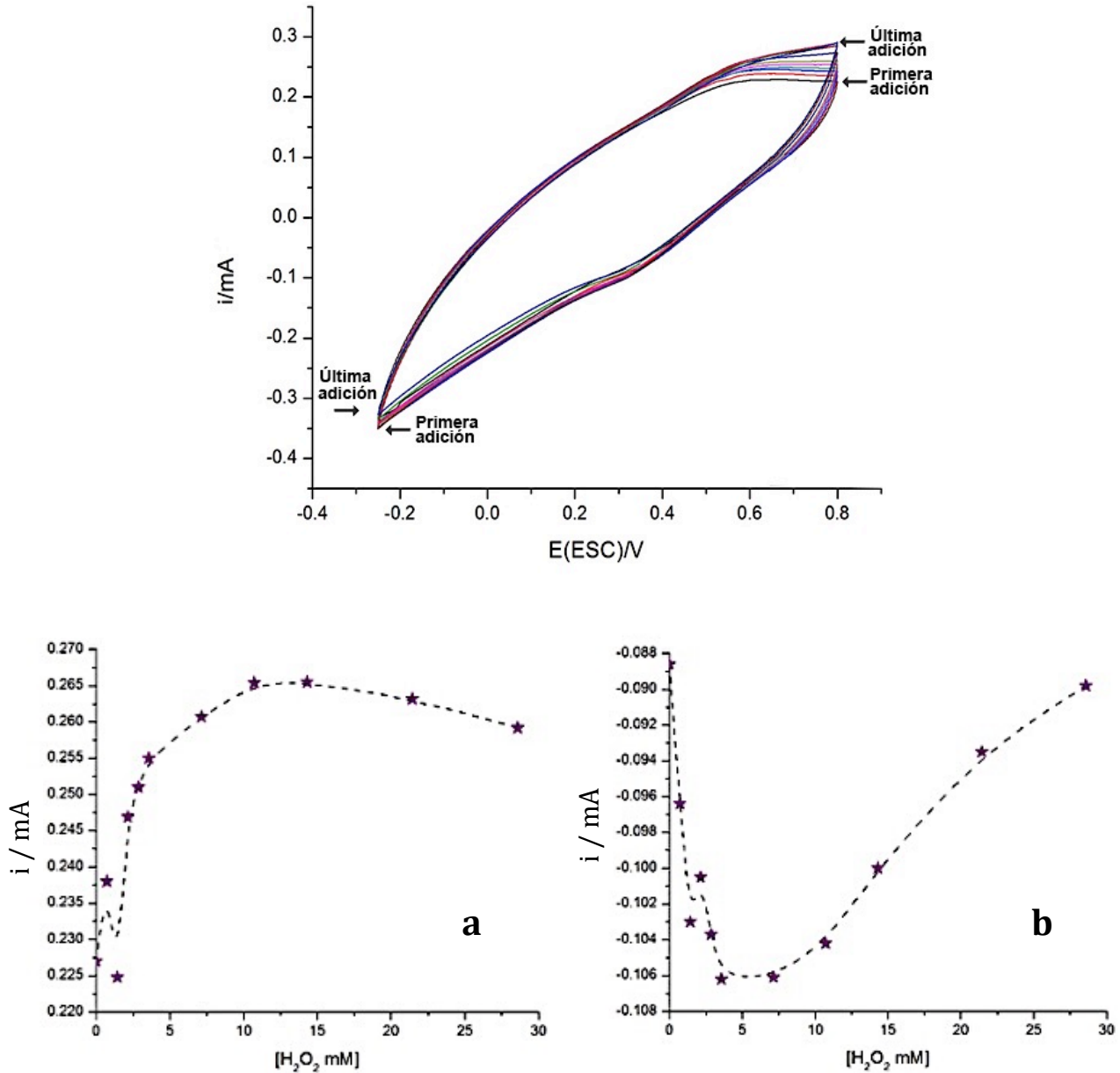


Figura 20. Voltamperograma de adiciones de H_2O_2 a $ABTS O_2$ con un electrodo de Lc-GA-NTC/nanofoam.
a) oxidación **b)** reducción.

Se prosiguió en evaluar el mismo electrodo pero ahora en condiciones anaerobias (**Figura 21**). De igual manera que en la figura anterior, el efecto en la corriente de los picos de oxidación en el ABTS aumentan a mayor concentración de H_2O_2 mientras que los de reducción son poco notorios. Para este caso la concentración de saturación del H_2O_2 en el lado de oxidación es de 15 mM y observando una tendencia lineal desde la concentración de 0.6 hasta 3.3 mM (R^2 de 0.995) y calculando una

sensibilidad de 0.007 mA mM^{-1} esto quiere decir que el electrodo puede tener un aumento de corriente de 0.007 mA por cada 15 mM de H_2O_2 adicionados, lo cuál es bueno porque puede discernir entre cada una de las concentraciones agregadas. Cabe mencionar que la corriente es mayor en este caso con respecto a la solución saturada con oxígeno debido a que en esta última existen dos reacciones competitivas de reducción por la Lc entre el oxígeno y el H_2O_2 , caso contrario con la solución saturada en N_2 . En la reducción la tendencia lineal va desde la concentración de 0.6 hasta 3.3 mM (R^2 de 0.989) y con una sensibilidad de $0.0065 \text{ mA mM}^{-1}$.

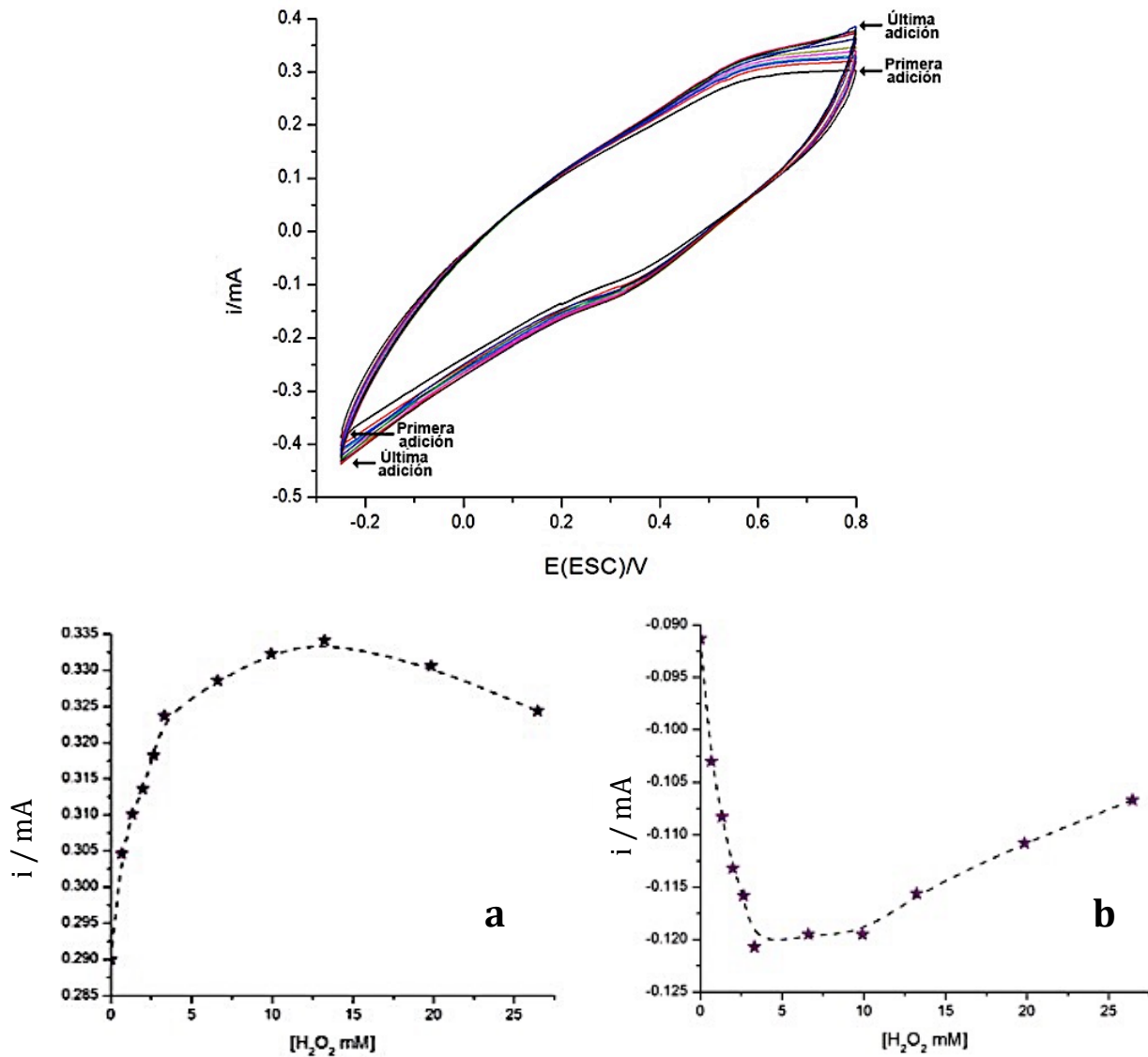
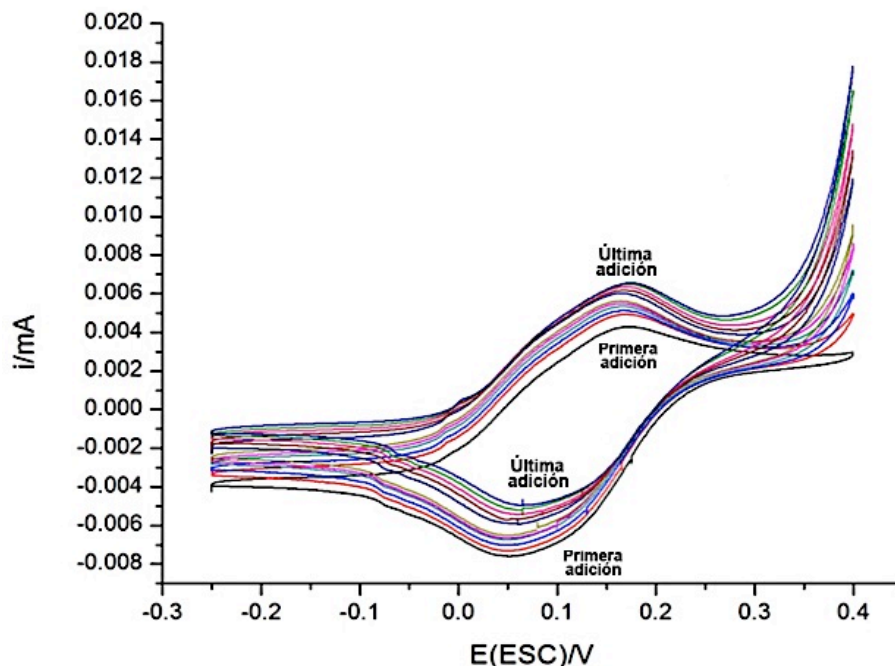


Figura 21. Voltamperograma de adiciones de H_2O_2 a ABTS N_2 con un electrodo de Lc-GA-NTC/nanofoam.
a) oxidación b) reducción.

➤ Electrodo de toray.

Se prosiguió en utilizar el mismo método de adiciones de H_2O_2 en condiciones aerobias y anaerobias pero con la enzima Lc-NTC-GA inmovilizada dentro del toray. Como se observó con anterioridad los picos de reducción a $0.052 V (vs ECS)$ y oxidación a $0.17 V (vs ECS)$ del ABTS respectivamente, son más evidentes en toray por los tamaños de los poros que permiten una mayor difusión de moléculas. De igual manera, a mayor concentración de H_2O_2 adicionado, la corriente aumenta para los proceso de oxidación y reducción el ABTS en función bioelectrocatalítica de la enzima en la reducción del O_2 y H_2O_2 de forma competitiva. Graficando la concentración de H_2O_2 vs corriente anódica y catódica se observó aumentos en la corriente; en el caso de las corrientes de oxidación no se observa una saturación por el sustrato adicionado, pero la tendencia lineal se encuentra desde la concentración de 1 hasta 5 mM (R^2 de 0.963) y calculando una sensibilidad de $0.0002 mA mM^{-1}$. En las corrientes de reducción, la tendencia lineal se encontró desde la concentración de 1 hasta 20 mM (R^2 de 0.925) y sensibilidad de $0.0001 mA mM^{-1}$. Por otro lado, considerando las concentraciones de 1 a 10 mM se obtuvo una mejor R^2 de 0.953 con una sensibilidad de $0.0001 mA mM^{-1}$, indicando un menor error si se considera esta ultimo rango de concentración (**Figura 22**).



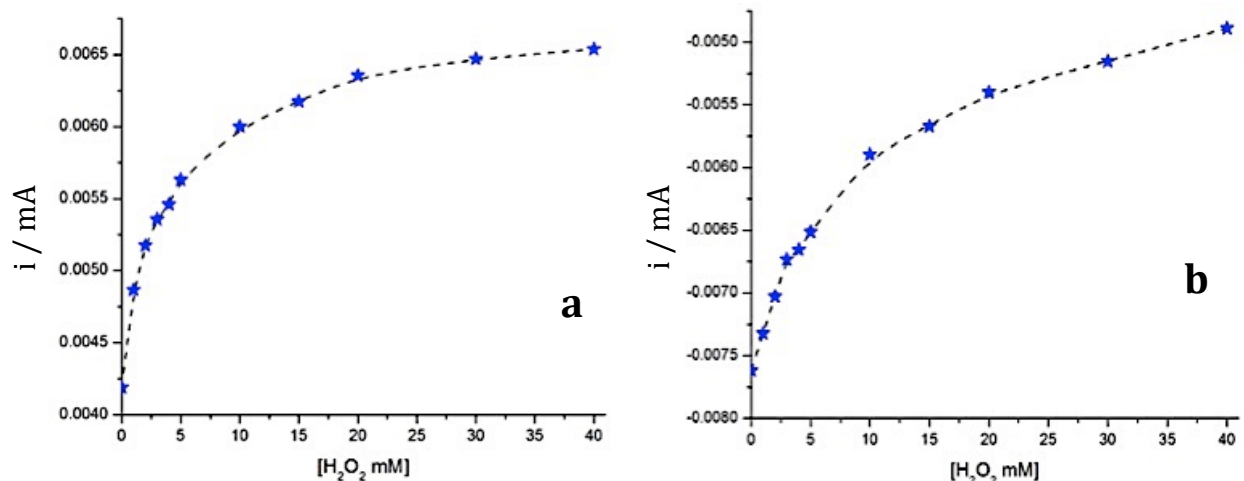


Figura 22. Voltamperograma de adiciones de H₂O₂ a ABTS O₂ con un electrodo de Lc-GA-NTC/toray, a) oxidación b) reducción.

En el caso de las adiciones de H₂O₂ a ABTS saturado de nitrógeno, el pico de reducción se encuentra a 0.38 V (*vs ECS*) y el de oxidación a 0.5 V (*vs ECS*) (**Figura 23**). En el pico anódico/oxidación, no se observó concentraciones de saturación del H₂O₂, pero si una tendencia lineal desde la concentración de 2 a 10 mM (R^2 de 0.9698) y calculando una sensibilidad de $0.00009 \text{ mA mM}^{-1}$ esto quiere decir que el electrodo puede tener un aumento de corriente de 0.00009 mA por cada mM de H₂O₂ adicionado, la cantidad más pequeña que puede ser medida; mientras que en el catódico la de saturación del H₂O₂ es de 25 mM aproximadamente con una tendencia lineal desde la concentración de 2 a 10 mM (R^2 de 0.985) y calculando una sensibilidad de $0.0001 \text{ mA mM}^{-1}$ esto quiere decir que el electrodo puede tener un aumento de corriente de 0.0001 mA por cada 1 mM de H₂O₂ adicionado.

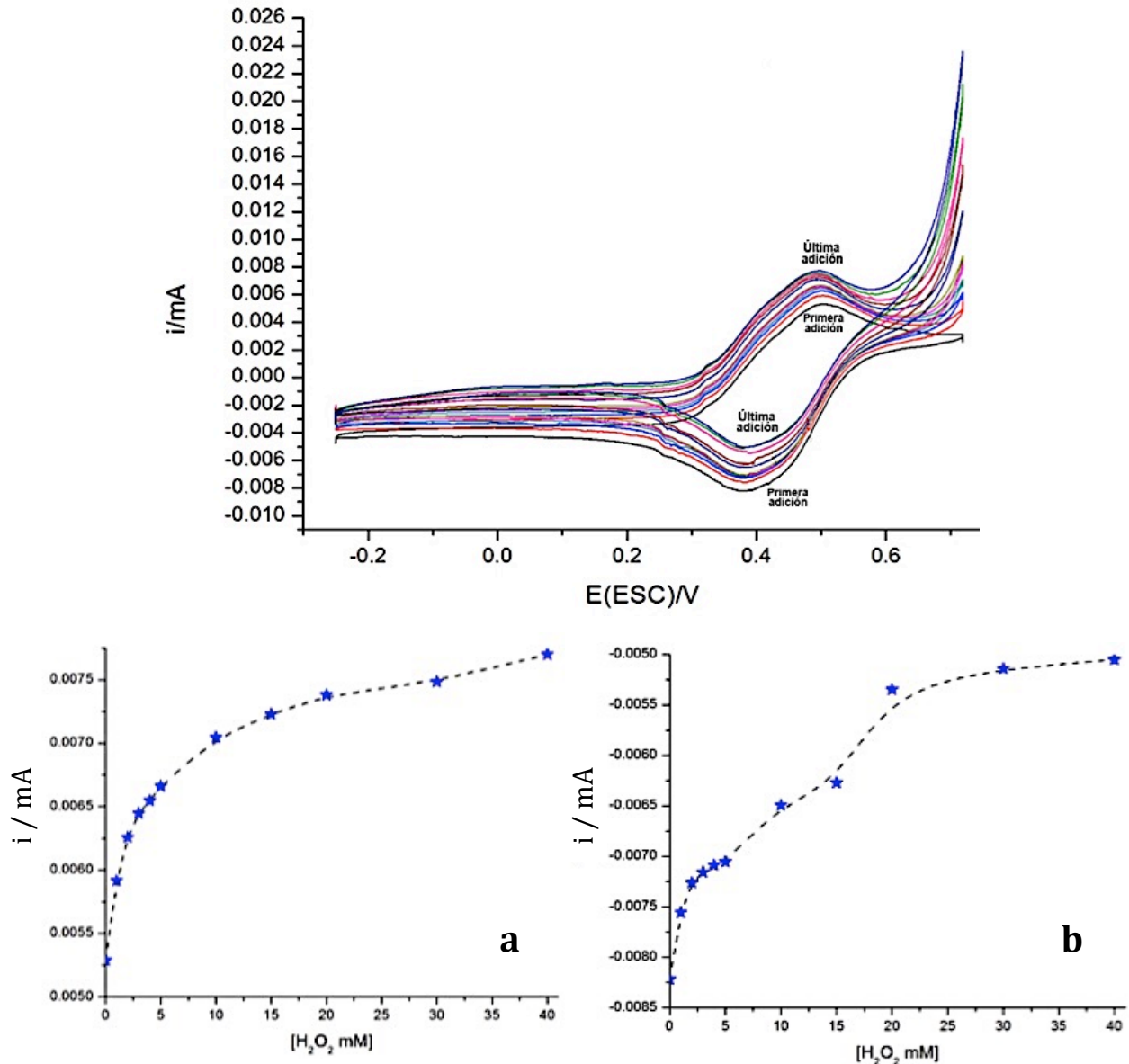


Figura 23. Voltamperograma de adiciones de H_2O_2 a ABTS N_2 con un electrodo de Lc-GA-NTC/toray, a) oxidación b) reducción.

Se ha reportado que el ABTS es incoloro (Solís-Oba, Ugalde-Saldívar, González, & Viniegra-González, 2005), no obstante conforme se va oxidando a $ABTS^{\cdot+}$ o a $ABTS^{2+}$ va adquiriendo un color verde. A medida que se adicionó mayor concentración de ABTS, mayor fue la intensidad de color, lo que puede ser útil posteriormente para una prueba de actividad enzimática.

5.3. Conclusiones preliminares

Los materiales 2D se utilizaron para la identificación de la Lc, sin ser clara la identificación del grupo cobre T1. Los resultados presentaron alta similitud con otros reportados con anterioridad, comenzando la reducción del oxígeno en aproximadamente $0.7 V$ (*vs ECS*) para el carbón vítreo y $0.4 V$ (*vs ECS*) para el grafito; lo que coincide con el potencial estándar de reducción de la Lc que se ubica entre 430 - 790 mV.

Con los materiales 3D no presentaron RRO por si solos, además de tener una alta resistividad y son muy capacitivos. Adicionalmente, el método de inmersión fue el más apropiado para la inmovilización de Lc dentro de las estructuras de carbón 3D.

Con la implementación del mediador ABTS a 2.5 mM se evaluó con mayor facilidad la RRO de la Lc tanto para el nanofoam y con una mejor señal en el toray, por medio de la corriente de los picos de oxidación y reducción en $0.58 V$ y $0.2 V$ (*vs ECS*) respectivamente.

Con la evaluación bioelectrocatalítica de la Lc por medio de adiciones de H_2O_2 a electrodos de nanofoam y toray, con la mezcla Lc-GA-NTC inmovilizada, se estudió la sensibilidad de los electrodos y el efecto de la competición de reducción del H_2O_2 o el oxígeno en solución. El electrodo de nanofoam no es muy sensible a concentraciones menores a 2 mM y se saturó a una concentración de 13 mM en condiciones aerobias y 10 mM en anaerobias. Sin embargo, en N_2 presenta una corriente mayor ya que no hay reacciones competitivas como la que tiene lugar en presencia de O_2 , donde éste compite contra el H_2O_2 por los sitios activos de la Lc.

Mientras que con en toray en condiciones de saturación de O_2 , presentó una tendencia lineal en aumento de corriente conforme aumenta la concentración, calculando una sensibilidad del electrodo de $0.0002 mA mM^{-1}$ y con una saturación de la señal en 40 mM. Adicionalmente, en toray las señales son más claras ya que los tamaños de los poros permiten una mayor difusión de moléculas de ABTS para reaccionar.

Mediante los experimentos con la Lc en media celda, se identificó de una forma simple la reducción de oxígeno debido a la presencia de Lc en condiciones aerobias y rectificándolo en ausencia de oxígeno. La TE facilitada de la Lc y la conservación de su actividad catalítica con la incorporación

de NTC dentro de la nano/micro estructura, hace de este bioelectrodo un buen candidato como cátodo en BCC.

5.4. Referencias.

- Arjona, N., Dector, A., Guerra-Bálcazar, M., Álvarez-Contreras, L., Sabat, N., Esquivel, J. P., y otros. (2014). Effect of metal content on the electrocatalytic activity of AuxPdy mixtures and their use in a glucose membraneless microfluidic fuel cell. *RSC Advances*, 26158–26165.
- Cuevas-Muñiz, F., Guerra-Balcázar, M., Esquivel, J., Sabaté, N., Arriaga, L., & Ledesma-García, J. (2012). Glucose microfluidic fuel cell based on silver bimetallic selective catalysts for on-chip applications. *Journal of Power Sources*, 297-303.
- Dogan, T., Bayram, E., Uzun, L., Senel, S., & Denizli, A. (2015). Trametes versicolor laccase immobilized poly(glycidyl methacrylate) based cryogels for phenol degradation from aqueous media. *Journal of Applied Polymer Science*, 1-9.
- Doscher, M., & F.M., R. (1963). The activity of an enzyme in the crystalline state: ribonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, 2399–2406.
- Freixo, M. d., Karmali, A., Frazao, C., & Arteiro, J. M. (2008). Production of laccase and xylanase from *Coriolus versicolor* grown on tomato pomace and their chromatographic behaviour on immobilized metal chelates. *Process Biochemistry*, 1265–1274.
- Jensen, U. B., Lörcher, S., Vagin, M., Chevallier, J., Shipovskov, S., Koroleva, O., y otros. (2012). A 1.76 V hybrid Zn-O₂ biofuel cell with a fungal laccase-carbon cloth biocathode. *Electrochimica Acta*, 218– 226.
- Karaskiewicz, M., Majdecka, D., Wieckowska, A., Biernat, J. F., & Bilewicz, R. (2014). Induced-fit binding of laccase to gold and carbon electrodes for thebiological fuel cell applications. *Electrochimica Acta*, 132-138.
- López-González, B., Dector, A., Cuevas-Muñiz, F., Arjona, N., Cruz-Madrid, C., Arana-Cuenca, A., y otros. (2014). Hybrid microfluidic fuelcell based on Laccase/C and AuAg/C electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 221–226.
- Merle, G., Brunel, L., Tingry, S., Cretin, M., Rolland, M., Servat, K., y otros. (2008). Electrode biomaterials based on immobilized laccase. Application for enzymatic reduction of dioxygen. *Materials Science and Engineering C*, 932–938.
- Milton, R. D., Giroud, F., Thumser, A. E., Minter, S. D., & Slade, R. C. (2013). Hydrogen peroxide produced by glucose oxidase affects the performance of laccase cathodes in glucose/oxygen fuel cells: FAD-dependent glucose dehydrogenase as a replacement. *Physical Chemistry*, 19371-19379.
- Munteanu, F.-D., Basto, C., Gübitz, G. M., & Cavaco-Paulo, A. (2007). Staining of wool using the reaction products of ABTS oxidation by Laccase: Synergetic effects of ultrasound and cyclic voltammetry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 363–367.
- Pang, R., Li, M., & Zhang, C. (2015). Degradation of phenolic compounds by laccase immobilized on carbon nanomaterials: Diffusional limitation investigation. *Talanta*, 38-45.

- Roy, J. J., & Abraham, T. E. (2006). Preparation and characterization of cross-linked enzyme crystals of laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 31-36.
- Salwielikowska, A., Gniadek, M., & Palys, B. (2013). Electrodeposited graphene nano-stacks for biosensor applications. Surface groups as redox mediators for laccase. *Electrochimica Acta*, 75-81.
- Solís-Oba, M., Ugalde-Saldívar, V. M., González, I., & Viniegra-González, G. (2005). An electrochemical–spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,20-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 59-66.
- Tortolini, C., Rea, S., Carota, E., Cannistraro, S., & Mazzei, F. (2012). Influence of the immobilization procedures on the electroanalytical performances of *Trametes versicolor* laccase based bioelectrode. *Microchemical Journal*, 8–13.
- Uniprot*. (2002). Obtenido de Q12718 - LAC2_TRAVE: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q12718>
- Zheng, W., Li, Q., Su, L., Yan, Y., Zhang, J., & Mao, L. (2006). Direct Electrochemistry of Multi-Copper Oxidases at Carbon Nanotubes Noncovalently Functionalized with Cellulose Derivatives. *Electroanalysis*, 587-594.

6. Celda híbrida de combustible.

6.1. Metodología.

6.1.1. Electrodeposición de oro (Au) en ánodo de toray.

Se electrodepositó Au en un electrodo de toray de área 160 mm^2 , a partir de una solución de HAuCl_4 4 mM en ácido perclórico y en una configuración de celda de tres electrodos. Se realizó por VC a una velocidad de 100 mV s^{-1} , por 10 ciclos en la ventana de potencial $-0.1 \rightarrow 1.3 \text{ V}$ (*vs ECS*). Al término se realizó una limpieza electroquímica siguiendo la metodología descrita en la sección 5.1.1.

6.1.2. Preparación y aplicación de tintas electrocatalíticas en ánodos.

➤ Preparación de la tinta de Au/Ag.

Una tinta de Au/Ag se preparó con una mezcla de 3.5 mg polvo de Au/Ag en XC-72 Vulcan, con 49 μL de Nafión[®] 5% y 315 μL de isopropanol (Arjona, et al., 2013). Luego se dispersó la tinta por 30 minutos con ayuda de un sonicador. La impregnación de la tinta, previamente preparada, sobre el electrodo de nanofoam o toray, se llevó a cabo con ayuda de un aerógrafo. El electrodo resultante fue limpiado electroquímicamente siguiendo la metodología descrita en la sección 5.1.1.

6.1.3. Inmovilización de la enzima Lc en nanofoam y toray.

Los electrodos utilizados de nanofoam o toray fueron de área 160 mm^2 . Las siguientes inmovilizaciones se realizaron a partir de una solución estándar de Lc, compuesta de 125 μL de NTC secos, Lc (5 mg mL^{-1}) en BA pH 5 y GA (1 %) en una proporción 1:3 v/v respectivamente. Posteriormente se sumergió el electrodo en la solución estándar de Lc de 30 a 40 min. La importancia de agitar bien radica en que si la solución no se homogeneiza, habrá demasiado GA y éste impedirá el acceso del sustrato al centro activo de la enzima. El electrodo se dejó secar y posteriormente se realizó la identificación electroquímica.

Los protocolos para realizar la inmovilización por entrecruzamiento generalmente inician con la modificación de superficie del soporte o activación de grupos funcionales, sin embargo la Lc

comercial ya posee grupos amino libres con los que se puede formar el enlace covalente los grupos aldehído del GA (Durán, Rosa, D'Annibale, & Gianfred, 2002), por lo que se puede prescindir de ello.

6.1.4. Armado de la celda air-breathing.

La celda microfluídica (μ CC) (**Figura 24**) está conformada por dos tapas de acrílico de área 3.75 cm^2 y en el interior el canal de flujo se define gracias a una pieza delgada de sylvastic de $120 \mu\text{m}$ de grosor que tiene y con forma de Y. Los electrodos de toray se colocan en esta pieza con una separación entre ellos de 2 mm y se sostienen en su lugar con unas tiras de aluminio que rodean el extremo sobresaliente. En una de las tapas de acrílico del lado donde se coloca el cátodo hay una ventana para que la reacción tome el oxígeno del aire y dos entradas más pequeñas por donde entran los electrolitos. En la otra tapa hay una salida de residuos de reacción.

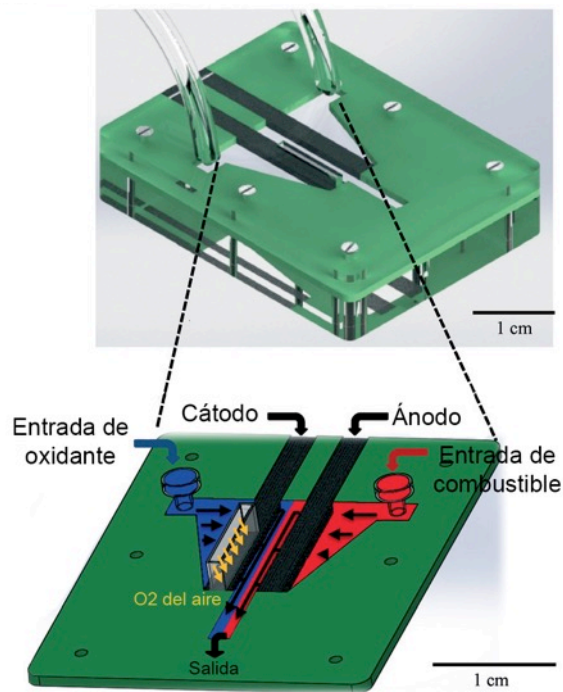


Figura 24. Esquema de una CC nanofluídica con respiradero.

Adaptado de (Ortiz-Ortega, et al., 2014).

6.2. Caracterización electroquímica.

La caracterización electroquímica se lleva a cabo evaluando la μ CC con un potenciostato/galvanostato BioLogic Science Instruments modelo VMP3. Las curvas de polarización se obtuvieron a velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} manteniendo la μ CC a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. La densidad de potencia (W en mW cm^{-2}) se calculó como el producto del potencial (E en V) y la densidad de corriente (J en mA , previamente dividida entre el área del electrodo en cm^{-2}).

6.3. Resultados y discusión

6.3.1. Evaluación del biocátodo Lc-NTC-GA en la celda híbrida nanofluídica air-breathing, en nanofoam.

Previamente con los estudios en media celda de la Lc dentro del nanofoam y toray se pudo corroborar que la enzima se encuentra de forma activa para la reducción del oxígeno, por lo que se prosiguió su evaluación en una celda de combustible híbrida que utiliza glucosa como combustible.

Para obtener los resultados en celda completa fue necesario hacer la normalización al área. Los resultados de densidad se normalizaron al área transversal del electrodo respecto al flujo de los reactivos. Para evadir la ambigüedad de los electrodos 3D, en otros trabajos también se ha recomendado usar el volumen entero de la cámara de la celda. En este dispositivo convenientemente el área transversal y el volumen tienen aproximadamente el mismo valor (0.02 cm^2 y 0.019 cm^3).

Primero se evaluó la Lc con GA para mejorar su inmovilización dentro del nanofoam como biocátodo utilizando una solución de BA pH 5 saturada con oxígeno gaseoso como catolito, mientras que el ánodo consistió en una aleación de catalizador abiótico AuAg/C, previamente reportada por el grupo de trabajo (Cuevas-Muñiz, Guerra-Balcazar, Castaneda, Ledesma-Garcia, & Arriaga, 2011), con anolito 5 mM glucosa en KOH 0.3 M saturado en nitrógeno. En la **Figura 25** se pueden observar dos curvas de polarización comparativas de la misma celda a dos flujos; 6 y 10 mL h^{-1} respectivamente, encontrando que para éste último se obtuvo un mayor desempeño de la CCH (0.84 V contra 0.61 V), sugiriendo que al aumentar el flujo del catolito se le administraba más oxígeno por lo

que su eficiencia se vio reflejado en un aumento en la densidad de corriente y activación de los catalizadores en el potencial a circuito abierto (PCA).

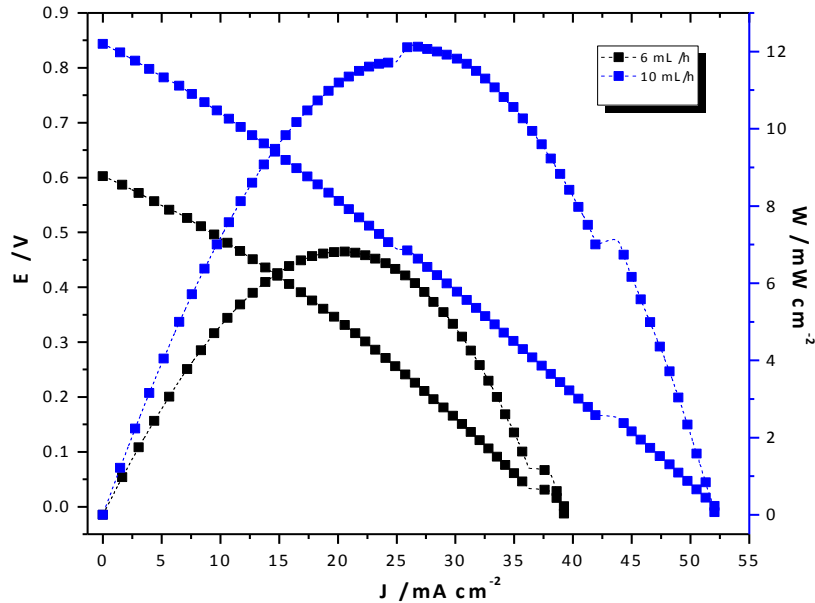


Figura 25. Evaluación de Lc en el nanofoam en celda completa híbrida a diferentes flujos.

En la **Tabla 1** se completan los resultados de operación de esta μ CC híbrida. La densidad de corriente para el flujo de 6 mL h^{-1} fue de 20.6 mA cm^{-2} y una potencia de 6.8 mW cm^{-2} , mientras que para un flujo de 10 mL h^{-1} un 28.6 % más de densidad de corriente y una potencia de 12.2 mW cm^{-2} debido a una mayor concentración de oxígeno disponible, como se ha reportado por otros autores y grupo de trabajo al realizar un estudio de variación de flujos del catolito y anolito (Kjeang, Raphaele, Harrington, Djilali, & Sinton, 2008), (Cuevas-Muñiz, Guerra-Balcázar, Esquivel, Sabaté, Arriaga, & Ledesma-García, 2012).

Tabla 1. Evaluación de Lc en el nanofom en celda completa híbrida a diferentes flujos.

Ánodo/soporte y anolito	Cátodo/soporte y catolito	Flujo mL h^{-1}	PCA (V)	Densidad corriente (pot máxima) mA cm^{-2}	Densidad de potencia mW cm^{-2}
AuAg / KOH 0.3 M con 5 mM glucosa	Lc-GA / nanofoam BA pH 5	6	0.61	20.6	6.8
AuAg / KOH 0.3 M con 5 mM glucosa	Lc-GA / nanofoam BA pH 5	10	0.84	26.5	12.2

Posteriormente, en la dispersión de Lc-GA fueron incorporados NTC multipared y se evaluaron a tres flujos 3, 6 y 10 mL h^{-1} , encontrando que para este último se obtuvo un mayor desempeño de la μCC híbrida obteniendo un PCA de 0.91 V, una densidad de corriente de 33 mA cm^{-2} y una densidad de potencia de 17 mA cm^{-2} (Figura 26). En el artículo publicado por (Cuevas-Muñiz, Guerra-Balcázar, Esquivel, Sabaté, Arriaga, & Ledesma-García, 2012), donde se utilizó el mismo ánodo y anolito que en el presente trabajo, AuAg/C, pero variando el cátodo que en su caso fue Pt/C comercial, alcanzaron un PCA de 0.67 V y una densidad de corriente y potencia máxima de 0.91 mA cm^{-2} y 0.39 mW cm^{-2} respectivamente; comparable solo a fines de materiales y métodos ya que ese trabajo no utiliza una celda *air-breathing* ni electrodos porosos.

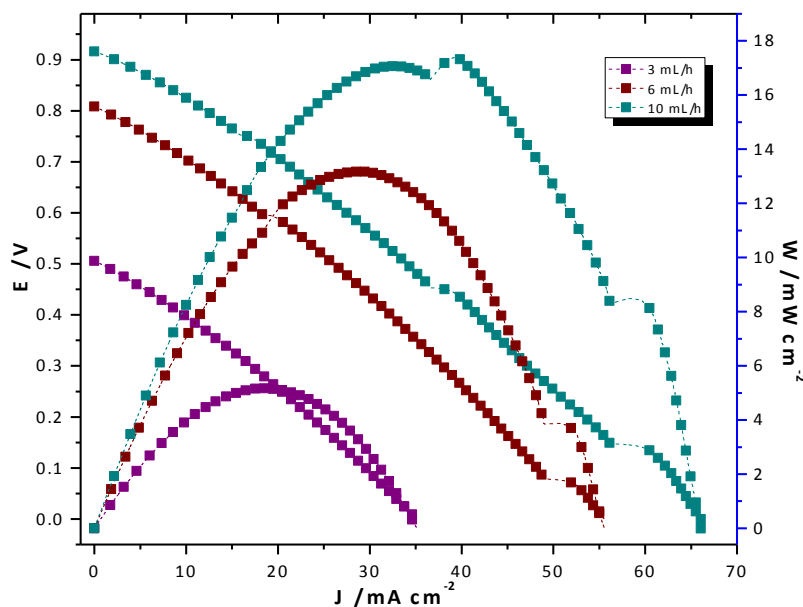


Figura 26. Lc-GA-NTC/nanofoam, a diferentes flujos.

Comparando nuestro resultado con respecto al anterior, se obtuvo un mayor PCA así como densidad de corriente y potencia principalmente, debido fundamentalmente a que la estructura de carbono 3D proporciona una mayor área electroactiva para la Lc beneficiando la densidad de corriente, que además es dividida por un área más pequeña. En este mismo sentido, el diseño de la celda al tener un respiradero le proporciona un suministro de oxígeno constante viéndose reflejado en el área de caída óhmica en la curva de polarización. El PCA más bajo obtenido fue al emplear un flujo de 3 mL h^{-1} siendo de 0.5 V, mientras que para un flujo de 6 mL h^{-1} fue de 0.81V, 0.41 V y 0.1 V menos con respecto a 10 mL h^{-1} .

Tabla 2. Resultados de la celda híbrida a diferentes flujos de entrada. El ánodo es de AuAg / KOH 0.3 M con 5 mM glucosa y el cátodo es de Lc-GA-CNT / nanofoam con BA pH 5.

Flujo mL h^{-1}	PCA (V)	Densidad de corriente (pot máxima) mA cm^{-2}	Densidad de potencia mW cm^{-2}
3	0.5	19.7	5.3
6	0.81	29.1	13.2
10	0.91	33	17

La **Figura 27** muestra las curvas de polarización y densidad de potencia de la celda de μCC comparando los cátodos de Lc-GA y Lc-GA-NTC con un ánodo de AuAg/C. El PCA máximo para la Lc-GA fue de 0.84 V, con una densidad de corriente de 28 mA cm^{-2} (a potencia máxima) y una potencia de 12 mW cm^{-2} con un flujo de 10 mL h^{-1} , mientras que con la incorporación de NTC el PCA aumentó hasta 0.92 V, con una densidad de corriente de 44 mA cm^{-2} (a potencia máxima) y una potencia de 17.2 mW cm^{-2} . Se ha reportado que la Lc presenta una transferencia directa de electrones ya que su sitio activo se encuentra dispuesto en la periferia interactuando íntimamente con la estructura de carbono 3D (Fernández-Fernández, Sanromán, & Moldes, 2013). No obstante, con la adición de NTC esta interacción se vio beneficiada reflejándose en el aumento principalmente de las densidades de corriente y potencia, ya que al introducir los NTC multicapa en la estructura, se permite una mejor TE entre el electrodo y la Lc, formando así las conexiones eléctricas entre los centros de reacción a la estructura del cátodo, lo que aumenta el coeficiente de difusión electrónica.

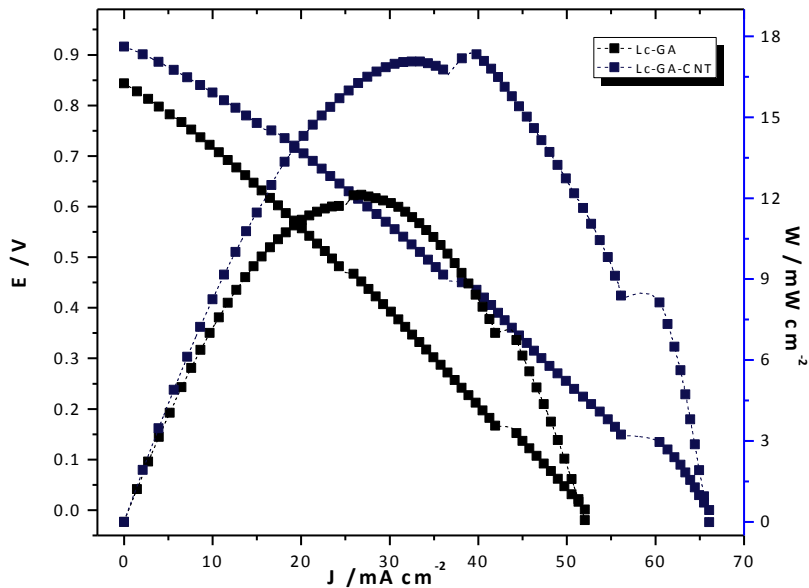
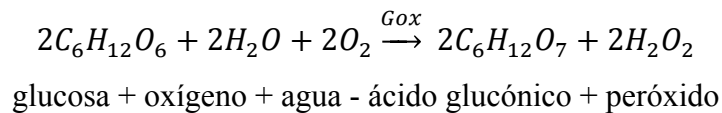


Figura 27. Curvas de polarización correspondientes a la inmovilización de Lc-GA/nanofoam y Lc-GA-CNT/nanofoam con ánodo Au/Ag y flujo de 10 mL hr⁻¹.

Finalmente, la glucosa oxidada en el ánodo posee una densidad energética teórica alta, inclusive comparable con la del metanol. Si la oxidación de la glucosa se completara hasta CO₂ se produciría un equivalente energético a $-2.87 \times 10^6 \text{ J/mol}$ y 24 electrones que son intercambiados (Basu & Basu, 2010), sin embargo sólo ocurre un intercambio de 4 electrones por parte del ánodo, que es después aprovechado por la Lc y descrito en la siguiente ecuación.



Como ventaja adicional, la glucosa es una molécula barata y abundante en la naturaleza, en particular en el organismo, donde las concentraciones varían entre 3 y 10 $m \text{ mol L}^{-1}$, intervalo entre una persona saludable y una diabética; facilitando que la glucosa se obtenga de los tejidos o del flujo sanguíneo (Ammann & Fransaer, 2013).

6.3.2. Evaluación del biocátodo de Lc-NTC-GA en la celda híbrida nanofluídica air-breathing, en toray.

Se prosiguió a utilizar el toray como estructura 3D para la inmovilización de la Lc utilizando como ánodo una estructura de Au electrodepositada de acuerdo a la metodología **6.1.1**. El aspecto físico de la estructura fue una superficie homogénea del color característico del oro. Se realizó el perfil del toray con el oro en H_2SO_4 0.5 M observando en el área de oxidación dos picos notorios en 0.6 V y 0.71 V; el primero se debe a una fuerte electroadsorción de iones hidroxilo y el segundo a la formación de los óxidos de oro AuO y Au_2O_3 en la superficie (Xu, Jia, Yang, & Dong., 2010) (**Figura 28**). Además de un pico de reducción en 0.41 V asociado con la reducción de los óxidos de Au.

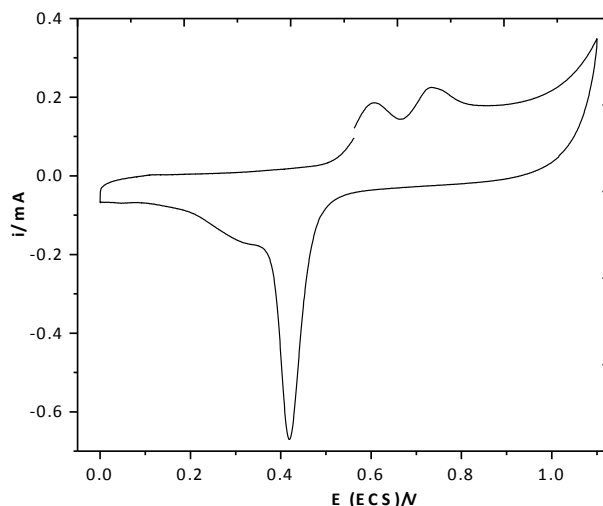


Figura 28. VC de toray con Au electrodepositado en 0.5 mM H_2SO_4 a 50 mV s^{-1} .

Demostrado que se tenía la estructura de Au electrodepositado sobre el toray, ésta se utilizó como ánodo para evaluar la Lc-NTC-GA en la celda híbrida nanofluídica y hacer un análogo a los resultados en nanofoam con el material orgánico Au/Ag, sin ser necesariamente una comparación. Para ello, se utilizaron las mismas condiciones de preparación del biocátodo así como los mismos anolito y catolito. El PCA obtenido fue de 0.66 V mientras que la densidad de corriente y potencia fueron de 0.43 mA cm^{-2} y 0.11 mW cm^{-2} respectivamente (**Figura 29**). Comparando este resultado con respecto al nanofoam con Lc-NTC-GA se encontró que está muy por debajo, siendo un 27.5 %

menos que el PCA, mientras que la densidad de corriente solo representa el 1.3 % de la generada por el nanofoam y de 0.65 % del densidad de potencia.

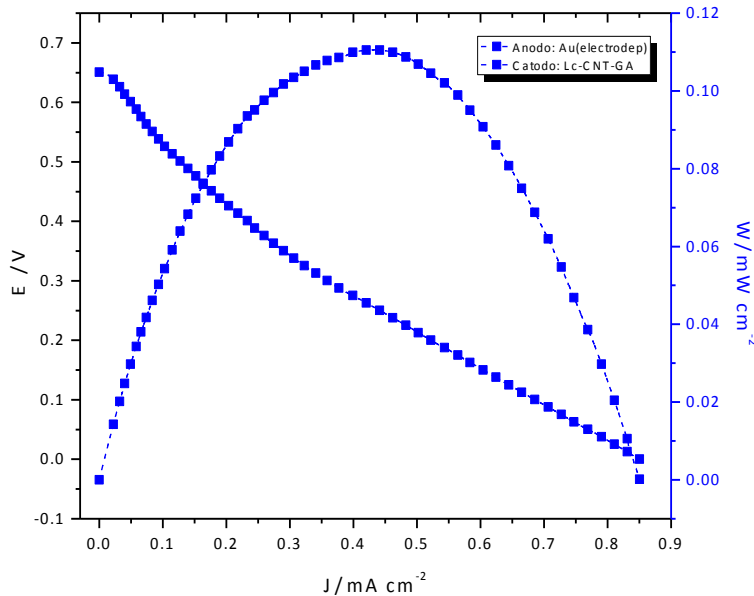


Figura 29. Curva de polarización de la inmovilización de Lc-GA-NTC/toray con ánodo de Au electrodepositado sobre toray y flujo de 10 mL hr⁻¹.

En la discusión del porqué se obtuvo un rendimiento menor con respecto al nanofoam se pueden mencionar los siguientes motivos: al tener en su estructura un tamaño de poro en el orden de las micras, los flujos podrían no ser adecuados o por el contrario, que sean altos y lixivien a la enzima reflejándose en la disminución de la densidad de corriente; el tiempo de interacción del combustible con los catalizadores es tres veces mayor en nanocanales que en microcanales, en nanofluidos se ha reportado que la cinética es más baja por lo que el rendimiento mejora a altos potenciales (Flexer, Brun, Backov, & Mano, 2010); en microporos la resistencia en el proceso de transferencia de masa es más alta que en nanoporos, por lo que tiende a crear una diferencia de concentraciones entre donde hay una mayor cantidad y los sitios de reacción ralentizando las reacciones conduciendo a la polarización de los electrodos (Kim, Jia, & Wang, 2006).

En la **Tabla 3** se muestran los resultados comparativos de celdas de combustible híbridas que usan la Lc en el cátodo incluyendo el reportado por el grupo de trabajo en una celda 2D y el reciente estudio del presente proyecto de tesis. Como se aprecia al utilizar en el ánodo Zn o su derivado los valores de

PCA son más altos con respecto a este trabajo, siendo de 1.21 V y 1.75 V para el más bajo y alto reportados respectivamente, debido principalmente a que el Zn tiene un potencial de celda de -1.2 V bajo las condiciones experimentales descritas en los artículos. Aunque más que una celda de combustible se comportan como una biobatería, ya que utiliza un catalizador redox en el ánodo y uno enzimático en el cátodo.

Tabla 3. Desempeño de celdas de combustible híbridas reportadas que utilizan lacasa en el cátodo.

Entrada	Ánodo/soporte y anolito	Cátodo/soporte y catolito	PCA (V)	Densidad corriente (mA cm ⁻²)	Potencia mW cm ⁻²
1	Zn	Lacasa-NTC-ABTS / aire	1.5	0.045	0.01
2	Zn	Lacasa-NTC-PSA / O ₂	1.25	0.4	0.275
3	Zn	Lacasa-NTC-GA	1.76	0.270	0.440
4	Zn y GOx/CNT-Cat	Lacasa-NTC-Nafion / O ₂ saturado	1.5	0.388	1
5	Zn	Bilirrubin oxidasa-NTC-nafion / O ₂	1.75	2.1	5.250
6	Zn	Lacasa-NTC / O ₂	1.5	1	0.580
7	Zn	Lacasa-NTC / O ₂ saturado	1.71	0.910	5.1
8	Zn	Lacasa-NTC / O ₂	1.63	0.484	0.600
9	AuAg/ KOH 0.3 M con 10 mM glucosa	Lacasa-ABTS-CV / BF pH5	1.21	0.7	0.45
10	AuAg/ KOH 0.3 M con 10 mM glucosa	Extracto Lacasa-ABTS-CV / BF pH5	1.21	1.1	0.5
11	AuAg/KOH 0.3 M con 5 mM glucosa	Lc-CNT-GA / BA pH 5	0.84	26.5	12.2
12	AuAg/KOH 0.3 M con 5 mM glucosa	Lc-CNT-GA / BA pH 5	0.91	33	17

6.4. Conclusiones preliminares.

Se evaluó el nanofoam y el toray en una μ CC híbrida que funciona con glucosa y con ánodos de Au/Ag o de Au electrodepositado.

Por un lado en nanofoam, se compararon los flujos 6 y 10 mL h⁻¹ en presencia de un biocátodo de Lc-GA, obteniendo que el flujo a 10 mL h⁻¹ da resultados de voltaje (0.84 V), densidad de corriente (26.5 mA cm⁻²) y potencia (12.2 mW cm⁻²) más altos, sugiriendo que a mayor flujo hay mayor disponibilidad de oxígeno para reducir. Luego se comprobó esta teoría con la incorporación de NTC en la inmovilización, ya que se encontró que a flujo de 10 mL h⁻¹ da un mejor resultado de voltaje (0.91 V), densidad de corriente (33 mA cm⁻²) y potencia (17 mW cm⁻²), incluso mayor que el electrodo de Lc-GA. Después se comparó el funcionamiento de un biocátodo de Lc-GA contra uno de Lc-GA-NTC, dando como resultados que las que más se ven beneficiadas son las densidades de corriente y potencia, ya que el incremento en PCA fue de sólo 0.07 V (de 0.85 V a 0.92 V). A pesar de que la Lc presenta TE directa porque su sitio activo se encuentra dispuesto en la periferia, los NTC ayudaron a este intercambio de electrones.

Por otro lado se hizo el electrodepósito de Au en toray y por VC se comprobó su buen funcionamiento, mostrando picos característicos en 0.6 V, 0.71 V y 0.41 V, relacionados a una fuerte electroadsorción de iones hidroxilo, a la formación de los óxidos de oro AuO y Au₂O₃ en su superficie y a la reducción de los óxidos de Au. Este electrodo se usó como ánodo en la μ CC con cátodo de Lc-GA-NTC, obteniendo como resultados 0.66 V de PCA, 0.43 mA cm⁻² de densidad de corriente y 0.11 mW cm⁻² de potencia, resultados mayores que con ánodo también inorgánico de Au/Ag, aunque no comparable; atribuido a la posible lixiviación de la enzima a este flujo y al tiempo de interacción del sustrato en los microporos del toray.

La incorporación de NTC en presencia de GA y Lc mostró ser más eficiente que en los experimentos sin ellos. Las estructuras 3D proporcionan mayor área electroactiva para la Lc y el tener un respiradero en el cátodo, le proporciona un suministro de oxígeno constante, mejorando la RRO. Hay relativamente poco control respecto a la orientación molecular, lo que puede resultar en resultados no óptimos. De entre los dos materiales que se utilizaron para el ánodo, el Au/Ag es el que mejor

funciona como material oxidante, ya que este resultado es superior a otras μ CCH anteriormente reportadas. Por último, los valores de potencia, densidad de corriente y voltaje obtenidos en este trabajo son superiores a otros reportados anteriormente en CCH.

6.5. Referencias.

- Ammann, M., Fransaer, J. (2013). Combination of laccase and catalase in construction of $\text{H}_2\text{O}_2\text{-O}_2$ based biocathode for applications in glucose biofuel cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 274–281.
- Arjona, N., Guerra-Balcázar, M., Ortiz-Frade, L., Osorio-Monreal, G., Álvarez-Contreras, L., Ledesma-García, J., y otros. (2013). Electrocatalytic activity of well-defined and homogeneous cubic-shaped Pd nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry A*, 15524–15529.
- Basu, D., & Basu, S. (2010). A study on direct glucose and fructose alkaline fuel cell. *Electrochimica Acta*.
- Cuevas-Muñiz, F., Guerra-Balcázar, M., Esquivel, J., Sabaté, N., Arriaga, L., & Ledesma-García, J. (2012). Glucose microfluidic fuel cell based on silver bimetallic selective catalysts for on-chip applications. *Journal of Power Sources*, 297–303.
- Cuevas-Muñiz, F., Guerra-Balcázar, M., Castaneda, F., Ledesma-García, J., & Arriaga, L. (2011). Performance of Au and AuAg nanoparticles supported on Vulcan in a glucose laminar membraneless microfuel cell. *Journal of Power Sources*, 5853–5857.
- Durán, N., Rosa, M., D'Annibale, A., & Gianfred, L. (2002). Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 907–931.
- Fernández-Fernández, M., Sanromán, M. Á., & Moldes, D. (2013). Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnology Advances*, 1808–1825.
- Flexer, V., Brun, N., Backov, R., & Mano, N. (2010). Designing highly efficient enzyme-based carbonaceous foams electrodes for biofuel cells. *Energy and environmental science*, 1302–1306.
- Kim, J., Jia, H., & Wang, P. (2006). Changes in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells. *Biotechnology advances*, 296–308.
- Kjeang, E., Raphaëlle, M., Harrington, D. A., Djilali, N., & Sinton, D. (2008). A Microfluidic Fuel Cell with Flow-Through Porous Electrodes. *Journal of American Chemical Society*, 4000–4006.
- Ortiz-Ortega, E., Goulet, M. A., Lee, J. W., Guerra-Balcázar, M., Arjona, N., Kjeang, E., y otros. (2014). A nanofluidic direct formic acid fuel cell with a combined flow-through and air-breathing electrode for high performance. *Lab On a Chip*.
- Xu, X., Jia, J., Yang, X., & Dong, S. (2010). A templateless, surfactantless, simple electrochemical route to a dendritic gold nanostructure and its application to oxygen reduction. *Langmuir*, 7627–7631.

7. Capítulo III - Biocelda

7.1. Metodología

7.1.1. Electrodeposición de Au en electrodos de nanofoam.

Se sigue la metodología descrita en la sección **6.1.2.**

7.1.2. Inmovilización de la Lc en nanofoam y toray.

Los electrodos utilizados de nanofoam y toray fueron de área 160 mm². Las siguientes inmovilizaciones se realizaron a partir de una solución estándar de Lc, compuesta de 125 µL de NTC secos, Lc (5 mg mL⁻¹) en BA pH 5 y GA (1 %) en una proporción 1:3 v/v respectivamente. Posteriormente se sumergió el electrodo en la solución estándar de Lc de 30 a 40 min. La importancia de agitar bien radica en que si la solución no se homogeneiza, habrá demasiado GA y éste impedirá el acceso del sustrato al centro activo de la enzima. El electrodo se dejó secar y posteriormente se realizó la identificación electroquímica.

7.1.3. Variaciones en la BCC.

- Incorporación de carbón vulcan a la solución de Lc.

Se pesaron 1.8 mg de XC-72 Vulcan y se incorporaron con los 125 µL de NTC en isopropanol. Luego se llevaron a sonicar por media hora y al término se introdujeron en la estufa a 80°C. Cuando el isopropanol evaporó por completo, se dejaron secar y se agregaron los otros reactivos de la solución estándar de Lc. Por último se sonicó por 30 segundos y se hizo el proceso de inmovilización por inmersión descrito en la sección **7.1.2.**

7.2. Caracterización electroquímica.

La caracterización electroquímica se lleva a cabo de acuerdo a la metodología descrita en la sección **6.2.**

7.3. Resultados y discusión

7.3.1. Evaluación del biocátodo Lc-NTC-GA en la biocelda nanofluídica air-breathing, con nanofoam.

Considerando los resultados más significativos obtenidos de otras μ CC híbridas con Lc y su similar glucosa oxidasa (GOx), se evaluó una biocelda de combustible nanofluídica (BCC) utilizando ambas enzimas. Para ello, el biocátodo, Lc, se preparó de acuerdo a la metodología de inmovilización junto con los NTC y GA en nanofoam, con catolito la solución de BA (0.1 M) pH 5 saturada en O₂. Por otro lado, el bioánodo consistió en una placa de nanofoam, GOx-GA-NTC, con anolito una solución amortiguadora de fosfatos (BF) 0.1 M a un pH 7.2 saturado con N₂. Cabe destacar que se evaluaron diferentes métodos de inmovilización de GOx y dispersión con los NTC, encontrando que las condiciones óptimas para este caso en particular, fueron muy similares a las de la Lc.

El mejor PCA de las BCC con respiradero evaluadas en nanofoam fue de 0.44 V y una densidad de corriente y potencia de 11 μ A cm^{-2} y 2.7 mW cm^{-2} respectivamente (**Figura 30**). La disminución del PCA en esta biocelda con respecto a las híbridas se atribuye a que el bioánodo se evaluó a un pH neutro, mientras que en los catalizadores derivados de Au fue alcalino, el óptimo para llevar a cabo una eficiente oxidación de la glucosa. Por otro lado, la corriente y la potencia también se ven afectadas por el uso de biocatalizadores que su actividad catalítica es menor con respecto a los catalizadores abióticos (Borole, LaBarge, & Spott, 2009), además, la oxidación de glucosa para este caso solo se aprovechan 2 electrones por cada molécula de glucosa oxidada, mientras que en el Au si es completa 24 electrones (Merle, et al., 2008). No obstante, es un resultado muy sobresaliente, ya que los catalizadores abióticos no tienen o es muy baja su actividad a pH's neutros o cercanos, limitando su aplicación para sistemas de energía con aplicación biomédica.

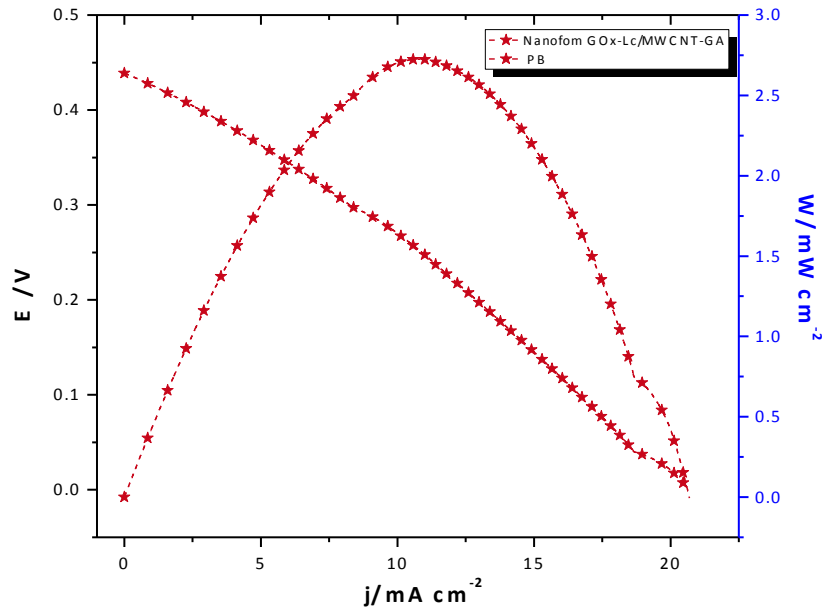


Figura 30. Curva de polarización correspondiente a la BCC de Lc-Gox/nanofoam.

La inmovilización por atrapamiento físico tiene la ventaja de que provoca perturbación estructural mínima a la conformación nativa y al funcionamiento. Además, al incorporar el GA, sus propiedades entrecruzantes lo hacen ideal para inmovilizar hidrolasas, liasas y oxidoreductasas (entre las cuales se encuentran la Gox y la Lc) en diferentes tipos de materiales (Matijosyte, Arends, de Vries, & Sheldon, 2010), ofreciendo en algunos casos conveniente practicidad debido a que las enzimas inactivas se pueden sustituir por remoción simple por enzimas nuevas.

7.3.2. Evaluación del biocátodo Lc-NTC-GA en la biocelda nanofluídica air-breathing, con toray.

De igual manera, fue evaluada la BCC en electrodos de toray en las mismas condiciones de operación con respecto a la de nanofoam (**Figura 31**). El potencial a circuito abierto alcanzado fue de 0.6 V, mayor con respecto al nanofoam, se puede sugerir que el aumento del PCA en toray se encuentra relacionado con la actividad de GOx, ya que sus resultados del PCA en la celda híbrida con el toray fueron mayores con respecto al nanofoam, alcanzando incluso potenciales de 1.3 V. La densidad de corriente y potencia alcanzada fue de $0.35 \mu\text{A cm}^{-2}$ y 0.12 mW cm^{-2} , muy similares a los alcanzados en la celda híbrida.

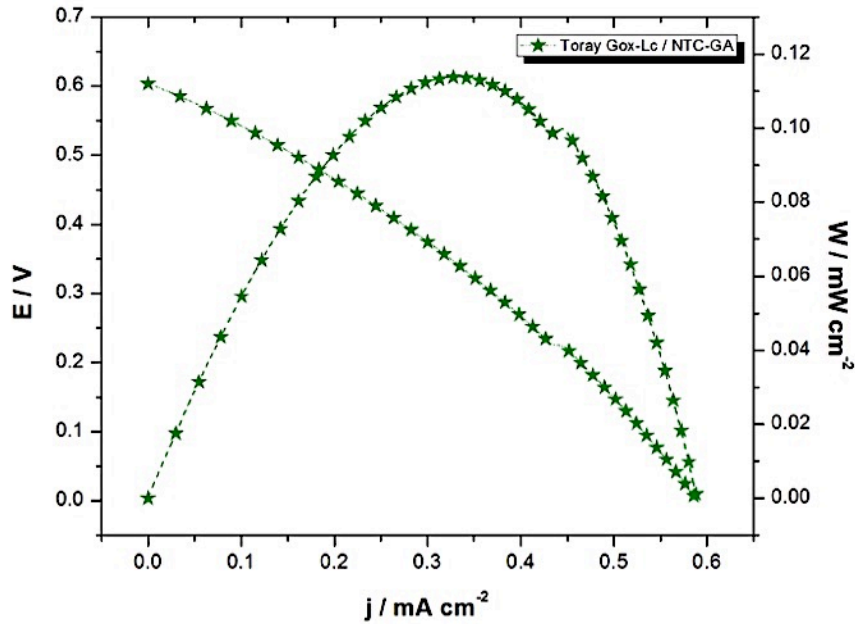


Figura 31. Curva de polarización correspondiente a la μ BCC de Lc-Gox/toray.

En la **Tabla 4** se resumen los resultados comparativos entre utilizar nanofoam y toray como estructura de carbono 3D utilizando los catalizadores enzimáticos, Gox y LC, resultado el PCA obtenido con el toray, aunque la densidad de corriente y de potencia fueron mayores para el nanofoam, en magnitudes mayores de 31 y 22.5 respectivamente.

Tabla 4. Resultados comparativos de la BCC nanoflúidica entre electrodos de nanofoam y toray.

Ánodo/soporte y anolito	Cátodo/soporte y catolito	PCA (V)	Densidad de corriente (pot máx) mA cm^{-2}	Potencia mW cm^{-2}
Gox-GA-NTC / nanofoam BF pH 7 con 5 mM glucosa	Lc-GA-NTC/ nanofoam BA 0.1 M pH 5	0.44	11	2.7
Gox-GA-NTC / toray BF pH 7 con 5 mM glucosa	Lc-GA-NTC / toray BA 0.1 M pH 5	0.60	0.35	0.12

La presencia de Lc-GA-NTC en el cátodo y Gox-GA-NTC en el ánodo se confirmó por VC del funcionamiento de la μ BCC; la eficiencia de este sistema depende de diversos factores, como lo son la adecuada incorporación de la enzima a los electrodos y del flujo a través ellos; además de las interacciones entre la enzima, el agente entrecruzante y los nanotubos.

7.3.3. Variaciones en las condiciones estándar de la μ BCC.

Los aspectos generales sobre ambas enzimas y más particularmente sobre la Lc, son requerimientos básicos para entender la forma en que su inmovilización se puede llevar a cabo y para entender las propiedades finales del catalizador inmovilizado; es por ello que sobre el mismo tipo de celda se pueden hacer diversas modificaciones. Los siguientes resultados en tablas muestran en resumen todas las variaciones que se le hicieron a las condiciones originales de la BCC nanofluídica. Primero las modificaciones de los reactivos de entrada.

- Lc en medio neutro (pH 7). Para el ánodo, se preparó la solución de glucosa 5 mM en BF; mientras que para el cátodo, en la inmovilización estándar de la enzima se sustituyó al BA por BF y el flujo de entrada fue BF saturado en oxígeno. Se usa BF pH 7 para evaluar el funcionamiento de la Lc a pH neutro como varios autores han reportado (Endrodi, Kormányos, Janáky, Berkesi, & Visy, 2014), (Tastan, Onder, & Kok, 2011) y (Żelechowska, et al., 2013); con un resultado favorable ya que el OCP aunque es bajo fue mejor comparado contra otra concentración de BA, pero no mejor que en condiciones estándar de operación (**Entrada 1**).

El resultado de operar la celda en medio neutro fue que ésta funciona pero no hay una contribución significativa de corriente, que deriva en una potencia también pequeña.

- Modificación de la concentración de reactivo. En lugar de usar BA 0.1 M se cambió por uno 0.01 M, para determinar si la concentración de iones afectaba la reacción. El resultado de PCA fue mayor de toray que en nanofoam, como se había visto en resultados anteriores, pero con este último se obtiene una mayor densidad de corriente y potencia (**Entradas 2 y 3**); posiblemente debido a que la enzima se desnaturaliza por efecto de los iones H_2O_2 que se producen en el ánodo al realizar la oxidación de glucosa y que el BA 0.01M no logra equilibrar.

Tabla 5. Variaciones de los reactivos de entrada de la μ BCC, mientras el ánodo se conserva en las mismas condiciones de GOx-GA-NTC / toray ó nanofoam en BF pH 7 con 5 mM glucosa y a un flujo de entradas de 6 mL h^{-1} .

Entrada	Cátodo/soporte y catolito	OCP (V)	Densidad corriente (pot máx) mA cm^{-2}	Potencia mWcm^{-2}
1	Lc-GA-NTC / toray BF pH 7	0.24	0.0014	0.18
2	Lc-GA-NTC/ nanofoam BA 0.01M pH 5	0.11	0.013	0.7
3	Lc-GA-NTC/ toray BA 0.01M pH 5	0.23	0.00035	0.06

Luego se evaluó la μ BCC modificando las condiciones en ambos electrodos.

- Incorporando carbón XC-72 Vulcan (**Entradas 4 y 5**). Se sabe que si los poros del material son muy grandes, la TE será más complicada, por lo que se pueden agregar otro tipo de materiales que la favorezcan. Tal es el caso del XC-72 Vulcan, que puede funcionar como relleno de los huecos de las nano/micro estructuras. Hay moléculas de materiales conductores como el XC-72 Vulcan que pueden permitir una mejor TE, dado que en la enzima el ión cobre del sitio T1 se localiza en un extremo y al fondo de una cavidad hidrofóbica (Karaskiewicz, Majdecka, Wieckowska, Biernat, & Bilewicz, 2014). Este tipo de celda funciona porque en presencia de este material, es más sencillo que los electrones sean transferidos del T1 al clúster T2/T3 que se ubica a 1.2 nm del sitio T1.
- Electrodeposición de Au en ambos electrodos previo a la inmovilización de la enzima (**Entradas 6 y 7**). En este caso los resultados fueron de un PCA máximo de 0.35 V en toray, pero con una corriente muy pequeña, mientras que en nanofoam una corriente y voltaje no tan bajos comparados con otras μ BCC. Sin embargo, estos valores no superan los obtenidos incorporando carbón vulcan, lo que da una idea de que la porosidad se reduce al hacer el electrodeposición, no permitiendo que exista una alta inmovilización de la enzima y en cambio, se favorece la potencia.

Tabla 6. Variaciones en la mezcla de inmovilización de las enzimas para ambos electrodos de la μ BCC.

Entrada	Ánodo/soporte y anolito	Cátodo/soporte y catolito	OCP (V)	Densidad corriente (pot máx) mA cm^{-2}	Potencia mW cm^{-2}
4	Gox-GA-NTC + Vulcan / nanofoam con BF pH 7 con 5 mM glucosa	Lc-GA-NTC + Vulcan / nanofoam BA 0.1M pH 5	0.16	0.07	5.6
5	Gox-GA-NTC + Vulcan / toray en BF pH 7 con 5 mM glucosa	Lc-GA-NTC + Vulcan / toray BA 0.1M pH 5	0.41	0.0018	0.48
6	Gox-GA-NTC / nanofoam + Au electrodep en BF pH 7 con 5 mM glucosa	Lc-GA-NTC / nanofoam + Au electrodep en BA 0.1M pH 5	0.23	0.1	12
7	Gox-GA-NTC / toray + Au electrodep en BF pH 7 con 5 mM glucosa	Lc-GA-NTC / toray + Au electrodep BA 0.1M pH 5	0.35	0.0075	1.5

Estas pruebas con modificaciones no arrojan resultados tan altos como los obtenidos de las condiciones estándar de la μ BCC, debido a varios factores como la orientación de las enzimas por la inmovilización por inmersión, la inactivación de la Lc o simplemente porque uno de los dos bioelectrodos no funciona eficientemente. En este sentido, la orientación de las enzimas dentro del electrodo es importante cuando se requiere de una eficiente DTE, ya que los sitios activos de la enzima generalmente no se acomodan ordenadamente.

7.4. Conclusiones preliminares.

Con el biocátodo de Lc-GA-NTC y un bioánodo de GOx-GA-NTC en una BCC el mejor resultado alcanzado en nanofoam fue de 0.44 V y una densidad de corriente y potencia de 11 mA cm^{-2} y 2.7 mW cm^{-2} respectivamente; resultado muy sobresaliente comparado con otros reportados, ya que los catalizadores abióticos no tienen o es muy baja su actividad a pH's neutros o cercanos.

Por otro lado en toray, el mejor resultado alcanzado fue de 0.6 V de voltaje, una densidad de corriente de 0.35 mA cm^{-2} y potencia de 0.12 mW cm^{-2} .

Luego se evaluaron diferentes condiciones de operación de la BCC nanofluídica, ya sea modificando los reactivos de entrada, incorporando algún otro elemento a la solución de inmovilización o hacer alguna modificación a los electrodos originales. En las variaciones a los reactivos de entrada el de mayor PCA fue usando BF pH 7 en el cátodo de toray, con voltaje de 0.24 V pero densidad de corriente y potencia muy bajas. Por otro lado al incorporar algún otro elemento en la solución de inmovilización, el mejor resultado fue el de la incorporación de vulcan en toray con voltaje de 0.41 V pero densidad de corriente y de potencia bajas, de $1.8 \mu\text{A cm}^{-2}$ y 0.48 mW cm^{-2} respectivamente. Finalmente al modificar los electrodos originales, el mejor resultado fue al electrodepositar Au en el electrodo de toray previo a la inmovilización, con un PCA de 0.35 V, densidad de corriente pequeña y potencia de 1.5 mW cm^{-2} .

Una ventaja importante en las nano/micro estructuras de carbón es que debido a su alta área superficial, hace posible que se puedan modificar interiormente o inmovilizar especies en su interior. La incorporación de enzimas como catalizadores en los electrodos de una CC, hace que su aplicación biológica cada vez se encuentre más cercana. Se comprueba que en el nanofoam la densidad de corriente es más alta que en toray, pero el PCA es más alto en toray que en nanofoam, independientemente de casi cualquier modificación a las condiciones estándar de operación, esto se debe a la TE dentro de un soporte con poros más grandes o más pequeños.

7.5. Referencias.

- Borole, A. P., LaBarge, S., & Spott, B. A. (2009). Three-dimensional, gas phase fuel cell with a laccase biocathode. *Journal of Power Sources*, 421–426.
- Endrodi, B., Kormányos, A., Janáky, C., Berkesi, O., & Visy, C. (2014). Fixation of laccase enzyme into polypyrrole, assisted by chemical interaction with modified magnetite nanoparticles: A facile route to synthesize stable electroactive bionanocomposite catalysts. *Electrochimica Acta*, 282–288.
- Karaskiewicz, M., Majdecka, D., Wieckowska, A., Biernat, J. F., & Bilewicz, R. (2014). Induced-fit binding of laccase to gold and carbon electrodes for thebiological fuel cell applications. *Electrochimica Acta*, 132–138.
- Matijosyte, I., Arends, I., de Vries, S., & Sheldon, R. A. (2010). Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 142–148.
- Merle, G., Brunel, L., Tingry, S., Cretin, M., Rolland, M., Servat, K., et al. (2008). Electrode biomaterials based on immobilized laccase. Application for enzymatic reduction of dioxygen. *Materials Science and Engineering C*, 932–938.
- Tastan, E., Onder, S., & Kok, F. N. (2011). Immobilization of laccase on polymer grafted polytetrafluoroethylene membranes for biosensor construction. *Talanta*, 524–530.
- Żelechowska, K., Stolarczyk, K., Łyp, D., Rogalski, J., Roberts, K. P., Bilewicz, R., et al. (2013). Aryl and N-arylamide carbon nanotubes for electrical coupling of laccase to electrodes in biofuel cells and biobatteries. *Biocybernetics and Biomedical Engineering*, 235–245.

8. Capítulo IV.

8.1. Conclusiones generales.

La inmovilización de la Lc se realizó sobre materiales de carbón 2D carbón vítreo y carbón grafito, encontrando el potencial de reducción de oxígeno entre 430 - 790 mV (vs ECS). Mientras que con las estructuras 3D, nanofoam y toray, el mejor resultado de inmovilización fue por inmersión del electrodo en una solución de Lc con nanotubos de carbono y una solución de glutaraldehído 1 %, encontrando la RRO alrededor de 500 mV con una mayor corriente.

Con la implementación del mediador ABTS 2.5 mM se logró identificar mejor la bioelectroactividad de la Lc dentro de las estructuras 3D mediante el aumento de la corriente en los procesos de oxidación y reducción en 0.3 V y 0.5 V (vs ECS); por medio de adiciones de ABTS y adiciones de H₂O₂ como sustrato para reducir, se encontró una mayor corriente en los picos anódicos y catódicos en nanofoam y con el toray se observó una mejor tendencia lineal.

En la celda de combustible híbrida air-breathing con el nanofoam se obtuvo el mayor rendimiento consiguiendo un PCA de 0.91 V y una densidad de corriente y potencia de 33 $\mu A cm^{-2}$ y 17 $mW cm^{-2}$ respectivamente, siendo el valor más alto reportado para celdas tipo 3D. Por otro lado, entre todas las modificaciones evaluadas para la BCC la densidad de corriente y potencia más altas conseguidas fue 11 $\mu A cm^{-2}$ y 2.7 $mW cm^{-2}$ respectivamente usando nanofoam y GOx-NTC-GA en el ánodo y Lc-NTC-GA en el cátodo. Por otro lado, con el toray se consiguió un OCP máximo de 0.6 V pero con una potencia y corriente muy por debajo con respecto al nanofoam.

Por último, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el método de inmovilización influye directamente en el desempeño de las nano y micro CC, la incorporación de los NTC beneficia la transferencia de electrones y el GA permite tener las enzimas más unificadas, mientras que las estructuras 3D proporcionan mayor área electroactiva para la Lc viéndose reflejado en una mayor densidad de corriente y potencia, de igual manera contribuye contar con un respiradero en el cátodo para proporcionar una concentración de oxígeno constante. Por lo que el método de

inmovilización y el diseño de la celda permitieron obtener resultados eficientes comparables con lo reportado por otros autores a nivel internacional.

8.2. Anexos.

8.2.1. Voltametría.

La voltametría comprende un grupo técnicas electroquímicas que se basan en la respuesta corriente-potencial de un electrodo polarizable en la solución que se analiza. En estas técnicas, se estudian los cambios de corriente, como una función del potencial aplicado a través de la celda electrolítica. El proceso involucra la electrólisis de una o más especies electroactivas, el cual comprende: reacción de la especie electroactiva en el electrodo y mecanismo de transferencia de masa. Estos últimos pueden ser por migración (movimiento de especies por diferencia de carga), convección (movimiento de la materia por cambios físicos) y difusión (movimiento de las especies por gradiente de concentración). En la mayoría de los casos, la electrólisis se efectúa bajo condiciones tales, que la difusión sea el proceso fundamental en el transporte de la especie electroactiva; la migración y la convección se minimizan por la adición de un exceso de electrolito soporte y evitando el movimiento de agitación y gradientes de temperatura.

Históricamente, la voltametría se desarrolló del descubrimiento de la polarografía por el químico checoslovaco Jaroslav Heyrovsky en 1922. Más adelante Matherson y Nichols desarrollaron los métodos de barrido rápido de potencial, técnicas (voltametría de barrido lineal y cíclica) que fueron descritas teóricamente por Randles y Sevcik.

– Voltametría cíclica.

La voltamperometría cíclica consiste en aplicar un potencial al electrodo de trabajo que cambia con respecto al tiempo, lo cual provoca por una señal de forma triangular, tal como se muestra en la figura 2.1.

El potencial se varía linealmente desde E_o hasta E_f , cuando se ha alcanzado este valor el sentido de barrido se invierte y el potencial vuelve a su valor original E_o , este ciclo de excitación puede ser repetido cuantas veces lo requiera la experiencia. Los potenciales a los que tiene lugar la inversión se llaman potenciales de cambio. El intervalo de potenciales de cambio elegido para un experimento dado, es aquel en el que tiene lugar la oxidación o reducción controlada por difusión de una o más

especies. Dependiendo del tipo de estudio, la dirección del barrido inicial puede ser negativa o positiva.

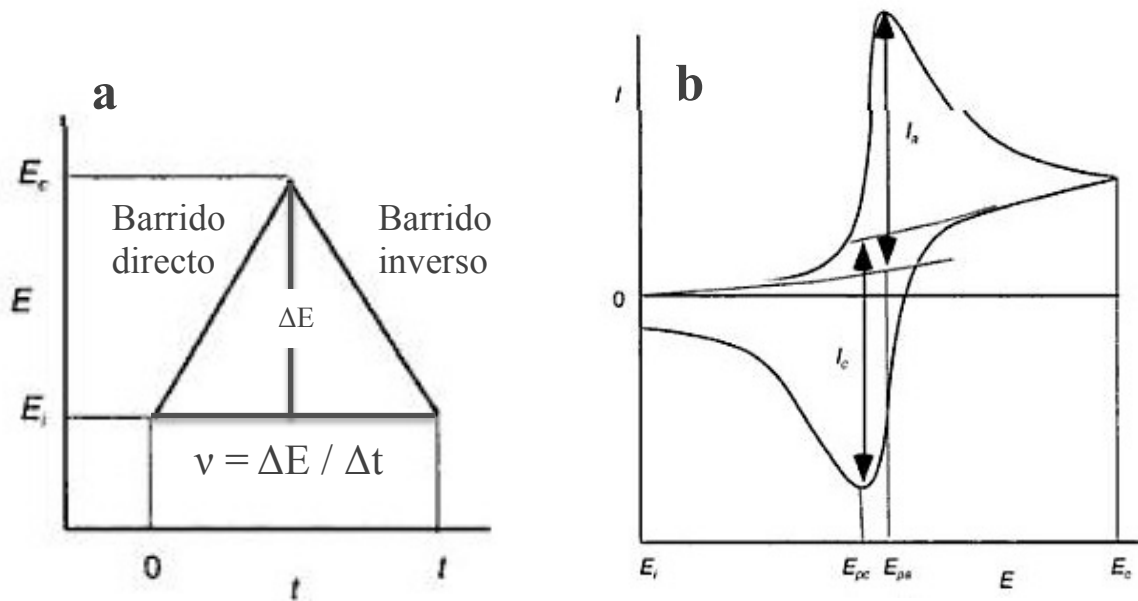


Figura 32. Voltametría cíclica. a) Barrido de potenciales. b) Voltamperograma.

En un estudio típico cuantitativo se acostumbra obtener voltamperogramas en un amplio rango de velocidades de barrido (Q) e intervalos de potencial. Comúnmente, en los voltamperogramas hay una cierta cantidad de picos y por medio de la variación de las velocidades de barrido e intervalos de potencial podemos observar como estos aparecen y desaparecen, notando las diferencias que existen entre el primer y los barridos subsecuentes se determina cómo los procesos representados por los picos están relacionados, al mismo tiempo que de la dependencia de la velocidad de barrido y amplitud del pico explica el papel de la adsorción, difusión y reacciones químicas acopladas dentro del proceso en estudio.

En el caso de los sistemas reversibles, la velocidad de la transferencia de electrones es más grande que la velocidad del transporte de masa, y el equilibrio de Nernst siempre se mantiene en la superficie del electrodo. Cuando la velocidad de transferencia de electrones es incapaz de mantener este equilibrio en el electrodo la forma del voltamperograma cíclico toma algunos cambios. A bajas velocidades de barrido la transferencia de electrones predomina sobre la transferencia de masa y el

voltamperograma registrado es como el de un proceso reversible. Sin embargo mientras la velocidad de barrido aumenta, la velocidad del transporte de masa incrementa y llega a ser comparable con la de transferencia de electrones; entonces el efecto a notar en los voltamperogramas es la separación de los picos anódicos y catódicos y se dice que es un sistema irreversible.

8.2.1.1. Referencias.

M. Noel, K. I. (2000). *Cyclic Voltammetry and the frontiers of electrochemistry*. Aspect Publications LTD.

Richard G. Compton, Graig E. Banks. (2011). *Understanding Voltametry* (Segunda ed.). Imperial College Press.

Scholz, F. (2010). *Electrochemical Methods. Guide to Experiments and Applications* (Segunda ed.). Springer.

8.2.2. Fotografías de los experimentos.



Figura 33. Acomodo de media celda.



Figura 34. Cambio de coloración al realizar las adiciones de ABTS.



Figura 35. Electrodeposición de Au a un electrodo de nanofoam.

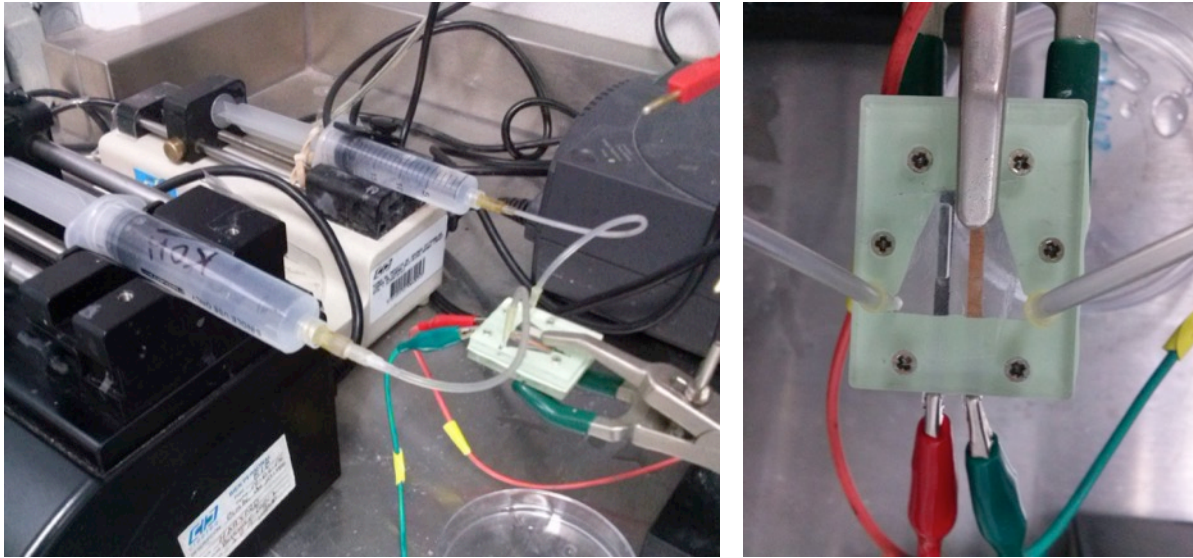


Figura 35. Experimentos en celda completa con dos flujos.

8.2.3. Perspectivas.

Dentro de lo mucho que se puede seguir trabajando en este mismo tema, está justificar cómo es que estas estructuras contribuyen o no a la RRO, desarrollar más el tema de inmovilización de enzimas por el uso de distintas metodologías, ampliar las comparaciones entre el nanofoam y el toray y mejorar los estudios de análisis de ambos materiales por VC.

También se puede ahondar más en la cuestión de usar o no mediadores y cómo incorporarlos.

Respecto al diseño de la celda y de los electrodos también hay mucho que hacer, ya que actualmente hay mucho desarrollo en los materiales para la producción de energías alternativas.

8.2.4. Abreviaturas.

Å	Armstrong
ΔE_p	Separación de pico de oxidación y reducción en voltios
μA	Microamperios
μCC	Microceldas de combustible
μL	Microlitros
μm	Micrómetros
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
Au	Oro
Au/Ag	Oro/plata
BA	Buffer acetatos
BCC	Biocelda de combustible
BF	Buffer fosfatos
CC	Celda de combustible
CCH	Celda de combustible híbrida
CV	Carbón vítreo
DTE	Directa transferencia electrónica
ECS	Electrodo de calomel saturado
GA	Glutaraldehído
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
hr	Horas
i	Corriente
J	Densidad de corriente
Km	Constante de Michaelis-Menten
Lc	Lacasa
mA	Milamperios
mg	Miligramos
mL	Mililitros

mM	Milimolar
mV	Milivoltios
nf	Nanofoam
nm	Nanómetros
NTC	Nanotubos de carbono
PCA	Potencial a circuito abierto
pH	Potencial de hidrógeno
RRO	Reacción de reducción de oxígeno
s	Segundos
TE	Transferencia electrónica
V	Voltaje
VC	Voltametría cíclica
W	Watts (Potencia)