

Dirección General de Bibliotecas UAQ



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Ingeniería en Nanotecnología



Título del proyecto:

DESARROLLO DE SISTEMA ENZIMATICO TIPO CASCADA PARA APLICACIÓN EN CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROFLUÍDICAS

Dirigido por:

Dra. Janet Ledesma García

Co-asesor:

Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa

Universidad Autónoma de Querétaro: Campus Aeropuerto
Investigación básica

Presenta:

Damián Vite González



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Ingeniería en Nanotecnología



DESARROLLO DE SISTEMA ENZIMATICO TIPO CASCADA PARA
APLICACIÓN EN CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROFLUÍDICAS

Opción de titulación:

TESIS

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

INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA

Presenta:

Damián Vite González

Dirigido por:

Dra. Janet Ledesma García

Dra. Janet Ledesma García

Presidente

Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa

Secretario

Dra. Vanessa Vallejo Becerra

Vocal

Dra. Alejandra Álvarez López

Suplente

Firma

Firma

Firma

Firma

Centro Universitario
Santiago de Querétaro, Querétaro
Fecha noviembre 2020

Resumen

En este trabajo se desarrollaron dos bioánodos basados en la inmovilización de las enzimas alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa en una matriz de nanofibras de carbono funcionalizadas como catalizadores para la oxidación parcial del etanol. Los efectos de la inmovilización enzimática y la fabricación de los bioánodos en la actividad catalítica de las enzimas fueron estudiados con técnicas bioquímicas y fisicoquímicas. Se realizaron pruebas de SEM, SECM, actividad enzimática, retención de proteína y termoestabilidad para ambos bioánodos. Las pruebas bioquímicas indican que las enzimas retienen actividad catalítica después del proceso de inmovilización. Se realizaron pruebas de media celda para los bioánodos de voltametría cíclica y voltametría de pulso diferencial. Posteriormente los bioánodos fueron evaluados en celda de combustible microfluídica contra un cátodo de Pt-Vulcan (20%), obteniendo la curva de polarización, la curva de potencia y un cronoamperograma de 30 minutos del sistema. Para el bioánodo basado en alcohol deshidrogenasa se registró un potencial máximo de 1.00 V, una densidad de corriente de 28.98 mA/cm² y una densidad de potencia de 11.07Mw/cm² en el pH óptimo con una concentración de combustible de 10mM de etanol y solución amortiguadora de Tris-HCl con pH de 9.0. Para el bioánodo basado en aldehído deshidrogenasa el potencial máximo alcanzado fue de 0.735 V, una densidad de corriente de 5.35 mA/cm² y una densidad de potencia de 1.82mW/cm² usando un combustible con una concentración de 100mM de acetaldehído en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.5. Después los bioánodos fueron implementados en una celda de combustible microfluídica configurada en cascada donde se evaluó su desempeño en conjunto. Se obtuvo la curva de polarización y la curva de potencia para el sistema con los bioánodos conectados en serie y en paralelo en el circuito. En la configuración en serie se alcanzó un potencial de 1.14 V, una densidad de corriente de 23.1mA/cm² y una densidad de potencia de 8.43mW/cm² mientras que en la configuración en paralelo se obtuvo un voltaje de 0.879 V, una densidad de corriente de 34.4 mA/cm² y una densidad de potencia de 14.98mW/cm². Finalmente se realizaron pruebas de celda de combustible microfluídica en cascada utilizando bioetanol extraído de *Salicornia Bigelovii* como combustible, obteniendo una densidad de potencia de 3.66mW/cm², comprobando así la viabilidad del sistema propuesto y los bioánodos desarrollados.

Palabras clave: bioánodo, inmovilización enzimática, nanofibras de carbono, celda de combustible microfluídica, bioetanol.

Agradecimientos

En primera instancia quiero agradecer a la Universidad Autónoma de Querétaro y a mis profesores por los conocimientos que me brindaron durante mi formación académica.

A mi asesora de tesis, la Dra. Janet Ledesma García, por la oportunidad y el apoyo brindado para que este proyecto de tesis pudiese llevarse a cabo.

A CIDETEQ, al Laboratorio Nacional de Micro y Nanofluídica, a la Universidad Autónoma de Querétaro y a CONACYT por brindar el apoyo, el equipo y el espacio sin el cual este proyecto no pudo haberse llevado a cabo.

A mi asesor, el Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa, por su invaluable apoyo, su esfuerzo, su guía y la gran paciencia que tuvo conmigo durante el desarrollo de este trabajo, sin los cuales este trabajo no hubiese sido posible.

Y finalmente pero no menos importante a mi familia, a mi padre y a mi madre, por todo el amor, trabajo y esfuerzo con el que han contribuido a mi desarrollo durante toda mi vida.

Muchas Gracias.

Tabla de contenidos

Resumen	4
Agradecimientos	5
Tabla de contenidos	6
Índice de Figuras.....	7
Lista de Abreviaciones	10
Introducción.....	11
Planteamiento del problema	13
Justificación.....	15
Hipótesis	15
Objetivos.....	16
Antecedentes	17
Metodología.....	29
Resultados y Discusión	46
Conclusiones	103
Referencias	105

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema de celda microfluídica en “Y” .	21
Figura 2. Mecanismo de reacción de la enzima ADH.	23
Figura 3. Mecanismo de reacción de la enzima ALDH.	25
Figura 4: Imágenes de SEM obtenidas donde se muestra a) la superficie de un electrodo de papel carbon Toray®, b) papel carbon Toray® con la matriz de inmovilización Nafion®-CNFs-TBAB, c) el bioánodo ADH-CNFs y d) el bioánodo ALDH-CNFs. Todas X500 aumentos.	46
Figuras 5: Imágenes de SEM a X4000 aumentos: a) bioánodos ADH-CNFs y b) ALDH-CNFs.	47
Figura 6: a) Actividad catalítica en la superficie del bioánodo ADH-CNFs en ausencia de etanol y b) vista lateral. c) Actividad catalítica en la superficie del bioánodo ADH-CNFs en presencia de etanol (100mM en la solución amortiguadora) y d) vista lateral. Las áreas que presentan actividad se denotan de color amarillo.	48
48	
Figura 7: a) Actividad catalítica en la superficie del bioánodo ALDH-CNFs sin acetaldehído y b) vista lateral. c) Actividad catalítica en la superficie del bioánodo ALDH-CNFs en presencia de acetaldehído (100mM en la solución amortiguadora) y d) vista lateral.	50
Las áreas que presentan actividad se denotan de color rojo.	50
Figura 8: Voltamperograma del bioánodo ADH-CNFs en solución de etanol 100mM en solución amortiguadora de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.8. Diferentes velocidades de barrido.	53
Figura 9: Voltamperograma del bioánodo ALDH-CNFs en solución de acetaldehído 50mM en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.4. Diferentes velocidades de barrido.	54
Figura 10: Voltamperogramas del bioánodo ADH-CNFs en solución amortiguadora de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.9, con diferentes concentraciones de etanol.	55
Figura 11: Voltamperogramas del bioánodo ALDH-CNFs en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.4, con diferentes concentraciones de acetaldehído.	56
Figura 12: Voltamperogramas del bioánodo ADH-CNFs en solución de etanol 50mM variando el pH del medio.	57
Figura 13: Voltamperogramas del bioánodo ALDH-CNFs en solución de acetaldehído 50mM variando el pH del medio.	59
Figura 14: Voltamperogramas de pulso diferencial del bioánodo ADH-CNFs en solución de Tris-HCl pH 8.8 con diferentes concentraciones de etanol.	61
Figura 15 Curva de calibración obtenida a partir de los voltamperogramas de pulso diferencial mostrados en la Figura 15.	61

Figura 16: Voltamperogramas de pulso diferencial del bioánodo ADH-CNFs en solución de Tris-HCl pH 8.8 con diferentes concentraciones de etanol.	62
Figura 17: Curva de calibración obtenida a partir de los voltamperogramas de pulso diferencial mostrados en la Figura 16.	63
Figura 18: Curva de calibración para cuantificación de proteína en solución por el método de Lowry utilizando suero de albúmina bovino (SAB).	64
Figura 19: Retención de proteína en bioánodos a)ADH-CNFs y b)ALDH-CNFs de 5x5 mm.	65
Figura 20: Prueba de actividad enzimática por tiempo de reacción a temperatura ambiente para el a)bioánodo ADH-CNFs comparado con la enzima ADH libre en solución en solución amortiguadora de Tris-HCl (pH 8.8) y b)bioánodo ALDH-CNFs comparado con la enzima ALDH libre en solución en solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4).	66
Figura 21: Prueba de actividad enzimática a temperatura ambiente en un rango de pH de 3.0 a 9.5 para el a)bioánodo ADH-CNFs comparado con la enzima ADH libre en solución y b)bioánodo ALDH-CNFs comparado con la enzima ALDH libre en solución.	68
Figura 22: Resultados del ensayo de actividad enzimática variando la temperatura de la prueba para a)la enzima ADH libre en solución, y b) el bioánodo ADH-CNFs.	70
Figura 23: Resultados de pruebas de termoestabilidad a temperatura ambiente y pH óptimo para cada enzima de los bioánodos a) ADH-CNFs y b) ALDH-CNFs.	71
Figura 24: Registro de OCVs alcanzados en con el dispositivo CCMF-ADH utilizando en diferentes pH con una concentración de 100mM de etanol como combustible.	73
Figura 25: Registro de densidades de corriente alcanzadas en con el dispositivo CCMF-ADH utilizando 100mM de etanol en el combustible y diferentes pH.	75
Figura 26: Registro de densidades de potencia alcanzadas en con el dispositivo CCMF-ADH utilizando 100mM de Etanol en el combustible y diferentes pH.	76
Figura 27: Curvas de polarización y curvas de potencia para el bioánodo ADH-CNFs en	78
Figura 28: Curvas de polarización y curvas de potencia para el bioánodo ADH-CNFs en celda de combustible microfluídica individual con concentraciones de 100, 50 y 10mM de etanol en el flujo de combustible con solución amortiguadora Tris-HCl pH 8.5.	79
Figura 29: Curvas de polarización y curvas de potencia para el bioánodo ADH-CNFs en celda de combustible microfluídica individual con concentraciones de 100, 50 y 10mM de etanol en el flujo de combustible con solución amortiguadora Tris-HCl pH 9.0.	80
Figura 30: Curvas de polarización y curvas de potencia para el bioánodo ADH-CNFs en celda de combustible microfluídica individual con concentraciones de 100, 50 y 10mM de etanol en el flujo de combustible con solución amortiguadora Tris-HCl pH 10.0.	82

Figura 31: Curvas de polarización y curvas de potencia para el bioánodo ADH-CNFs en celda de combustible microfluídica individual con una concentración de 100mM de etanol en el flujo de alimentación, varios pH.	83
Figura 32: Cronoamperometrías del sistema CCMF-ADH con una concentración de 10mM de etanol en el combustible en diferentes pH.....	85
Figura 33: Registro de OCVs alcanzados en CCMF con el bioánodo ALDH-CNFs con diferentes concentraciones de acetaldehído y diferentes pH.	87
Figura 34: Registro de densidades de corriente alcanzadas en CCMF con el bioánodo ALDH-CNFs con diferentes concentraciones de acetaldehído y diferentes pH.....	88
Figura 35: Registro de densidades de potencia alcanzadas en CCMF con el bioánodo ALDH-CNFs con diferentes concentraciones de acetaldehído y diferentes pH.....	89
Figura 36: Curvas de polarización y curvas de potencia para el dispositivo CCMF-ALDH con concentración de acetaldehído en el anolito de 100mM en pH 7.0.	90
Figura 37: Curvas de polarización y curvas de potencia para el dispositivo CCMF-ALDH con concentraciones de acetaldehído en el anolito de 100 y 10mM en pH 7.5.	91
Figura 38: Curvas de polarización y curvas de potencia para el dispositivo CCMF-ALDH con concentraciones de acetaldehído en el anolito de 100 y 50mM en pH 9.0.	92
Figura 39: Cronoamperometrías del sistema CCMF-ADH con distintos pH y 10mM de acetaldehído en el combustible.....	94
Figura 40: Curvas de polarización y curvas de potencia para el dispositivo CCMF-ADH-ALDH en pH 8.86 con una concentración de etanol inicial de 100mM en el anolito.....	95
Figura 41: Cronoamperometría del sistema CCMF-ADH-ALDH en solución amortiguadora de Tris-HCL pH 8.86 configurado en serie y en paralelo.....	98
Figura 42: Curvas de polarización y curvas de potencia para el dispositivo en cascada CCMF-ADH-ALDH configurado en serie con un pH de 8.86 utilizando bioetanol como combustible primario.	99
Figura 43: Cronoamperometría del sistema CCMF-ADH-ALDH en solución amortiguadora de Tris-HCL pH 8.86 configurado en serie utilizando bioetanol como combustible primario.	100

Lista de Abreviaciones

ADH	Alcohol deshidrogenasa
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
SEM	Microscopía electrónica de barrido
CNFs	Nanofibras de carbono
CCMF	Celda de combustible microfluidica
SECM	Microscopía electroquímica de barrido
ADH-CNFs	Bioánodo basado en alcohol deshidrogenasa
ALDH-CNFs	Bioánodo basado en aldehído deshidrogenasa
ADH-CCMF	Celda microfluídica individual con el bioánodo ADH-CNF
ALDH-CCMF	Celda microfluídica individual con el bioánodo ALDH-CNF
ADH-ALDH-CCMF	Celda microfluídica en cascada con ambos bioánodos

Introducción

Las celdas de combustible son dispositivos que producen energía eléctrica a partir de energía química por medio de la reacción entre un combustible y un oxidante (Arechederra et al., 2009; Aquino *et al.*, 2013). Actualmente representan un área de interés en la investigación porque representan una alternativa a la quema de combustibles fósiles como fuente de energía y por su versatilidad de funcionamiento y múltiples aplicaciones (Allan et al., 2016; Heller et al. 2003).

Una celda de combustible consiste fundamentalmente de un cátodo, un ánodo y un medio electrolítico para el intercambio iónico entre ellos, aunque diferentes arreglos, materiales y componentes adicionales han sido estudiados con el fin de mejorar su eficiencia (Kamil et al., 2008; Kjeang et al., 2008; Sun et al., 2007). Entre los arreglos de celdas de combustible, destacan las celdas de combustible microfluídicas (CCMFs) debido a que explotan el flujo co-laminar que se da en la microescala para separar el combustible de la especie oxidante, eliminando la necesidad de una membrana que realice esta función, como en las celdas de combustible convencionales (Choban et al., 2003; Ho et al., 2011; Kjeang et al., 2008). Las CCMFs pueden ser diseñadas con diferentes arquitecturas y catalizadores, permitiéndoles utilizar diversos tipos de combustibles y ampliando su campo de aplicaciones. El ánodo ha sido el foco de las investigaciones en este ámbito, por ser donde ocurre la reacción de oxidación del combustible (Bazylak et al., 2005; Choban et al., 2004; Jayashre et al., 2005; Kjeang et al., 2009).

Entre los combustibles utilizados en estos dispositivos los alcoholes son de gran interés debido a que pueden ser transportados y almacenados con facilidad y se pueden obtener fácilmente de diversas fuentes (Ahmed et al., 2001; Braunchweigh et al., 2013; Jiang et al., 2000; Shao et al., 2002). Los alcoholes más utilizados en las celdas de combustible son metanol y el etanol, siendo el etanol el de mayor interés por su baja toxicidad, densidad energética superior a la de otros alcoholes (6.32 kWhL⁻¹), (Badwal et al., 2015; Galindo-de-la-Rosa et al., 2016; Lam et al., 2008; Ribeiro et al., 2011), de fácil obtención

a partir de recursos naturales y en el caso de las CCMFs por su disponibilidad en fluidos corporales, permitiendo su uso como fuente de energía para dispositivos biométricos portátiles.

Para el uso de alcoholes en celdas de combustibles, es requerido un catalizador que permita llevar a cabo la oxidación del alcohol. Los catalizadores biológicos, específicamente las enzimas, han sido ampliamente estudiadas por las ventajas que presentan sobre los catalizadores convencionales: alta especificidad de reacción, bajo costo, y reducción de dimensiones del dispositivo donde se emplean (Minteer et al., 2007; Zhang et al., 2010).

Para utilizar enzimas como catalizadores se requiere de un proceso de inmovilización que las vuelva insolubles. La inmovilización de la enzima le brinda estabilidad a la enzima, extiende su tiempo de actividad y el rango de condiciones en las que puede operar. El soporte juega una parte importante en el desarrollo del bioánodo enzimático, ya que a través de él se lleva a cabo la transferencia electrónica producto de la oxidación del combustible (Arrocha et al., 2014).

Entre los materiales utilizados como soporte para la inmovilización enzimática los materiales nanoestructurados son de interés debido a su alta área superficial, tamaño y propiedades físicas. (Lu et al., 2008; Vamvakaki et al., 2006; Wang et al., 2008; Wang et al., 2006) Se ha reportado el uso de nanofibras de carbono (CNFs) para inmovilización enzimática, particularmente deshidrogenasas, por sus características morfológicas y electroquímicas (Huang et al., 2008; Weeks et al., 2008).

De la oxidación completa del etanol a dióxido de carbono y agua se espera obtener doce electrones, sin embargo, por su especificidad con el combustible, un bioánodo no lleva a cabo la oxidación completa del compuesto (Aquino et al., 2013; Arechederra et al., 2009). Una manera de aprovechar la densidad energética del etanol es con un sistema en cascada. El diseño de sistemas en cascada nos permite llevar a cabo la oxidación completa del combustible utilizando bioánodos con diferentes enzimas inmovilizadas en

cada uno, en donde los productos de la primera reacción se convierten en los reactivos de la siguiente, así eliminando intermediarios no deseados como acetaldehído y formaldehído (Addo et al., 2010; Cooney et al., 2008).

En este trabajo de investigación se buscó desarrollar sistemas enzimáticos tipo cascada para la oxidación del etanol utilizando las enzimas alcohol deshidrogenasa (ADH) y aldehído deshidrogenasa (ALDH), utilizando nanofibras de carbono como soporte de inmovilización. Las enzimas son catalizadores eficientes de bajo costo ideales para su aplicación en sistemas biocompatibles, de sensado y de producción de energía. Por su parte las nanofibras de carbono son igualmente de bajo costo y por sus propiedades fisicoquímicas son viables para aplicaciones de generación de energía e inmovilización enzimática. Este trabajo permitirá abrir las puertas a investigaciones que permitan el desarrollo de nuevas maneras de aprovechamiento de biocombustibles, así como sensores biológicos y dispositivos biomédicos diversos.

Planteamiento del problema

El desarrollo de un sistema enzimático en cascada de dos etapas requiere la fabricación de dos bioánodos enzimáticos. Para garantizar el funcionamiento del sistema completo se requiere que la primera reacción de oxidación de etanol a acetaldehído se lleve a cabo con un rendimiento suficiente para producir suficiente acetaldehído que permita que se lleve a cabo la reacción en la segunda etapa (Sokic-Lazic et al., 2011). Un indicador de la eficiencia de las celdas de combustible desarrolladas a partir de los bioánodos fabricados es su desempeño energético, evaluado por técnicas electroquímicas (Sokic-Lazic et al., 2010).

Los dispositivos que utilicen la oxidación del etanol para generar energía se enfrentan a otro problema para poder ser aplicados en el área biomédica. El acetaldehído producido en la reacción es una sustancia tóxica y cancerígena (Perez et al., 2003). El acetaldehído se acopla por enlace covalente a diversas proteínas en el organismo, alterando su estructura y función. Entre sus efectos nocivos se han reportado que impide la secreción

de proteínas en células hepáticas y favorece la peroxidación lipídica (Burke et al., 1979; Homann et al., 1997; Lieber et al., 1998; Marchner et al., 1978; Perez et al., 2003). Para el desarrollo de dispositivos biomédicos que utilicen celdas de combustible de etanol es de interés llevar a cabo la oxidación del acetaldehído, reduciendo el riesgo a la salud que representa y aprovechando la energía obtenida de su oxidación. Muchos sistemas en cascada se han enfocado a la oxidación del etanol y del acetaldehído utilizando las enzimas ADH y ALDH por su especificidad y alto rendimiento (Akers et al., 2005; Moehlenbrock et al., 2008). De nuevo se recalca la importancia de llevar a cabo un proceso de inmovilización para poder utilizar estas enzimas como catalizadores en aplicaciones en celda microfluídica de combustible.

Las enzimas por si solas presentan algunas desventajas frente otros tipos de catalizadores: sólo trabajan en condiciones de pH y temperatura específicas y tienen un tiempo de vida útil antes de perder su actividad catalítica. Diferentes materiales, soportes, arquitecturas y métodos de inmovilización se ha estudiado con el fin de desarrollar CCMFs más eficientes. La selección del soporte para la inmovilización enzimática es un factor importante en el desempeño final de la celda debido a que afecta la actividad enzimática del bioánodo, el tiempo de actividad catalítica y la conducción eléctrica (Leech et al., 2012). Las interacciones que rigen la inmovilización tienen un efecto en la actividad y estabilidad de la enzima inmovilizada, siendo las uniones covalentes las que presentan mejor estabilidad y tiempo de actividad (Arrocha et al., 2014; Davis et al., 1983; Kim et al., 2006; Minteer et al., 2007). Se ha reportado el uso de nanomateriales como soportes para enzimas deshidrogenasas en bioceldas de combustible (A. de-Poulpiquet et al., 2014; Aquino et al., 2011; Kim *et al.*, 2006; Wu et al., 2007) que demuestran la viabilidad del uso de nanoestructuras para la inmovilización enzimática en aplicaciones electroquímicas.

Justificación

El desarrollo de bioánodos enzimáticos para su aplicación en celdas de combustible representa un área de innovación en las tecnologías de producción de energía y sensores por ser específicos en su reacción, energéticamente eficientes, de dimensiones reducidas y de bajo costo (Belike et al., 2009; Sokic-Lazic et al., 2011). Nuevos métodos de inmovilización, materiales soporte y enzimas/combustibles son propuestos constantemente en la actualidad debido a la gran variedad de posibles aplicaciones de esta tecnología, desde la producción de energía hasta dispositivos biomédicos (Bandodkar et al., 2006; Moehlenbrock et al., 2008; Willner et al., 2009; Zhou et al., 2012).

En un sistema de reacción en cascada como el propuesto el desempeño individual adecuado de cada bioánodo es indispensable para el funcionamiento correcto del dispositivo final. Es por esto que los bioánodos deben ser caracterizados individualmente así como en conjunto dentro del sistema en cascada. Las caracterizaciones electroquímicas permiten determinar si el desempeño de los bioánodos es adecuado y el perfil final de posibles aplicaciones en los que pueden utilizarse. Las caracterizaciones fisicoquímicas y bioquímicas por su parte nos brindan información sobre los efectos de la inmovilización enzimática en la actividad de la enzima, así como parámetros generales de la inmovilización realizada. Asimismo estas caracterizaciones nos permiten definir los parámetros óptimos de operación del dispositivo en cascada final.

Hipótesis

El uso de nanofibras de carbono como soporte de inmovilización enzimática nos permitirá utilizar las enzimas alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa como catalizadores en un sistema de celda de combustible microfluídica en cascada.

Objetivos

Desarrollar bioánodos enzimáticos utilizando enzimas deshidrogenasas inmovilizadas sobre un soporte de nanofibras de carbono (en adelante CNFs) para su aplicación en un sistema de celda de combustible microfluídica en cascada con aplicaciones en las áreas biomédica y de generación de energía.

Los objetivos específicos necesarios para llevar a cabo este proyecto comprendieron:

- a) Elaborar los bioánodos por medio de un proceso de inmovilización enzimática utilizando nanofibras de carbono.
- b) Caracterizar bioquímica, electroquímica y fisicoquímicamente de los bioánodos obtenidos por medio de ensayo de actividad enzimática, ensayo de retención de proteína, ensayo de termoestabilidad, microscopía electroquímica de barrido, y voltametría de pulso diferencial.
- c) Evaluar el desempeño de los bioánodos desarrollados en una celda de combustible microfluídica por medio de voltametría cíclica de barrido y cronoamperometría.
- d) Evaluar los bioánodos en un sistema de celda de combustible microfluídica en cascada utilizando como combustible bioetanol obtenido de *Salicornia Bigelovii* con el fin de corroborar los resultados obtenidos con un combustible alternativo por medio de voltametría cíclica de barrido y cronoamperometría.

Antecedentes

Combustibles – Etanol y Acetaldehído

El etanol es un combustible de gran interés actualmente debido a su alta densidad energética (3.6 KJ/L) (Wyman et al., 1990) y su baja toxicidad en comparación con otros alcoholes como el metanol (Wyman et al., 1990). El etanol es un compuesto disponible como residuo de procesos industriales ya establecidos y puede ser producido como bioetanol a partir de fuentes sustentables como lo es la biomasa vegetal. Su bajo costo de producción, manejo y transporte lo convierten en una opción viable para la producción de energía (An et al., 2015; Vigier et al., 2004; Zhu et al., 2010).

En la actualidad el aprovechamiento de recursos renovables representa una tendencia en las áreas de investigación a nivel mundial. El bioetanol es etanol producido por medios de fermentación de materia orgánica y es de gran interés debido a su neutralidad de carbono, facilidad de manejo y transporte, alta solubilidad en agua, bajo costo y toxicidad, nula presencia de azufre en su composición y que es amigable con el medio ambiente (Arteaga et al., 2008; Benito et al., 2007; Qin et al., 2010). Es el biocombustible de mayor interés debido a estas ventajas y diversas tecnologías, entre ellas celdas de combustible, se desarrollan actualmente para su aprovechamiento (Deng et al., 2009).

El bioetanol ha sido obtenido de diversas fuentes de biomasa. *Salicornia Bigelovii* es una planta halófila endémica del noroeste de México a partir de la cual se ha obtenido bioetanol con el fin de aprovechar los recursos naturales de zonas áridas (Cybulska et al., 2014; Troyo-Diéguéz et al., 1994). Diferentes métodos de tratamiento y procesamiento han sido reportados. Se ha demostrado la viabilidad del bioetanol producido de *S. Bigelovii* como combustible comparándolo electroquímicamente con etanol analítico y obteniendo densidades de corriente similares (Bañuelos et al., 2008).

La oxidación completa de una molécula de etanol es de interés. Esto debido, además del aprovechamiento energético, que la oxidación parcial del etanol produce acetaldehído. El acetaldehído es un compuesto que representa un riesgo a la salud debido a que es

un compuesto irritante para los ojos, piel y sistema respiratorio (Pariente et al., 1995). Los efectos de la exposición a acetaldehído por periodos prolongados son similares a los del alcoholismo y varios estudios lo identifican como un compuesto posiblemente cancerígeno (Zhang et al., 2012). Para aprovechar el contenido energético el etanol de manera más eficiente y resolver la problemática de salud que representa su producción se requiere llevar a cabo la oxidación de este compuesto (Aquino et al., 2012; Badger 2002; Galindo-de-la-Rosa et al., 2017).

Las celdas de combustible que utilizan etanol para generar energía tienen diversas aplicaciones como son: la producción de energía, dispositivos para aplicaciones biomédicas y sensores (Kirubakaran e tal., 2009; Wyman et al., 1990). Diferentes arquitecturas, catalizadores y electrodos han sido estudiados para mejorar la eficiencia de estas celdas para diferentes aplicaciones particulares (DeLuca et al., 2006; Dennis et al., 2007; Xuan et al., 2008).

Para el uso de etanol como fuente de combustible, se ha propuesto el uso de CCMFs con catalizadores biológicos (Armenta et al., 2015; Kjeang et al., 2008; Moore et al., 2004; Selloum et al., 2014;). Se pretende utilizar enzimas para llevar a cabo la oxidación del etanol, particularmente las deshidrogenasas son las encargadas de llevar a cabo esta reacción en los seres vivos (Galindo-de-la-Rosa et al., 2017; Topcagic et al., 2005). Por su especificidad, una enzima no puede llevar a cabo una reacción de oxidación completa de etanol, por lo que se han desarrollado sistemas en serie, o cascada, que emplean múltiples enzimas para lograr la oxidación completa del etanol, paso por paso (Akers et al., 2005; Davis et al., 1983). Las primeras enzimas que llevan a cabo esta reacción son la alcohol deshidrogenasa (ADH), que lleva a cabo la reacción de oxidación de etanol a acetaldehído, y la acetaldehído deshidrogenasa (ALDH) que lleva a cabo la oxidación de acetaldehído a ácido acético (Galindo-de-la-Rosa et al., 2017; Moehlenbrock et al., 2008; Swift et al., 2003).

Los resultados reportados en la literatura para sistemas basados en bioánodos enzimáticos se muestran en la Tabla 1. Estas referencias permiten comparar los

resultados obtenidos de la evaluación de sistemas electroquímicos y enzimáticos para determinar su viabilidad.

Tabla 1: Desempeños de celdas de combustible con bioánodos enzimáticos reportados.

Diseño del ánodo y concentración de etanol	Diseño del cátodo y solución oxidante	Tipo de celda	Densidad de potencia	Referencia
ADH-PQQ dependiente, nanotubos decorados con AuNPs sobre papel Toray, (arquitectura DET), Nafion (modificado con TBAB), EtOH = 0.02 mol L ⁻¹ en solución amortiguadora de Tris-HCl pH = 7	Bilirrubina sobre Nafion (modificado con TBAB) y MWCNTs modificados con antraceno. 0.2 M Tris-HCl Solución amortiguadora y 1mM CaCl ₂ , electrodo saturado de calomel como referencia, malla de platino como contra electrodo.	PEM	22 +- 4 μW cm ⁻²	Aquino, 2016
ADH-PQQ dependiente, nanotubos decorados con AuNPs e intermediario de FcMe ₂ -c ₃ -LPEI sobre papel Toray, (arquitectura MET), Nafion (modificado con TBAB), EtOH = 0.02 mol L ⁻¹ en solución amortiguadora de Tris-HCl, pH = 7	Bilirrubina sobre Nafion (modificado con TBAB) y MWCNTs modificados con antraceno. 0.2 M Tris-HCl Solución amortiguadora y 1mM CaCl ₂ , electrodo saturado de calomel como referencia.	PEM	226 +- 21 μW cm ⁻²	Aquino, 2016
ADH sobre papel Toray recubierto con poli(verde de metileno), Nafion (modificado con TBAB), EtOH 1mM y 1mM NAD ⁺ en solución amortiguadora de fosfatos pH= 7.15	20% Pt en Vulcan XC-72. Solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.15, O ₂	PEM	1.16 +- 0.05 mW cm ⁻²	Alkers, 2004
ADH/nanotubos de carbono funcionalizados con 4-azidoanilina MeOH 200 mM en solución amortiguadora de fosfatos 100mM purgado con nitrógeno, pH= 7.5	Lacasa inmovilizada sobre electrodo de grafito con 4-(2-aminoetil) ácido benzoico. Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.5, O ₂	CCMF	40 mW cm ⁻²	Arrocha, 2014
ADH inmovilizado en papel Toray con verde de metileno y Nafion tratado con TBAB, 1.9 mmolL ⁻¹ NAD EtOH 0.1M en Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2	Electrodo de platino 20% sobre vulcan XC-72	PEM	88 +- 7 μW cm ⁻²	Aquino, 2013

Celdas de combustible microfluídicas

Las celdas de combustible son dispositivos que permiten obtener energía eléctrica a partir de la energía contenida en compuestos químicos por medio de una reacción de oxidación – reducción. Las celdas de combustible constan de tres componentes fundamentales para su funcionamiento, dos electrodos y un medio electrolítico que permita el paso de iones entre ellos. Los electrodos se dividen en dos, un cátodo en cuya superficie se lleva a cabo la reacción de reducción y un ánodo en cuya superficie se lleva a cabo la reacción de oxidación del combustible (Appleby 1994; Kordesch et al., 1988). En la superficie del ánodo el combustible pierde electrones al oxidarse, los cuales son transportados a través del ánodo y posteriormente a través de un circuito eléctrico externo al cátodo. El ánodo es de importancia en estos dispositivos debido a que es el sitio de inicio de la reacción a partir de la cual se genera una corriente eléctrica.

El ánodo es el electrodo negativo de una celda de combustible. Permite recolectar los electrones liberados por las moléculas durante la reacción en cuestión. Permiten además dispersar moléculas de hidrogeno sobre su superficie, permitiendo así el intercambio de iones con el cátodo. En la superficie del ánodo ocurre la reacción de oxidación en la que se basa el funcionamiento de una celda de combustible. Es a través de este componente que se recolectan los electrones derivados de la reacción de oxidación y son transferidos al circuito eléctrico externo.

Al oxidarse el combustible en el ánodo, los iones producidos viajan a través del medio electrolítico hacia el cátodo, donde se completa la reacción de reducción y se forman los productos de reacción. Los electrones obtenidos de la oxidación del combustible viajan desde el ánodo hacia el cátodo a través de un circuito externo, generando así una corriente eléctrica y completando la reacción de reducción (Appleby 1994; Kordesch et al., 1988).

Las celdas de combustible son dispositivos versátiles gracias a las modificaciones que se le pueden realizar a cada uno de sus componentes, sus diversas arquitecturas y la gran variedad de combustibles que pueden utilizar (Appleby 1994; Kordesch et al., 1988; Wang et al., 2017). Esto les brinda una gran gama de aplicaciones, desde generación de energía hasta sensores químicos. Su principal ventaja sobre otros métodos de generación de energía es que son dispositivos que generan energía limpia, es decir, que son una fuente baja de gases de efecto invernadero (Wang et al., 2017).

Una celda de combustible microfluídica es una celda de combustible que explota las ventajas del confinamiento microfluídico del medio electrolítico en el que se lleva a cabo el intercambio iónico entre los electrodos. Este confinamiento permite que el flujo del combustible y el agente oxidante se de carácter laminar (Choban et al., 2004; Jayashree et al., 2005; Kjeang et al., 2008). Esto evita la necesidad de una membrana protónica que separe los flujos de alimentación para evitar entrecruzamiento de combustible hacia el cátodo. Asimismo el flujo laminar no afecta el intercambio iónico entre los electrodos a través del electrolito, permitiendo su intercambio en los extremos finales de estos componentes (Bazylak et al., 2005; Kjeang et al., 2007). En la Figura 1 a continuación se muestra el esquema de la celda de combustible microfluídica utilizado.

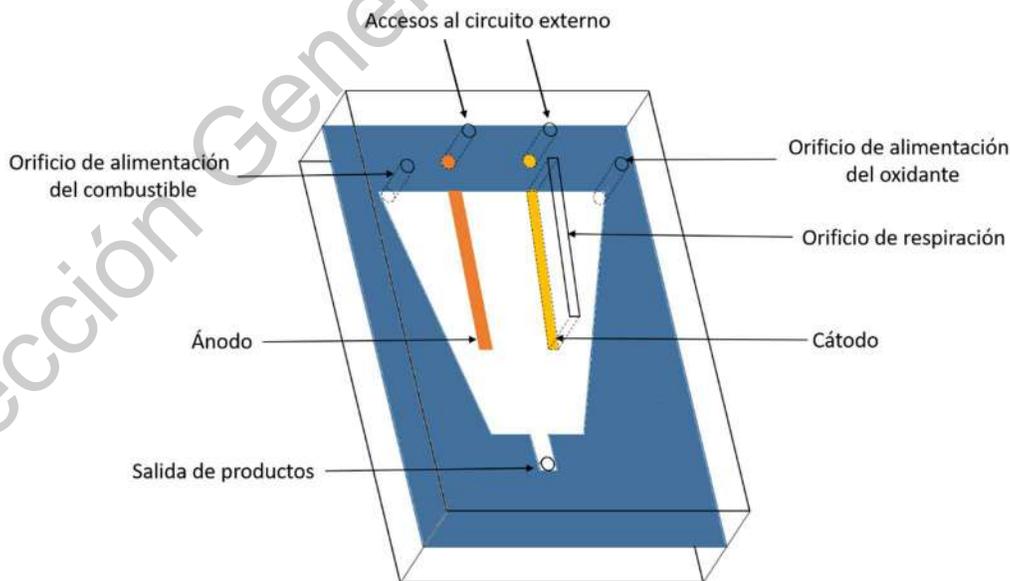


Figura 1. Esquema de celda microfluídica en "Y".

Un sistema de celda de combustible en cascada utiliza dos o más celdas de combustible conectadas una tras otra de manera que los productos generados en la primera celda fluyen y se convierten en reactivos para llevar a cabo una o más reacciones adicionales (Addo et al., 2010; Sokic-Lazic et al., 2010). Esto permite aprovechar en mayor medida el contenido energético del combustible. En el sistema propuesto la enzima ADH genera acetaldehído como producto en la primera celda de combustible, el cual fluye hacia la siguiente celda en la que la enzima ALDH oxida el acetaldehído a ácido acético, aprovechando de manera más eficiente el contenido energético del etanol y obteniendo un mayor potencial y densidad de corriente a través del dispositivo (Addo et al., 2010; Arechederra et al., 2009; Sokic-Lazic et al., 2011; Zhu et al., 2012).

Enzimas

Alcohol deshidrogenasa

La ADH forma parte de las enzimas deshidrogenasas, puede ser obtenida de diversos organismos y se encuentra disponible comercialmente. Dependiendo del organismo del que se extraiga puede tener diferentes estructuras y sitios activos, pero su función es la misma. Actúa oxidando una molécula de alcohol, usualmente etanol o metanol, en acetaldehído y reduciendo a su vez el compuesto nicotinamida adenina dinucleótido (de NAD⁺ a NADH). La ADH opera de manera óptima bajo condiciones de temperatura de 25°C y pH de 8.80 (Dickenson *et al.*, 1975), mejorando su estabilidad y tiempo de actividad al ser sometida a un proceso de inmovilización.

La ADH es parte de una familia de enzimas que llevan a cabo la oxidación del etanol y reducen a su vez la coenzima nicotin adenin dinucleótido (NAD⁺ en su forma oxidada y NADH en su forma reducida). Diferentes mecanismos de reacción existen para la ADH, dependiendo del organismo de origen (Modig et al., 2002). En algunos casos requiere coenzimas o cofactores para llevar a cabo la reacción, pero a grandes rasgos el principio por el que ocurre la reacción es el mismo. Para este trabajo se utilizarán ADH obtenidas de levaduras de *S. Cerevisiae*. La estructura de la ADH es un homo tetrámero de

polipéptidos, con 4 subunidades cada una con su dominio catalítico y coenzimático. Para llevarse a cabo la reacción se requiere además de etanol y ADH, la presencia de NAD^+ , y zinc como cofactor. El zinc cumple funciones estructurales y catalíticas en la enzima (Eklund et al., 1976; Kreitman et al., 1983).

El mecanismo de reacción de la ADH se basa en una cadena de transferencia de protones. Comienza con la formación del complejo ADH- NAD^+ . La ADH en su centro activo posee un átomo de zinc, el cual se liga a los pares de electrones libres del grupo hidroxilo del etanol cuando este se introduce al sitio activo (Eklund et al., 1976; Kreitman et al., 1983). Al ligarse el etanol a la ADH, ocurre un cambio conformacional en la enzima. La ADH presenta entonces un átomo de oxígeno al grupo hidroxilo del etanol, atrayendo al hidrogeno y captándolo por transferencia de protónica. Simultáneamente la coenzima NAD^+ es acercada al átomo de carbono del etanol donde se encuentra el grupo hidroxilo. El sitio activo de la NAD^+ obtiene uno de los átomos de hidrogeno enlazados a este carbono por transferencia protónica, reduciéndose a NADH . Los electrones libres del oxígeno y el carbono resultantes en el etanol forman un enlace, convirtiéndose en acetaldehído. Finalmente el acetaldehído se separa del átomo de zinc que lo anclaba a la enzima y sale del sitio activo (Blair et. al. 1966; Perez-Miller et. al. 2003). Este mecanismo se ejemplifica a continuación en la Figura 2.

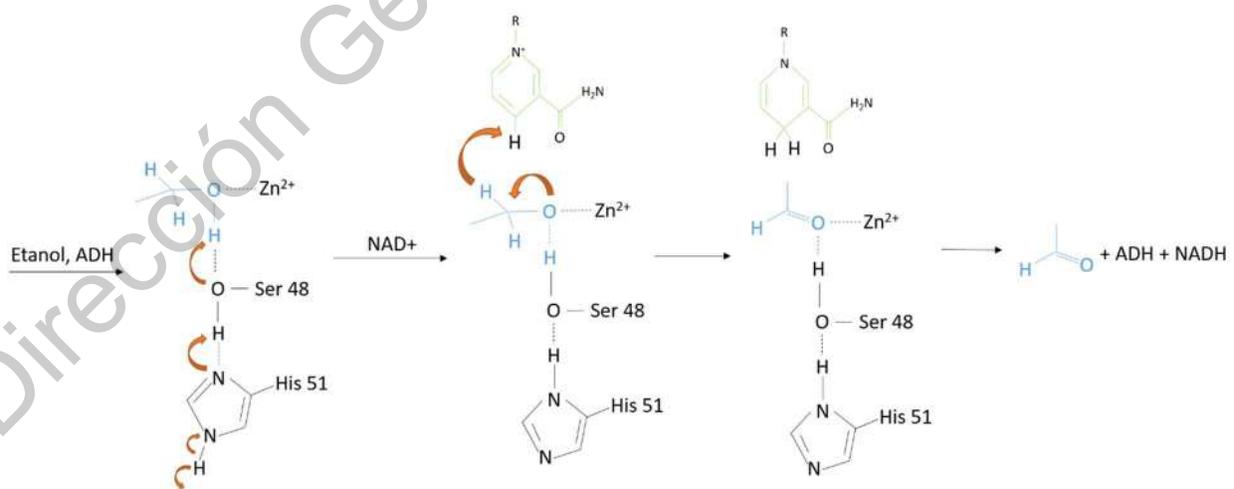


Figura 2. Mecanismo de reacción de la enzima ADH.

Aldehído deshidrogenasa

El acetaldehído producido de la oxidación del etanol puede entonces continuar siendo oxidado por la enzima ALDH, la cual lleva a cabo la reacción de oxidación de acetaldehído a ácido acético. Al igual que la ADH, la estructura y subunidades de la ALDH dependen del organismo del cual se extraen, siendo la ALDH extraída de microorganismos la más simple. Utiliza NAD(P)⁺ y magnesio como cofactor, reduciendo el NAD(P)⁺ y oxidando el acetaldehído. Las condiciones óptimas de actividad para la ALDH son temperatura de 35 °C y un pH de 7.40 (Modig et al., 2002; Yoshida et al., 1997). Se han reportado diferentes instancias de inmovilización de esta enzima usando nanoestructuras, como el uso de dendrímeros de PAMAM, que logró prolongar su periodo de vida hasta por 50 días sin perder actividad enzimática (Aquino, 2011).

El mecanismo de reacción de la ALDH es similar al de la enzima ADH. Para llevarse a cabo la reacción de oxidación del acetaldehído también requiere del cofactor NAD⁺ y una molécula de agua (Marchitti et al., 2008; Modig et al., 2002; Yoshida et al., 1997). El acetaldehído entra al sitio activo de la enzima a través de un canal en la superficie de la misma. La ALDH posee un grupo cisteína con un átomo de azufre, el cual lleva a cabo un ataque nucleofílico en el átomo de carbono que posee el grupo carbonilo del acetaldehído. El hidrogeno pasa a reducir el cofactor de NAD⁺ a NADH, lo que genera un cambio conformacional en la ALDH que permite la entrada de una molécula de agua al sitio activo. Un grupo glutamato de la ALDH permite que el agua lleve a cabo un ataque nucleofílico en el carbono del acetaldehído que posee el grupo carbonilo, produciendo ácido acético. Finalmente el ácido acético formado como producto sale del sitio activo de la enzima (Koppaka et al., 2012; Vallari et al., 1982). Este mecanismo se ilustra a continuación en la Figura 3.

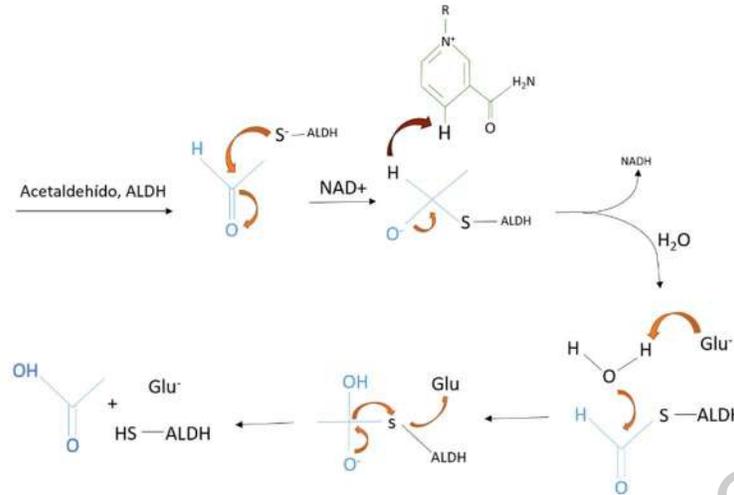


Figura 3. Mecanismo de reacción de la enzima ALDH

Inmovilización Enzimática

La inmovilización enzimática es un proceso en el que se acopla una enzima a un material inerte e insoluble con el fin de incrementar su resistencia a cambios de pH y temperatura. Permite además separar las enzimas de los productos de la reacción que llevan a cabo anclándolas en su lugar durante y después de la reacción (Vamvakaki et al., 2006; Wang et al., 2006; Wang et al., 2008). Existen diversos métodos de inmovilización enzimática los cuales presentan diferentes ventajas y desventajas cada uno y son utilizados para diferentes aplicaciones. Los métodos de inmovilización existentes son los siguientes:

1. Unión por afinidad con marcadores proteicos: Se le acopla un marcador proteico específico a la enzima que se acopla a su vez a un material poroso. Pueden utilizarse marcadores que se acoplan de manera covalente o no covalente, adaptando la hidrofobicidad del soporte poroso para retener el marcador empleado. Se utiliza este método para la separación y purificación de enzimas en muestras biológicas (Jockusch et al., 2003; Cho et al., 2007).
2. Adsorción: la enzima se acopla a la superficie de un material inerte. No involucra una reacción química entre el soporte y la enzima, siendo un proceso físico el que ocupa. La enzima permanece inmovilizada principalmente por interacciones

iónicas, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waal (González-Bacero et al., 2010).

3. Atrapamiento: la enzima es retenida físicamente en una matriz porosa por interacciones covalentes o no covalentes. La naturaleza de la matriz varía según la aplicación deseada y usualmente consiste en esferas, fibras o microcapsulas del material soporte (Sheldon et al., 2007).
4. Unión covalente: se basa en la formación de enlaces covalentes entre la enzima y grupos funcionales presentes en el material soporte. Es un método que afecta la actividad enzimática de la enzima, pero brinda alta estabilidad y retención para la misma (Pierre et al., 2006).
5. Copolimerización: este método consiste en formar enlaces covalentes entre grupos de enzimas sin el uso de un material soporte o matriz de inmovilización. Se emplean enzimas inertes para formar un complejo enzimático que a su vez contiene la enzima de interés. Afecta la estructura y actividad de la enzima debido a que el proceso de copolimerización emplea reactivos que pueden desnaturalizar la enzima (Meléndez-Ortiz et al., 2014).
6. Encapsulación: se inmovilizan las enzimas dentro de una membrana de encapsulación semipermeable. La actividad enzimática resultante de este proceso depende principalmente de la estabilidad de la enzima dentro de la cápsula. Controlando la membrana utilizada es posible mediar el intercambio de masa entre el interior y el exterior de la cápsula (Wang et al., 2005).

El proceso de inmovilización enzimática es indispensable para reducir la solubilidad de las enzimas, permitiendo su recuperación después de llevar a cabo la reacción de interés y para ampliar su rango de resistencia a cambios de pH y temperatura. Sin embargo este proceso afecta la actividad enzimática debido a que limita o favorece cambios conformacionales en la enzima y altera el transporte de reactivos, productos y cofactores entre la enzima y el medio en que se desempeña (Sheldon 2007). Un importante marcador de la viabilidad de los bioánodos enzimáticos es el cambio en la actividad enzimática respecto a la actividad de la enzima en solución libre. Existen distintos métodos para determinar la actividad enzimática, como son: espectrofotométricos, de

fluorescencia, calorimétricos, de quimio-luminiscencia, dispersión de luz, termoforesis a microescala, cromatografía y radiometría; cada uno presenta ventajas y desventajas para las diversas reacciones enzimáticas existentes (Milton *et. al.* 2001).

Diversos soportes han sido reportados para la inmovilización de enzimas en aplicaciones para celda de combustible. Entre ellos los materiales nanoestructurados son de interés por sus propiedades fisicoquímicas y porque han demostrado aumentar la estabilidad de las enzimas inmovilizadas y mejorar la conductividad eléctrica de estas (Arrocha *et al.*, 2014; Aquino *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2010).

Nanofibras de carbono

Las nanofibras de carbono son nanoestructuras cilíndricas formadas por capas de grafeno ordenado en pilas de conos, copas o platos. Son producidas por electrohilado, autoensamblaje y separación de fases (De Jong *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 1993). Estas nanoestructuras tienen una amplia gama de aplicaciones gracias a sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas, así como su bajo costo. En la superficie de las nanofibras de carbono pueden generarse grupos funcionales de ácido carboxílico por medio de un tratamiento ácido sin cambios significativos a sus propiedades físicas (Hammel *et al.*, 2004).

Las nanofibras de carbono funcionalizadas (CNFs) son atractivas debido a que pueden ser tratadas con ácido nítrico para producir en ellas grupos funcionales con oxígeno, sin que las fibras pierdan su integridad estructural (Klein *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013). Estos grupos funcionales facilitan el intercambio electrónico en el ánodo. Adicionalmente las CNFs son excelentes conductores eléctricos, presentan buena dispersión, humectabilidad y solubilidad permitiendo manipularlas fácilmente y brindan una alta área superficial para el anclaje iónico de enzimas (Baker *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008).

El uso de nanofibras de carbono para aplicaciones de inmovilización de enzimas permite mantener la estabilidad estructural de la proteína así como su función biológica. Como

muchas nanoestructuras ofrecen las características ideales para el balance de factores clave que determinan la eficiencia de estos biocatalizadores, como área superficial, resistencia a transferencia de masa y carga enzimática efectiva. Esas nanoestructuras han sido utilizadas en aplicaciones industriales en áreas de biosensores y celdas de biocombustibles, constantemente expandiéndose a nuevas fronteras. (Feng *et al.*, 2011)

Las nanofibras de carbono pueden ser obtenidas por diversos procesos como descarga de arco (Anazawa *et al.*, 2002), ablación láser (Guo *et al.* 1995), y deposición química de vapor (Li *et al.* 1996). La versatilidad de producción de las nanofibras de carbono brinda una ventaja económica y abre su campo de aplicación debido a que reducen el costo de su producción y uso. Exhiben además propiedades mecánicas, eléctricas y térmicas extraordinarias, lo que las vuelve materiales atractivos para aplicaciones de inmovilización enzimática. En el área de biosensores y bioceldas de combustible las propiedades de interés son sus características eléctricas como lo son su ágil cinética de transferencia electrónica, alta sensibilidad y un bajo límite de detección que otras alternativas para el proceso de inmovilización. (Feng, *et al.*, 2011)

Metodología

El desarrollo de este proyecto consistió en tres etapas principales. La primera etapa fue la fabricación de los bioánodos enzimáticos, seguida de la caracterización fisicoquímica, bioquímica y electroquímica y finalmente las pruebas en celda de combustible microfluídica individual y en cascada.

Elaboración de los bioánodos enzimáticos

La primera etapa consistió en el desarrollo de los bioánodos enzimáticos. A partir de la búsqueda bibliográfica se determinó el método de fabricación de los bioánodos enzimáticos. Los bioánodos enzimáticos fueron preparados por inmovilización covalente de las enzimas alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa en una matriz de Nafion®, nanofibras de carbono funcionalizadas y bromuro de tetra-n-butilamonio (TBAB) sobre papel carbón Toray® (Dector et al., 2017; Galindo-de-la-Rosa et al., 2017). El papel carbon Toray® constituye una capa de difusión de gases que brinda una estructura de soporte para la elaboración del bioánodo, así como un medio de conducción electrónica, remoción de agua y calor, y protección al catalizador frente a la erosión y corrosión ocasionadas por los flujos de combustible (Ramasamy et al., 2010). El Nafion® es un polímero sintético con propiedades iónicas utilizado como conductor de protones en aplicaciones para celda de combustible. El Nafion® se agrupa en estructuras micelares en las cuales las enzimas ADH y ALDH pueden ser estabilizadas. El bromuro de tetra-n-butilamonio es una sal cuaternaria que permite el ensanchamiento de los canales de conducción protónica en la estructura micelar formada por el Nafion®, mejorando el transporte protónico entre el sitio activo de la enzima y el medio electrolítico (Dector et al., 2017; Galindo-de-la-Rosa et al., 2017).

Funcionalización de las CNFs

Para su uso como soporte de inmovilización enzimática las nanofibras de carbono fueron sometidas a un proceso de funcionalización. La funcionalización de una superficie es un proceso en el que se alteran las propiedades de la superficie de un material. En este caso se sometieron las nanofibras de carbono a un ataque químico para generar grupos funcionales en su superficie. Los grupos funcionales generados por este método son afines a los grupos funcionales en la superficie de las enzimas y permiten su anclaje de manera covalente sin alterar significativamente su función catalítica o las propiedades físicas de las nanofibras.

Las nanofibras de carbono de Sigma-Aldrich fueron funcionalizadas llevando a cabo un ataque químico con una mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico concentrados en una relación (1:3) por 4 horas. El ácido nítrico y el ácido sulfúrico son ácidos fuertes capaces de modificar la superficie de las nanofibras generando grupos funcionales carbonilos. Esta modificación a su superficie es esencial en el proceso de inmovilización enzimática ya que provee de puntos de anclaje con los grupos funcionales propios de las estructuras proteínicas a través de los cuales se logra adherir una enzima a la estructura.

Posteriormente fueron lavadas con agua desionizada múltiples veces, agregando agua desionizada, filtrando y repitiendo el proceso hasta alcanzar un pH de 7.0. Esto con el fin de remover agentes ácidos aun presentes en las CNFs y asegurar su correcto desempeño en aplicaciones de inmovilización enzimática las cuales son altamente dependientes del pH del medio en que se encuentran. Finalmente secadas a temperatura ambiente y almacenadas a temperatura ambiente para su posterior uso.

Preparación del electrodo enzimático

Inicialmente se elaboró la solución enzimática de ADH mezclando en un tubo eppendorf solución amortiguadora de Tris-HCl (pH 8.8), Nafión®, enzima ADH comercial (E.C. 1.1.1.1, Aldrich), nanofibras de carbono funcionalizadas y TBAB. La mezcla se sometió

a baño ultrasónico por 30 min o hasta dispersar los aglomerados de CNFs visibles. Para el bioánodo basado en ALDH se preparó una solución similar, pero reemplazando la solución amortiguadora y la enzima utilizada por una solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4) y enzima ALDH comercial (E.C. 1.2.1.5, Aldrich).

La preparación de cada bioánodo se realizó sumergiendo una lámina de 20x2 mm de papel carbón Toray® en la solución enzimática correspondiente, sometiéndola a sonicación por 30 minutos y secando a temperatura ambiente. Los bioánodos fueron almacenados a -20 °C al estar fuera de uso.

Etapa 2: Caracterización de los bioánodos desarrollados

Pruebas bioquímicas

Pruebas de retención de proteína – Método de Lowry

Inicialmente se determinó la eficiencia del método de inmovilización enzimático analizando la concentración de proteína remanente en la solución enzimática al finalizar la fabricación de un bioánodo enzimático. Para determinar la concentración de proteína que se inmoviliza en los bioánodos se utilizó el método de Lowry (Peterson, 1977). Las pruebas de retención de proteína se realizaron por separado para cada bioánodo.

El método de Lowry para la cuantificación de proteínas consiste en la hidrólisis ácida de proteínas seguida de un análisis de aminoácidos presentes en una solución. Se basa en la reacción de Bluret en la cual los enlaces péptidos proteínicos reaccionan con cobre en condiciones alcalinas para formar Cu^+ . Los iones de cobre entonces reaccionan con el reactivo de Folin en la reacción Folin-Ciocalteu. Esta reacción en esencia consiste en la reducción de fosfomolibdotungstato a azul de heteropolimolibdeno. La reacción resulta en un intenso color azul, el cual depende del contenido de tirosina y triptófano en el medio. Esto nos permite cuantificar los aminoácidos en la solución a analizar. La cuantificación se realiza por medio de espectroscopia de UV-VIS, midiendo la absorbancia de luz a una longitud de onda de 630 nm a concentraciones de proteína

menores a $\mu\text{g/ml}$ o 550 a concentraciones entre 100 y 2000 $\mu\text{g/ml}$. Para esta prueba se registró la absorbancia a una longitud de onda de 630 nm (Hartree 1972; Peterson 1977).

La prueba de Lowry se llevó a cabo de la siguiente manera. Se prepararon los siguientes reactivos y soluciones:

1. Reactivos formadores de complejos: se preparó una mezcla de las siguientes soluciones en una relación 100:1:1 por volumen.
 - a. A: 2% (w/v) Na_2CO_3 en agua destilada
 - b. B: 1% (w/v) CuSO_4 en agua destilada
 - c. C: 2% (w/v) tartrato de potasio sódico en agua destilada
2. NaOH 2N
3. Reactivo de Folin® concentración 1 N
4. Estándares: se preparan estándares a partir de una solución madre de proteína con suero de albumina bovina con una concentración de 2 mg/ml en agua destilada. Los estándares se obtuvieron a partir de las siguientes diluciones:

Tabla 2: Estándares para determinación de concentración de proteína.

Solución madre de albúmina(μl)	0	2.5	5	12.5	20	50	125	250	500
Agua (μl)	500	498	495	488	475	450	375	250	0
Concentración de proteína ($\mu\text{g/ml}$)	0	10	20	50	100	200	500	1000	2000

La reacción se llevó a cabo hidrolizando 0.1 ml de muestra de proteína o de estándar agregando 0.1 ml de NaOH 2 N y sometiendo a baño María de 100 °C por 10 minutos. A continuación se deja enfriar la muestra y se le agrega 0.1 ml de solución de reactivos formadores de complejos y se dejó reposar por 10 minutos. Luego se le agregó a la muestra 0.1 ml de reactivo de Folin®, se agitó la muestra y se dejó reposar por 45 minutos antes de medir la absorbancia de la muestra. Se realizó este procedimiento para

las diluciones de estándar, a partir de las cuales se determinó una curva de calibración contra la cual se compararon los resultados de las mediciones de concentración de proteína de las soluciones enzimáticas a partir de las cuales se fabricaron los bioánodos. Se realizó este ensayo tanto para la solución enzimática de ADH como para la de ALDH por triplicado.

Pruebas de actividad enzimática por espectrometría UV-VIS

Se determinaron los cambios en la actividad catalítica de las enzimas por el proceso de inmovilización. Para la evaluación de los cambios de actividad catalítica en las enzimas se realizaron pruebas de actividad catalítica por espectrofotometría de UV-VIS. Se evaluó la actividad de la enzima libre en un rango amplio de temperatura, tiempo de reacción y pH, y se comparó con la actividad de la enzima inmovilizada en los mismos rangos. Se omitió la prueba de temperatura para la enzima ALDH debido a que el acetaldehído utilizado como combustible posee un punto de ebullición de 20.2° C y elevar la temperatura de este compuesto sobre esta marca representa un riesgo para la salud. El método de determinación por espectrofotometría resultó ideal para la determinación de actividad enzimática de deshidrogenasas dependientes de NAD⁺, ya que el NADH absorbe luz en su forma reducida pero no en su forma oxidada. (Cowan *et. al.* 1997)

Las enzimas ADH y ALDH utilizan el cofactor NAD⁺ para llevar a cabo su función como oxidorreductasas. Estas enzimas oxidan el etanol y el acetaldehído y a su vez reducen el cofactor NAD⁺ a NADH durante el proceso. Este cofactor en su forma oxidada no absorbe luz en la longitud de onda de 340 nm, pero en su forma reducida si presenta absorción en esta longitud. Aprovechando este fenómeno se pueden determinar las unidades formadas de NADH como indicador de la actividad enzimática utilizando un equipo de espectrofotometría de UV-VIS. Las pruebas se llevaron a cabo por triplicado como se describen a continuación.

Pruebas de actividad enzimática para ADH

La metodología para llevar a cabo las pruebas de actividad se llevó a cabo de la siguiente manera. Utilizando agua ultrapura y desionizada se prepararon las siguientes soluciones y componentes:

1. Solución amortiguadora de fosfatos pH 8.8, 1 M.
2. Etanol 95% v/v.
3. Solución de coenzima β -NAD, 15 mM.
4. Solución madre de ADH – se preparó en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 8.8 con una concentración de 1 mg de enzima por ml de solución amortiguadora.
5. Diluyente enzimático – se preparó una solución de suero de albúmina bovina en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.5 con una concentración de 1 mg de enzima por ml de solución amortiguadora.
6. Solución de ADH de trabajo – fue preparada inmediatamente antes de realizar las pruebas de espectrofotometría diluyendo 0.050 ml de Solución madre de ADH en 25 ml de Diluyente enzimático.
7. Bioánodo enzimático de ADH de 5x5 mmm

Se mezcló en un tubo de ensayo la solución amortiguadora, la solución de etanol y la solución de coenzima como se muestra en la Tabla 3.1 a continuación. De esta manera se prepara el medio para el ensayo en un rango de pH estable con etanol y la coenzima NAD⁺. Los ensayos se prepararon por triplicado.

Tabla 3.1: Mezclas para ensayo de actividad enzimática de ADH y ADH-CNFs.

Reactivo	Ensayo para ADH	Ensayo para ADH-CNFs
Solución amortiguadora de fosfatos 1M, pH 8.8	1.30 ml	1.30 ml
Etanol 95%	0.10 ml	0.10 ml
Solución de coenzima β -NAD 15 mM	1.50 ml	1.50 ml

Los tubos fueron mezclados por inversión y para comenzar la reacción de oxidación se agregó la enzima en su forma libre en solución o el bioánodo ADH-CNFs como se muestra en la Tabla 3.2 a continuación. Para las pruebas blanco se agregan 0.10 ml de Diluyente enzimático en vez de la solución de trabajo de ADH o el bioánodo.

Tabla 3.2: Catalizador para ensayo de actividad enzimática de ADH y ADH-CNFs.

Catalizador	Ensayo para ADH	Ensayo para ADH-CNFs
Solución de trabajo de ADH	0.1 ml	-
Bioánodo ADH-CNFs 5x5 mm	-	1 pieza

Se evaluó la actividad enzimática en ambos casos contra el tiempo de reacción midiendo la absorción de la muestra a una longitud de onda de 340 nm cada 5 minutos durante 60 minutos en condiciones de temperatura ambiente. Una vez determinado el tiempo óptimo de reacción se repitieron los ensayos variando la temperatura del tubo de ensayo. Para este fin se empleó un baño térmico de agua en el que se sumergieron los tubos de ensayo hasta que alcanzaran una temperatura fija antes de agregar la solución enzimática o el bioánodo. Se evaluó la actividad enzimática en un rango de temperatura de 25 a 50 °C en pasos de 5 °C.

El pH de la prueba fue variado utilizando solución amortiguadora de un pH diferente en la mezcla inicial descrita en la Tabla 3.1. Se evaluó la actividad enzimática variando el pH en un rango de 3 a 10 en pasos de 0.5 en la escala de pH. Se utilizaron solución amortiguadoras a concentración 0.1 M; solución amortiguadora de glicerina para la preparación de los pH más ácidos, solución amortiguadora de acetatos para el rango de pH de 4 a 5.5, solución amortiguadora de fosfatos para pH de 6 a 8 y solución amortiguadora de Tris-HCl para los pH más básicos. Los resultados fueron registrados utilizando un espectrofotómetro de UV-VIS.

Esta prueba fue derivada de un ensayo de determinación de unidades enzimáticas por mg de sólido de la enzima en polvo como reactivo. Estas unidades representan sitios

activos de la enzima capaces de llevar a cabo la reacción descontando el material proteínico inerte que pudiese existir en la enzima como reactivo en polvo.

Pruebas de actividad enzimática para ALDH

Las pruebas de actividad catalítica para la enzima ALDH fueron basadas en la medición de la absorción de la luz a la longitud de onda de 340 nm. La enzima ALDH tiene el mismo cofactor NAD⁺ en común que la enzima ADH. De igual manera este cofactor es reducido a NADH al llevarse a cabo la oxidación del acetaldehído en la enzima. Siguiendo el mismo principio, se evaluó la actividad enzimática de la enzima ALDH con la medición de la absorción de luz por el cofactor NADH. Con base en esto la prueba de actividad se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se prepararon las siguientes soluciones y reactivos utilizando agua ultrapura y desionizada:

1. Solución amortiguadora de Tris-HCl pH 8.0, 1 M.
2. Acetaldehído, 100 mM.
3. Solución de coenzima β -NAD, 20 mM.
4. Solución 3 M de KCl.
5. Diluyente enzimático – se preparó una solución de suero de albúmina bovina en solución amortiguadora de Tris-HCl 100 mM pH 8.0 con una concentración de 0.02% (w/v).
6. Solución de ALDH de trabajo – Se preparó una solución con 0.25-0.5 unidades de ALDH en diluyente enzimático.
7. Bioánodo ALDH-CNFs de 5x5 mm.

Se utilizaron estas soluciones para preparar los ensayos de actividad enzimática mezclándolas como se describe a continuación en la Tabla 4.1. Los ensayos se realizaron por triplicado en tubos de ensayo.

Tabla 4.1: Mezclas para ensayo de actividad enzimática de ALDH y ALDH-CNFs.

Reactivo	Ensayo para ALDH	Ensayo para ALDH-CNFs
Solución amortiguadora de Tris-HCl pH 8.0, 1 M	0.30 ml	0.30 ml
Solución de coenzima β -NAD, 20 mM	0.10 ml	0.10 ml
Solución 3 M de KCl	0.10 ml	0.10 ml
Acetaldehído 100 mM	0.05 ml	0.05 ml
Agua desionizada	2.32 ml	2.32 ml

Las soluciones fueron mezcladas por inversión, preparando así el medio con un pH estable que contiene la coenzima NAD⁺ y acetaldehído. Para iniciar la reacción se agregó a la mezcla solución de trabajo de ALDH o el bioánodo ALDH-CNFs al tubo de ensayo como se muestra en la Tabla 4.2 a continuación. Para las pruebas blanco se agregaron 0.10 ml de Diluyente enzimático en vez de la solución de trabajo de ALDH o el bioánodo ALDH-CNFs.

Tabla 4.2: Catalizador para ensayo de actividad enzimática de ALDH y ALDH-CNFs.

Catalizador	Ensayo para ALDH	Ensayo para ALDH-CNFs
Solución de trabajo de ALDH	0.1 ml	-
Bioánodo ADLH-CNFs 5x5	-	1 pieza

Esta prueba se realizó variando condiciones de tiempo de reacción y pH por triplicado. Se realizaron las pruebas de tiempo de reacción llevando a cabo la prueba como se describió y midiendo la absorción a 340 nm cada 5 minutos por 50 minutos en condiciones de temperatura ambiente. Una vez determinado el tiempo óptimo de reacción se evaluó la actividad enzimática variando las condiciones de pH en un rango de 3 a 10 en pasos de 0.5 en la escala de pH. Se utilizaron solución amortiguadoras a concentración 0.1 M; solución amortiguadora de glicerina para la preparación de los pH

más ácidos, solución amortiguadora de acetatos para el rango de pH de 4 a 5.5, solución amortiguadora de fosfatos para pH de 6 a 8 y solución amortiguadora de Tris-HCl para los pH más básicos. Los resultados fueron registrados utilizando un espectrofotómetro de UV-VIS.

Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés Scanning Electron Microscopy) es utilizada para obtener imágenes de la topografía de una superficie de dimensiones reducidas. Se fundamenta en las interacciones entre un haz de electrones disparado sobre la superficie a estudiar y los átomos de la muestra (Goldstein et al., 2017). Los electrones reaccionan de diferentes maneras al interactuar con la muestra, lo que genera distintas señales entre las que se encuentran las de electrones secundarios, electrones retrodispersados y señales de rayos-X. La señal de interés para la SEM usualmente es la de electrones secundarios. Estos electrones son emitidos por las interacciones entre el haz de electrones con la superficie del espécimen a estudiar, lo que permite la obtención de imágenes topográficas de la muestra (Reimer 2013).

Los bioánodos desarrollados fueron caracterizados por SEM con el fin de obtener imágenes de la superficie del mismo. Se obtuvo la topografía de los bioánodos para ambas enzimas, así como para un electrodo fabricado sin enzima para fines de comparación. Se prepararon bioánodos de 5 mm x 5 mm por el método descrito anteriormente con las enzimas ADH y ALDH. Los bioánodos fueron sujetos a un porta-muestras de oro utilizando cinta conductora de carbono y se obtuvieron imágenes del papel carbón Toray®, el papel carbón Toray® con la matriz de inmovilización enzimática Nafion®-CNFs-TBAB sin la enzima, el papel carbón Toray® con la matriz de inmovilización enzimática Nafion®-CNFs-TBAB con la enzima ADH y el papel carbón Toray® con la matriz de inmovilización enzimática Nafion®-CNFs-TBAB con la enzima ALDH. Se obtuvieron imágenes con un aumento de 500x y adicionalmente imágenes de los bioánodos ADH-CNFs y ALDH-CNFs con un aumento de 4000x.

Caracterización electroquímica

Una vez determinada la viabilidad catalítica de los bioánodos desarrollados para las enzimas ADH y ALDH se procedió a la caracterización electroquímica de los mismos. Ambos bioánodos fueron estudiados utilizando técnicas voltamperométricas en una celda de tres electrodos, en una celda microfluídica individual para cada bioánodo y en una celda de combustible microfluídica compuesta de dos celdas de combustible individuales en secuencia.

Una celda de combustible de tres electrodos permite estudiar el comportamiento de un anolito en la interfase electrodo/electrolito en la celda de combustible (Fang et al., 2010). Este estudio requiere monitorear la corriente eléctrica y el potencial en el sistema. Se estudia la reacción deseada en el primer electrodo de trabajo, mientras que el segundo electrodo perturba el equilibrio del sistema al ser polarizado o aplicando un potencial o corriente eléctrica entre este y el electrodo de trabajo. Debido a que al cargar una corriente eléctrica el potencial de un electrodo puede cambiar, es necesario utilizar un tercer electrodo de referencia a través del cual no circule corriente eléctrica. La configuración de tres electrodos nos brinda de esta manera una representación más exacta del comportamiento del sistema (Fang et al., 2010; Hoshi et al., 2015; Xiong et al., 2001). Los electrodos de referencia más comunes son los electrodos de plata-cloruro de plata o los electrodos de Kalomel.

La voltametría consiste en el estudio de un anolito en un sistema electroquímico en el cual se obtiene información de este midiendo la corriente eléctrica conforme se varía el potencial en el sistema. La información obtenida es registrada en un voltamperograma en el cual se grafica la corriente producida contra el potencial del electrodo de trabajo. Diferentes variaciones existen en las cuales se modifica la manera en que se varía el potencial, el tiempo de las pruebas y en sistemas experimentales más complejos, el número de electrodos (Laviron 1979; Laviron 1980).

Estas pruebas nos permiten comprobar si la reacción de oxidación se lleva a cabo en presencia del combustible para cada uno de los bioánodos enzimáticos. La magnitud de la corriente eléctrica registrada depende de la actividad oxidativa del bioánodo enzimático y de la concentración de combustible en la solución electrolítica de trabajo. De esta manera se comprueba la actividad catalítica y la viabilidad electroquímica de las enzimas ADH y ALDH como catalizadores en los bioánodos desarrollados.

Para ambos bioánodos se obtuvieron voltamperogramas cíclicos con las diferentes concentraciones de combustible, diferentes pH y diferentes velocidades de barrido utilizando un potenciostato BioLogic VSP. Se realizaron también pruebas de voltametría de pulso diferencial con diferentes concentraciones de combustible al pH óptimo de operación del bioánodo, 8.8 para el ADH-CNFs y 7.4 para el ALDH-CNFs con el fin de determinar la sensibilidad de los bioánodos a cambios en la concentración de combustible (etanol para el bioánodo ADH-CNFs y acetaldehído para el bioánodo ALDH-CNFs respectivamente).

La prueba se llevó a cabo preparando bioánodos de ADH-CNFs y ALDH-CNFs como electrodos de trabajo, los cuales fueron evaluados contra un electrodo de grafito como contraelectrodo y un electrodo de Ag/KCl como electrodo de referencia. La voltametría cíclica se realizó con una ventana de medición de -0.5 a 1.0 V. Se realizaron pruebas de potencial de media celda en un medio electrolítico de solución amortiguadora de fosfatos y Tris-HCl (dependiendo del pH) con concentraciones de combustible de 10, 50 y 100 mM, utilizando etanol y acetaldehído para los electrodos de ADH-CNFs y ALDH-CNFs respectivamente. El pH de la solución amortiguadora fue variado en un rango de 8.0 a 9.5 en pasos de 0.5 en la escala de pH para el bioánodo de ADH-CNFs y en un rango de 6.5 a 8.0 en pasos de 0.5 para el bioánodo de ALDH-CNFs. Esta solución electrolítica fue burbujeada con nitrógeno durante 20 minutos previos a realizar la prueba. Esto con el fin de evaluar los efectos del pH en la actividad catalítica de los bioánodos.

Microscopía electroquímica de barrido

La evaluación de las reacciones enzimáticas en la superficie del bioánodo desarrollado se realizó por medio de microscopía electroquímica de barrido (SECM por sus siglas en inglés Scanning Electrochemical Microscopy). La microscopia electroquímica de barrido involucra la medición de corriente a través de un ultra-microelectrodo (UME) al acercarlo a la superficie de un sustrato. El sustrato perturba la respuesta electroquímica del UME, brindando información sobre la naturaleza y propiedades del mismo (Amphlett et al., 1998).

La SECM ha permitido el estudio de la actividad de enzimas inmovilizadas debido a que permite obtener información topográfica de la actividad química de la molécula en la interfaz entre enzimas redox y la superficie del electrodo soporte. Permite obtener información puntual de la cinética de reacciones heterogéneas y la detección de productos de reacción, logrando así monitorear la velocidad de reacción de la enzima. (Burchard *et al*, 2008). Funciona registrando la corriente de oxidación a través del UME aplicando un potencial predeterminado. Al llevarse a cabo la reacción de oxidación deseada en la interfaz del electrodo el sustrato pierde electrones los cuales contribuyen a la densidad de corriente registrada por medio de SECM. Llevando a cabo un análisis puntual a través de la superficie del electrodo es posible conocer las regiones en las que la reacción de oxidación del sustrato se lleva a cabo en las condiciones establecidas.

La SECM se utiliza en un amplio rango de aplicaciones; se ha utilizado para obtener imágenes topográficas de sustratos, mediciones cinéticas de reacciones homogéneas y heterogéneas, procesos de transporte de iones y electrones en interfaces líquido-líquido, reacciones superficiales y caracterización de superficies en las cuales se llevan a cabo reacciones de interés (Jeon et al., 2012; Wain 2014). La SECM también se utiliza para estudiar sistemas biológicos; se utiliza para la obtención de imágenes de células, estudiar la evolución de oxígeno en superficies de hojas vegetales, transporte de especies a través de la piel y otros tejidos y para evaluación de reacciones enzimáticas (Casero et al., 2010; Kueng et al., 2003; Kranz et al., 2004).

La actividad enzimática de las enzimas en los bioánodos ADH-CNFs y ALDH-CNFs se evaluó por SECM utilizando un sistema de escaneo biológico ac-SECM/SECM470 utilizando una celda de cuatro electrodos con un ultramicroelectrodo (UME) de 25 μm de diámetro, un electrodo de referencia de Ag|AgCl|3M KCl, y un electrodo de grafito como electrodo auxiliar. Los bioánodos fueron sujetos al electrodo de grafito de referencia utilizando cinta conductora de carbono.

La topología y la actividad enzimática localizada en la superficie de los bioánodos ADH-CNFs y ALDH-CNFs fue estudiada a temperatura ambiente 25 °C utilizando un método de recolección general. Se ajustó la distancia del UME a 53 μm de la muestra utilizando una curva de aproximación en una solución 5mM de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a un potencial de -150 mV. Se registró la corriente de oxidación del etanol para el electrodo de ADH-CNFs en una solución de etanol 100 mM en solución amortiguadora de Tris-HCl 0.1 M pH 8.8 y la corriente de oxidación del acetaldehído para el electrodo de ALDH-CNFs en una solución de acetaldehído 100 mM en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.4. En ambos casos se utilizó 1 mM de ferrocianuro de potasio como aceptor de electrones. Ambas mediciones se realizaron aplicando un potencial de 400 mV en el UME. Se obtuvieron imágenes de la topografía y actividad enzimática para un área de 400x400 μm .

Pruebas en celda de combustible microfluídica individual

Como se argumentó anteriormente se utilizó una celda de combustible microfluídica gracias a que esta configuración permite explotar las características del flujo laminar del combustible y el oxidante para eliminar la necesidad del uso de una membrana de intercambio protónico entre cátodo y ánodo. Para el registro y medición de resultados se utilizó un potenciostato BioLogic VSP.

Una celda de combustible individual se define como una celda de combustible en la cual solo se lleva a cabo una sola reacción química. En la primera celda de combustible individual propuesta la reacción que se lleva a cabo es la oxidación del etanol en el flujo

de combustible a acetaldehído gracias al catalizador enzimático inmovilizado en el bioánodo de la celda. En la segunda celda de combustible se evalúa la oxidación de acetaldehído en el flujo de combustible a ácido acético. Estos sistemas fueron propuestos con el fin de estudiar el desempeño de cada bioánodo enzimático por separado previo a su evaluación en conjunto.

Se realizó la caracterización de los bioánodos fabricados de manera individual en una celda microfluídica variando las condiciones de pH y concentración de combustible en el flujo de alimentación anódico. Se determinó la curva de polarización y la curva de potencia del sistema en cada ocasión por medio de una descarga de voltaje a partir de un punto de equilibrio. Posteriormente se realizó una prueba de cronoamperometría por 30 minutos para conocer la estabilidad del sistema en ese tiempo. Para las pruebas de cronoamperometría se definió el voltaje al que el dispositivo presenta la mayor potencia según las curvas de polarización obtenidas.

Las pruebas se llevaron a cabo de la siguiente manera. Los bioánodos fueron probados contra cátodos de Pt-Vulcan 20%w. Los cátodos fueron fabricados sobre una lámina de Nanoespuma de carbono de 20x2 mm depositando tinta catalítica de Pt por aerografía hasta incrementar en 1 mg el peso de la lámina. La tinta catalítica fue preparada mezclando en un tubo eppendorf los siguientes reactivos:

1. 14 μ l de Nafion® por cada mg de catalizador
2. 63 μ l de alcohol isopropilico por cada mg de catalizador
3. Catalizador: Fue preparado mezclando Pt en polvo con Negro Carbón Vulcan con una relación 1:1.

La solución de alimentación para el cátodo fue una solución de KOH 0.3 M en agua desionizada y ultrapura. La solución de alimentación para los bioánodos consistió en soluciones de combustible (etanol o acetaldehído dependiendo del bioánodo en cuestión) en solución amortiguadora de pH.

Las pruebas se realizaron variando el pH y la concentración de combustible. El pH fue variado en un rango de 3 a 10 en pasos de 0.5 en la escala de pH. Las soluciones amortiguadoras de pH utilizados fueron a base de glicerina para pH de 3 a 4, de acetatos de 4.5 a 5.5 de fosfatos para pH de 6.5 a 8 y de Tris-HCl para pH de 8.5 a 10, todos a concentración 0.1 M. La concentración del combustible en el flujo de alimentación fue variada de 10, 50 y 100 mM. La velocidad de alimentación de los flujos tanto para el cátodo como para el ánodo fue de 30 μ l/min.

Las pruebas fueron realizadas para los bioánodos de ADH y ALDH por separado, utilizando etanol como combustible para el bioánodo de ADH-CNFs y acetaldehído para el bioánodo de ALDH-CNFs. Adicionalmente se realizaron las pruebas sobre papel carbón Toray® sin aditamentos y papel carbón Toray® con la matriz de inmovilización de nanofibras de carbono y Nafión® como blancos para comparación.

Pruebas en celda de combustible en cascada

Una vez realizadas las pruebas en celda de combustible microfluídica individual se procedió con las pruebas en celda microfluídica en cascada. La característica principal de este sistema es que los productos de la primera reacción llevada a cabo por el bioánodo de ADH fluyen hacia el segundo bioánodo de ALDH como reactivos para llevarse a cabo la siguiente reacción.

Se evaluaron los bioánodos contra cátodos de Pt-Vulcan 20%w utilizando una solución de KOH 0.3 M como oxidante. El flujo de alimentación de combustible consistió en una solución de etanol en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 8.8. Se realizaron las pruebas con diferentes concentraciones de etanol en el flujo de alimentación de combustible: 10, 50 y 100mM.

Las pruebas realizadas se llevaron a cabo conectando los electrodos tanto en serie como en paralelo. Se realizaron las mismas pruebas que en la evaluación en celda individual:

descarga de voltaje para determinar la curva de polarización y curva de potencia del sistema, cronoamperometría a potencial constante por 30 minutos.

Pruebas en celda de combustible en cascada con bioetanol

Finalmente se llevó a cabo la prueba del sistema propuesto utilizando bioetanol extraído de *Salicornia Bigelovii* como combustible. Se realizaron pruebas de descarga de voltaje y cronoamperometría como se describieron anteriormente contra cátodos de Pt-Vulcan 20%w. La solución de oxidante fue KOH 0.3 M y la solución de alimentación de combustible consistió en una solución de bioetanol en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 mM, pH 8.8 a concentración 100 mM de bioetanol.

Resultados y Discusión

Evaluación fisicoquímica

Se fabricaron los bioánodos de ADH-CNFs y ALDH-CNFs con el método de inmovilización enzimática propuesto a partir del cual se obtuvieron electrodos de 20 mm x 2 mm. A simple vista se puede observar la deposición del material de la solución enzimática en la superficie del papel carbón. Una vez fabricados los bioánodos se procedió a estudiarlos por SEM para observar la deposición de la enzima sobre el papel carbón Toray®. De las pruebas de SEM se obtuvieron imágenes de la topología de los bioánodos desarrollados, mostradas a continuación en la Figura 4.

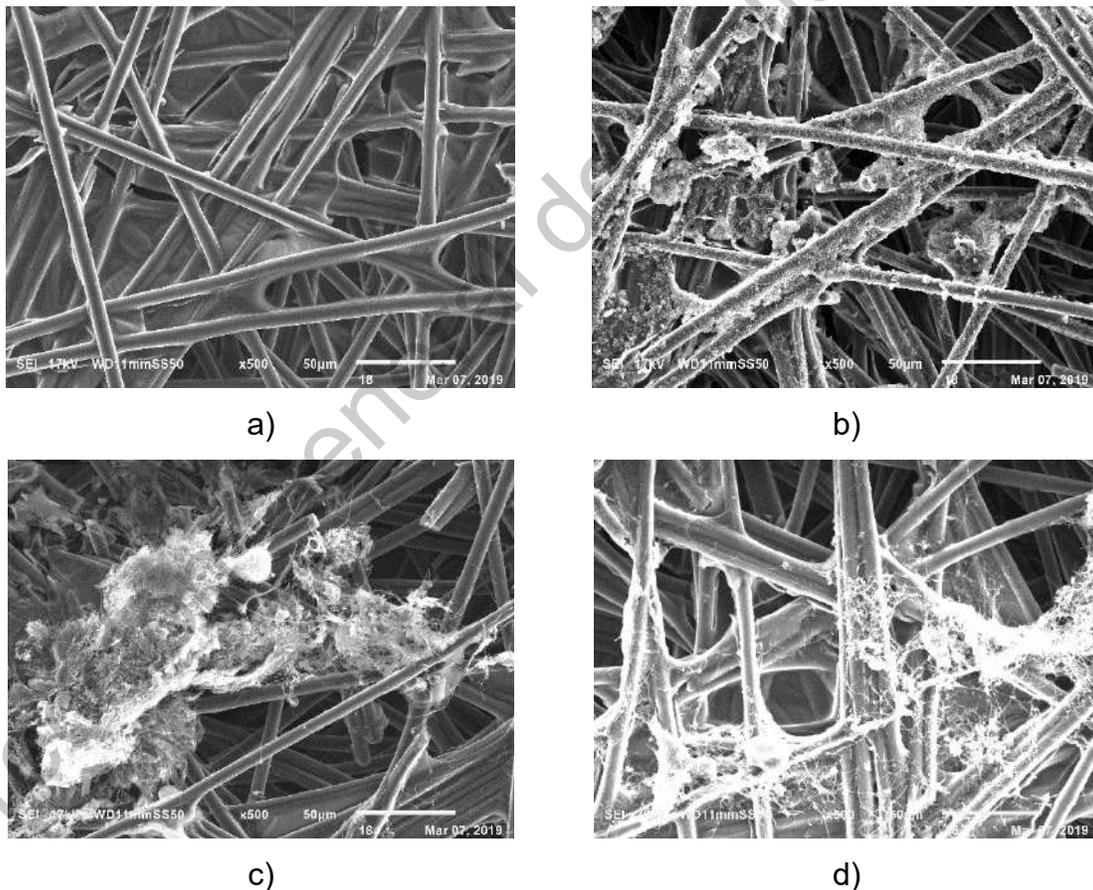
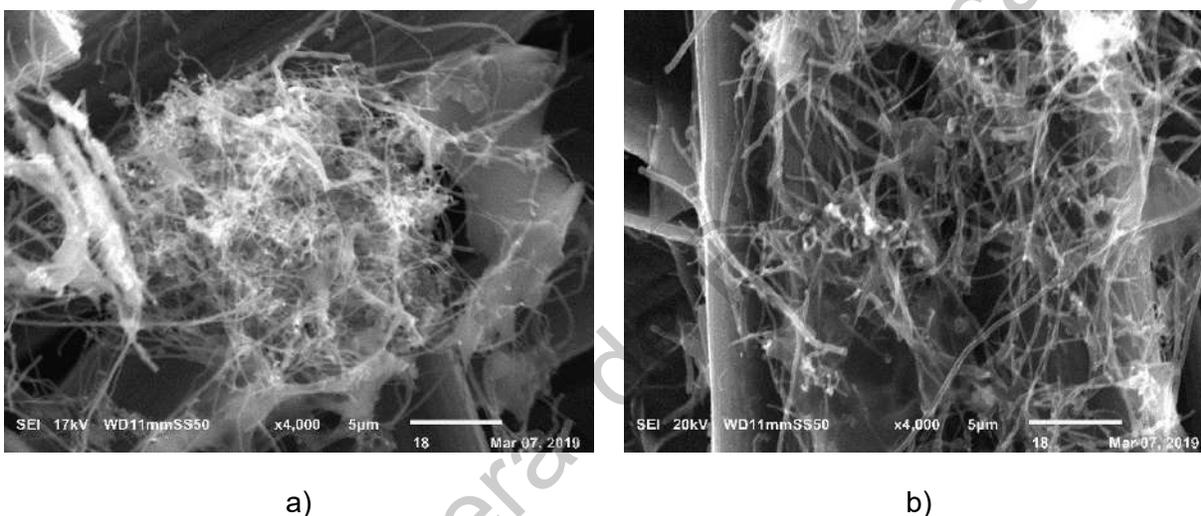


Figura 4: Imágenes de SEM obtenidas donde se muestra a) la superficie de un electrodo de papel carbon Toray®, b) papel carbon Toray® con la matriz de inmovilización Nafion®-CNFs-TBAB, c) el bioánodo ADH-CNFs y d) el bioánodo ALDH-CNFs. Todas X500 aumentos.

En la Figura 4a) se observan las fibras del papel carbón Toray® sin material adherido. La Figura 4b) se muestra que la matriz de inmovilización enzimática se adhiere a la superficie de las fibras del papel Toray®. La matriz se adhiere de manera uniforme a la superficie del papel Toray® y se infiltra en los poros del mismo. En la Figura 5c) se muestra la superficie del bioánodo ADH-CNFs. El material depositado parece aglomerarse de manera más significativa que con la matriz de CNFs sin enzima o el bioánodo ALDH-CNFs, sin embargo permanece adherido al papel Toray® a lo largo de toda su superficie y entre sus poros. La Figura 4d) muestra el bioánodo ALDH-CNFs



Figuras 5: Imágenes de SEM a X4000 aumentos: a) bioánodos ADH-CNFs y b) ALDH-CNFs.

En las imágenes de SEM a x4000 aumentos de los bioánodos fabricados se logran observar las CNFs en la matriz de inmovilización enzimática adherida al papel carbón Toray® (Figura 5). Las imágenes obtenidas permiten comprobar que la matriz enzimática se adhiere a la superficie y entre los poros del papel carbón Toray® en el proceso de fabricación de los bioánodos.

Evaluación Electroquímica

Microscopía electroquímica de barrido

Se obtuvieron imágenes por SECM que muestran la actividad catalítica de los bioánodos ADH-CNFs y ALDH-CNFs en presencia y ausencia de su respectivo combustible. La prueba para el bioánodo ADH-CNFs se realizó en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 9.0 y registrando la corriente eléctrica generada ausencia de etanol como combustible a temperatura ambiente. En la Figura 6 a continuación se muestran los resultados de la actividad catalítica registrada.

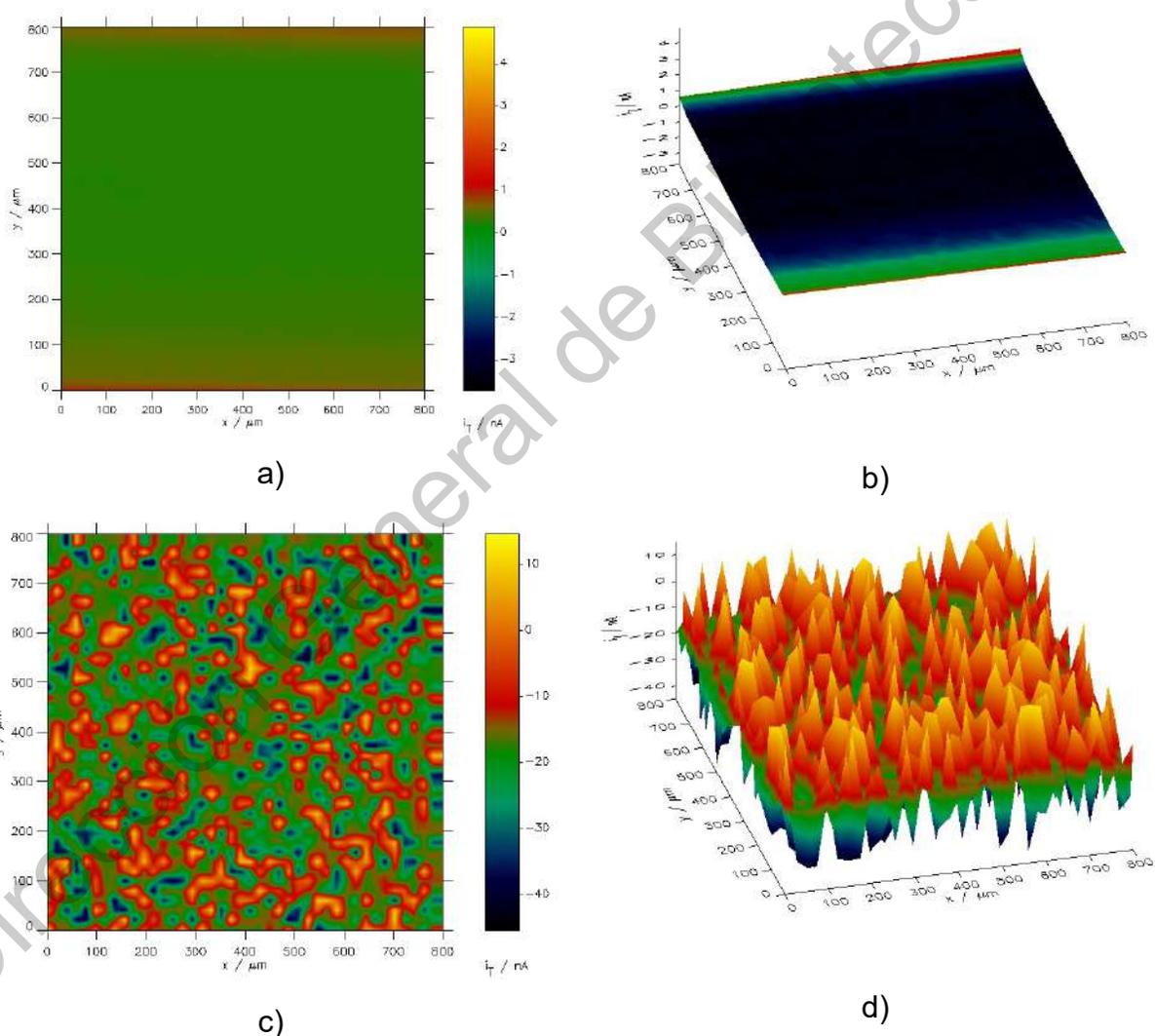


Figura 6: a) Actividad catalítica en la superficie del bioánodo ADH-CNFs en ausencia de etanol y b) vista lateral. c) Actividad catalítica en la superficie del bioánodo ADH-CNFs en presencia de etanol (100mM en la solución amortiguadora) y d) vista lateral. Las áreas que presentan actividad se denotan de color amarillo.

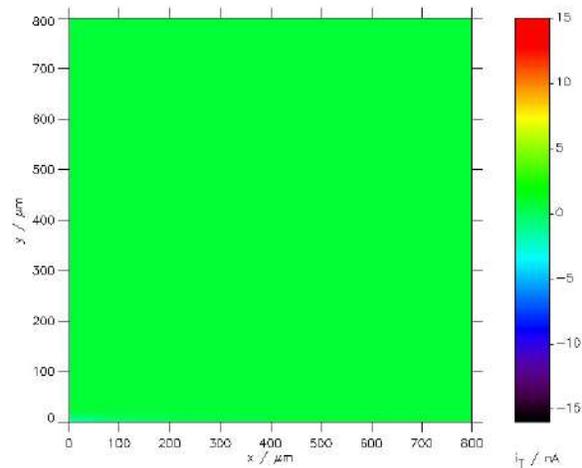
En las Figuras 6a y 6c se muestra una leyenda de color que indica la densidad de corriente presente en cada punto analizado del sustrato. Los colores cálidos indican la presencia de una densidad de corriente positiva mientras que los colores azules y violetas indican la presencia de una densidad de corriente negativa. El color verde indica regiones donde la corriente neta registrada es nula.

Se observa en la Figura 6a que en ausencia de etanol en contacto con el bioánodo no existe una respuesta en forma de corriente eléctrica de la actividad catalítica del bioánodo. Esto indica que no se lleva a cabo ninguna reacción química de interés en el sustrato.

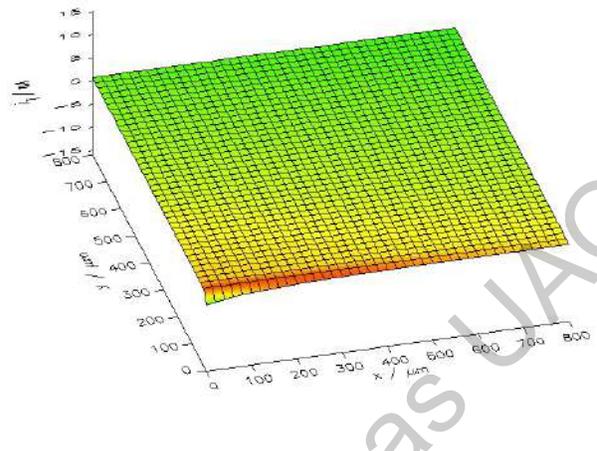
Por otra parte se observan en las Figuras 6c y 6d que en presencia de etanol el bioánodo presenta actividad catalítica uniforme a lo largo de la superficie estudiada. La evidencia de que la reacción de oxidación de etanol se lleva a cabo se registra en las regiones donde la densidad de corriente aumenta (zonas color cálido) debido a la pérdida de electrones del etanol al oxidarse en acetaldehído, los cuales son captados por el UME.

La distribución de los sitios activos de reacción es homogénea y presenta una buena densidad de los mismos en el área estudiada. Esto comprueba la viabilidad del bioánodo fabricado ya que se lleva a cabo la reacción de oxidación del combustible deseado y se obtiene una corriente eléctrica a partir de esta reacción.

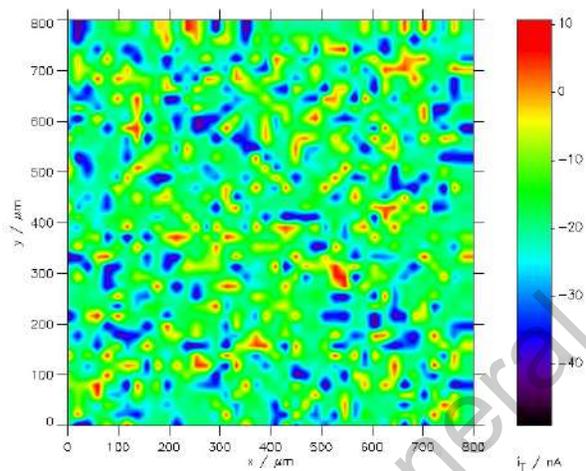
Para el electrodo ALDH se realizó la misma prueba utilizando un solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.4 en ausencia de sustrato acetaldehído en la solución amortiguadora a temperatura ambiente. Los resultados se muestran a continuación en la Figura 7.



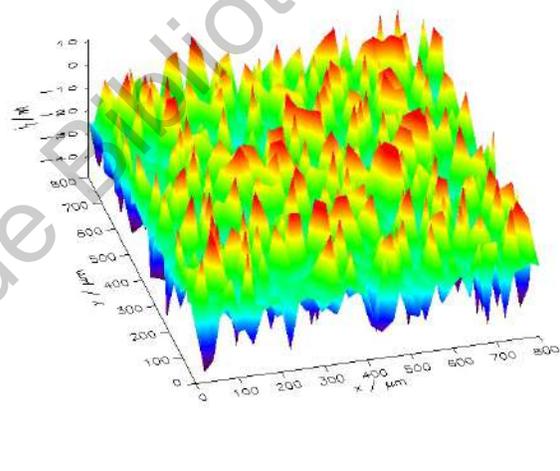
a)



b)



c)



d)

Figura 7: a) Actividad catalítica en la superficie del bioánodo ALDH-CNFs sin acetaldehído y b) vista lateral, c) Actividad catalítica en la superficie del bioánodo ALDH-CNFs en presencia de acetaldehído (100mM en la solución amortiguadora) y d) vista lateral.

Las áreas que presentan actividad se denotan de color rojo.

En la Figura 7a y 7c se muestra una leyenda que indica la densidad de corriente detectada por el UME. Los colores cálidos (amarillo, rojo) representan áreas en las cuales la densidad de corriente es positiva, los colores fríos (azul, violeta) denotan un área en la que la densidad de corriente es negativa y finalmente el color verde indica las áreas en las que se registra una densidad de corriente nula.

En las Figuras 7a y 7b se observa que el área en verde en su totalidad, es decir que la densidad de corriente registrada es nula. Estas figuras corresponden a un sistema en ausencia de acetaldehído. Esto indica que ninguna reacción química de interés se lleva a cabo en la superficie del bioánodo ALDH-CNFs en ausencia de acetaldehído.

En las Figuras 7c y 7d son mostrados los resultados de la misma prueba realizada en presencia de acetaldehído en el medio. Se observa una distribución de áreas en las cuales la densidad de corriente es positiva. Esto indica que la reacción de oxidación del acetaldehído se lleva a cabo en la superficie del bioánodo. Los electrones perdidos por el acetaldehído en su oxidación a ácido acético son registrados por el UME como las regiones de la Figura 7 de color amarillo y rojo.

Estos resultados nos indican que ambas enzimas fueron inmovilizadas de manera exitosa en la superficie del papel carbón Toray® y presentan actividad química a partir de la cual se registró una respuesta en la densidad de corriente en la superficie de cada bioánodo. Esto en presencia del sustrato adecuado en las condiciones de pH óptimas para cada enzima y a temperatura ambiente. Asimismo demuestran que el procedimiento de inmovilización enzimática permite la preparación de una superficie homogénea y de alta densidad de sitios activos de reacción independientemente de la enzima inmovilizada.

Con esto se comprobó preliminarmente el funcionamiento de los bioánodos desarrollados en aplicaciones electroquímicas y se procedió a su caracterización en celda de combustible de tres electrodos.

Celda de combustible de tres electrodos

Voltamperometría cíclica

Se evaluó la reacción de reducción-oxidación llevada a cabo en la interface de los bioánodos desarrollados en una celda de combustible de tres electrodos. Los bioánodos ADH-CNFs y ALDH-CNFs fueron utilizados como electrodos de trabajo. El electrodo de referencia utilizado fue un electrodo de Ag/AgCl y como contra-electrodo se utilizó un electrodo de grafito. El medio electrolítico fue preparado como se describe en la metodología para estas pruebas y burbujeado con nitrógeno por 20 minutos previos a la realización de la prueba. Todas las pruebas reportadas en esta sección constaron de cinco ciclos y se reporta el tercer ciclo en todos los casos. Se añadió ferroceno como mediador en una concentración 0.1M a la solución de la celda. El ferroceno es un mediador redox que permite el transporte de electrones desde el sitio activo de la enzima hacia la superficie del electrodo y es de uso común en sistemas que emplean enzimas en aplicaciones electroquímicas.

Se obtuvieron voltamperogramas de -0.5 a 1.0 V para el sistema con diferentes velocidades de barrido en el pH de operación óptimo para cada bioánodo. Los resultados de estas pruebas para el bioánodo ADH-CNFs en solución amortiguadora de pH 8.8 se muestran en la Figura 8:

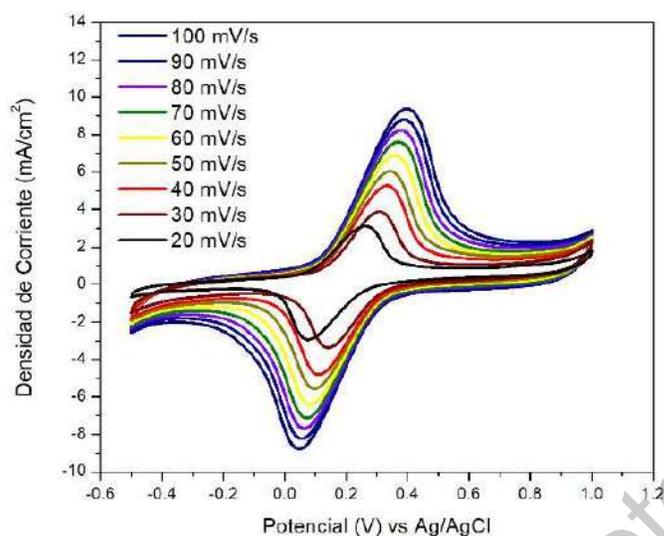


Figura 8: Voltamperograma del bioánodo ADH-CNFs en solución de etanol 100mM en solución amortiguadora de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.8. Diferentes velocidades de barrido.

En el voltamperograma de la Figura 8 para el bioánodo ADH-CNFs se observan los picos de corriente correspondientes a la oxidación y reducción del etanol en la superficie del bioánodo (Figura 8). Esto indica que la reacción deseada se lleva a cabo. En esta prueba se observó que conforme aumenta la velocidad de barrido aumenta la separación de potencial entre los picos de corriente anódico y catódico, esto nos indica que la reacción de oxidación del etanol se lleva a cabo en un proceso irreversible electroquímicamente. La reacción de oxidación del etanol por otro lado es de naturaleza reversible, denotado por la densidad de corriente registrada al someter el sistema a un escaneo hacia potenciales positivos.

El proceso irreversible descrito se refiere a la velocidad de transferencia cinética de los electrones en el bioánodo. Esto indica que la constante de transferencia electrónica en el sistema propuesto es lenta, y se requieren potenciales mayores para inducir la transferencia electrónica. Al aumentar el sobrepotencial al que se somete el bioánodo ADH-CNFs se registra una mayor separación entre los picos de corriente catódica y anódica, ya que al aumentar el potencial el gradiente de concentración de las especies

en la superficie del bioánodo tarda más en reaccionar al cambio de potencial, alcanzando una máxima concentración cada vez más alejada del potencial inicial.

De manera similar para el bioánodo ALDH-CNFs se obtuvieron voltamperogramas con diferentes velocidades de barrido. El medio electrolítico consistió en una solución de acetaldehído 50mM en una solución amortiguadora de fosfatos con una concentración de 0.1M y pH 7.4 utilizando ferroceno en una concentración de 0.1M como mediador entre el sitio activo de la enzima y la superficie del electrodo. En la Figura 9 a continuación se muestran los resultados obtenidos:

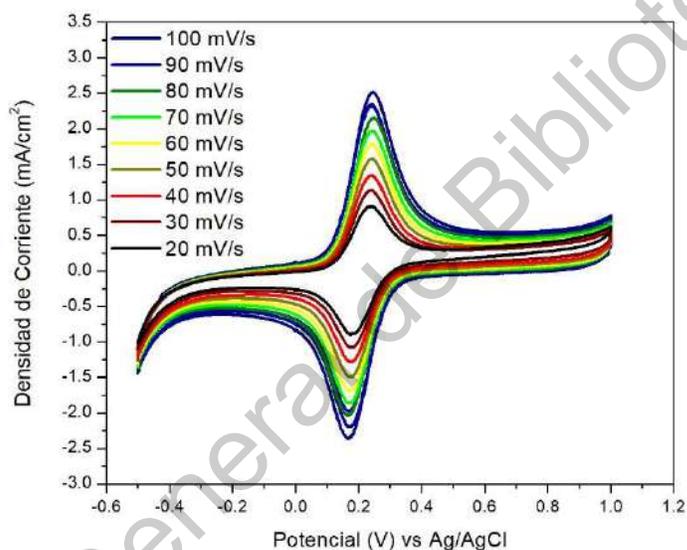


Figura 9: Voltamperograma del bioánodo ALDH-CNFs en solución de acetaldehído 50mM en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.4. Diferentes velocidades de barrido.

En la Figura 9b se observa que la reacción de oxidación del acetaldehído se lleva a cabo. Se determinó que la reacción de oxidación del acetaldehído a ácido acético en la superficie del bioánodo ALDH-CNFs ocurre en un proceso completamente reversible electroquímicamente, lo cual se deduce al observar que la separación de potencial entre los picos de las corrientes anódica y catódica se mantiene constante conforme aumenta la velocidad de barrido. También se observa que la reacción química llevada a cabo es

reversible químicamente gracias al pico de reducción observado al barrer el sistema hacia un potencial positivo.

De manera análoga a un proceso electroquímicamente irreversible, un proceso reversible indica que la transferencia electrónica en la superficie del bioánodo se da de manera frecuente, fácil y rápida al entrar en contacto el acetaldehído con el bioánodo ALDH-CNFs.

Posteriormente se obtuvieron voltamperogramas del sistema utilizando diferentes concentraciones de combustible en la solución electrolítica en pH 8.9 y utilizando 0.1M de ferroceno como mediador. Los resultados obtenidos para el bioánodo ADH-CNFs se muestran a continuación.

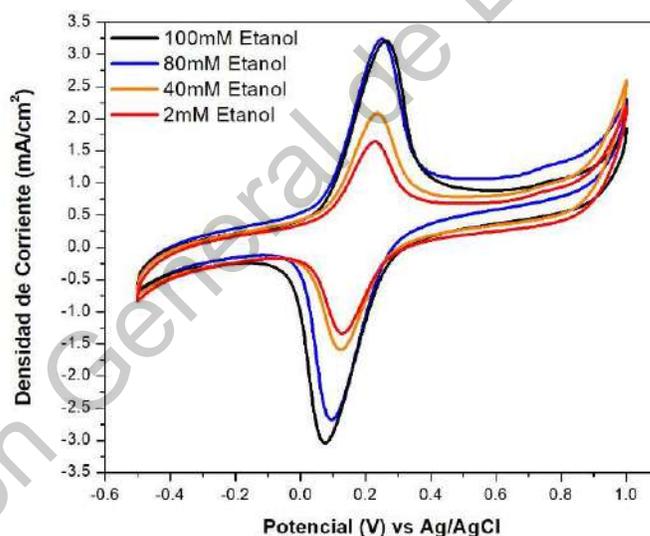


Figura 10: Voltamperogramas del bioánodo ADH-CNFs en solución amortiguadora de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.9, con diferentes concentraciones de etanol.

Se utilizaron concentraciones de etanol en la solución electrolítica de 100, 80, 40 y 2mM. Se observa en la Figura 10 que la magnitud de la diferencia entre los picos de corriente anódica y catódica aumenta conforme aumenta la concentración de combustible. Se

observa también que los voltamperogramas obtenidos con 100 y 80mM de etanol en solución alcanzan la misma densidad de corriente en el pico de oxidación. Esto indica que el bioánodo alcanza un punto de saturación a partir del cual la densidad de corriente obtenida no sigue incrementando al incrementar la concentración de combustible. También se observa un ligero desplazamiento de los potenciales en los que se ubican los picos de corriente anódica y catódica con las concentraciones más altas.

El desplazamiento de los picos de corriente al aumentar la concentración de etanol en el medio vuelve a denotar la irreversibilidad química del proceso llevado a cabo. Con una mayor concentración de etanol que induce un aumento en el número de reacciones que se llevan a cabo en la interfaz del bioánodo, se requiere alcanzar potenciales mayores para llevar a cabo la transferencia electrónica entre los sitios de reacción y el electrodo.

Para el bioánodo ALDH-CNFs los resultados obtenidos utilizando concentraciones de acetaldehído de 100, 80, 20 y 10mM como combustible en la solución electrolítica descrita anteriormente se muestran en la Figura 11.

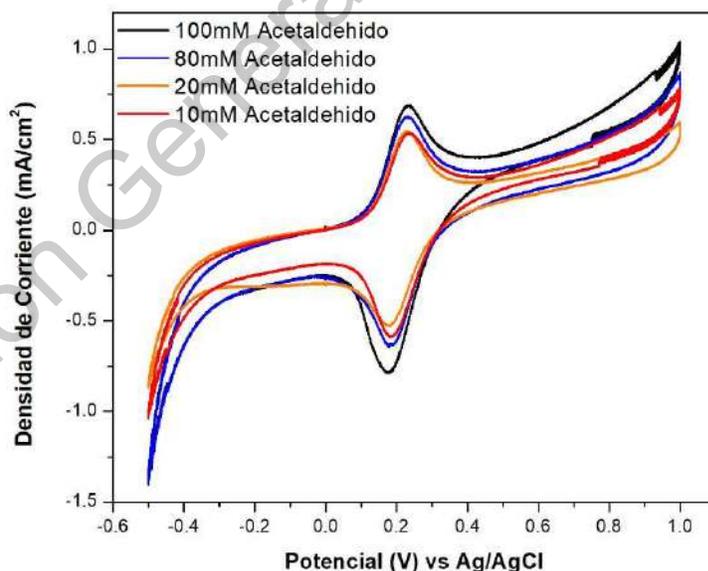


Figura 11: Voltamperogramas del bioánodo ALDH-CNFs en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.4, con diferentes concentraciones de acetaldehído.

A diferencia de los resultados mostrados en la Figura 11 para el bioánodo ADH-CNFs en la que la relación entre la corriente de oxidación y la concentración de combustible se observa claramente, en la Figura 11 solo se observa un ligero incremento de la corriente al aumentar la concentración de acetaldehído en el medio. La reacción de oxidación si se lleva a cabo, y la respuesta del bioánodo al cambio en la concentración de combustible es menor en comparación con la observada del bioánodo ADH-CNFs. El cambio en la concentración de combustible no parece afectar el potencial en el que se ubican los picos de corriente de oxidación y reducción.

Posteriormente, debido a la dependencia de las enzimas utilizadas como catalizadores a su rango de pH óptimo se realizaron las mismas pruebas variando el pH de la solución amortiguadora del medio electrolítico, obteniendo los voltamperogramas mostrados en la Figura 12.

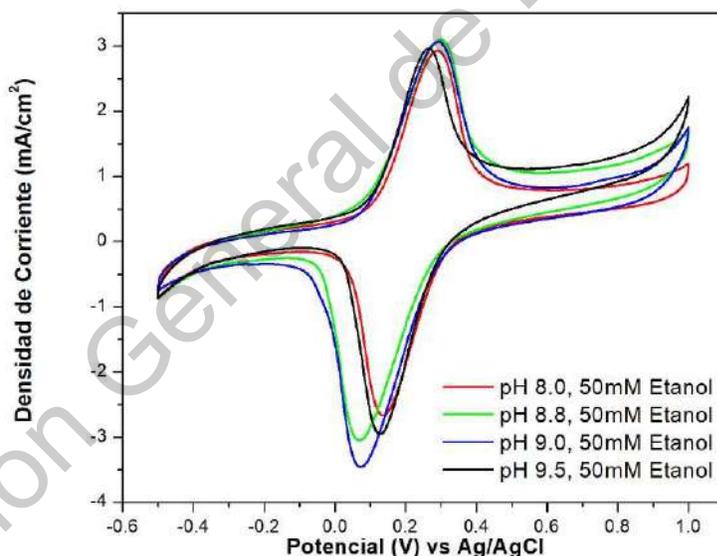


Figura 12: Voltamperogramas del bioánodo ADH-CNFs en solución de etanol 50mM variando el pH del medio.

Se observa que la reacción se lleva a cabo en el rango de pH seleccionado, obteniendo intensidades de corriente ligeramente superiores en el pH óptimo de la enzima. Esto

corroborar el comportamiento del bioánodo ALDH-CNFs reportado en las pruebas bioquímicas. Se observa un aumento en el potencial entre los picos de corriente anódica y catódica conforme el pH se aproxima más al pH óptimo de la enzima; el potencial en el que ubica el pico de corriente de reducción disminuye en los pH 8.8 y 9.0. Esto indica que conforme se lleva a cabo la prueba, más acetaldehído es producido a partir de la oxidación del etanol en este pH, corroborando que el desempeño del bioánodo ADH-CNFs es mejor en estas condiciones.

El pH afecta directamente las propiedades catalíticas y electroquímicas del bioánodo por la misma naturaleza dependiente de pH que presentan las enzimas. Cambios en el pH afectan la estructura de la enzima inmovilizada, afectando la cinética de transferencia de masa del sustrato y los productos de reacción en la interfaz del bioánodo ADH-CNFs, así como la transferencia electrónica desde los sitios activos de reacción en la enzima y el electrodo. El corrimiento observado en la reducción en la región de barrido a un potencial positivo se debe a un entorpecimiento de la transferencia electrónica en el bioánodo en estas condiciones, lo que indica que el bioánodo favorece la reacción de oxidación sobre la de reducción en pH cercanos al pH óptimo de la enzima. Esto puede deberse a la concentración de especies químicas en el sistema y a al acomodo estructural de la enzima inmovilizada en estas condiciones, así como a irregularidades en el método de fabricación del bioánodo.

Para el bioánodo ALDH-CNFs los resultados se muestran en la Figura 13.

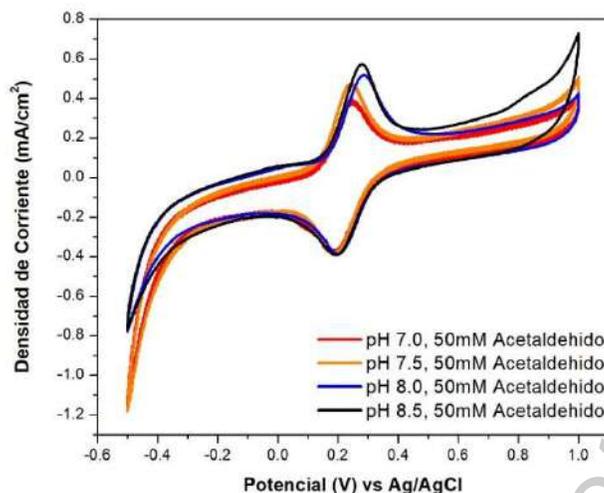


Figura 13: Voltamperogramas del bioánodo ALDH-CNFs en solución de acetaldehído 50mM variando el pH del medio.

En la Figura 13 se reportan los voltamperogramas obtenidos con el bioánodo ALDH-CNFs variando el pH de la solución electrolítica con una concentración constante de acetaldehído como combustible. Se observa que en el pico de corriente de oxidación el pico de corriente anódica se desplaza en los pH 8.0 y 8.5. Esto corresponde a un pH más básico que el pH óptimo de la enzima, en el cual también se utilizó una solución amortiguadora basada en Tris-HCl en vez de fosfatos. Se observa que se obtiene una mayor corriente en el pH 7.5 en comparación con el pH 7.0, lo que indica que la reacción se ve favorecida en estas condiciones. De igual manera se obtiene una mejor corriente en el pico de oxidación con un pH de 8.5 que con 8.0. Se determinó que el bioánodo lleva a cabo la reacción deseada.

Los cambios conformacionales de la enzima con respecto al pH afectan de igual manera en este sistema la transferencia de masa de productos y reactivos, la velocidad de reacción y la transferencia electrónica desde el sitio de reacción al resto del electrodo. En el pH óptimo de la enzima la estructura molecular de esta es óptima, de manera que la reacción de oxidación se lleva a cabo con una mejor velocidad de reacción y se registra

un aumento en la densidad de corriente registrada. El corrimiento observado indica que se entorpece la transferencia electrónica en la superficie del electrodo en los pH 8.0 y 8.5. Esto puede deberse a irregularidades en la fabricación del bioánodo, a la composición química del buffer utilizado y a cambios estructurales en la enzima en este rango de basicidad.

Voltametría de pulso diferencial (DVP)

Se llevaron a cabo pruebas de voltametría de pulso diferencial con diversas concentraciones de combustible para cada bioánodo en media celda con el fin de evaluar su sensibilidad a la concentración de su respectivo combustible y determinar su viabilidad como biosensores. Las pruebas se realizaron por triplicado y en el pH óptimo de cada enzima. Los resultados se muestran a continuación.

La voltametría de pulso diferencial es una técnica electroquímica de análisis de una celda electroquímica de combustible que brinda información sobre la corriente Faradaica sin interferencia de la corriente de carga con respecto a la transferencia electrónica desde y hacia el electrodo. De esta manera se pueden analizar las contribuciones del analito a la corriente con base en su concentración en el medio. Utiliza un pulso de potencial de amplitud constante en escalera ascendente que se aplica al sistema mientras se registra la corriente eléctrica. Al alcanzar el potencial redox del analito se registra un aumento en la corriente derivado de la reacción de oxidación en el electrodo hasta alcanzar un punto máximo, a partir del cual la corriente disminuye. Esto nos permite conocer la concentración del analito con base en la corriente máxima alcanzada, que es en el potencial en el que se lleva a cabo la reacción de oxidación en mayor medida.

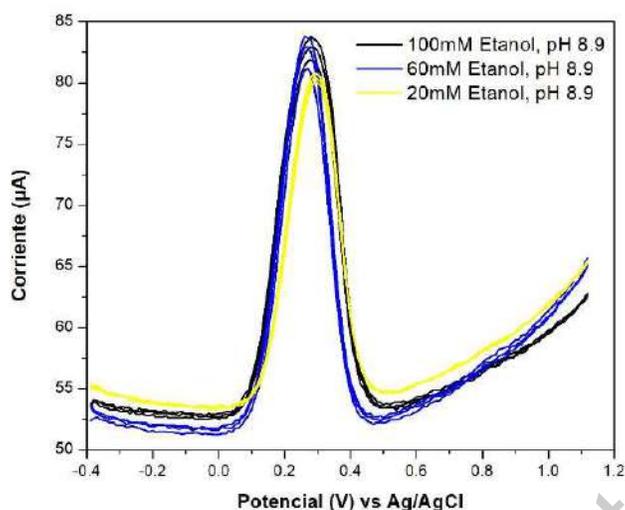


Figura 14: Voltamperogramas de pulso diferencial del bioánodo ADH-CNFs en solución de Tris-HCl pH 8.8 con diferentes concentraciones de etanol.

En la Figura 14 se muestran los resultados para el bioánodo ADH-CNFs. Se observa que los picos de corriente máxima se encuentran en un rango de corriente de 20µA en un potencial del 0.28V aproximadamente. A partir de estos datos se determinó la curva de calibración mostrada a continuación en la Figura 15.

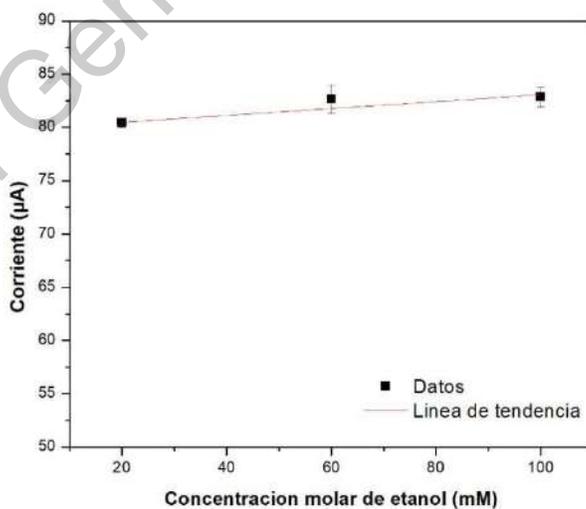


Figura 15 Curva de calibración obtenida a partir de los voltamperogramas de pulso diferencial mostrados en la Figura 15.

En la Figura 15 se observa que existe un incremento de corriente al aumentar la concentración de combustible. Las variaciones pueden atribuirse a irregularidades en el área efectiva del bioánodo en el momento de realizar la prueba. En comparación con otros biosensores reportados en la literatura, el bioánodo ADH-CNFs aparenta presentar una sensibilidad más alta que la reportada por otros tipos de biosensores (Colak *et al.*, 2015) con base en la tendencia calculada con los datos obtenidos.

Para el bioánodo ALDH-CNFs los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16.

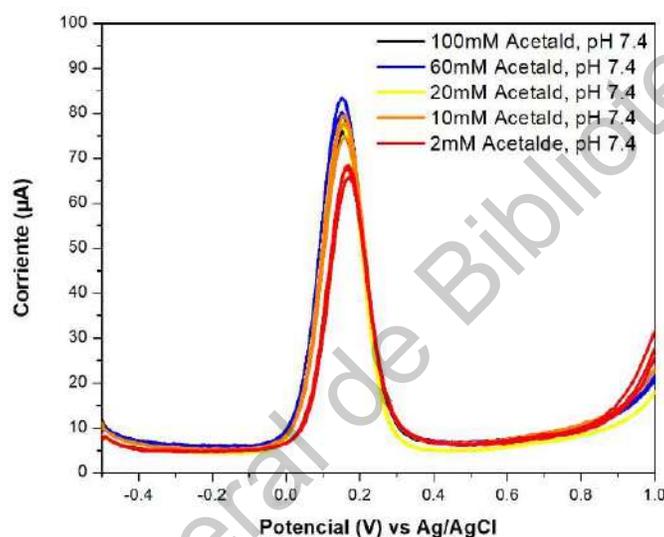


Figura 16: Voltamperogramas de pulso diferencial del bioánodo ADH-CNFs en solución de Tris-HCl pH 8.8 con diferentes concentraciones de etanol.

En la Figura 16 se observa que los picos de corriente máxima alcanzados se encuentran en un rango de 20µA en un potencial de 0.14V aproximadamente. La relación entre la concentración de acetaldehído en la solución electrolítica y la corriente obtenida se muestra en la Figura 17.

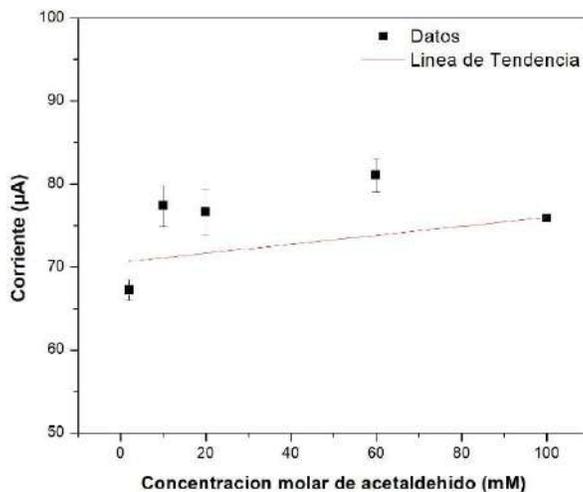


Figura 17: Curva de calibración obtenida a partir de los voltamperogramas de pulso diferencial mostrados en la Figura 16.

Con base en la línea de tendencia calculada se observa que el bioánodo ALDH-CNFs no presenta una sensibilidad a los cambios en la concentración de combustible que justifique su uso como biosensor. Las discrepancias observadas pueden atribuirse a irregularidades en el área efectiva del bioánodo durante la realización de la prueba.

La técnica de DVP requiere de un proceso de optimización necesario para mejorar la sensibilidad y especificidad de la prueba. Esto debido a que la información y detección electroquímica ocurre en la superficie de los bioánodos. Ampliando el área superficial efectiva de los bioánodos aumentando la proporción de la matriz de inmovilización que contiene las enzimas catalíticas en los bioánodos ADH-CNFs y ALDH-CNFs se obtendría una respuesta más precisa con respecto a la concentración de etanol y acetaldehído respectivamente, pero en detrimento de la eficiencia del ensayo electroquímico y la sensibilidad de la prueba. Estas pruebas están fuera de los parámetros de este trabajo.

Caracterizaciones bioquímicas

Retención de proteína por prueba de Lowry

Se realizó la cuantificación de retención de proteína durante el proceso de fabricación de los bioánodos desarrollados utilizando el método de cuantificación de proteína de Lowry. Se realizó la curva de calibración con concentraciones conocidas de proteína (suero de albúmina bovino, SAB) a partir de la cual se determinó la relación entre la absorbancia registrada y la cantidad de proteína disuelta en la solución de interés. Los resultados se muestran a continuación en la Figura 18.

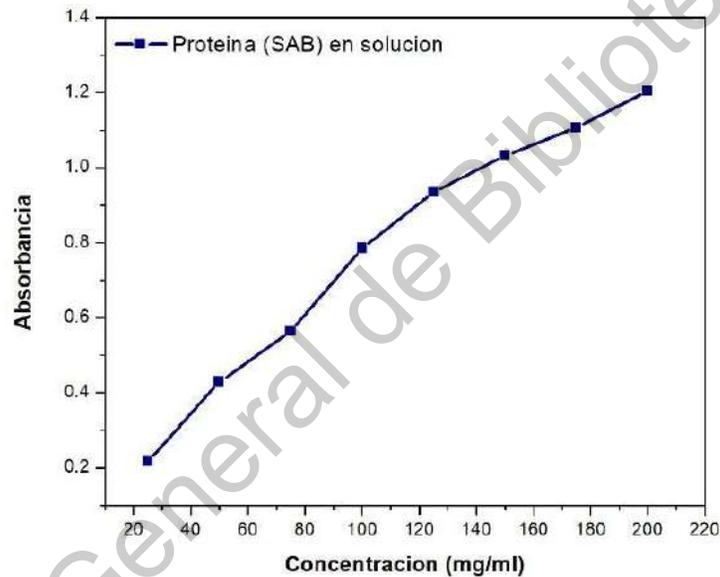


Figura 18: Curva de calibración para cuantificación de proteína en solución por el método de Lowry utilizando suero de albúmina bovino (SAB).

A partir de la curva de calibración mostrada en la Figura 18 se determinó la relación entre la cantidad de proteína en solución y la absorbancia registrada por el espectrofotómetro. La relación lineal entre la absorbancia registrada $A(c)$ respecto a la concentración de proteína en solución c se determinó a partir de esta prueba como se muestra en la Ecuación 1:

$$A(c) = 0.0056c + 0.149$$

Posteriormente se preparó una solución enzimática de cada enzima de 1mg/ml de concentración y se tomaron muestras de esta durante el proceso de fabricación de los bioánodos de 5 x 5 mm de ADH-CNFs y ALDH-CNFs respectivamente. Utilizando la relación obtenida de la curva de calibración se registró la cantidad de proteína retenida en cada bioánodo a lo largo del proceso de fabricación de los bioánodos como se muestra a continuación:

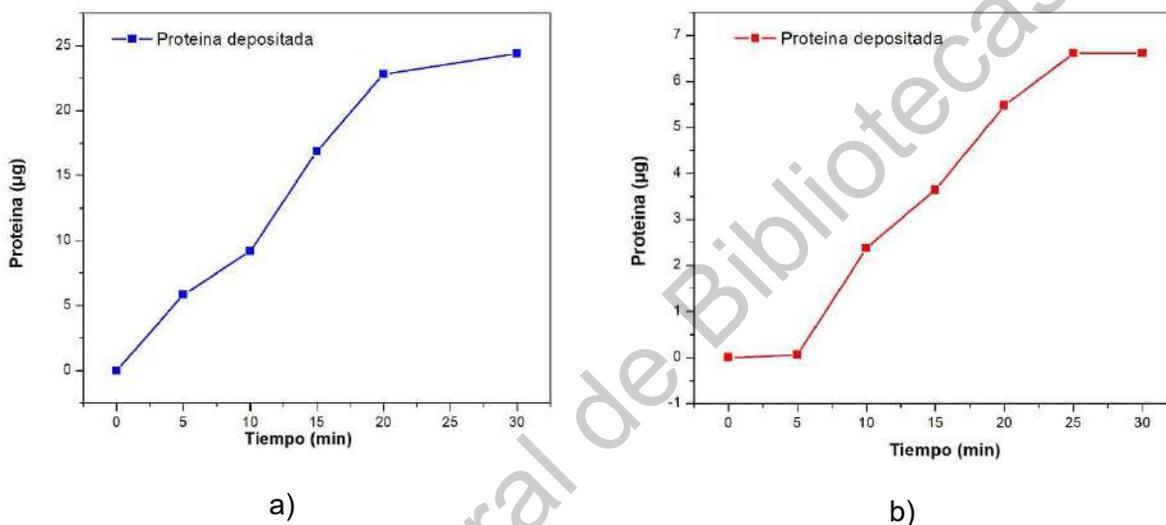


Figura 19: Retención de proteína en bioánodos a)ADH-CNFs y b)ALDH-CNFs de 5x5 mm.

A partir de la cantidad restante de proteína en solución registrada durante el proceso de fabricación de ambos bioánodos se logró determinar la cantidad de enzima inmovilizada en cada uno. Se observa que la enzima se acopla a los bioánodos durante el proceso de fabricación hasta aproximadamente 25 minutos empezado el proceso. A partir de este tiempo se reduce la cantidad de enzima que se deposita. Durante el proceso no aumenta la cantidad de enzima en solución, lo que indica que la enzima ya no es soluble y se encuentra retenida en el bioánodo.

En el bioánodo ADH-CNFs se llegaron a acoplar hasta $0.5 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ de enzima ADH mientras que en el bioánodo ALDH-CNFs se acoplaron hasta $0.14 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ de enzima ALDH. Conocer esta relación es de importancia debido a que nos permite ajustar el

proceso de fabricación de los bioánodos, aprovechando de manera más eficiente la enzima utilizada durante el proceso. Esto ayuda a reducir costos en la preparación de los bioánodos y reducir el desperdicio de material utilizado.

Ensayos de actividad enzimática evaluados por espectrofotometría UV-Vis.

La evaluación de los efectos de la inmovilización enzimática sobre la actividad catalítica de las enzimas después del proceso de fabricación de los bioánodos ADH-CNFs y ALDH-CNFs fue realizada por espectrofotometría UV-VIS. Además de evaluar los efectos de la inmovilización también fueron variadas las condiciones de pH, temperatura y tiempo actividad. Se realizó la comparación de los resultados obtenidos para cada bioánodo contra su correspondiente enzima libre en solución. Se registran los resultados como unidades enzimáticas viables por mg de sólido.

En primer lugar se registró la actividad enzimática de los bioánodos y de la enzima libre en condiciones óptimas de pH y temperatura (de acuerdo con las especificaciones del vendedor) durante una hora. Esto con el fin de estudiar la cinética de la reacción y determinar la velocidad a la que se lleva a cabo la reacción deseada.

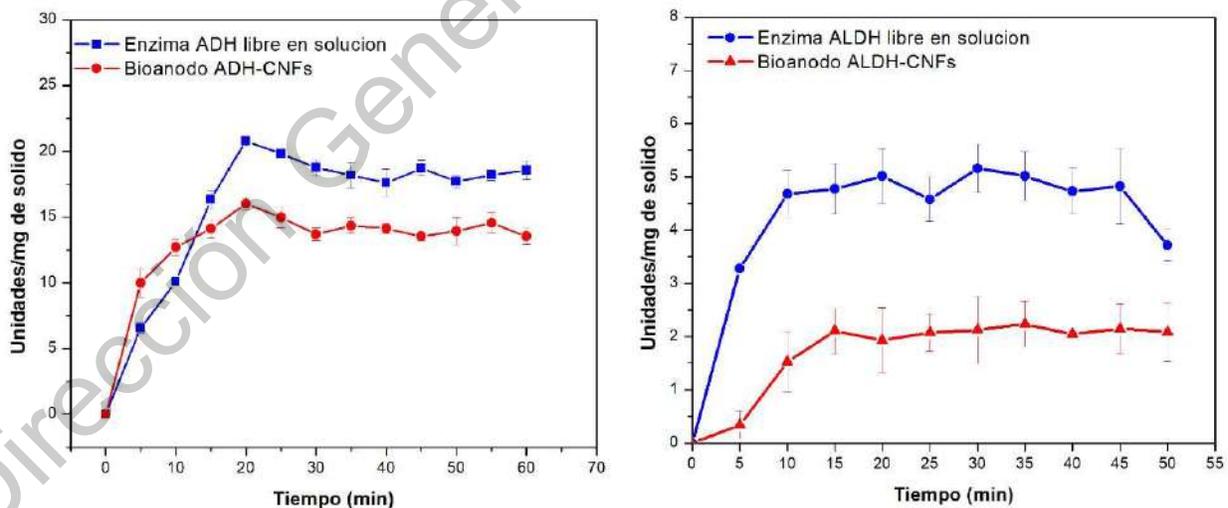


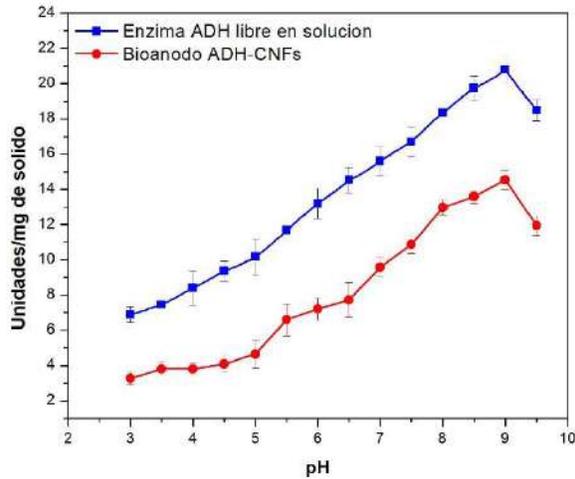
Figura 20: Prueba de actividad enzimática por tiempo de reacción a temperatura ambiente para el a) bioánodo ADH-CNFs comparado con la enzima ADH libre en solución en solución amortiguadora de Tris-HCl (pH 8.8) y b) bioánodo ALDH-CNFs comparado con la enzima ALDH libre en solución en solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4).

Para el bioánodo ADH-CNFs se observa en la Figura 20-a que después de 20 minutos el bioánodo alcanza el punto máximo de oxidación de etanol posible. A partir de ese tiempo la actividad enzimática encuentra un punto de saturación y se deja de observar un aumento en el NADH producido. El proceso de inmovilización reduce la actividad catalítica de la enzima ADH en un 25% aproximadamente, sin embargo muestra la misma estabilidad que la enzima libre en solución.

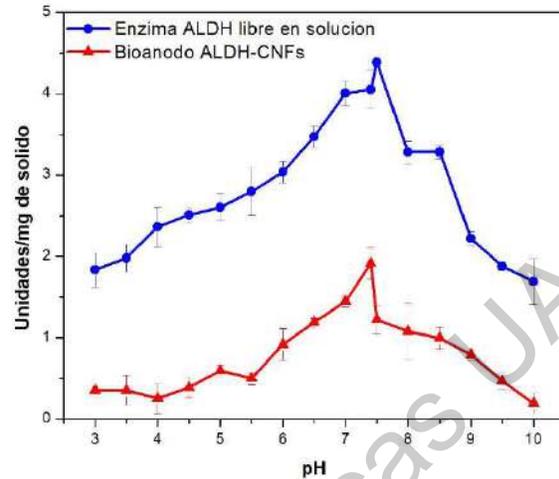
Para el segundo bioánodo ALDH-CNFs se observa en la Figura 20-b que después de 10 minutos aproximadamente se alcanza un punto de saturación de la misma manera que con el bioánodo ADH-CNFs. Después de este tiempo la actividad enzimática permanece constante. Se observa que la actividad de la enzima ALDH inmovilizada se reduce más drásticamente con respecto a la enzima libre que en el caso de la enzima ADH. En este caso la reducción de actividad llega hasta un 50% aproximadamente. Pese a esto, la reacción de oxidación de acetaldehído a ácido acético se sigue llevando a cabo en el bioánodo ALDH-CNFs, lo que indica que permanece viable.

Para ambos bioánodos este ensayo demuestra que la actividad catalítica de ambas enzimas permanece viable después de ser sometidas al proceso de inmovilización propuesto. La actividad catalítica se ve reducida en ambos bioánodos como consecuencia esperada del proceso de inmovilización, sin embargo ambos permanecen viables ya que siguen llevando a cabo la reacción deseada.

Posteriormente se procedió a repetir el ensayo de actividad enzimática variando las condiciones de pH de la solución amortiguadora en la que se lleva a cabo. Los resultados se muestran a continuación en la Figura 21.



a)



b)

Figura 21: Prueba de actividad enzimática a temperatura ambiente en un rango de pH de 3.0 a 9.5 para el a) bioánodo ADH-CNFs comparado con la enzima ADH libre en solución y b) bioánodo ALDH-CNFs comparado con la enzima ALDH libre en solución.

En el ensayo de actividad enzimática para las enzimas ADH y ALDH libres en solución se observa que la actividad enzimática es mayor en el pH óptimo para cada enzima; 9.0 para la enzima ADH y 7.5 para la enzima ALDH aproximadamente. En condiciones de pH más ácidas o básicas que su punto óptimo, la actividad enzimática se ve reducida. Este comportamiento se observa tanto para las enzimas libres en solución como para los bioánodos desarrollados a partir de ellas. Ambas enzimas presentan mejor actividad en pHs básicos que en ácidos, esto en el rango entre 7.0 y 9.0 en la escala de pH. Fuera de este rango la actividad registrada disminuye considerablemente en comparación con la actividad registrada en condiciones de pH óptimo para las enzimas libres y para los bioánodos por igual.

La disminución en la actividad enzimática es un efecto propio del proceso de inmovilización. En su estado soluble las enzimas cuentan con libertad espacial para modificar su estructura conforme se lleva a cabo la reacción de oxidación. Sin embargo durante el proceso de inmovilización se forman enlaces covalentes entre los grupos funcionales de las CNFs y los grupos enzimáticos de las enzimas, limitando su libertad

espacial y entorpeciendo el transporte de masa alrededor de la enzima, lo que se traduce en una ligera pérdida de actividad catalítica (Deng *et al.*, 2010)

En su aplicación en un sistema en cascada ambos bioánodos operan con el mismo pH de la solución de alimentación que contiene el combustible. Las pruebas realizadas corroboran que ambos bioánodos presentan actividad catalítica en el rango de pH de 7.0 a 9.0. A partir de esto se puede definir el pH de operación de la celda de combustible microfluídica en cascada propuesta.

La reacción más importante del proceso es la inicial de oxidación de etanol a acetaldehído. Esto debido a que la segunda reacción depende de los productos generados por el primer bioánodo. Por esto se busca producir la mayor cantidad de acetaldehído posible para alimentar al segundo bioánodo y de esa manera aprovechar de manera más eficiente el contenido energético del etanol.

La determinación del rango óptimo de operación de los bioánodos desarrollados permite seleccionar la aplicación adecuada para el dispositivo. Se observa que el pH óptimo para el bioánodo ADH-CNFs se encuentra entre 8.5 y 9.0 al igual que para la enzima ADH libre en solución. La enzima ALDH y el bioánodo ALDH-CNFs presentan una mayor actividad entre los pH 7.0 y 8.0. Sin embargo esta aún presenta actividad enzimática hasta un pH de 9.0. Con el fin de favorecer la producción de acetaldehído en la primera reacción se tomó el pH 9.0 como óptimo para realizar pruebas posteriores en celda de combustible microfluídica en cascada.

A continuación se realizaron los ensayos de actividad enzimática variando las condiciones de temperatura en las que se realizó la prueba. El acetaldehído es un compuesto volátil, tóxico y nocivo para la salud con un punto de ebullición de 19 °C. Esta prueba no se realizó para la enzima ALDH libre en solución ni para el bioánodo ALDH-CNFs debido a que se requiere someter a calentamiento las soluciones del ensayo y por su bajo punto de ebullición el acetaldehído representa un riesgo para la salud en estas

condiciones. Los resultados obtenidos para la enzima ADH libre en solución y para el bioánodo ADH-CNFs se muestran a continuación en la Figura 22:

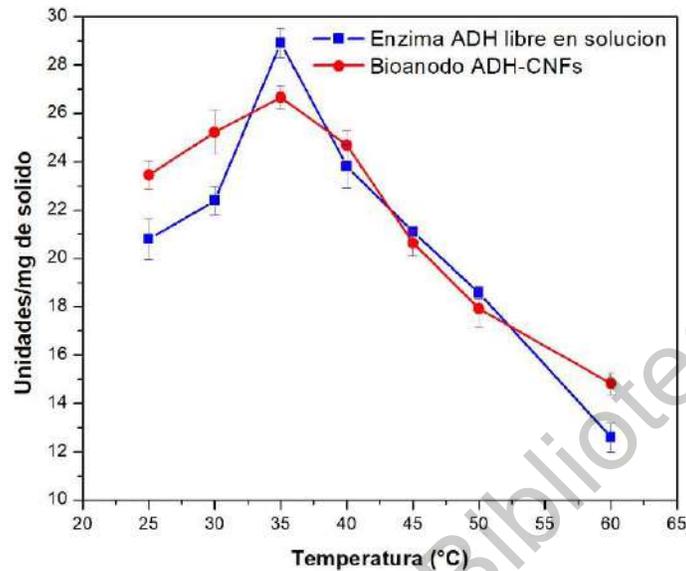


Figura 22: Resultados del ensayo de actividad enzimática variando la temperatura de la prueba para a) la enzima ADH libre en solución, y b) el bioánodo ADH-CNFs.

Se encontró que las condiciones de temperatura óptimas para la enzima ADH libre en solución y para el bioánodo ADH-CNFs son aproximadamente 35 °C. Iniciando a temperatura ambiente, la actividad enzimática registrada aumenta conforme aumenta la temperatura hasta llegar a los 35 °C. A partir de este punto subsecuentes aumentos a la temperatura del ensayo disminuyen la actividad enzimática debido a la desnaturalización térmica de la enzima. Este comportamiento se observa de la misma manera tanto para la enzima ADH libre como para el bioánodo ADH-CNFs.

El proceso de inmovilización parece favorecer la estabilidad de la enzima respecto a cambios de temperatura como se observa en la Figura 22. Sin embargo los cambios en la actividad enzimática por el proceso de inmovilización no son drásticos. Temperaturas menores a y hasta 35 °C los cambios en la actividad enzimática al cambiar la temperatura son menos agresivos en el bioánodo que en la enzima libre. Sin embargo se observa una disminución de la actividad enzimática del bioánodo a temperatura óptima en comparación con la enzima libre.

A temperatura ambiente (25 °C) el bioánodo ADH-CNFs mantiene una mejor actividad catalítica a la actividad registrada a 35 °C. Se observa solo una disminución de aproximadamente 3 unidades/mg de sólido entre la actividad registrada a 25 °C y a 35 °C. Esto es de interés debido a que el dispositivo enzimático no presenta una pérdida de actividad significativa con respecto a la actividad de la enzima libre a temperatura ambiente, lo que le permite al dispositivo (CCMF) propuesto operar sin necesidad de calentamiento. Esto representa una disminución en el costo de implementación del bioánodo en este dispositivo.

Termoestabilidad

Finalmente se realizó una evaluación de termoestabilidad para determinar el tiempo de vida estable de los bioánodos ADH-CNFs y ALDH-CNFs. Se realizaron los ensayos de actividad continuamente por un periodo de tiempo hasta dejar de registrar una actividad catalítica estable. Los resultados se muestran a continuación en la Figura 23:

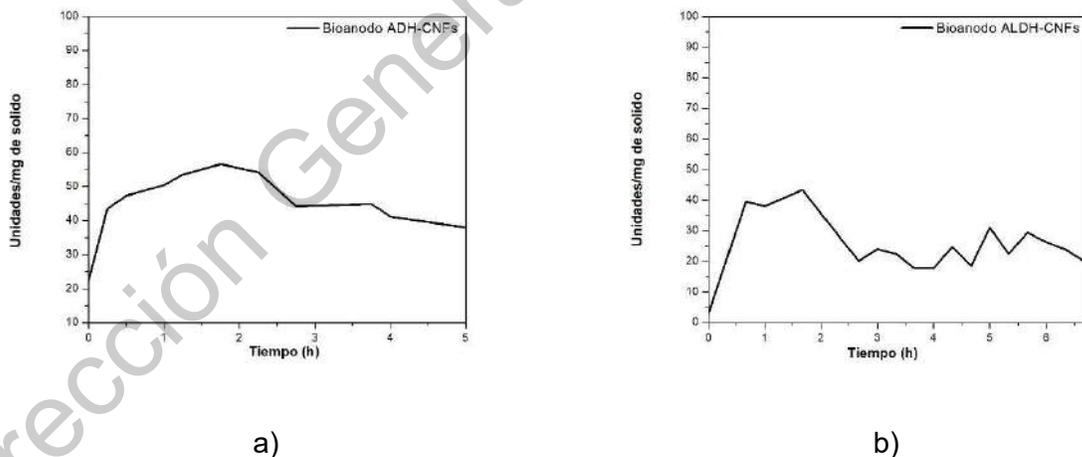


Figura 23: Resultados de pruebas de termoestabilidad a temperatura ambiente y pH óptimo para cada enzima de los bioánodos a) ADH-CNFs y b) ALDH-CNFs.

El bioánodo ADH-CNFs mantiene una actividad estable hasta por 5 horas continuas. El bioánodo ALDH-CNFs por su parte dio muestras de actividad constante hasta por 6.6

horas continuas, pese a una ligera pérdida de actividad después de las dos primeras horas. Posteriormente se registraron pérdidas de actividad significativas en ambos bioánodos conforme transcurrían los ensayos. Esto puede atribuirse a la desnaturalización de las enzimas, pérdida de material por desgaste mecánico y degradación. En comparación con otros bioánodos en la literatura como los mencionados en la Tabla 1, los bioánodos desarrollados presentan una excelente estabilidad y capacidad de operar continuamente por largos periodos de tiempo.

A partir de las pruebas bioquímicas realizadas se determinó que después del proceso de inmovilización al que fueron sometidas las enzimas para la fabricación de los bioánodos ADH-CNFs y ALDH-CNFs la actividad catalítica de estas permanece viable. La técnica de inmovilización por unión covalente no resulto agresiva para las enzimas, sin embargo si redujo la actividad registrada con respecto a las enzimas libres en solución. Se determinó el pH y las temperaturas óptimas de operación para cada sistema enzimático tanto para las enzimas libres en solución como para los bioánodos. Se determinó además que en el rango de pH óptimo para el bioánodo ADH-CNFs el bioánodo ALDH-CNFs presenta actividad catalítica, por lo que se busca favorecer la producción de acetaldehído en la primera reacción utilizando ese rango de pH en pruebas posteriores. De igual manera la temperatura óptima del bioánodo ADH-CNFs es de 35 °C pero presenta actividad catalítica similar a temperatura ambiente, por lo que pruebas posteriores con este bioánodo se realizaron a esta temperatura con el fin de reducir costos.

Se omitieron estas pruebas para el bioánodo ALDH-CNFs por el riesgo que representa el uso de acetaldehído. Sin embargo los ensayos anteriores para este bioánodo fueron realizados a temperatura ambiente y la actividad catalítica registrada fue considerada prueba suficiente para justificar su uso a temperatura ambiente en pruebas posteriores.

Pruebas en celda de combustible

Pruebas en celda microfluídica individual - Dispositivo CCMF-ADH.

Se implementó el bioánodo ADH-CNFs en una celda de combustible microfluídica individual (CCMF-ADH) contra un cátodo de Pt-Vulcan 20%w. Se realizaron las pruebas de descarga de voltaje y cronoamperometría en celda microfluídica individual con concentraciones de etanol de 100, 50 y 10 mM en el flujo de combustible. Se varió el pH del flujo de combustible de 3.0 a 10.0 utilizando soluciones amortiguadoras de glicina, fosfatos, acetatos y TRIS-HCl. El flujo de alimentación al cátodo consistió en una solución de KOH 0.3 M saturada de O₂. A partir de estas pruebas se determinó la curva de polarización y la curva de potencia del sistema, así como un cronoamperograma de treinta minutos.

En la Figura 24 a continuación se muestran los potenciales de circuito abierto alcanzados por la CCMF-ADH individual.

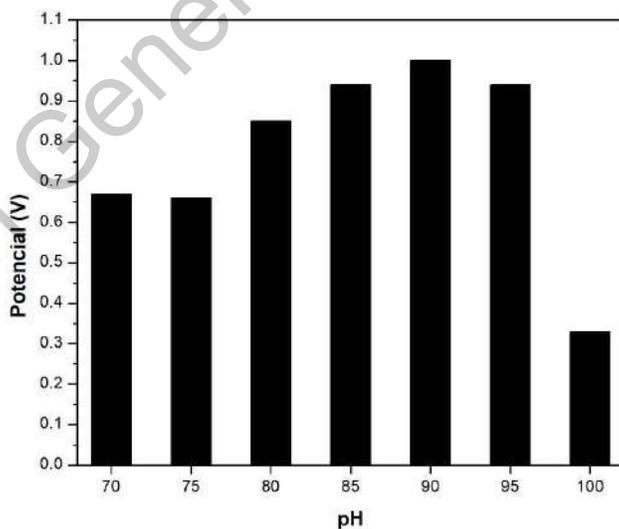


Figura 24: Registro de OCVs alcanzados en con el dispositivo CCMF-ADH utilizando en diferentes pH con una concentración de 100mM de etanol como combustible.

Los valores de OCP más altos reportados en la literatura para bioánodos basados en ADH en celda de combustible oscilan entre los 7.4 y 8.5 V (Akers *et al.*, 2005; Palmore *et al.*, 1998. En la Figura 24 se observa una relación entre el potencial alcanzado y la diferencia entre el pH del sistema contra el pH óptimo de la enzima. En el pH óptimo de la enzima se alcanza el mayor potencial, y disminuye conforme este parámetro se aleja del óptimo para la enzima. Los resultados obtenidos son similares con distintas concentraciones de etanol en el combustible. Las variaciones observadas pueden atribuirse a cambios en la resistencia del sistema por variaciones en el flujo de las soluciones dentro del dispositivo, defectos en el proceso de fabricación de los bioánodos y la sensibilidad a la humedad del equipo utilizado para el registro de datos.

En el pH óptimo de la enzima el bioánodo ADH-CNFs presenta la mayor actividad catalítica debido a que se encuentra en las condiciones óptimas de reacción para la enzima ADH. En estas condiciones la reacción de oxidación del etanol se lleva a cabo de manera más frecuente ya que en este pH la enzima presenta la mayor velocidad de reacción. Esto debido a que en este pH la enzima se encuentra en su conformación estructural óptima para el transporte de masa de productos y reactivos al sitio activo de reacción, lo que se traduce en un aumento en la velocidad de reacción del proceso de oxidación llevado a cabo en la superficie del bioánodo. Esto genera una concentración de cationes en la superficie del bioánodo en condiciones de pH óptimo de la enzima mayor a la registrada en otros pH, lo que se traduce en un mayor potencial alcanzado por el dispositivo CCMF-ADH.

La corriente máxima generada por la CCMF-ADH también fue registrada para cada pH como se muestra a continuación en la Figura 25:

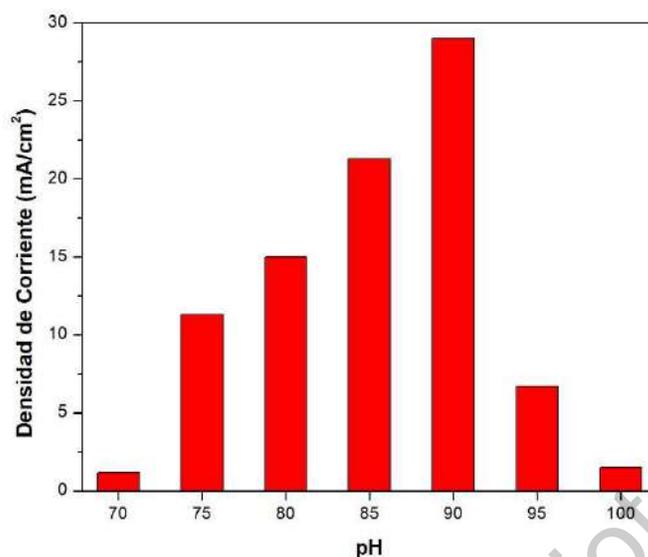


Figura 25: Registro de densidades de corriente alcanzadas en con el dispositivo CCMF-ADH utilizando 100mM de etanol en el combustible y diferentes pH.

Se observa que la mayor densidad de corriente se registra en el pH 9.0, pH óptimo de la enzima ADH. En ambientes más ácidos o básicos el desempeño de la celda se ve reducido considerablemente, aunque aún presenta actividad en el rango de pH de 7.0 a 8.5. Los resultados registrados con concentraciones de 10 y 50mM de etanol en el combustible muestran una tendencia similar con respecto al pH utilizado. La densidad de corriente obtenida en cada caso también muestra una relación con la concentración de combustible, obteniendo mayores densidades con una mayor concentración de etanol. Las densidades de corrientes obtenidas en el pH óptimo de la enzima son superiores a las registradas en la literatura para la mayoría de los sistemas electroquímicos similares basados en la enzima ADH (Akers *et al.*, 2005).

En las condiciones óptimas de pH de la enzima ADH para el bioánodo ADH-CNFs se registra la mayor densidad de corriente del dispositivo debido a que en estas condiciones la reacción de oxidación se lleva a cabo de manera más eficiente y con mayor frecuencia

que en otras condiciones. Esto se traduce en un aumento en los electrones liberados por la enzima y su transferencia hacia el electrodo y el circuito eléctrico exterior. Pese a que la reacción presenta tendencias de ser un proceso electroquímicamente irreversible, la transferencia electrónica del dispositivo es suficiente para obtener densidades de corriente mayores a las reportadas en la literatura.

A partir del OCP y las densidades de corriente registradas se determinó la potencia máxima de sistema CCMF-ADH. Los resultados se muestran en la Figura 26:

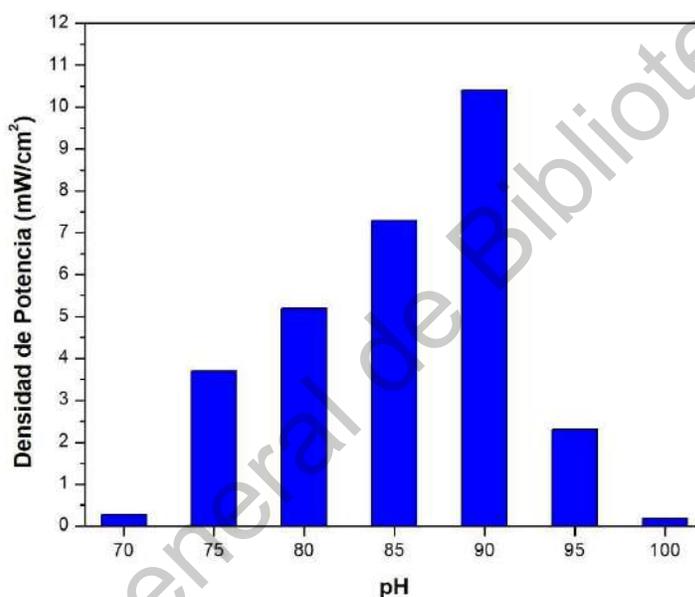


Figura 26: Registro de densidades de potencia alcanzadas en con el dispositivo CCMF-ADH utilizando 100mM de Etanol en el combustible y diferentes pH.

La densidad de potencia máxima es alcanzada por la CCMF-ADH en el pH óptimo de la enzima ADH. Al aumentar o disminuir el pH la potencia obtenido del dispositivo se ve reducida. Este comportamiento se repite utilizando concentraciones de etanol de 50 y 10mM.

La densidad de potencia del dispositivo CCMF-ADH es de interés como indicador del desempeño del dispositivo ya que es un factor importante en la miniaturización de los posibles dispositivos en las que puede ser implementado. En el pH 9.0 el dispositivo presenta el mejor desempeño energético, lo que permite reducir las dimensiones finales del dispositivo en el que sería aplicado. Otros pH presentan un menor desempeño, lo que conllevaría un aumento del costo de un dispositivo y dificultaría su aplicación biomédica. Esto debido a que se requeriría una mayor cantidad de material para su fabricación y sería un dispositivo que por sus dimensiones sería más invasivo. (Bandodkar *et al.*, 2016)

Por la inconsistencia que presentan algunos de los resultados obtenidos se deduce que en el sistema de CCMF propuesto existen factores que afectan las mediciones realizadas. Esos pueden ser las irregularidades en las superficies tanto del bioánodo como de la celda de combustible, pequeñas variaciones en el área efectiva del bioánodo, defectos en el proceso de fabricación del bioánodo y fuentes de resistencia eléctrica como humedad en los contactos metálicos o la formación de burbujas dentro del dispositivo.

Pese a estos inconvenientes, los resultados obtenidos demuestran que el dispositivo presenta un mejor desempeño que otros sistemas electroquímicos similares reportados en la literatura (Alkers *et al.*, 2004; Arrocha *et al.*, 2014; Aquino *et al.*, 2013). El bioánodo ADH-CNFs demuestra ser viable y tener un buen desempeño para su aplicación en una CCMF. Los resultados obtenidos se profundizan en la siguiente sección.

Curvas de potencia y curvas de polarización del dispositivo CCMF-ADH en distintos pH y con diferentes concentraciones de etanol.

A partir de las descargas de voltaje registradas en el dispositivo CCMF-ADH se obtuvieron las siguientes curvas de polarización y curvas de potencia. En primera instancia se muestran en la Figura 27 las curvas de densidad y de potencia obtenidas con diferentes concentraciones de etanol en un ambiente con pH 7.0.

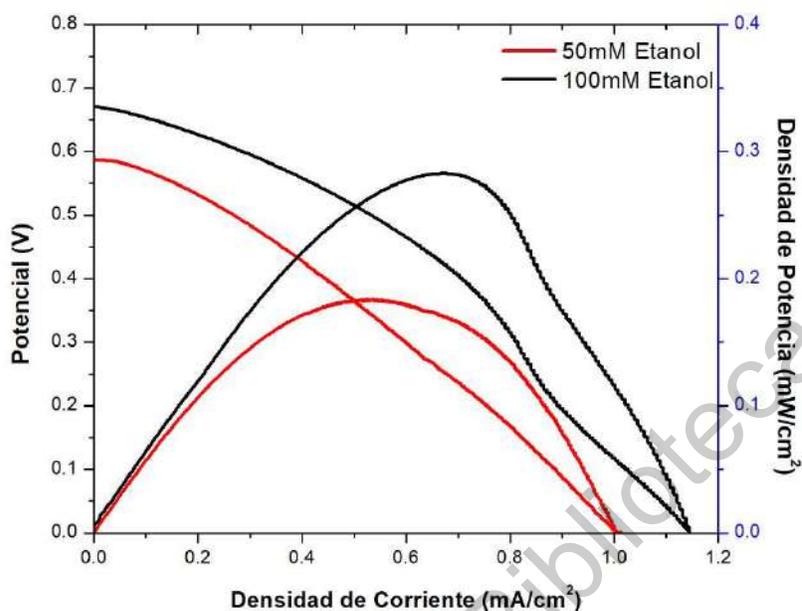


Figura 27: Curvas de polarización y curvas de potencia para el bioánodo ADH-CNFs en celda de combustible microfluídica individual con concentraciones de 100 y 50mM de etanol en el flujo de combustible con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0.

Se obtuvo un OCP de 0.673 V al utilizar un flujo de combustible con una concentración de 100mM de etanol y de 0.589 V con una concentración de 50mM. El potencial alcanzado se aproxima al reportado por Akers *et al.*, 2004. Ambos sistemas muestran pérdidas óhmicas predominantemente. Con respecto a la densidad de corriente alcanzada, con una concentración de 100mM el dispositivo alcanza 1.14mA/cm², mientras que con 50mM se alcanzan 1.01mA/cm². En ambos casos se alcanza una densidad de corriente superior a la reportada en la literatura.

Se observa en la Figura 27 una pérdida inicial a bajas densidades de corriente debido a las pérdidas por activación, es decir, las pérdidas ocasionadas por la energía requerida por el sistema para llevar a cabo la reacción de oxidación del etanol a partir de un estado de equilibrio. Para ambas concentraciones de etanol estas son las pérdidas

predominantes hasta aproximadamente 0.1 mA/cm^2 . Posteriormente se observa una zona de pérdidas óhmicas debidas a la resistencia intrínseca del sistema. Se observa que las pérdidas óhmicas no presentan un comportamiento totalmente lineal. Esto se atribuye a s pérdidas por transporte de masa debidas a la cinética propia de las enzimas de aceptación de sustrato y liberación de productos de reacción. Finalmente en altas densidades de potencia se observan pérdidas predominantemente debidas al transporte de masa en la superficie del bioánodo ADH-CNFs.

Con respecto a la densidad de potencia se obtuvieron 2.79 mW/cm^2 con una concentración de etanol de 100mM y 1.183mW/cm^2 con una concentración de 50mM . Esto indica que el desempeño del dispositivo es mejor al incrementar la concentración de etanol en el flujo de alimentación, favoreciendo la reacción de oxidación.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en un pH básico más débil que el pH óptimo de la enzima.

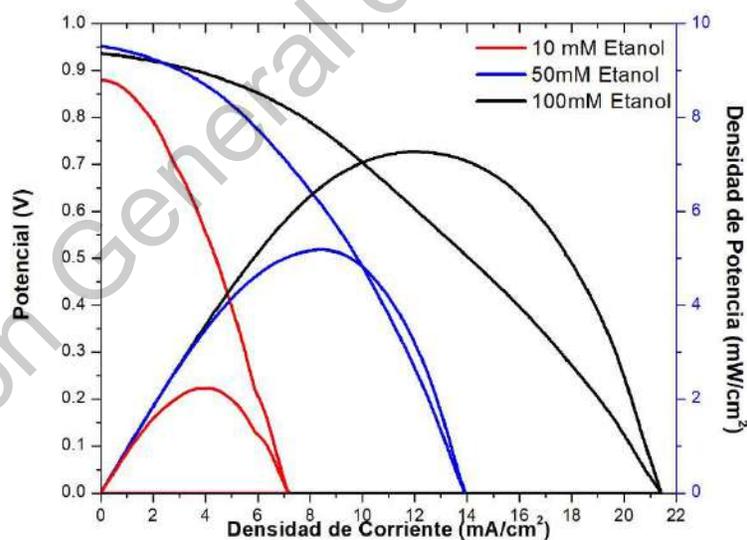


Figura 28: Curvas de polarización y curvas de potencia para el bioánodo ADH-CNFs en celda de combustible microfluídica individual con concentraciones de 100, 50 y 10mM de etanol en el flujo de combustible con solución amortiguadora Tris-HCl pH 8.5.

El desempeño del dispositivo CCMF-ADH mejora conforme nos acercamos al pH óptimo de la enzima. Se alcanzaron OCPs de 0.94, 0.952 y 0.878 V para concentraciones de etanol en el anolito de 100, 50 y 10mM respectivamente. Incluso con la menor concentración de etanol se obtiene un OCP mayor al reportado en la literatura. Se observa también que la densidad de corriente aumenta junto con la concentración de etanol, alcanzando 21.35mA/cm² en presencia de 100mM de etanol, Esto se ve reflejado en la densidad de potencia obtenida de 7.19 mW/cm² con la misma concentración.

Con respecto a las zonas de pérdidas por activación, óhmicas y por transporte de masa, en comparación con la Figura 27, en la Figura 28 a lo largo de las 3 concentraciones de combustible con las que se llevaron a cabo las pruebas, predominan las pérdidas óhmicas y por transporte de masa a lo largo de las curvas obtenidas. Las pérdidas por activación no son significativas en el sistema, mientras que las pérdidas óhmicas y por transporte de masa rigen el comportamiento del dispositivo. Esto es debido a la cinética de la enzima ADH, que contribuye a pérdidas desde bajas densidades de corriente.

Posteriormente se realizaron las mismas pruebas en el pH óptimo de la enzima. Los resultados se muestran en la Figura 29 a continuación.

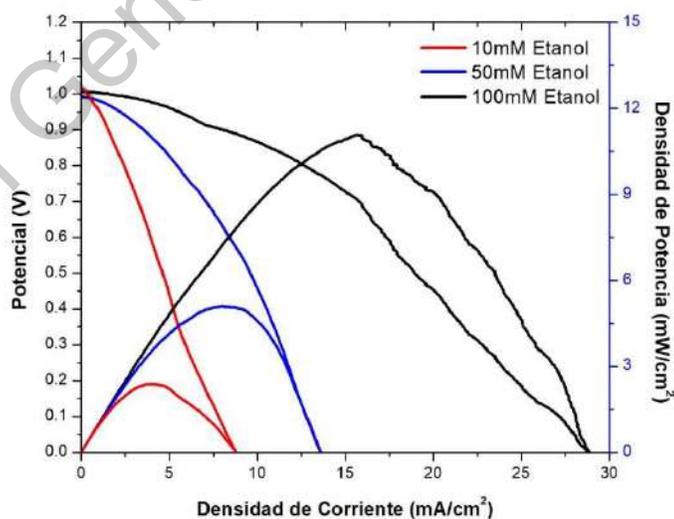


Figura 29: Curvas de polarización y curvas de potencia para el bioánodo ADH-CNFs en celda de combustible microfluídica individual con concentraciones de 100, 50 y 10mM de etanol en el flujo de combustible con solución amortiguadora Tris-HCl pH 9.0.

En la Figura 29 se muestra que en el pH óptimo de la enzima ADH se alcanzó el mejor desempeño registrado para el dispositivo CCMF-ADH desarrollado en este trabajo. Se alcanzaron OCV superiores a los reportados por Akers *et al.*, 2004 utilizando concentraciones de etanol en el anólito de 100, 50 y 10mM de 1.00, 0.99 y 1.03V respectivamente. La densidad de corriente obtenida para estas dos concentraciones también fue la más alta obtenida, alcanzando 28.48mA/cm² con la máxima concentración. La mayor densidad de potencia obtenida fue de 11.07mW/cm² con una concentración de etanol de 100mM.

En estas condiciones de pH se alcanza el mejor desempeño del sistema CCMF-ADH en comparación con otras pruebas realizadas con pH diferente. Se alcanza el mayor potencial y densidades de corriente y potencia gracias a que la enzima ADH puede realizar de manera más eficiente la reacción de oxidación de etanol, así como el intercambio de productos de reacción con el flujo de alimentación. Con bajas concentraciones de etanol el sistema se rige principalmente por pérdidas óhmicas, esto se atribuye al transporte eficiente de combustible y liberación de productos de reacción al flujo del sistema. Con concentraciones mayores de combustible se especula que la enzima alcanza un punto de inhibición parcial por la competencia de sustratos a insertarse en el sitio activo de la enzima, generando pérdidas por transporte de masa. En presencia de concentraciones de etanol de 50 y 100 mM, el sistema se rige principalmente por pérdidas óhmicas y de transporte de masa.

Finalmente se realizaron las mismas pruebas en un pH más básico que el pH óptimo de la enzima ADH y se obtuvieron los resultados mostrados a continuación en la Figura 30:

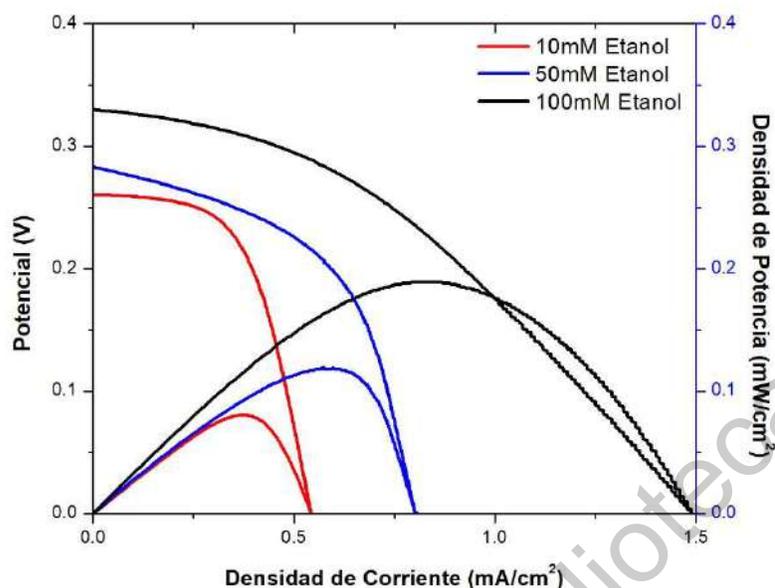


Figura 30: Curvas de polarización y curvas de potencia para el bioánodo ADH-CNFs en celda de combustible microfluídica individual con concentraciones de 100, 50 y 10mM de etanol en el flujo de combustible con solución amortiguadora Tris-HCl pH 10.0.

En la Figura 30 se registra una pérdida significativa en el desempeño del dispositivo. Los OCPs obtenidos para todas las concentraciones no sobrepasan 0.35V. Las densidades de corriente obtenidas muestran un ligero incremento en relación directamente proporcional a la concentración de etanol en el anolito y no superan 1.5mA/cm² aun con la mayor concentración de etanol utilizada. La densidad de potencia máxima obtenida fue de 0.178mW/cm² con una concentración de 100mM de etanol. El desempeño obtenido en este pH es menor que el obtenido en el pH más ácido, mostrado en la Figura 31. Esto indica que un pH más básico que el óptimo afecta negativamente la actividad de la enzima ADH en la que se basan el bioánodo ADH-CNFs.

En este ambiente de pH la enzima pierde la integridad estructural que le permite llevar a cabo la reacción de oxidación en el sitio activo de manera eficiente. Las pérdidas por transporte de masa son mucho más drásticas que en otras condiciones de pH, y rigen el comportamiento del dispositivo. Las pérdidas óhmicas son mínimas debido al bajo desempeño de la CCMF-ADH en estas condiciones.

Con las pruebas realizadas se puede afirmar que el bioánodo ADH-CNFs presenta actividad catalítica en la celda de combustible en el rango de pH de 3.0 a 10.0. El mejor desempeño del bioánodo ADH-CNFs se registra en el pH 9.0, el cual es el más cercano al pH óptimo de la enzima ADH. Con un flujo de combustible con pH más ácidos o básicos al pH óptimo de la enzima el desempeño y la potencia del bioánodo disminuyen. La concentración de combustible en el flujo de alimentación también afecta la corriente obtenida en el dispositivo, siendo las concentraciones de 100mM las que generan mayor densidad de corriente.

En la Figura 31 a continuación se muestran nuevamente los resultados obtenidos para varios pH utilizando una concentración de etanol de 100mM para comparación.

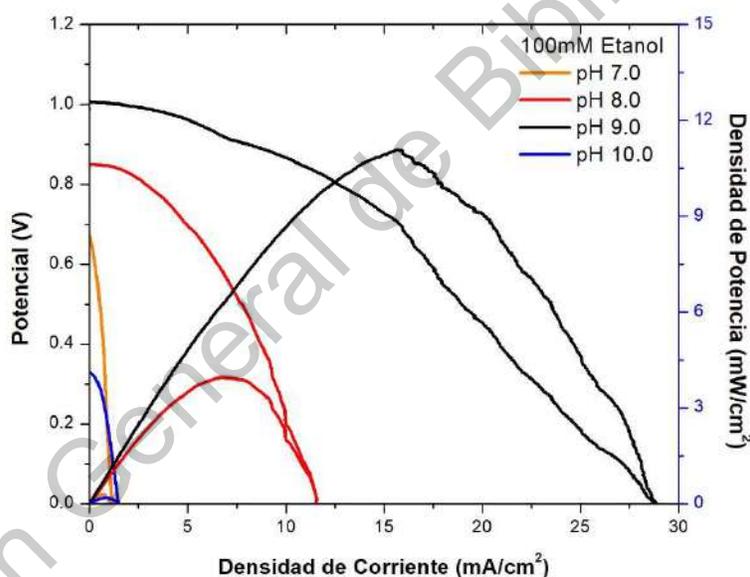


Figura 31: Curvas de polarización y curvas de potencia para el bioánodo ADH-CNFs en celda de combustible microfluídica individual con una concentración de 100mM de etanol en el flujo de alimentación, varios pH.

La Figura 31 muestra el desempeño de la CCMF-ADH utilizando soluciones amortiguadoras de pH 7.0, 8.0, 9.0 y 10.0 para el anolito utilizando una concentración de 100mM. El mejor desempeño en términos de potencia es alcanzado por el dispositivo en el pH óptimo de la enzima entre el pH 8.0 y 9.0 como se muestra en la Figura 31. La

densidad de corriente alcanzada y el OCP obtenidos disminuye notablemente fuera de este rango. La concentración de etanol en el anolito también afecta la densidad de corriente y el OCP alcanzado, tendiendo a aumentar estos parámetros conforme aumenta la concentración. En los casos en que el OCP o la corriente muestran un comportamiento anormal se puede inferir que el dispositivo microfluídico presenta defectos en la superficie los cuales afectan el flujo homogéneo del anolito y catolito dentro del mismo y puede favorecer la aparición de burbujas o regiones donde el flujo es inconsistente alrededor de los electrodos. Además, el proceso de fabricación de los bioánodos puede afectar la integridad estructural del papel carbón Toray® utilizado como soporte y pueden presentarse áreas sobre el bioánodo sobre las cuales la deposición de la matriz enzimática no es homogénea.

Variando el pH del sistema en un rango amplio no afecta las pérdidas por activación del sistema. Esto se debe a que la enzima ADH reduce en gran medida la energía necesaria para que se lleve a cabo la reacción de oxidación. Las pérdidas óhmicas y de transporte de masa rigen en gran medida el comportamiento del sistema en el rango de pH y la variación de concentración de combustible estudiada. Las pérdidas por transporte de masa afectan al sistema incluso en densidades de corriente moderadas, esto es debido a la cinética de la enzima ADH. Los cambios conformacionales que sufre durante la reacción y el intercambio de sustrato y productos de reacción con el medio afectan este parámetro.

Las pruebas realizadas comprueban que el bioánodo desarrollado y su aplicación en un dispositivo electroquímico como el propuesto no solo son viables, sino que se llegan a obtener resultados superiores a los reportados en la literatura en un pH de 9.0. También se observa que el dispositivo es altamente dependiente del pH del anolito y catolito, ya que en condiciones fuera de las óptimas presenta un desempeño inadecuado para poder ser utilizado en cualquier aplicación. A partir de estas pruebas se determinaron las condiciones de pH en las que debe operar el dispositivo de manera óptima y se procedió a realizar las mismas pruebas con el bioánodo ALDH-CNFs.

Cronoamperometría

Se estudió la estabilidad del sistema CCMF-ADH por cronoamperometría a un potencial determinado por las curvas de potencia para cada pH y concentración de etanol en el anolito. A partir del potencial en el que se registra la mayor potencia para cada caso se llevaron a cabo pruebas de 30 minutos. Se observa que la corriente obtenida es mayor en condiciones de pH cercanas al pH óptimo de la enzima ADH en la Figura 32 a continuación. En pH ácidos y pH más básicos que el óptimo se registra una densidad de corriente muy baja, mientras que en el rango de pH de 7.0 a 9.0 se observa un mejor desempeño, obteniendo la mayor densidad de corriente registrada en estas pruebas en el pH óptimo de la enzima (9.0).

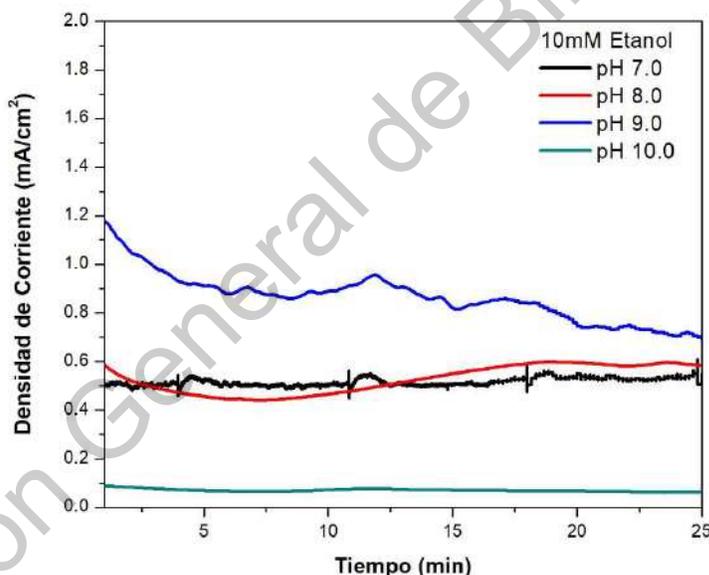


Figura 32: Cronoamperometrías del sistema CCMF-ADH con una concentración de 10mM de etanol en el combustible en diferentes pH.

Se observa que en todos los casos presentados en la Figura 32. Con una concentración de etanol de 10mM, el dispositivo CCMF-ADH mantiene una corriente estable por al menos media hora. Existen fuentes de ruido como lo son las dinámicas del fluido dentro

del dispositivo y perturbaciones en el intercambio de sustrato y producto de la enzima con el medio. El mejor desempeño se presenta en el pH óptimo de la enzima, y el dispositivo mantiene actividad significativa en el rango de pH de 7.0 a 9.0. Fuera de estas condiciones el dispositivo presenta pérdidas importantes en la densidad de corriente alcanzada.

En la Tabla 1 se recopilaron los resultados reportados por otros autores respecto a sistemas enzimáticos similares al desarrollado en este trabajo. Las mayores densidades de potencia son reportadas por Arrocha *et al.* 2014 de 40mW/cm² y Davis *et al.* 1983 de 20mW/cm². Estos sistemas presentan potencias mayores a las obtenidas en este trabajo, sin embargo a pesar de estar basados en la enzima ADH son sistemas que presentan componentes diferentes a los utilizados en la fabricación del bioánodo ADH-CNFs y en la construcción del dispositivo microfluídico utilizado. En la mayoría de los otros casos publicados se reporta una potencia menor a la obtenida por el dispositivo CCMF-ADH elaborado en este trabajo.

Con la determinación de las curvas de potencia, curvas de polarización y cronoamperogramas para el sistema CCMF-ADH en un rango de pH de 3.0 a 10.0 y utilizando diferentes concentraciones de etanol como combustible se determinó que el sistema propuesto es viable para la generación de energía. Se obtuvieron resultados de OCP, densidad de corriente y densidad de potencia mejores que los reportados por otros autores para sistemas enzimáticos similares utilizando un pH de 9.0. Las pruebas de cronoamperometría permitieron determinar que el sistema es estable. Se concluye que el bioánodo ADH-CNFs y su aplicación en un dispositivo de CCMF son viables y se procedió con la caracterización del bioánodo ALDH-CNFs.

Pruebas en celda microfluídica individual - Dispositivo CCMF-ALDH.

Se implementó el bioánodo ALDH-CNFs en una celda de combustible microfluídica individual contra un cátodo de Pt-Vulcan 20%w. El anolito de alimentación consistió en soluciones de acetaldehído en soluciones amortiguadoras con diferentes pH y diferentes

concentraciones de acetaldehído burbujeado con nitrógeno, mientras que el catolito consistió en una solución 0.3M de KOH burbujeada con oxígeno. Las concentraciones de acetaldehído utilizadas fueron de 100, 50 y 10mM. Se determinaron las curvas de polarización y potencia para el sistema y se obtuvieron cronoamperogramas del sistema de treinta minutos. Los OCVs, densidades de corriente y densidades de potencia máximas obtenidas se muestran a continuación en la Figura 33.

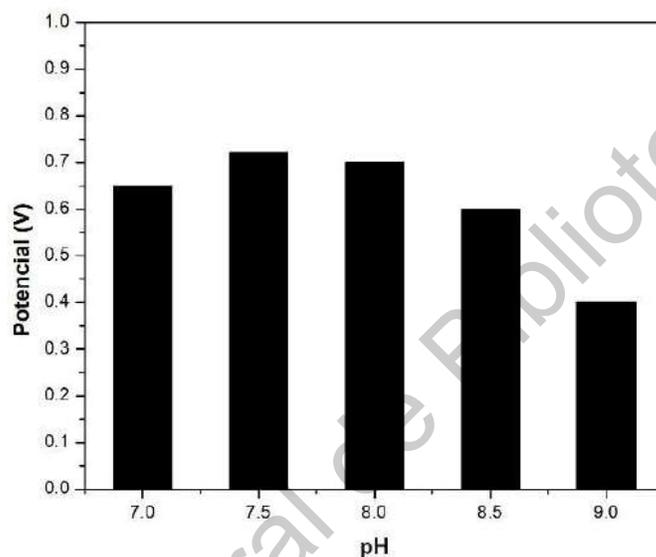


Figura 33: Registro de OCVs alcanzados en CCMF con el bioánodo ALDH-CNFs con diferentes concentraciones de acetaldehído y diferentes pH.

Los OCVs más altos obtenidos se encuentran en el rango entre 7.0 y 8.5 de pH para el dispositivo CCMF-ALDH. Se obtuvo el OCV más alto en el pH óptimo de la enzima (7.5) de 7.32V utilizando una concentración de acetaldehído de 100mM. En el rango de pH ácido estudiado se observa una disminución de los OCVs obtenidos. La concentración de acetaldehído en el flujo del anolito muestra en la mayoría de los casos un efecto sobre los OCV obtenidos, observándose una tendencia en el rango de pH de 7.0 a 8.5.

Con respecto a la densidad de corriente obtenida se muestran los resultados obtenidos en la Figura 34 a continuación:

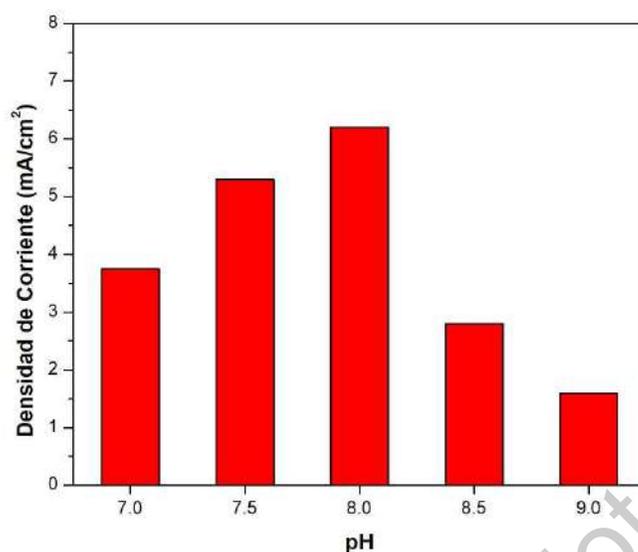


Figura 34: Registro de densidades de corriente alcanzadas en CCMF con el bioánodo ALDH-CNFs con diferentes concentraciones de acetaldehído y diferentes pH.

La densidad de corriente obtenida muestra un comportamiento similar al OCV obtenido de las pruebas como se expone en la Figura 34. Las mayores densidades de corriente se observan en el rango de pH de 7.0 a 8.5, alrededor del pH óptimo de la enzima. Se muestra nuevamente que la concentración de combustible afecta la densidad de corriente obtenida, aumentando conforme aumenta la concentración de acetaldehído. La mayor densidad de potencia alcanzada fue de 6.4mA/cm² en pH 7.5 con una concentración de 100mM de acetaldehído.

A partir de estos resultados se calculó la densidad de potencia obtenida, la cual se muestra a continuación.

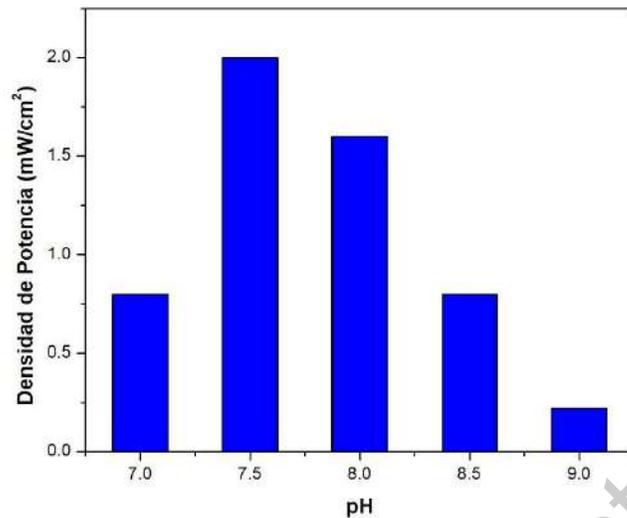


Figura 35: Registro de densidades de potencia alcanzadas en CCMF con el bioánodo ALDH-CNFs con diferentes concentraciones de acetaldehído y diferentes pH.

De la misma manera que en las Figuras anteriores, el dispositivo CCMF-ALDH muestra el mejor desempeño en el pH de 7.5. Presenta también una alta densidad de corriente en el rango de pH 7.0 a 8.5. Fuera de este rango la densidad de potencia registrada comienza a decaer.

Con estas pruebas se comprobó que el bioánodo ALDH-CNFs resulta viable en su aplicación en celda de combustible microfluídica. El pH óptimo de operación del bioánodo es de 7.5, similar al pH óptimo de la enzima ALDH libre. Pese a una disminución de eficiencia, el dispositivo muestra actividad en un ambiente con pH 9.0. Esto es de importancia debido a que es el pH óptimo del bioánodo ADH y será el pH en el que opere el dispositivo microfluídico con ambos bioánodos.

Curvas de potencia y curvas de polarización del dispositivo CCMF-ALDH en distintos pH y con diferentes concentraciones de acetaldehído.

En pH neutro las curvas de polarización y curvas de potencia más significativas registradas fueron las siguientes:

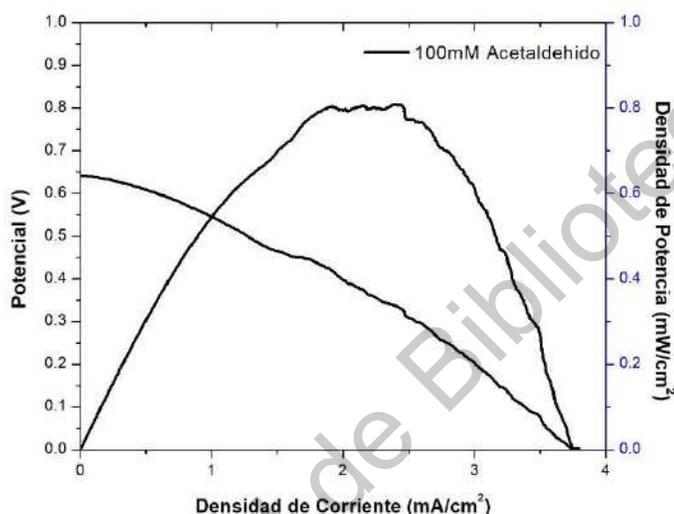


Figura 36: Curvas de polarización y curvas de potencia para el dispositivo CCMF-ALDH con concentración de acetaldehído en el anolito de 100mM en pH 7.0.

Se registró un OCV de 0.645 V con una concentración de acetaldehído de 100mM. La densidad de corriente fue obtenida fue de $3.72\text{mA}/\text{cm}^2$ y la densidad de potencia alcanzada fue de $0.8\text{mW}/\text{cm}^2$ aproximadamente.

Se observa en la Figura 36 que las pérdidas por activación son mínimas debido a la naturaleza catalítica de la enzima ALDH incorporada en el sistema. El comportamiento de las pérdidas se rige por pérdidas óhmicas y de transferencia de masa desde densidades de corriente baja a altas. Este es debido a las pérdidas por transferencia de masa ocasionadas por la cinética de reacción de la enzima ALDH, la cual sufre de cambios conformacionales para la inserción del sustrato en el sitio activo y para la liberación de ácido acético como producto de reacción.

Posteriormente se repitieron las pruebas en el pH óptimo de la enzima (7.5) y los resultados obtenidos se agruparon en la Figura 37:

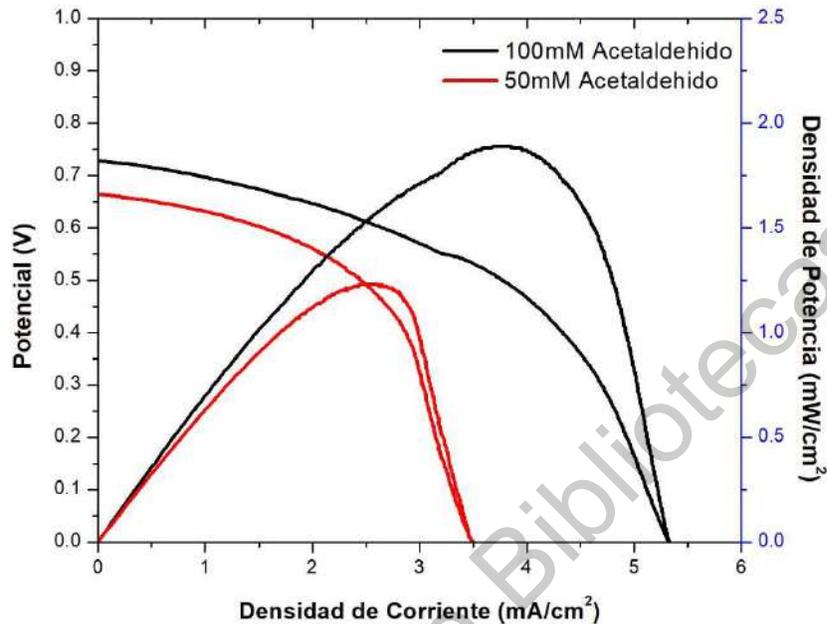


Figura 37: Curvas de polarización y curvas de potencia para el dispositivo CCMF-ALDH con concentraciones de acetaldehído en el anolito de 100 y 10mM en pH 7.5.

En estas condiciones de pH se obtuvieron los mejores desempeños del dispositivo CCMF-ALDH. Se obtuvieron OCVs de 0.735 y 0.661V con las concentraciones de 100 y 50mM de acetaldehído respectivamente. La densidad de corriente máxima obtenida fue de 5.35 mA/cm^2 con la concentración máxima de acetaldehído. Con una concentración de 100mM inicial de acetaldehído la densidad de corriente obtenida sigue un comportamiento regido por fenómenos óhmicos hasta aproximadamente 3.5 mA/cm^2 , punto a partir del cual se observa que las pérdidas siguen un comportamiento de pérdidas por transporte de masa. Este comportamiento se repite al utilizar una concentración de acetaldehído de 50mM, con el punto en el que el comportamiento de las pérdidas cambia de óhmico a dependiente del transporte de masa aproximadamente en 2.5 mA/cm^2 . Se alcanzaron densidades de potencia de 1.87 mW/cm^2 con 100mM de acetaldehído y de 1.21 mW/cm^2 con 50mM.

En estas condiciones de pH el sistema CCMF-ALDH presenta una distinción clara en la Figura 37 entre las regiones de pérdidas óhmicas y las ocasionadas por transporte de masa. Esto es debido a que en estas condiciones de pH la enzima ALDH en la que se basa el sistema presenta la mejor velocidad de reacción, favoreciendo el intercambio de masa entre el sitio activo de la enzima y el medio. No se registraron pérdidas por activación gracias a las cualidades catalíticas de la enzima.

Finalmente se obtuvieron las curvas de polarización y potencia con un pH de 9.0. Los resultados se muestran en la Figura 38.

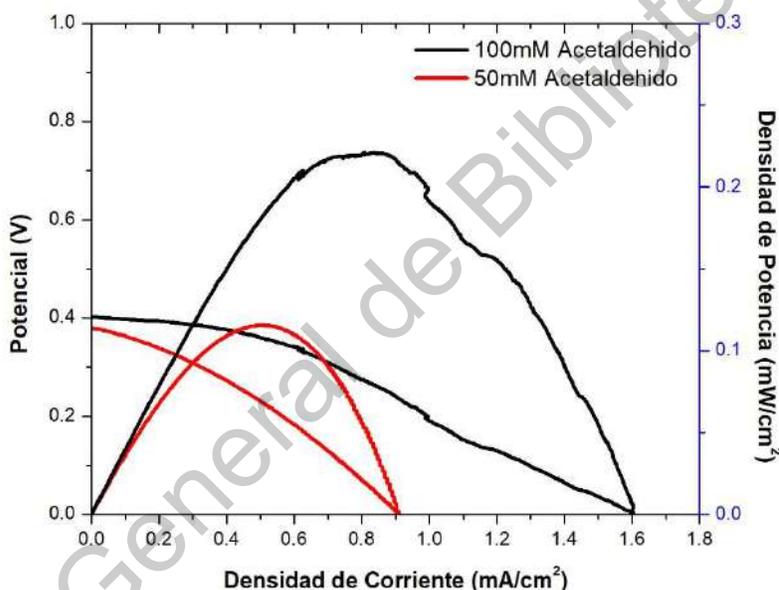


Figura 38: Curvas de polarización y curvas de potencia para el dispositivo CCMF-ALDH con concentraciones de acetaldehído en el anolito de 100 y 50mM en pH 9.0.

Se observa una disminución en el desempeño del dispositivo en comparación con el reportado en la Figura 38 para las dos concentraciones reportadas. Se alcanzó un OCV máximo de aproximadamente 0.4V con las concentraciones de 100 y 50mM de acetaldehído. Con respecto a las densidades de corriente obtenidas se observa un aumento de este parámetro en relación con el aumento en la concentración de combustible, alcanzando $1.6\text{mA}/\text{cm}^2$ con una concentración de 100mM.

Con una concentración de 100mM de acetaldehído la región en la que se denotan pérdidas óhmicas comienza en $0.6\text{mA}/\text{cm}^2$. Las pérdidas por activación no resultan significativas debido a la eficiencia catalítica de la enzima ALDH. Las pérdidas por transporte de masa se registran desde bajas y moderadas densidades de corriente. Esto es nuevamente debido a la cinética de reacción de la enzima, la cual debe cambiar su conformación estructural para el intercambio de sustratos o productos de reacción con el medio.

Pese a la disminución en la actividad del dispositivo CCMF-ALDH en el pH 9.0, el dispositivo genera corriente eléctrica en presencia de etanol como combustible. Esto es de interés debido a que es en este pH en el que opera el dispositivo final con el bioánodo ADH-CNFs en conjunto con el bioánodo ALDH-CNFs. Esto con el fin de favorecer la producción de acetaldehído en la primera reacción dentro del dispositivo.

En general sobre estas pruebas se puede decir que en el pH 7.5 se alcanza la mayor densidad de corriente y densidad de potencia del dispositivo, acorde con el pH óptimo de la enzima catalizadora ALDH utilizada. En pH neutro el dispositivo también presenta buena actividad y en el pH de interés para el dispositivo en cascada, pH 9.0, se observa que el dispositivo genera corriente eléctrica. A partir de estos resultados se determina que el bioánodo ALDH-CNFs es viable en su aplicación como ánodo en una celda de combustible microfluídica y se procedió con la evaluación de su estabilidad.

Cronoamperometría

De las pruebas de cronoamperometría de treinta minutos que se realizaron variando la concentración de acetaldehído en el anolito y el pH de la solución amortiguadora utilizada se obtuvieron los cronoamperogramas presentados a continuación. Las pruebas fueron realizadas a temperatura ambiente.

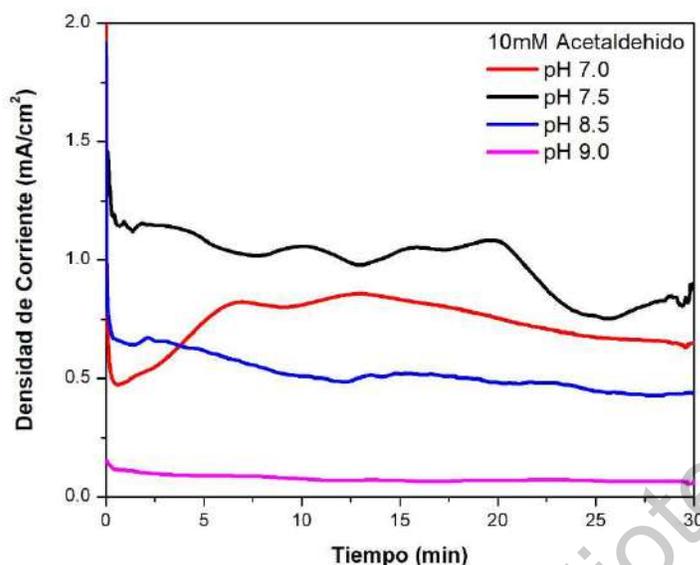


Figura 39: Cronoamperometrías del sistema CCMF-ADH con distintos pH y 10mM de acetaldehído en el combustible.

Se observa que el mayor desempeño se alcanza en el pH óptimo de la enzima (7.5). El sistema presenta ruido en este pH, el cual es atribuido principalmente a la volatilidad del combustible. En otros pH se observa una disminución en la densidad de corriente registrada durante las pruebas. Esto debido a que el pH afecta la actividad de la enzima en el bioánodo. Las pérdidas en el pH 7.0 y 8.5 no son drásticas. En pH 9.0 la densidad de corriente, pese a que se mantiene estable durante la prueba, presenta una disminución importante de actividad.

Las pruebas demuestran que el bioánodo ALDH-CNFs es estable al implementarse en una CCMF. Se observa ruido en la mayoría de los cronoamperogramas obtenidos. Esto puede deberse a la naturaleza volátil del acetaldehído, así como irregularidades en el flujo dentro del dispositivo CCMF-ALDH. Pese a esto la densidad de corriente registrada parece mantenerse en un valor promedio constante.

Implementación de los bioánodos ADH-CNFs y ALDH-CNFs en un dispositivo CCMF en cascada.

Después de su evaluación individual los bioánodos fueron implementados en una celda de combustible microfluídica en cascada contra cátodos de Pt-Vulcan 20%w formando el dispositivo CCMF-ADH-ALDH. Los electrodos utilizados fueron de dimensiones de 0.010 cm^2 . El anolito consistió en una solución de etanol 100mM en una solución amortiguadora de Tris-HCl 0.1M, pH 8.86, la cual fue burbujeada con nitrógeno por 20 minutos previos a la realización de la prueba. El catolito consistió en una solución 0.3M de KOH, la cual fue burbujeada con oxígeno por 20 minutos previos a la realización de la prueba. Se inició la inyección del anolito y catolito y al alcanzar un OCV estable se realizó una descarga de potencial, a partir de la cual se determinaron las curvas de polarización y curvas de potencia del sistema. Se realizó la prueba con las celdas que conforman el dispositivo en cascada conectados en serie y en paralelo. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la Figura 40:

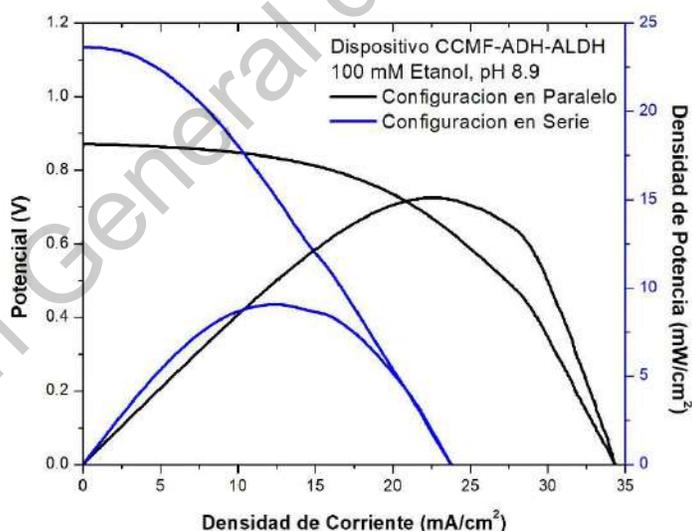


Figura 40: Curvas de polarización y curvas de potencia para el dispositivo CCMF-ADH-ALDH en pH 8.86 con una concentración de etanol inicial de 100mM en el anolito.

Se obtuvo un OCV de 1.14V en la configuración en serie y un OCV de 0.879V en la configuración en paralelo. Se observa que en la configuración en serie se alcanza un OCV mayor que en la configuración en paralelo. Esto es debido al diseño en cascada de la CCMF-ADH-ALDH, el cual consiste en un dispositivo que contiene dos celdas de combustible independientes una de otra excepto por el uso del flujo de productos de reacción de la primera celda como flujo de combustible de alimentación para la segunda. Utilizando dos celdas el dispositivo puede ser configurado en serie o en paralelo dependiendo de las necesidades de aplicación del dispositivo. En la Figura 40 se observa que la configuración en paralelo favorece el potencial alcanzado por el dispositivo, mientras que la configuración en serie favorece la densidad de corriente alcanzada; comportamiento esperado según la teoría de circuitos al conectar fuentes de voltaje en un circuito.

En ambas configuraciones existe el inconveniente de que al conectar las celdas que conforman el dispositivo CCMF-ADH-ALDH, una actúa como limitante de la segunda. Es decir, al conectar las celdas en una configuración en paralelo, la celda basada en el bioánodo ALDH-CNFs actúa como limitador de la densidad de corriente de la celda basada en el bioánodo ADH-CNFs debido a que la primera celda posee su dinámica individual de oxidación y generación de densidad de corriente. La celda basada en ALDH-CNFs actúa como resistor de la corriente eléctrica generada por la celda basada en ADH-CNF. De manera análoga al conectar las celdas en serie la celda basada en ALDH-CNFs la celda CCMF-ALDH limita el potencial total alcanzado por el dispositivo debido a que no alcanza un potencial de la misma magnitud que la celda CCMF-ADH. Esto de acuerdo con la teoría de circuitos respecto a la suma de fuentes de voltaje y corriente. En la aplicación de esta tecnología para el desarrollo de dispositivos se debe tomar en cuenta este fenómeno para seleccionar la configuración adecuada según las necesidades primordiales, ya se alcanzar un potencial más elevado o favorecer la densidad de corriente obtenida por el dispositivo.

Las densidades corriente alcanzadas fueron de 34.4mA/cm² en paralelo y 23.1mA/cm² en serie. Con respecto a la densidad de potencia obtenida, en la configuración en serie

se alcanzaron cerca de $8.43\text{mW}/\text{cm}^2$, mientras que en la configuración en paralelo se alcanzaron aproximadamente $14.98\text{mW}/\text{cm}^2$. Se observa un comportamiento mayormente regido por pérdidas óhmicas y en menor medida pérdidas por transporte de masa. Esto es debido a la naturaleza cinética de las enzimas ADH y ALDH al intercambiar masa con el medio. Se observa también ruido en el sistema, lo cual puede deberse a irregularidades en el flujo interno o en fuentes de resistencia incidentales.

El dispositivo CCMF-ADH-ALDH presenta un desempeño superior al de la celda individual CCMF-ADH. Sin embargo la superioridad descrita es dependiente de si se configura el dispositivo en paralelo o en serie, ya que cada configuración favorece al potencial alcanzado por el dispositivo o a la densidad de corriente obtenida. La ventaja que ofrece este dispositivo es el uso del acetaldehído producido en la primera reacción para llevar a cabo la segunda, mejorando la capacidad de generación de energía del dispositivo. Asimismo permite reducir el acetaldehído residual de la reacción, el cual es un producto nocivo para la salud.

Posteriormente se realizaron pruebas de cronoamperometría por una hora para el sistema CCMF-ADH-ALDH en configuración en serie y en configuración en paralelo. Se utilizó una solución amortiguadora de Tris-HCl 0.1M con pH 8.86 con un contenido de etanol de 100mM como anolito. Los resultados se muestran a continuación en la Figura 41.

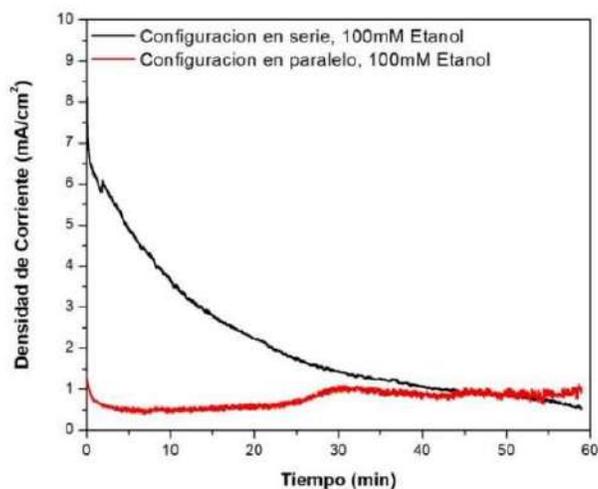


Figura 41: Cronoamperometría del sistema CCMF-ADH-ALDH en solución amortiguadora de Tris-HCL pH 8.86 configurado en serie y en paralelo.

Se observa en la Figura 41 que el sistema configurado en serie alcanza una alta densidad de corriente. La densidad de corriente registrada no es estable y decrece conforme transcurre el tiempo hasta aproximadamente 1.0mA/cm^2 . Esta densidad de corriente sigue siendo alta en comparación con los sistemas CCMF-ADH y CCMF-ALDH individuales. En la configuración en paralelo se observa estabilidad en el sistema durante el transcurso de la prueba, aunque una menor densidad de corriente en comparación con su contraparte en serie. Se alcanza en la configuración en paralelo aproximadamente 1.0mA/cm^2 .

La caída en la densidad de corriente registrada en el sistema en serie se atribuye a turbulencias generadas dentro del dispositivo CCMF-ADH-ALDH. Al acumularse el acetaldehído dentro del dispositivo este se ve dispersado hacia la sección de la celda CCMF-ADH, lo que ocasiona que sea reducido a etanol nuevamente por el bioánodo ADH-CNFs, alcanzando un nuevo punto de equilibrio y sustrayendo electrones del electrodo para llevar a cabo la reducción.

Evaluación electroquímica del sistema CCMF-ADH-ALDH utilizando bioetanol extraído de *Salicornia Bigelovii* como combustible primario.

Finalmente se obtuvieron la curva de polarización y la curva de potencia del dispositivo CCMF-ADH-ALDH utilizando bioetanol producido a partir de biomasa vegetal obtenida de *Salicornia Bigelovii*. Se configuró el dispositivo en serie debido a que se obtuvo un mejor desempeño con esta configuración. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la Figura 42.

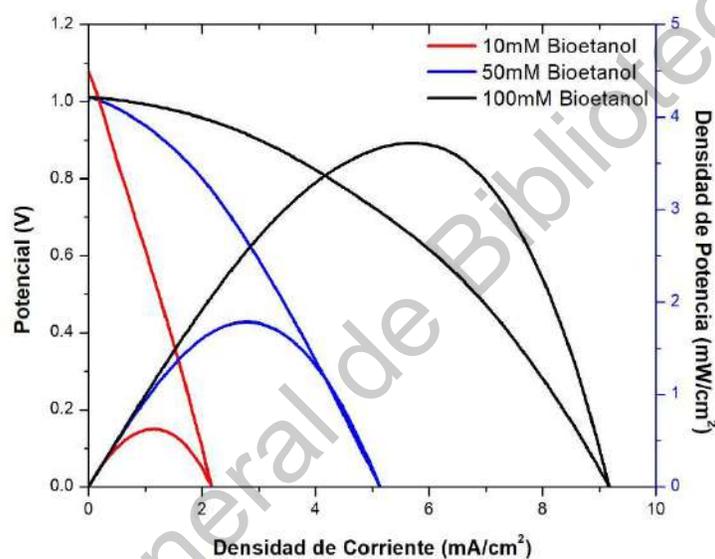


Figura 42: Curvas de polarización y curvas de potencia para el dispositivo en cascada CCMF-ADH-ALDH configurado en serie con un pH de 8.86 utilizando bioetanol como combustible primario.

Utilizando bioetanol como combustible primario para el dispositivo CCMF-ADH-ALDH se obtuvieron OCVs de 1.01, 1.01 y 1.06V para las concentraciones de bioetanol de 100, 50 y 10mM en el anolito respectivamente. La mayor densidad de corriente obtenida fue de 9.13A/cm² con una concentración de bioetanol de 100mM, seguida de densidades de corriente de 5.09mA/cm² y 2.14mA/cm² obtenidas utilizando 50 y 10mM de bioetanol respectivamente. Se observa que las pérdidas en el sistema se deben predominantemente a pérdidas óhmicas y en menor medida a pérdidas por transporte de masa. Las densidades de potencia obtenidas fueron 3.66mW/cm², 1.76mW/cm² y

0.72mW/cm² para las concentraciones de 100, 50 y 10mM respectivamente. Se obtuvo un rendimiento ligeramente inferior al obtenido en las pruebas que emplean etanol analítico, sin embargo esto puede atribuirse a variaciones en la elaboración de los bioánodos utilizados y a fuentes de resistencia incidentales en el sistema.

Los resultados de las pruebas de cronoamperometría realizados se muestran a continuación en la Figura 43:

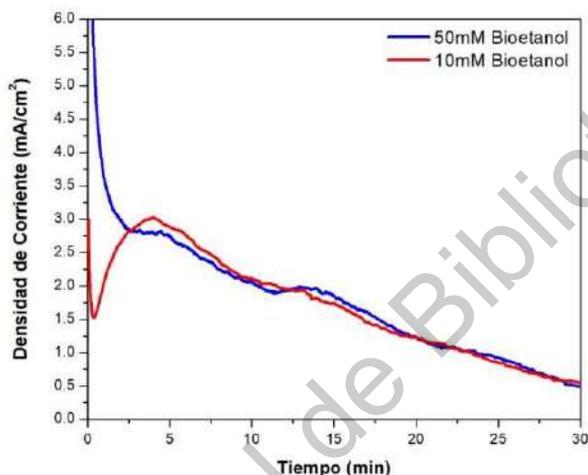


Figura 43: Cronoamperometría del sistema CCMF-ADH-ALDH en solución amortiguadora de Tris-HCL pH 8.86 configurado en serie utilizando bioetanol como combustible primario.

Se observa en la Figura 43 que después de 4 minutos aproximadamente se obtiene una densidad de corriente de 2.8mA/cm² aproximadamente con ambas concentraciones de bioetanol utilizadas. Previo a este punto se observa un comportamiento irregular en ambos casos, posiblemente debido a irregularidades en el flujo del dispositivo. Posterior a este punto se observa un descenso progresivo de la densidad de corriente registrada.

Este comportamiento se atribuye al reflujó del acetaldehído producido en la primera sección del dispositivo debido a la arquitectura de la celda en cascada. Pese a esto el dispositivo CCMF-ADH-ALDH presenta una alta densidad de corriente en comparación con otras pruebas realizadas. El desempeño obtenido utilizando bioetanol como combustible fue menor que el obtenido utilizando etanol analítico. Esto se atribuye a

posibles contaminantes residuales del proceso de fermentación presentes en el bioetanol utilizado.

En los cronoamperogramas mostrados en la Figura 43 se observa una disminución progresiva de la densidad de corriente a través del sistema durante el transcurso de la prueba. Esto fue discutido con antelación y se deduce que es debido al reflujo de acetaldehído hacia la primera sección de la celda. El desempeño del dispositivo CCMF-ADH-ALDH utilizando bioetanol resulta ligeramente menor que el obtenido utilizando etanol analítico, sin embargo permanece viable en comparación con los resultados reportados en la literatura (Akers *et al.*, 2004).

Comparación final

En la Tabla 5 a continuación se reportan los mejores resultados obtenidos de OCV, densidad de corriente y densidad de potencia para los sistemas CCMF individuales y en cascada desarrollados en este trabajo.

Tabla 5: Comparación de resultados obtenidos.

Dispositivo pH Concentración de combustible	OCV (V)	Densidad de corriente (mA/cm²)	Densidad de potencia (mW/cm²)
CCMF-ADH-ALDH en serie pH 8.86 100mM Etanol	1.14	23.1	8.43
CCMF-ADH-ALDH en paralelo pH 8.86 100mM Etanol	0.879	34.4	14.98
CCMF-ADH-ALDH en serie pH 9.0 10mM Bioetanol	1.01	9.13	3.66
CCMF-ADH pH 9.0 100mM Etanol	1.00	28.98	11.07
CCMF-ALDH pH 7.5 100mM Acetaldehído	0.735	5.35	1.82

Un ejemplo en la literatura en el que se reporta el uso de bioánodos basados en ADH y ALDH (sin componentes nanoestructurados) en aplicaciones electroquímicas es el presentado por Akers *et al.*, en el 2004. En este trabajo se reporta el desempeño de los bioánodos basados en ADH y ALDH por separado y en conjunto en una biocelda de combustible a temperatura ambiente. El sistema propuesto por Akers *et al.*, 2004 es similar al trabajo realizado en esta tesis, con la diferencia de que no se emplea un sistema microfluídico como celda de combustible. El desempeño máximo reportado por Akers (*et al.*, 2004) utilizando ambos bioánodos reporta un OCV de 0.8V, una densidad de corriente de 5.1mA/cm² y una densidad de potencia de 2.2mW/cm².

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis son mejores en comparación con lo reportado en la literatura como se muestra en la Tabla 1. El alto desempeño de los dispositivos elaborados en este trabajo en comparación con lo reportado en la literatura puede atribuirse al uso de las CNFs en el proceso de inmovilización enzimática, que gracias a sus propiedades eléctricas facilita el transporte de electrones entre el sitio activo de la enzima y el circuito externo al que se conecta el bioánodo.

Con esto se concluye que la hipótesis propuesta es correcta con base en el desempeño registrado de los dispositivos CCMF-ADH, CCMF-ALDH y CCMF-ADH-ALDH. Asimismo las pruebas realizadas con bioetanol como combustible indican que el dispositivo elaborado es viable para la producción de energía.

Conclusiones

El propósito del desarrollo de bioánodos enzimáticos fue el de explotar las propiedades de especificidad y eficiencia de las enzimas en su uso como catalizadores. Las imágenes obtenidas de SEM indican que el material de la tinta enzimática empleada para la elaboración de los bioánodos se adhiere a la superficie del electrodo. Las evaluaciones bioquímicas de los bioánodos ADH-CNFs y ALDH-CNFs indican que retienen actividad enzimática después del proceso de inmovilización. La actividad enzimática de los bioánodos presenta una pérdida en comparación con la actividad de las enzimas en solución, lo cual es esperado de un proceso de inmovilización.

Las pruebas bioquímicas de actividad enzimática muestran que el desempeño de los bioánodos es similar al de las enzimas libres en solución en las que se basan. El pH óptimo en el que presentan mayor actividad se mantiene constante para cada enzima. Asimismo el tiempo de reacción para ambos bioánodos se mantiene igual respecto a la enzima libre. En ambos casos se muestra una pérdida de actividad enzimática propia del proceso de inmovilización. El comportamiento del bioánodo ADH-CNFs con respecto a los cambios de temperatura es similar al de la enzima libre. Presenta una pérdida de actividad enzimática en el punto de temperatura óptimo, sin embargo el proceso de inmovilización permite que la actividad enzimática se preserve en temperaturas más altas.

Las pruebas de media celda indican que ambos bioánodos enzimáticos desarrollados presentan actividad electroquímica en presencia de su respectivo combustible. El bioánodo ADH-CNFs rige un proceso reversible mientras que el ALDH-CNFs rige uno irreversible. El pH en el que presentan un mejor desempeño es el pH óptimo de la enzima en la que se basa cada bioánodo. No fue posible determinar de manera precisa la sensibilidad de los bioánodos a la concentración de combustible debido a que se alcanza un punto de saturación en un estado estacionario con una concentración baja de combustible.

Los bioánodos desarrollados fueron implementados cada uno en una celda de combustible microfluídica individual. En ella fueron evaluados en diferentes pH utilizando diferentes concentraciones del combustible primario que utiliza cada bioánodo. Para ambos sistemas las curvas de polarización y potencia indican que el potencial alcanzado por el dispositivo tiene relación con el pH en el que se realiza la prueba, alcanzando el mayor potencial en un pH igual al pH óptimo para la enzima en la que se basa cada bioánodo. Conforme el pH del sistema diverge de este valor el potencial alcanzado se reduce. La concentración del combustible afecta la densidad de corriente alcanzada por el dispositivo, aumentando conforme aumenta la concentración de combustible. En las pruebas de cronoamperometría se observa que para los dos bioánodos ambos sistemas permanecen estables por al menos media hora.

Los bioánodos fueron entonces implementados en una celda de combustible en cascada. En las pruebas electroquímicas el dispositivo muestra un aumento de desempeño al utilizar ambos bioánodos. En una configuración en serie se observa un aumento en el potencial alcanzado, mientras que en una configuración en paralelo aumenta la densidad de corriente alcanzada. Esto indica que el uso de ambos bioánodos en conjunto en un sistema en cascada es viable. Finalmente las pruebas con bioetanol nos permitieron comprobar la viabilidad de los bioánodos en una aplicación de celda de combustible que utiliza combustibles renovables.

Referencias

Abad, J. M., García-Mendiola, T., Lorenzo, E., Pariente, F., Pita, M., & Gómez-Anquela, C. (2015). Scaffold electrodes based on thioctic acid-capped gold nanoparticles coordinated Alcohol Dehydrogenase and Azure A films for high performance biosensor. *Bioelectrochemistry*, 106, 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2015.06.009>

Addo, RL Arechederra, SD Minteer, (2010) Evaluating Enzyme cascades of metanol/air biofuel cells based on NAD⁺ dependent enzymes. *Electroanalysis*, 7(8): 807-812.

Agarwal, A. K. (2007). Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Progress in Energy and Combustion Science*, 33(3), 233–271. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2006.08.003>

Ahmed, S., & Krumpelt, M. (2001). Hydrogen from hydrocarbon fuels for fuel cells. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26(4), 291–301. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(00\)00097-5](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(00)00097-5)

Aikens, D. A. (2009). Electrochemical methods, fundamentals and applications. *Journal of Chemical Education* (Vol. 60). <https://doi.org/10.1021/ed060pa25.1>

Akers, CM Moore, SD Minteer, (2005) Development of alcohol/o₂ biofuelcells using salt-extracted tetrabutylammonium bromide/Nafion membranes to immobilize dehydrogenase enzymes. *Electrochimica Acta* 50:2521-2525.

Allan, J. T. S., Rahman, M. R., & Easton, E. B. (2017). The influence of relative humidity on the performance of fuel cell catalyst layers in ethanol sensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical* (Vol. 239). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.07.156>

Almuaibed, A., & Townshend, A. (1987). Determination OF Acetaldehyde by Flow Injection. *Analytica Chimica Acta*, 198, 37–44.

Aquino Neto, S., Hickey, D. P., Milton, R. D., De Andrade, A. R., & Minteer, S. D. (2015). High current density PQQ-dependent alcohol and aldehyde dehydrogenase bioanodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 72, 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.05.011>

Aquino Neto, S., Milton, R. D., Hickey, D. P., De Andrade, A. R., & Minteer, S. D. (2016). Membraneless enzymatic ethanol/O₂ fuel cell: Transitioning from an air-breathing Pt-based cathode to a bilirubin oxidase-based biocathode. *Journal of Power Sources*, 324, 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2016.05.073>

Aquino Neto, S., Suda, E. L., Xu, S., Meredith, M. T., De Andrade, A. R., & Minteer, S. D. (2013). Direct electron transfer-based bioanodes for ethanol biofuel cells using PQQ-dependent alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Electrochimica Acta*, 87(July), 323–329. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.09.052>

Arechederra, R. L., & Minteer, S. D. (2009). Complete Oxidation of Glycerol in an Enzymatic Biofuel Cell. *Fuel Cells*, 9(1), 63–69. <https://doi.org/10.1002/fuce.200800029>

Arechederra, R. L., Treu, B. L., & Minteer, S. D. (2007). Development of glycerol/O₂ biofuel cell. *Journal of Power Sources*, 173(1), 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2007.08.012>

Armenta-gonzález, A. J., Carrera-cerritos, R., Moreno-zuria, A., & Álvarez-contreras, L. (2016). An improved ethanol microfluidic fuel cell based on a PdAg / MWCNT catalyst synthesized by the reverse micelles method, 167, 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.11.057>

Arrocha, A. A., Cano-Castillo, U., Aguila, S. A., & Vazquez-Duhalt, R. (2014b). Enzyme orientation for direct electron transfer in an enzymatic fuel cell with alcohol oxidase and laccase electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 61(June), 569–574. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.06.009>

Arshad, A., Ali, H. M., Habib, A., Bashir, M. A., Jabbal, M., & Jabbal, M. (2018). Energy and Exergy analysis of Fuel Cells : A Review. *Thermal Science and Engineering Progress*. <https://doi.org/10.1016/j.tsep.2018.12.008>

Arteaga, L. E., Peralta, L. M., Kafarov, V., Casas, Y., & Gonzales, E. (2008). Bioethanol steam reforming for ecological syngas and electricity production using a fuel cell SOFC system, 136, 256–266. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.03.047>

Baker, S. E., Colavita, P. E., Tse, K., Hamers, R. J., April, R. V, Re, V., ... June, V. (2006). Functionalized Vertically Aligned Carbon Nanofibers as Scaffolds for Immobilization and Electrochemical Detection of Redox-Active Proteins, (7), 4415–4422. <https://doi.org/10.1021/cm0609000>

Bandodkar, A. J., & Wang, J. (2016). Wearable Biofuel Cells : A Review, 1(858), 1188–1200. <https://doi.org/10.1002/elan.201600019>

Banta, S., Minteer, S. D., Kim, Y. H., Campbell, E., & Yu, J. (2012). Complete Oxidation of Methanol in Biobattery Devices Using a Hydrogel Created from Three Modified Dehydrogenases. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(5), 1437–1440. <https://doi.org/10.1002/anie.201207423>

Bañuelos, J. A., Velázquez-Hernández, I., Guerra-Balcázar, M., & Arjona, N. (2018). Production, characterization and evaluation of the energetic capability of bioethanol from *Salicornia Bigelovii* as a renewable energy source. *Renewable Energy*, 123, 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.02.031>

Barton, S. C., Gallaway, J., & Atanassov, P. (2004). Enzymatic Biofuel Cells for Implantable and Microscale Devices.

Bazylak, A., Sinton, D., & Djilali, N. (2005). Improved fuel utilization in microfluidic fuel cells : A computational study, 143, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2004.11.029>

Beilke, M. C., Klotzbach, T. L., Treu, B. L., Sokic-Lazic, D., Wildrick, J., Amend, E. R., ... Minteer, S. D. (2009). Enzymatic Biofuel Cells. *Micro Fuel Cells*, 179–241. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374713-6.00005-6>

Bernard Ho, Erik Kjeang, *Microfluidic Fuel Cell Systems* (2011). *Cent. Eur. J. Eng*, 1(2):123-131. DOI: 10.2478/s13531-011-0012-y.

Bhatnagar, D., Xu, S., Fischer, C., Arechederra, R. L., & Minteer, S. D. (2011). Mitochondrial biofuel cells: expanding fuel diversity to amino acids, 86–92. <https://doi.org/10.1039/c0cp01362e>

Bilgi, M., & Ayranci, E. (2016). Biosensor application of screen-printed carbon electrodes modified with nanomaterials and a conducting polymer: Ethanol biosensors based on alcohol dehydrogenase. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 237, 849–855. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.06.164>

Braunchweig, B., Hibbitts, D., Neurock, M., & Wieckowski, A. (2013). Electrocatalysis: A direct alcohol fuel cell and surface science perspective. *Catalysis Today*, 202, 197–209. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2012.08.013>

Bühner, M., & Sund, H. (1969). Yeast Alcohol Dehydrogenase: –SH Groups, Disulfide Groups, Quaternary Structure, and Reactivation by Reductive Cleavage of Disulfide Groups. *European Journal of Biochemistry*, 11(1), 73–79. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1969.tb00741.x>

Burke JP, Rubin E, The effects of ethanol and acetaldehyde on the products of protein synthesis by liver mitochondria (1979) *Journal of Technical methods and pathology*, 1979, 41(5), 393-400.

Burke JP, Rubin E., (1979) The effects of ethanol and acetaldehyde on the products of protein synthesis by liver mitochondria *Lab Invest* 41(5):393-400.

Canovas, P. A., & Shock, E. L. (2016). Geobiochemistry of metabolism: Standard state thermodynamic properties of the citric acid cycle. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 195, 293–322. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2016.08.028>

Carrette, K. Andreas Friedrich, Ulrich Stimming, (2000) *Fuel Cells: Principles, types, fuels and applications. Review ChemPhysChem*, 1(4):162-193..

Cheng, K. Y., Karthikeyan, R., & Wong, J. W. C. (2019). Remediation of Organic Contaminants : Possibilities and Perspective. *Biomass, Biofuels, Biochemicals*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64052-9.00025-X>

Chien, H.-C., Zhu, C.-Y., Chang, F.-C., Tsai, L.-D., Lai, C.-M., & Lin, J.-N. (2012). Characteristics of high-water-uptake activated carbon/Nafion hybrid membranes for proton

exchange membrane fuel cells. *Journal of Power Sources*, 226(March 2015), 87–93.
<https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2012.10.017>

Chistine Mousty, (2010) Biosensing applications of clay-modified electrodes: a review, *Anal. Bioanal. Chem.*, 396(1):315-325.

Choban, E. R., Markoski, L. J., Wieckowski, A., & Kenis, P. J. A. (2004). Microfluidic fuel cell based on laminar flow. *Journal of Power Sources*, 128(1), 54–60.
<https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2003.11.052>

Cybulska, I., Chaturvedi, T., Brudecki, G. P., Kádár, Z., Meyer, A. S., Baldwin, R. M., & Hedegaard, M. (2014). Bioresource Technology Chemical characterization and hydrothermal pretreatment of *Salicornia bigelovii* straw for enhanced enzymatic hydrolysis and bioethanol potential. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, 153, 165–172.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.071>

Dalziel, K. (1962). Kinetic studies of liver alcohol dehydrogenase. *Biochem J*, 84, 244–254.
<https://doi.org/10.1042/bj0840244>

Dalziel, K., & Dickinson, F. M. (1966). The kinetics and mechanism of liver alcohol dehydrogenase with primary and secondary alcohols as substrates. *Biochem. J.*, 100(1), 34–46. <https://doi.org/10.1042/bj1000034>

Datta, S., & Christena, L. R. (2013). Enzyme immobilization : an overview on techniques and support materials, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>

Daussmann, T., Trivedi, A., Büchs, J., Heinemann, M., & Spiess, A. C. (2005). Optimization of adsorptive immobilization of alcohol dehydrogenases. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(4), 340–347. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.340>

de Jong, G. A. H., Stigter, E. C. A., Jongejan, J. A., Somers, W. A. C., Duine, J. A., & van der Lugt, J. P. (2002). Electron transfer between a quinohemoprotein alcohol dehydrogenase and an electrode via a redox polymer network. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(7), 489–494. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00158-1](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00158-1)

Deluca, N. W., & Elabd, Y. A. (2006). Polymer Electrolyte Membranes for the Direct Methanol Fuel Cell : A Review, (February), 2201–2225. <https://doi.org/10.1002/polb>

Deng, L., Shang, L., Wen, D., Zhai, J., & Dong, S. (2010). Biosensors and Bioelectronics A membraneless biofuel cell powered by ethanol and alcoholic beverage. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(1), 70–73. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.05.007>

Devianto, H., Han, J., Pil, S., Woo, S., & Lim, T. (2011). The effect of impurities on the performance of bioethanol- used internal reforming molten carbonate fuel cell. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(16), 10346–10354. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.09.070>

Eklund, H., Nordström, B., Zeppezauer, E., Söderlund, G., Ohlsson, I., Boiwe, T., & Brändén, C. I. (1974). The structure of horse liver alcohol dehydrogenase. *FEBS Letters*, 44(2), 200–204. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(74\)80725-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(74)80725-8)

Erik Kjeanga, Ned Djilalia, David Sinton, (2009) Microfluidic cells: a review. *Journal of Power sources* 186:353-369..

Ertek, B., & Dilgin, Y. (2016). Photoamperometric flow injection analysis of glucose based on dehydrogenase modified quantum dots-carbon nanotube nanocomposite electrode. *Bioelectrochemistry*, 112, 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2016.02.008>

Falk, M., Blum, Z., & Shleev, S. (2012). Direct electron transfer based enzymatic fuel cells. *Electrochimica Acta*, 82, 191–202. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.12.133>

Fan, F., Lorenzen, J. A., & Plapp, B. V. (1991). An Aspartate Residue in Yeast Alcohol Dehydrogenase I Determines the Specificity for Coenzyme. *Biochemistry*, 30(26), 6397–6401. <https://doi.org/10.1021/bi00240a008>

Fanavoll, E. V., Harrington, D. A., Sunde, S., Singh, G., & Seland, F. (2017). A microfluidic electrochemical cell with integrated PdH reference electrode for high current experiments. *Electrochimica Acta*, 225, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.11.147>

Feng, X., & Wang, Y. (2010). Multi-layer configuration for the cathode electrode of polymer electrolyte fuel cell. *Electrochimica Acta*, 55(15), 4579–4586.

Galindo-de-la-Rosa, Arjona N., Moreno-Zuria A., Ortiz-Ortega E., Guerra-Balcázar M., Ledesma-García J., Arriaga L.G., (2017) Evaluation of single and stack membraneless enzymatic fuel cells based on ethanol in simulated body fluids. *Biosensors and Bioelectronics*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2017.02.010>.

Ganzhorn, A. J., & Plapp, B. V. (1988). Carboxyl groups near the active site zinc contribute to catalysis in yeast alcohol dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 263(11), 5446–5454.

Ganzhorn, A. J., Green, D. W., Andrew, D., Robert, M., & Plapp, B. V. (1987). Kinetic Characterization of Yeast Alcohol Dehydrogenases. *Journal of Biological Chemistry*, 262(8), 3754–3761.

H. Marchner, pO. Tottmar, (1978) A comparative study on the effects of disulfiram, cyanamide and 1-aminocyclopropanol on the acetaldehyde metabolism in rats *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 43(3): 219-232.

Homann N., Kärkkäinen P., Koivisto T., Nosova T., Jokelainen K., Salaspuro M., (1997) Effects of acetaldehyde on cell regeneration and differentiation of the upper gastrointestinal tract mucosa. *J Natl Cancer Inst*, 89(22):1692-1697.

Hoshi, Y., Narita, Y., Honda, K., Ohtaki, T., & Shitanda, I. (2015). Optimization of reference electrode position in a three-electrode cell for impedance measurements in lithium-ion rechargeable battery by finite element method. *Journal of Power Sources*, 288, 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2015.04.065>

Huang, B. J., Wang, D., Hou, H., & You, T. (2008). Electrospun Palladium Nanoparticle-Loaded Carbon Nanofibers and Their Electrocatalytic Activities towards Hydrogen Peroxide and NADH **, 441–448. <https://doi.org/10.1002/adfm.200700729>

Huang, J., Liu, Y., & You, T. (2010). Carbon nanofiber based electrochemical biosensors : A review, 202–211. <https://doi.org/10.1039/b9ay00312f>

Hummers, W. S., & Offeman, R. E. (1958). Preparation of Graphitic Oxide. *Journal of the American Chemical Society*, 80(6), 1339. <https://doi.org/10.1021/ja01539a017>

Jayashree, R. S., Gancs, L., Choban, E. R., Primak, A., Natarajan, D., Markoski, L. J., & Kenis, P. J. A. (2005). Air-breathing laminar low-based microfluidic fuel cell. *Journal of the American Chemical Society*, 127(48), 16758–16759. <https://doi.org/10.1021/ja054599k>

Jiali Zhang, Feng Zhang, Haijun Yang, Xuelei Huang, Hui Liu, Jingyan Zhang and Shouwu Guo, (2010) Graphene Oxide as a matrix for enzyme immobilization, *Langmuir*, 26(9):6083-6085.

Jiang, Y., & Virkar, A. V. (2001). A High Performance , Anode-Supported Solid Oxide Fuel Cell Operating on Direct Alcohol, 706–709. <https://doi.org/10.1149/1.1375166>

Kim Jungbae, Jay W. Grate, Ping Wang, (2006) Nanostructures for enzyme stabilization, *Chemical Engineering Science*, 61(3):1017-1026.

Kim, J., Jia, H., & Wang, P. (2006). Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells. *Biotechnology Advances*, 24(3), 296–308. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.11.006>

Kirubakaran, A., Jain, S., & Nema, R. K. (2009). A review on fuel cell technologies and power electronic interface, 13, 2430–2440. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.04.004>

Kjeang, E., Mckechnie, J., Sinton, D., & Djilali, N. (2007). Planar and three-dimensional microfluidic fuel cell architectures based on graphite rod electrodes, 168, 379–390. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2007.02.087>

Klein, K. L., Melechko, A. V, Mcknight, T. E., Retterer, S. T., Rack, P. D., Klein, K. L., ... Rack, P. D. (2013). Surface characterization and functionalization of carbon nanofibers, 061301(2008). <https://doi.org/10.1063/1.2840049>

Klinman, J. P. (1976). Isotope Effects and Structure-Reactivity Correlations in the Yeast Alcohol Dehydrogenase Reaction. A Study of the Enzyme-Catalyzed Oxidation of Aromatic Alcohols. *Biochemistry*, 15(9), 2018–2026. <https://doi.org/10.1021/bi00654a032>

Kranz, C., Kueng, A., Lugstein, A., Bertagnolli, E., & Mizaikoff, B. (2004). Mapping of enzyme activity by detection of enzymatic products during AFM imaging with integrated SECM – AFM probes, 100, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2003.10.004>

Lawal, A. T. (2016). Synthesis and utilization of carbon nanotubes for fabrication of electrochemical biosensors. *Materials Research Bulletin*, 73, 308–350. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2015.08.037>

Ledesma-García, J., Galindo-de-la-Rosa, J., Guerra-Balcázar, M., Arriaga, L. G., & Arjona, N. (2015). Evaluation of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase enzymes as bi-enzymatic anodes in a membraneless ethanol microfluidic fuel cell. *Journal of Physics: Conference Series*, 660, 012131. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/660/1/012131>

Leech, D., Kavanagh, P., & Schuhmann, W. (2012). Enzymatic fuel cells: Recent progress. *Electrochimica Acta*, 84, 223–234. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.02.087>

Liao, M. H., & Chen, D. H. (2001). Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase on magnetic nanoparticles. *Biotechnol Lett*, 23, 1723–1727. <https://doi.org/10.1023/A:1012485221802>

Lieber, C.S. (1988) Metabolic effects of acetaldehyde. *Biochem Soc Trans*, 16(3):241-247.

Liu, H., Song, C., Zhang, L., Zhang, J., Wang, H., & Wilkinson, D. P. (2006). A review of anode catalysis in the direct methanol fuel cell, 155, 95–110. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2006.01.030>

Liu, S., & Cai, C. (2007). Immobilization and characterization of alcohol dehydrogenase on single-walled carbon nanotubes and its application in sensing ethanol. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 602(1), 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2006.12.003>

M. J. Cooney, V. Svoboda, C. Lau, G. Martina, S. D. Minteer, (2008) Enzyme catalyzed biofuel cells. *Energy Environ. Sci*,3:320-337.

Magonet, E., Hayen, P., Delforge, D., Delaive, E., & Remacle, J. (1992). Importance of the structural zinc atom for the stability of yeast alcohol dehydrogenase. *Biochem J.*, 287, 361–365. <https://doi.org/10.1042/BJ2870361>

Marcus, A. K., Wanger, G., Gorby, Y. A., & Rittmann, B. E. (2009). Selecting Anode-Respiring Bacteria Based on Anode Potential: Phylogenetic, Electrochemical, and Microscopic Characterization, 43(24), 9519–9524.

Méndez, J., Cabrera, C. R., Griebenow, K., Fonseca, J. J., & Nicolau, E. (2011). Bioelectrochemistry of non-covalent immobilized alcohol dehydrogenase on oxidized diamond nanoparticles. *Bioelectrochemistry*, 85, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2011.11.002>

Ming Zhou, Yueming Zhai and Shaojun Dong, (2009) Electrochemical sensing and biosensing platform based on chemically reduced graphene oxide, *Anal. Chem.*, 81(14):5603-5613.

Modig, T., & Lide, G. (2002). Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase ;, 776, 769–776.

Moore, C. M., Minter, S. D., & Martin, R. S. (2005). Microchip-based ethanol / oxygen biofuel cell, 218–225. <https://doi.org/10.1039/b412719f>

Munasinghe, P. C., & Khanal, S. K. (2010). Biomass-derived syngas fermentation into biofuels: Opportunities and challenges. *Bioresource Technology*, 101(13), 5013–5022. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.098>

Ni, M., Leung, D. Y. C., & Leung, M. K. H. (2007). A review on reforming bio-ethanol for hydrogen production, 32, 3238–3247. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.04.038>

Niakolas, D. K., Daletou, M., Neophytides, S. G., & Vayenas, C. G. (2016). Fuel cells are a commercially viable alternative for the production of “ clean ” energy. *Ambio*, 45(1), 32–37. <https://doi.org/10.1007/s13280-015-0731-z>

Padgilwar, S., Manwar, J., Vohra, M., Patil, S., & Manmode, R. (2013). Bioethanol production: Feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 573–584. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.10.013>

Palmore, G. T. R., Bertschy, H., Bergens, S. H., & Whitesides, G. M. (1998). A methanol/dioxygen biofuel cell that uses NAD⁺-dependent dehydrogenases as catalysts: Application of an electro-enzymatic method to regenerate nicotinamide adenine dinucleotide at low overpotentials. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 443(1), 155–161. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(97\)00393-8](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(97)00393-8)

Pariente, F., Lorenzo, E., Tobalina, F., & Abruña, H. D. (1995). Aldehyde Biosensor Based on the Determination of NADH Enzymically Generated by Aldehyde Dehydrogenase. *Analytical Chemistry*, 67(21), 3936–3944. <https://doi.org/10.1021/ac00117a019>

Peralta, D., Bucio, E., Zerrweck-maldonado, L., Exterior, C., & Coahuila, D. (2014). Preparation of Stimuli-Responsive Nanogels of Poly [2- (dimethylamino) Ethyl Methacrylate] by Heterophase and Microemulsion Polymerization Using Gamma Radiation. <https://doi.org/10.1002/pen>

Perez-Miller SJ, Hurley TD, (2003) Coenzyme isomerization is integral to catalysis in aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry*, 42(23), 7100-7109.

Peterson, G. L. (1997) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83(2), 346-356.

Popov, K. I., Živković, P. M., Jokić, B., & Nikolić, N. D. (2016). The shape of the polarization curve and diagnostic criteria for control of the metal electrodeposition process. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 81(3), 291–306. <https://doi.org/10.2298/JSC150717076P>

Ramanavicius, A., Kausaite, A., & Ramanaviciene, A. (2006). Potentiometric study of quinoxaline alcohol dehydrogenase immobilized on the carbon rod electrode. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 113(1), 435–444. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.03.081>

Ribeiro, A., Ferreira, R., & Pires, P. (2011). Biofuel Cells in Implantable Medical Devices Analyzing the Differences between several kinds of Biofuel harvest Energy for Implantable Medical Devices.

Ribeiro, Alexandre, Ricardo Ferreira, Patricia Pires, Biofuel cells in implantable Medical Devices. Facultad de medicina de la Universidad de Lisboa. Extraído de

Schuhmann, W., Kulesza, P. J., Dimcheva, N., Karnicka, K., Gorton, L., Guschin, D. Ackermann, Y. (2009). Membrane-Less Biofuel Cell Based on Cellobiose Dehydrogenase (Anode)/Laccase (Cathode) Wired via Specific Os-Redox Polymers . Fuel Cells, 9(1), 53–62. <https://doi.org/10.1002/fuce.200800033>

Shao, Z., Wang, X., & Hsing, I. (2002). Composite Nafion / polyvinyl alcohol membranes for the direct methanol fuel cell, 210, 147–153.

Shelley D Minter, Bor Yann Liaw, Michael J Cooney, (2007) Enzyme-based biofuel cells. Current review on Biotechnology (Energy Biotechnology), 18:228-234.

Sidney Aquino Neto, Juliane C. Forti, Valtencir Zucolotto, Pietro Ciencagli, Adalgisa R. De Andrade, (2011) The kinetic behavior of dehydrogenase enzymes in solution and immobilized onto nanostructured carbon platforms, Process Biochemistry, 46(12):2347-2352.

Sidney Aquino Neto, Juliane C. Forti, Valtencir Zucolotto, Pietro Ciencagli, Adalgisa R. De Andrade, The kinetic behavior of dehydrogenase enzymes in solution and immobilized onto nanostructured carbon platforms (2011), Process Biochemistry, 46(12):2347-2352.

Sidney Aquino Neto, Thiago S. Almeida, Matthew T. Meredith, Shelley D. Minter, Adalgisa R. De Andrade, Employing Methylene Green coated nanotube Electrodes to enhance NADH electrocatalysis for use in ethanol biofuel cell (2013). Electroanalysis 25(10):2394-2402.

Sidney Aquino Neto, Ross D. Milton, David P. Hickey, Adalgisa R. De Andrade, Shelley D. Minter, Membraneless enzymatic ethanol/O₂ fuel cell: transitioning from an air breathing Pt-based cathode to a bilirubin oxidase-based biocathode (2016), Journal of Power Sources 324:208-214.

Sidney Aquino Netao, Emily L. Suda, Shuai Xub, Matthew T. Meredithb, Adalgisa R. De Andrade, Shelley D. Minteer, Direct electron transfer-based bioanodes for ethanol biofuel cells using PQQ-dependant alcohol and aldehyde dehydrogenases (2013), *Electrochimica Acta*, 87:323-329.

Sokic-lazic, D., Arechederra, R. L., Treu, B. L., & Minteer, S. D. (2010). Oxidation of Biofuels : Fuel Diversity and Effectiveness of Fuel Oxidation through Multiple Enzyme Cascades, 757–764. <https://doi.org/10.1002/elan.200980010>

Sokic-Lazic, D., De Andrade, A. R., & Minteer, S. D. (2011). Utilization of enzyme cascades for complete oxidation of lactate in an enzymatic biofuel cell. *Electrochimica Acta*, 56(28), 10772–10775. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.01.050>

Topcagic, S., & Minteer, S. D. (2006). Development of a membraneless ethanol / oxygen biofuel cell, 51(December 2004), 2168–2172. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2005.03.090>

Vamvakaki, V., Tsagaraki, K., & Chaniotakis, N. (2006). Carbon Nanofiber-Based Glucose Biosensor, 78(15), 5538–5542. <https://doi.org/10.1021/ac060551t>

Vigier, F., Coutanceau, C., Perrard, A., Belgsir, E. M., & Lamy, C. (2004). Development of anode catalysts for a direct ethanol fuel cell, 439–446.

Vite-González, D., Arriaga, L. G., Vázquez-Maya, N., Galindo-de-la-Rosa, J., Álvarez, A., Ledesma-García, J., & Díaz-Real, J. A. (2018). Alcohol dehydrogenase as bioanode for methanol and ethanol oxidation in a microfluidic fuel cell. *Journal of Physics: Conference Series*, 1052, 012064. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1052/1/012064>

Wallach, Jacques, (2008) Interpretation of Diagnostic Tests. Disorders due to Physical and Chemical Agents. 8th ed. Lipincott, Williams and Wilkins,.

Wang, D., Feng, B., Liu, X., Li, Q., Zhao, C., & Gou, M. (2015). Identification and characterization of aldehyde dehydrogenase 9 from *Lampetra japonica* and its protective role against cytotoxicity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 187, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.05.001>

Wang, H. J., Di, L., Ren, Q. S., & Wang, J. Y. (2009). Applications and degradation of proteins used as tissue engineering materials. *Materials*, 2(2), 613–635. <https://doi.org/10.3390/ma2020613>

Wang, H., Gu, S., Leung, D. Y. C., Xu, H., Leung, M. K. H., Zhang, L., & Xuan, J. (2014). Development and characteristics of a membraneless microfluidic fuel cell array. *Electrochimica Acta*, 135, 467–477. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.04.165>

Wang, M., Wang, X., Chen, M., Yang, Z., & Dong, C. (2016). Nanostructured electrocatalytic materials and porous electrodes for direct methanol fuel cells. *Cuihua Xuebao/Chinese Journal of Catalysis*, 37(7), 1037–1048. [https://doi.org/10.1016/S1872-2067\(16\)62477-4](https://doi.org/10.1016/S1872-2067(16)62477-4)

Welsh, K. M., Creighton, D. J., & Klinman, J. P. (1980). Transition-State Structure in the Yeast Alcohol Dehydrogenase Reaction: The Magnitude of Solvent and α -Secondary Hydrogen Isotope Effects. *Biochemistry*, 19(10), 2005–2016. <https://doi.org/10.1021/bi00551a001>

Wen, D., & Eychmüller, A. (2017). Enzymatic biofuel cells on porous nanostructures. *Biocatalysis and Nanotechnology*, 617–648. <https://doi.org/10.1201/9781315196602>

Willner, I., Yan, Y., & Willner, B. (2009). Integrated Enzyme-Based Biofuel Cells – A Review, (1), 7–24. <https://doi.org/10.1002/fuce.200800115>

Wu, J., Li, S., & Wei, H. (2018). Multifunctional nanozymes: Enzyme-like catalytic activity combined with magnetism and surface plasmon resonance. *Nanoscale Horizons*, 3(4), 367–382. <https://doi.org/10.1039/c8nh00070k>

Xin, L., Zhang, Z., Qi, J., Chadderdon, D., & Li, W. (2012). Applied Catalysis B : Environmental Electrocatalytic oxidation of ethylene glycol (EG) on supported Pt and Au catalysts in alkaline media : Reaction pathway investigation in three-electrode cell and fuel cell reactors, 125, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2012.05.024>

Xu, S., & Minteer, S. D. (2014). Characterizing Efficiency of Multi-Enzyme Cascade-Based Biofuel Cells by Product Analysis. *ECS Electrochemistry Letters*, 3(8), H24–H27. <https://doi.org/10.1149/2.0071408eel>

Ying Wang, Zhaohui Li, Jun Wang, Jinghong Li, Yuehe Lin, Graphene and graphene oxide: biofunctionlization and applications in biotechnology (2011), Trends Biotechnol. 29(5):205-212..

Zhang J1, Zhang F, Yang H, Huang X, Liu H, Zhang J, Guo S. Graphene Oxide as a Matrix for Enzyme Immobilization (2010). Langmuir, 26(9):6083-6085.

Zhang, L., Zhou, M., & Dong, S. (2012). A self-powered acetaldehyde sensor based on biofuel cell. Analytical Chemistry, 84(23), 10345–10349. <https://doi.org/10.1021/ac302414a>

Zhou, M., Yang, J., Wang, H., Jin, T., Hassett, D. J., & Gu, T. (2014). Bioelectrochemistry of Microbial Fuel Cells and their Potential Applications in Bioenergy. Bioenergy Research: Advances and Applications. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59561-4.00009-7>

Zhu, J. Y., & Pan, X. J. (2010). Bioresource Technology Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production : Technology and energy consumption evaluation q. Bioresource Technology, 101(13), 4992–5002. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.007>