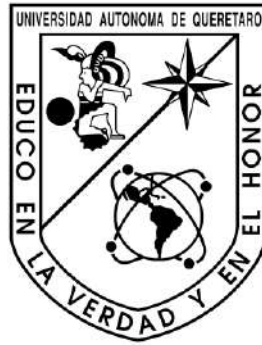


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE INGENIERÍA
INGENIERÍA EN NANOTECNOLOGÍA



TESIS

INMOVILIZACIÓN DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE EN ÓXIDO
DE GRAFENO PARA SU USO EN CELDA DE COMBUSTIBLE
MICROFLUÍDICA



QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

ALAN DANIEL GARCÍA VILLAGÓMEZ

Director de tesis: Vanessa Vallejo Becerra
Codirector de tesis: Andrés Déctor Espinoza

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Especialidad en Ingeniería en Nanotecnología



“Inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* en óxido de grafeno para su uso en celda de combustible microfluídica”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA

Presenta:

Alan Daniel García Villagómez

Dirigido por:

Dra. Vanessa Vallejo Becerra

Dra. Vanessa Vallejo Becerra
Presidente

Dr. Andrés Déctor Espinoza
Vicepresidente

Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa
Secretario

Dra. Alejandra Álvarez López
Vocal

Dr. José Alberto Rodríguez Morales
Vocal

Firma

Firma

Firma

Alejandra A.L.

Firma

Firma

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

Junio, 2021

México

Resumen

El ser humano hace uso de fuentes de energía como pilas y baterías para proveer energía a dispositivos portátiles, lo cual tiene repercusiones negativas en el medio ambiente al momento de ser desechadas, por lo que se debe indagar en nuevas fuentes de energía portátiles. El uso de microorganismos para producir energía a partir de sustrato orgánico es una tecnología en la que se ha llevado a cabo investigación y ha captado interés reciente debido a su implementación en celdas de combustible microfluídicas.

En el presente trabajo se desarrollaron ánodos para celdas de combustible microfluídicas fabricadas en papel de un solo canal, haciendo uso de levadura *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada en dos sistemas, uno que incluye carbón Vulcan y otro que incluye óxido de grafeno para consumir los carbohidratos glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa. El comportamiento electroquímico de un electrodo de carbono vítreo recubierto con tinta que contiene levadura se evaluó mediante voltamperometría cíclica para la oxidación de los diferentes azúcares. También se obtuvieron imágenes SEM de la levadura inmovilizada sobre sustrato de carbono. Se desarrollaron celdas de combustible microfluídicas fabricadas con papel absorbente de un solo flujo, las cuales fueron caracterizadas al obtener el potencial de circuito abierto, la cronoamperometría, las curvas de descarga y polarización y las curvas de potencia probando los sistemas desarrollados de las celdas de combustible con los carbohidratos de interés. Debido a los recursos económicos necesarios para fabricarlo, la celda de combustible microfluídica presentada es un fuerte candidato desechable para su uso en dispositivos electrónicos de baja potencia.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, óxido de grafeno, celda de combustible microfluídica, voltamperometría, glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa, electroquímica.

Summary

Humanity makes use of non-renewable and polluting energy sources as batteries to provide energy to portable devices which has negative repercussions in the environment at the moment of being discarded, so it is necessary to look for new portable energy sources. The use of microorganisms to produce energy from organic substrate is a technology in which investigations have been carried out and it has attracted interest recently due to its implementation in microfluidic fuel cells.

In the present work, anodes for single-channel paper-based microfluidic fuel cells were developed, using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* yeast in two systems, one of them including Vulcan and the other including graphene oxide. The yeast was applied to the anode to consume glucose, fructose, maltose and sucrose. The electrochemical behavior of a vitreous carbon electrode modified with yeast-containing ink was evaluated by cyclic voltammetry for the oxidation of the different sugars. SEM images of the yeast immobilized on carbon substrate were also obtained. Single flow absorbent paper microfluidic fuel cells were developed, which were characterized by obtaining open circuit potential, chronoamperometry, discharge and polarization curves and power curves by testing the developed fuel cell systems with the carbohydrates of interest. Due to the financial resources required to manufacture it, the microfluidic fuel cell was a strong disposable candidate for its use in small energy electronic devices.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, graphene oxide, microfluidic fuel cell, voltammetry, glucose, fructose, maltose, sucrose, electrochemistry.

Dedicatoria

A mi familia, a mis amigos, a mis compañeros y a mis profesores.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Agradecimientos

Doy gracias a mi familia por apoyarme a cada paso del camino, pues parte de lo que soy es lo que he vivido con ellos y este logro es también suyo.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro, que cuenta con una gran variedad de deportes y talleres donde pasé momentos de diversión, disciplina y entrenamiento con amigos, además de los profesores del programa de Ingeniería en Nanotecnología que formaron parte de mi desarrollo académico.

A la Dra. Vanessa Vallejo por recibirme en su grupo de trabajo, al Dr. Juan de Dios Galindo por enseñarme a usar los equipos, llevar a cabo mediciones e inmovilización de microorganismos entre muchas otras cosas, a la Dra. Alejandra por sus enseñanzas en temas de electroquímica, al Dr. Andrés Déctor por enseñarme acerca de las celdas de combustible microfluídicas y a mis compañeros de laboratorio entre los que siempre hubo armonía y colaboración.

A mis compañeros de la carrera Ollin, Luis, Alejandro y Mario con los que participé en innumerables proyectos y presentaciones, a mis amigos ajenos a mi licenciatura y a mi novia.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	3
SUMMARY	4
ÍNDICE DE TABLAS	10
ÍNDICE DE FIGURAS	11
1. INTRODUCCIÓN.....	16
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. ANTECEDENTES.....	20
4.1 Celdas de combustible microbianas.....	20
4.1.1 Celdas de combustible microfluídicas microbianas convencionales	23
4.1.2 Celdas de combustible microfluídicas fabricadas de papel	25
4.1.3 Celdas de combustible microfluídicas de un solo canal	26
4.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
4.3 Carbohidratos de interés	28
4.3.1 Glucosa	28
4.3.2 Fructosa	29
4.3.3 Maltosa	30
4.3.4 Sacarosa.....	30
4.4 Óxido de grafeno	31
4.5 Carbón Vulcan.....	32
4.6 Platino.....	33
4.7 Mecanismo de transferencia de electrones	33
5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	35
5.1 Hipótesis	35

5.2	Objetivo general	35
5.3	Objetivos específicos.....	35
6.	METODOLOGÍA	35
6.1	Inoculación de levadura	35
6.2	Preparación de tintas catalíticas	36
6.3	Caracterización fisicoquímica	37
6.3.1	Tinción de levadura y observación a microscopio óptico	37
6.3.2	Observación de levadura con microscopía electrónica de barrido	38
6.4	Pruebas electroquímicas de tintas.....	38
6.5	Pruebas bioquímicas de tintas	39
6.6	Construcción de celdas de combustible	42
6.6.1	Celda basada en carbón Vulcan	42
6.6.2	Celda basada en óxido de grafeno	43
6.7	Evaluación electroquímica de celdas de combustible.....	44
7.	ANÁLISIS Y RESULTADOS	45
7.1	Microscopía.....	45
7.1.1	Microscopía óptica	45
7.1.2	Microscopía electrónica de barrido.....	45
7.2	Pruebas bioquímicas	46
7.3	Sistema A: Celda con carbón Vulcan	50
7.3.1	Voltametrías cíclicas.....	50
7.3.2	Voltametrías de pulso diferencial	56
7.3.3	Potencial de circuito abierto	59
7.3.4	Cronoamperometría	64
7.3.5	Curvas de descarga y polarización.....	68
7.4	Sistema B: Celda con óxido de grafeno	73
7.4.1	Voltametrías cíclicas.....	73
7.4.2	Voltametrías de pulso diferencial	76
7.4.3	Potencial de circuito abierto	79
7.4.4	Cronoamperometría	84
7.4.5	Curvas de descarga y polarización.....	87
7.5	Comparación de sistemas	92
7.5.1	Pruebas electroquímicas	92

8.	CONCLUSIONES.....	96
9.	PERSPECTIVAS A FUTURO.....	97
10.	REFERENCIAS.....	99
11.	ANEXOS	111
11.1	Técnicas de caracterización.....	111
11.1.1	Microscopía electrónica de barrido.....	111
11.1.2	Voltametría cíclica.....	113

Dirección General de Bibliotecas UNQ

Índice de tablas

Tabla 1: Soluciones preparadas para los carbohidratos de interés. Cada solución además del carbohidrato cuenta con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.....	39
Tabla 2: Capacitancia específica de los materiales anódicos de los sistemas A y B.....	94
Tabla 3: Potencial máximo obtenido para los sistemas A y B con los distintos carbohidratos en las pruebas de potencial de circuito abierto.	94
Tabla 4: Densidad de corriente máxima y densidad de potencia máxima obtenidas para los sistemas A y B con los distintos carbohidratos.	95

Dirección General de Bibliotecas UNQ

Índice de figuras

Figura 1: Áreas de uso de nanotecnología para generación de energía.....	16
Figura 2: Fuentes de combustible contaminantes basadas en carbono.....	17
Figura 3: Diagrama de celda de combustible microbiana (Revelo D et al, 2013).....	21
Figura 4: Diseño de celda de combustible microfluídica con membrana de intercambio de protones (Qian et al, 2011).	24
Figura 5: Celda de combustible microfluídica sin membrana de intercambio de protones (Dingding Y. et al, 2013).....	25
Figura 6: Celda de combustible microfluídica basada en papel sin membrana de intercambio de protones (Esquivel et al, 2014)	26
Figura 7: Estructura de la glucosa.	29
Figura 8: Estructura de la fructosa.....	29
Figura 9: Estructura de la maltosa.	30
Figura 10: Estructura de la sacarosa.	31
Figura 11: Estructura del óxido de grafeno (adaptado de Ahmad H, 2018).....	31
Figura 12: Transferencia directa de electrones por medio de citocromo (izquierda) y nanoalambre (derecha)	34
Figura 13: Transferencia de electrones por medio de un mediador.	34
Figura 14: Proceso de preparación de tintas catalíticas anódicas.	37
Figura 15: Esquema de elaboración de soluciones para pruebas bioquímicas. A partir de la solución 5 se manipula el pH y la temperatura para comenzar las pruebas.	42
Figura 16: Diseño de celda de combustible microfluídica basada en papel de un solo canal.	44
Figura 17: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> vista con microscopio óptico.....	45
Figura 18: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> inmovilizada en sustrato de carbono observada con microscopio electrónico de barrido.	46
Figura 19: Actividad enzimática para levadura en solución con respecto al pH.....	47
Figura 20: Actividad enzimática para levadura en solución con respecto a la temperatura.	47
Figura 21: Actividad enzimática para levadura inmovilizada en Vulcan con respecto al pH.	48
Figura 22: Actividad enzimática para levadura inmovilizada en Vulcan con respecto a la temperatura.	49
Figura 23: Actividad enzimática para la levadura inmovilizada en óxido de grafeno con respecto al pH.	49
Figura 24: Actividad enzimática para la levadura inmovilizada en óxido de grafeno con respecto a la temperatura.	50
Figura 25: Voltametría cíclica de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con Vulcan para $C_6FeK_4N_6$ 1 mM en ausencia de los azúcares de interés.	51
Figura 26: Conversión de energía de los carbohidratos en ATP en la mitocondria.	52

Figura 27: Voltametrías cíclicas de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con Vulcan para glucosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.	52
Figura 28: Catabolismo de la glucosa en <i>Sacchaormyces cerevisiae</i> (adaptado de Zhao J. et al, 2005).....	53
Figura 29: Voltametrías cíclicas de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con Vulcan para fructosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.	54
Figura 30: Voltametrías cíclicas de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con Vulcan para maltosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.	55
Figura 31: Voltametrías cíclicas de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con Vulcan para sacarosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.	56
Figura 32: Voltametrías de pulso diferencial de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con Vulcan para glucosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.....	57
Figura 33: Voltametrías de pulso diferencial de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con Vulcan para fructosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.....	58
Figura 34: Voltametrías de pulso diferencial de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con Vulcan para maltosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.....	58
Figura 35: Voltametrías de pulso diferencial de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con Vulcan para sacarosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.....	59
Figura 36: Potencial de circuito abierto para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con Vulcan en el ánodo para $C_6FeK_4N_6$ 1 mM en ausencia de las azúcares de interés.....	60
Figura 37: Potencial de circuito abierto para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con Vulcan en el ánodo para glucosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.....	61
Figura 38: Potencial de circuito abierto para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con Vulcan en el ánodo para fructosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.....	62
Figura 39: Potencial de circuito abierto para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con Vulcan en el ánodo para maltosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.....	63
Figura 40: Potencial de circuito abierto para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con Vulcan en el ánodo para sacarosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.....	64

Figura 41: Cronoamperometría para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con Vulcan en el ánodo para $C_6FeK_4N_6$ 1 mM en ausencia de las azúcares de interés.	65
Figura 42: Cronoamperometrías para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con Vulcan en el ánodo para glucosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.	66
Figura 43: Cronoamperometrías para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con Vulcan en el ánodo para fructosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.	66
Figura 44: Cronoamperometrías para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con Vulcan en el ánodo para maltosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.	67
Figura 45: Cronoamperometrías para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con Vulcan en el ánodo para sacarosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.	68
Figura 46: Curva de descarga y polarización para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con Vulcan en el ánodo para $C_6FeK_4N_6$ 1 mM en ausencia de las azúcares de interés.	69
Figura 47: Curvas de descarga y polarización para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con Vulcan en el ánodo para glucosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.	70
Figura 48: Curvas de descarga y polarización para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con Vulcan en el ánodo para fructosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.	71
Figura 49: Curvas de descarga y polarización para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con Vulcan en el ánodo para maltosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.	72
Figura 50: Curvas de descarga y polarización para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con Vulcan en el ánodo para sacarosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.	73
Figura 51: Voltametrías cíclicas de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno para glucosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.	74
Figura 52: Voltametrías cíclicas de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno para fructosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.	75
Figura 53: Voltametrías cíclicas de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno para maltosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.	75
Figura 54: Voltametría cíclica de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno para sacarosa con concentración de 1 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.	76

Figura 55: Voltametrías de pulso diferencial de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno para glucosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.	77
Figura 56: Voltametrías de pulso diferencial de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno para fructosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.....	78
Figura 57: Voltametrías de pulso diferencial de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno para maltosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.	79
Figura 58: Potencial de circuito abierto para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para $C_6FeK_4N_6$ 1 mM en ausencia de las azúcares de interés.....	80
Figura 59: Potencial de circuito abierto para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para glucosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.....	81
Figura 60: Potencial de circuito abierto para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para fructosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.....	82
Figura 61: Potencial de circuito abierto para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para maltosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.....	83
Figura 62: Potencial de circuito abierto para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para sacarosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.....	84
Figura 63: Cronoamperometrías para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para $C_6FeK_4N_6$ 1 mM en ausencia de las azúcares de interés.	85
Figura 64: Cronoamperometrías para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para glucosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.....	85
Figura 65: Cronoamperometrías para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para fructosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.....	86
Figura 66: Cronoamperometrías para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para maltosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.....	87
Figura 67: Cronoamperometrías para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para sacarosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.....	87
Figura 68: Curva de descarga y polarización para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para $C_6FeK_4N_6$ 1 mM en ausencia de las azúcares de interés.	88

Figura 69: Curvas de descarga y polarización para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para glucosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.	89
Figura 70: Curvas de descarga y polarización para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para fructosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.	90
Figura 71: Curvas de descarga y polarización para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para maltosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.	91
Figura 72: Curvas de descarga y polarización para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para sacarosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.	92
Figura 73: Pérdidas energéticas en celda de combustible microbiana (adaptado de Schröder U., 2007).....	93
Figura 74: Interacción entre electrones y espécimen a analizar en microscopía electrónica de barrido.....	111

Dirección General de Bibliotecas UAQ

1. Introducción

La nanotecnología puede ser definida como la disciplina que consiste en el diseño, síntesis, caracterización y aplicación de materiales y dispositivos cuya organización funcional más pequeña en al menos una dimensión está en la escala de los nanómetros o $1 \cdot 10^{-9} \text{m}$. A esta escala, la consideración de moléculas individuales y grupos de moléculas en relación con las propiedades del ente macroscópico se vuelve importante debido a que el control de la estructura molecular fundamental es el que permite el control de las propiedades físicas y químicas (Silva G, 2004).

Entre las áreas en las cuales la nanotecnología está generando mayor interés se encuentra la de generación de energía de forma sustentable. Está siendo aplicada para generación de energía solar, supercapacitores y en obtención de energía por medio de hidrógeno (Figura 1), además de en el uso de celdas de combustible microfluídicas (Serrano E, Rus G, 2009).



Figura 1: Áreas de uso de nanotecnología para generación de energía.

Entre los grandes retos a los que se enfrenta la comunidad científica hoy en día, se encuentra el de la obtención de energía eléctrica por medio de fuentes no contaminantes. Las fuentes de energía actuales basadas en carbono no son sustentables, debido al hecho de que contaminan y generan calentamiento global debido al efecto invernadero, además de que provienen de fuentes no renovables como lo son la gasolina o el gas natural.

Es por ello que una opción viable es el recurrir a desarrollar nuevas tecnologías para la obtención de energías que cubran los aspectos negativos de las fuentes de energía basadas en carbono mencionadas, por medio de las cuales no se contamine y el origen de la energía sea

una fuente renovable. En particular, la obtención de energía a partir de microorganismos promete ser eficiente, dado que no contamina además de provenir de sustrato biológico (fuente renovable).

Las celdas de combustible microbianas son una tecnología emergente que obtiene energía eléctrica a partir del consumo por parte de microorganismos de componentes orgánicos. Se basan en bacterias, levaduras u otro tipo de cepa que suelen ser inoculadas en la cámara del ánodo de la celda donde a partir del consumo de ciertos sustratos se producen electrones, protones y productos metabólicos. Los protones viajan por difusión a la cámara del cátodo y participan en reacciones de reducción mientras que los electrones fluyen a través del circuito externo. Cuentan también con la ventaja de operar con condiciones simples y de utilizar nutrientes fácilmente accesibles (Yang & Ye, 2016).

Las celdas de combustible microfluídicas prometen ser un candidato ideal para reemplazar fuentes de energía no renovables para determinadas aplicaciones, como lo son los sistemas microelectromecánicos biológicos (bio-MEMS), micro sistemas de análisis total (μ TAS) y dispositivos lab-on-chip. (Parkhey & Sahu, 2020)



Figura 2: Fuentes de combustible contaminantes basadas en carbono

El interés de este proyecto es obtener energía eléctrica empleando microorganismos, en este caso de la cepa microbiana de *Sacharomyces cerevisiae*, y estudiar su potencial uso práctico.

La razón por la que se eligió la cepa *Saccharomyces cerevisiae* es que ha sido muy estudiada y utilizada por la humanidad a lo largo de toda su historia y se han reportado pocos efectos negativos en el organismo humano, además de que es comercializada en todo el mundo a

precios muy accesibles, lo que además reduciría costos en la fabricación de celdas de combustible basadas en esta levadura (Enache A, Hennequin C, 2005). Así mismo, se propone inmovilizar los microorganismos en nanoestructuras como lo es el óxido de grafeno, el cual contiene grupos funcionales que facilitan la adsorción de la levadura además de que facilitará la transferencia de electrones en las celdas de combustible.

La fabricación de celdas de combustible microfluídicas puede ser bastante compleja, pero este proceso se puede simplificar al hacer uso de una celda de combustible basada en papel, en la cual no sea necesario un sistema de bombeo externo debido al fenómeno físico de la difusión, por medio del cual se podría hacer pasar una solución con compuestos orgánicos para que los mismos sean consumidos por los microorganismos. Esto no solo hace que se simplifique la fabricación, sino que además la vuelve más económica (Fraiwan A *et al*, 2013).

2. Planteamiento del problema

El desarrollo de celdas de combustible microfluídicas suele requerir tecnologías de alto costo como lo son aquellas en que se usa fotolitografía para los microcanales. Se pueden utilizar tecnologías más accesibles para el desarrollo de celdas de combustible microfluídicas.

Las celdas de combustible microfluídicas microbianas hacen uso de dos sustancias que pasan a través de las mismas, el anolito y el catolito, y se requiere una gran sincronía para que ocurra flujo lateral entre ambas sin que se mezclen por la ausencia de una membrana de intercambio iónico. Este problema podría verse solucionado al hacer uso del oxígeno del aire para no necesitar un catolito en el funcionamiento de la celda.

El tipo de cepas que se utilizan para el desarrollo de estas celdas de combustible podrían tener efectos nocivos en el ser humano, por lo que es necesario hacer uso de una cepa altamente estudiada y que sea no patógena.

Las celdas de combustible desarrolladas hasta la fecha con la cepa *Saccharomyces cerevisiae* no producen una gran cantidad de energía a comparación de otras cepas, por lo que la

implementación de nanomateriales para mejorar su eficiencia es clave para el desarrollo de esta tecnología.

3. Justificación

La cepa *Saccharomyces cerevisiae* ha sido ampliamente utilizada y estudiada por la humanidad para el desarrollo de alimentos y bebidas. El uso de una cepa de la que se conoce bastante es necesario si se quieren desarrollar celdas de combustible microbianas que se usen de manera cotidiana.

Se han reportado en la literatura celdas de combustible microfluídicas (μ FC's) que usan enzimas como electrodos, con alta especificidad a ciertos sustratos orgánicos. Sin embargo su alto costo inspira la indagación en nuevos materiales bióticos que cumplan la misma función, como las bacterias y levaduras, que a pesar de no contar con la alta especificidad de las enzimas, llevan a cabo el consumo de sustratos orgánicos para la generación de energía el cual es el objetivo de una celda de combustible (Craknell *et al*, 2008).

Las celdas de combustible microfluídicas microbianas (μ MFC's) prometen ser una fuente limpia de energía al consumir sustrato orgánico para sus propias necesidades energéticas además de aportar energía a un sistema externo. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido estudiada y utilizada por el ser humano desde hace mucho tiempo, y debido a lo poco nociva que es, es un buen candidato para su uso como ánodo en una celda de combustible microfluídica microbiana de varios azúcares como lo pueden ser la glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa, de modo que se puedan obtener valores de una potencia relativamente comparables con la literatura (Rahimnejad M *et al*, 2012).

Para mejorar la eficiencia energética de la celda de combustible, también es necesario indagar en nanomateriales, como lo es el óxido de grafeno, para hacer uso de sus propiedades físicas y químicas, como lo son su alta conductividad y sus grupos funcionales que facilitan la inmovilización de microorganismos en el mismo (Hermanová, S *et al*, 2015).

La conductividad así como la amplia variedad de grupos funcionales presentes en la superficie del óxido de grafeno, lo hacen el candidato ideal para la inmovilización de

microorganismos para su uso en celdas de combustible ya que favorece el mecanismo de transferencia de electrones directa dentro de las mismas, aumentando su eficiencia en la producción de energía.

Las celdas de combustible convencionales hacen uso de un sistema de bombeo externo, el cual resulta poco práctico en aplicaciones comerciales. Es por eso que hacer uso de una celda de combustible microfluídica basada en papel resulta tan conveniente, ya que el fenómeno de la capilaridad elimina la necesidad de un sistema de bombeo al hacer fluir una sustancia a través de sí (Fraivan A, Choi S, 2016).

En las celdas de combustible se requiere en el ánodo una sustancia a oxidar, en este caso es sustrato orgánico consumido por los microorganismos. Sin embargo en el cátodo se requiere un proceso de reducción, por lo general basado en oxígeno. Elaborar una celda de combustible de un solo canal en la cual el oxígeno se obtenga del aire facilita su diseño y fabricación (Yang W *et al*, 2017).

4. Antecedentes

4.1 Celdas de combustible microbianas

Una celda de combustible microbiana (MFC, por sus siglas en inglés) es un dispositivo que convierte energía química en energía eléctrica por medio de la actividad catalítica de microorganismos. Aunque las MFCs tienen el potencial de convertirse en una fuente de energía alternativa, su implementación aún resulta poco práctica en la vida cotidiana ya que se requieren procesos nuevos de tratamiento de aguas residuales, debido a que es en estos procesos donde se contempla implementar estas tecnologías al aprovecharse del sustrato orgánico presente en las mismas, además de biosensores para oxígeno y contaminantes para aumentar la eficiencia de las mismas sin perjudicar su funcionamiento (Kim B *et al*, 2007).

El diagrama de una celda de combustible microbiana se muestra en la Figura 3.

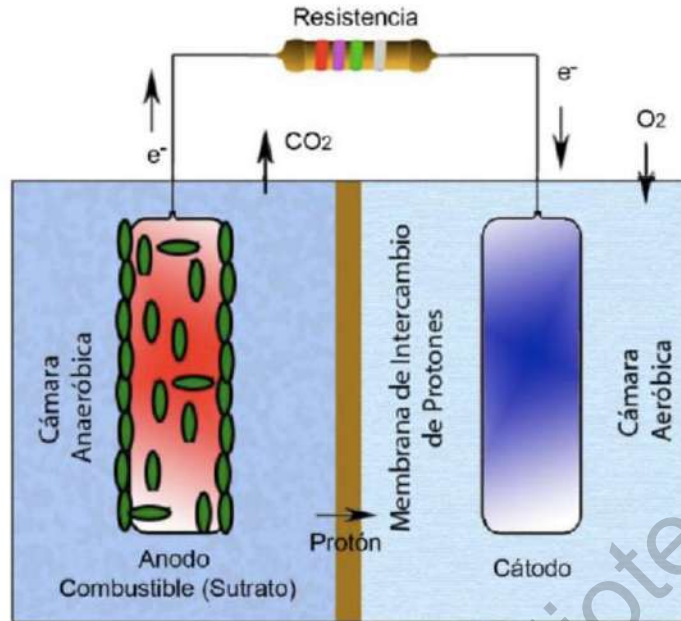


Figura 3: Diagrama de celda de combustible microbiana (Revelo D *et al*, 2013).

Las celdas de combustible microbianas están compuestas por una cámara aeróbica (cátodo) y otra anaeróbica (ánodo), separadas por una membrana de intercambio de protones. En la cámara anaeróbica se encuentra el microorganismo junto con el sustrato orgánico del que se alimenta. De ahí genera electrones que pasan a un electrodo, y de ahí viajan al cátodo por medio de un circuito externo que es donde se aprovecha la electricidad (Revelo D *et al*, 2013).

Los avances en la inmovilización microbiana, además de la creciente demanda de energías alternas, han generado interés en la producción de celdas de combustible basadas en microorganismos. Esta nueva tecnología promete aportar energía eléctrica de forma limpia y renovable (Yang *et al*, 2016).

La investigación en el área de las celdas de combustible microbianas carece de una terminología establecida y de métodos para el análisis del desempeño de los sistemas, lo cual hace complicada la tarea de comparar dispositivos en una base equivalente. La construcción y el análisis de celdas de combustible microbianas requiere conocimiento en diferentes áreas de la ciencia y la ingeniería (Logan *et al*, 2006).

Celdas de combustible en las que se hace uso de electrodos de carbono sobre los cuales se inmovilizan microorganismos han sido desarrolladas para bacterias como lo es la cepa

Proteus vulgaris en conjunto con un mediador de oxidación-reducción. La respuesta ante el consumo de sustrato orgánico es más veloz en el caso de las celdas que tienen la cepa inmovilizada a comparación con las que tienen organismos libres en suspensión, Lo cual se atribuye a la proximidad de la bacteria con el electrodo (Allen, 1993).

Las celdas de combustible microbianas representan una nueva oportunidad para la producción sostenible de energía a partir de componentes biodegradables. Funcionan a partir de distintos carbohidratos pero también a partir de sustancias complejas presentes en aguas residuales. La información disponible acerca del metabolismo energético y del comportamiento de los microorganismos al usar el ánodo como aceptor de electrones sigue siendo limitada, pues apenas han sido establecidos unos pocos mecanismos de transferencia de electrones. Para optimizar la obtención de energía a partir de microorganismos, este conocimiento es esencial. Dependiendo de los parámetros con que opera cada celda de combustible microbiana, los microorganismos usan rutas metabólicas distintas (Rabaey, 2005).

Las aplicaciones posibles de las celdas de combustible microbianas son para tratamiento de aguas residuales y producción de energía de forma simultánea, pero también serán útiles para otras aplicaciones especializadas como por ejemplo, como fuentes de energía para sensores ambientales y para bioremediación. Con algunas modificaciones podrían ser aplicadas a producción de H₂ y producción de energía a partir de biomasa de agricultura. El hecho de que las celdas de combustible microbianas puedan funcionar con una gran diversidad de bacterias y microorganismos deja aún mucho que aprender de este campo (Logan, 2006).

El número reportado de microorganismos que pueden generar corriente eléctrica en celdas de combustible microbianas ha ido en aumento en los últimos años. La generación de energía eléctrica por parte de las bacterias se asocia a la respiración celular principalmente, pero es posible que también se presente debido a la comunicación entre células (Logan, 2009).

La posibilidad de producir energía eléctrica con celdas de combustible microbianas ha sido reconocida desde hace tiempo, pero aplicaciones prácticas para las mismas se han desarrollado de manera muy lenta. Una de las ventajas con que cuenta esta fuente de energía

es que las colonias de microorganismos pueden mantenerse a sí mismas lo que permitiría la producción de energía en lugares remotos (Lovley, 2006).

Hasta la fecha solo algunas celdas de combustible microbianas han sido utilizadas de manera práctica para sedimentos marinos. Algunos investigadores declaran que el mayor valor de las celdas de combustible microbianas se obtendrá a partir de su habilidad para degradar desperdicios y químicos tóxicos (Franks, 2010). Sin embargo, con la implementación de nuevas tecnologías para el desarrollo de estas celdas en un futuro próximo las veremos implementadas en más sistemas de forma práctica.

4.1.1 Celdas de combustible microfluídicas microbianas convencionales

Las celdas de combustible microfluídicas microbianas (μ MFC's, microfluidic microbial fuel cells, por sus siglas en inglés) hacen uso de microorganismos para generar energía por medio de su metabolismo, de modo que se pueda obtener electricidad de forma no contaminante y con sustratos relativamente baratos. Existen también μ FC que hacen uso de enzimas, las cuales actualmente han sido ampliamente estudiadas como electrodos. Sin embargo, su costo inspira la indagación en nuevos materiales bióticos que cumplan la misma función (Rabaey & Verstraete, 2005).

Las μ MFC's producen energía eléctrica por medio del metabolismo del microorganismo, que posteriormente pasa a la membrana celular y de ahí a un electrodo externo, por medio de un proceso llamado transferencia extracelular de electrones, el cual toma un rol clave en el almacenamiento de energía dentro del sistema. El mecanismo de este proceso aún no ha sido descifrado, pero se han propuesto varios caminos para que se lleve a cabo (Qian & Morse, 2011).

Una μ MFC's está constituida básicamente por un cátodo y un ánodo sin ser separados por una membrana de intercambio de protones. En la μ MFC's, el microorganismo generalmente se encuentra conformando el ánodo, donde oxida un sustrato orgánico, produciendo electrones por medio de su metabolismo y liberándolos de forma extracelular para pasar al cátodo (Rabaey *et al*, 2005).

Los materiales usados como sustratos para depositar los microorganismos en el ánodo de la celda deben de ser conductores, biocompatibles y químicamente estables. Se pueden usar metales compuestos como aceros inoxidables, pero no se puede usar cobre debido a la toxicidad de los iones de cobre con algunos microorganismos. El material más versátil para el ánodo conformado por microorganismos es el carbono, en la forma de placas de grafito, materiales fibrosos, etc. (Logan *et al*, 2006).

Previamente las celdas de combustible microfluídicas estaban basadas en dos canales que dividían el sustrato anódico y catódico con una membrana de intercambio protónico. Esta membrana añade resistencia interna al sistema lo cual lo hace menos eficiente, un ejemplo es la celda desarrollada por Qian *et al*, 2011. El diseño de una celda de combustible microfluídica con membrana de intercambio de protones se muestra en la Figura 4.

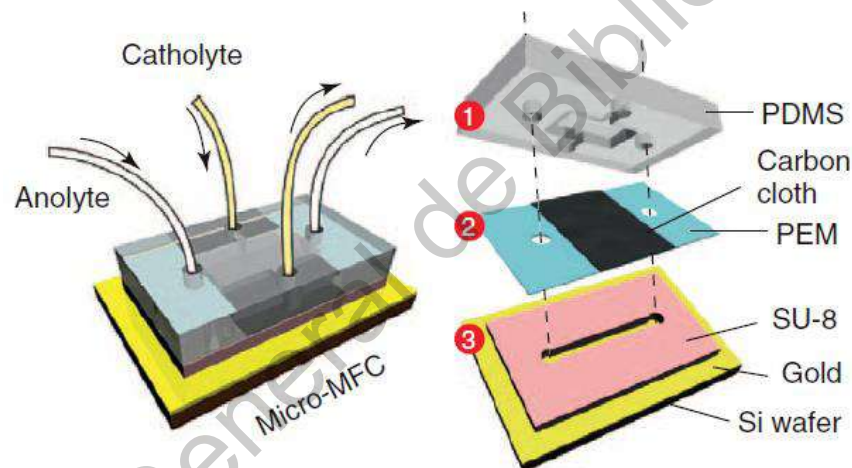


Figura 4: Diseño de celda de combustible microfluídica con membrana de intercambio de protones (Qian *et al*, 2011).

Sin embargo más adelante fueron diseñadas celdas de combustible microfluídicas (μ FC's) que no contenían membrana de intercambio de protones. Fue descubierto que si las sustancias viajaban a poca velocidad y distancias, el número de Reynolds debía ser menor a 200 para conseguir un flujo laminar dentro de una μ MFC's, con lo cual las sustancias no se mezclaban entre sí pero permitían el intercambio de protones, por lo que surgieron muchos nuevos diseños sin membrana de intercambio protónico que resultaron ser más eficientes (Wang H, Su J, 2013) (Dingding Y. *et al*, 2013) (Yang Y. *et al*, 2016). El diagrama de una celda de combustible microfluídica sin membrana de intercambio de protones se muestra en la Figura 5.

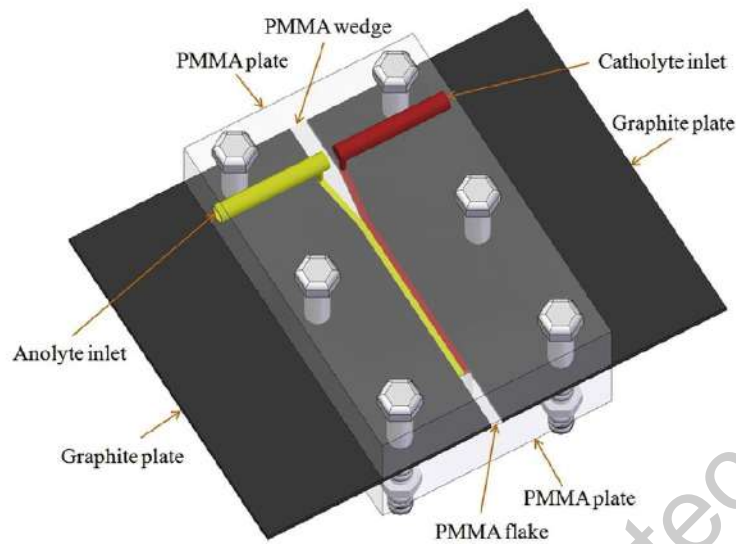


Figura 5: Celda de combustible microfluídica sin membrana de intercambio de protones (Dingding Y. et al, 2013)

4.1.2 Celdas de combustible microfluídicas fabricadas de papel

Han sido reportadas celdas de combustible microfluídicas en las cuales no es necesario un sistema externo de bombeo, pues hacen uso de la capilaridad para hacer fluir los sustratos a través de la celda de combustible. Esto es posible gracias a que la base del sistema la constituye un trozo de papel filtro, material poroso que permite el flujo de sustancias orgánicas en solución (Parkhey P, Sahu R, 2020).

El surgimiento de las celdas de combustible basadas en papel trajo nuevas funcionalidades a los materiales porosos. Se han presentado celdas de combustible basadas en papel con flujo lateral estándar que se benefician del flujo laminar por medio de capilaridad para reaccionar de forma separada con 2 flujos paralelos, anolito y catolito sin una membrana de intercambio iónico o sistema externo de bombeo. Debido a la capilaridad, el número de Reynolds resultante es del orden de 10^{-3} , lo cual garantiza un flujo laminar en el cual no se mezclarán los sustratos (Esquivel *et al*, 2014). El diagrama de una celda de combustible microfluídica basada en papel sin membrana de intercambio iónico se muestra en la Figura 6.

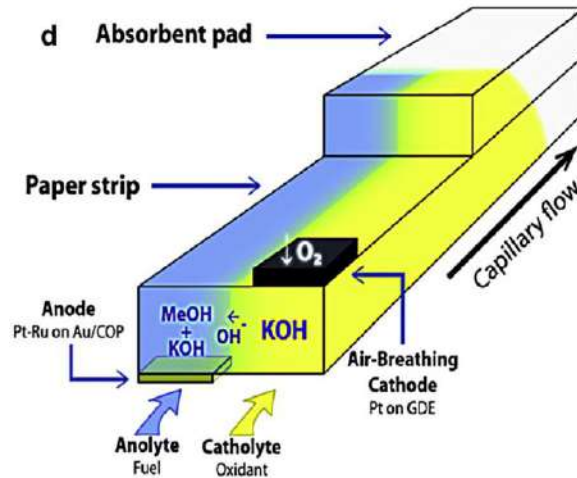


Figura 6: Celda de combustible microfluídica basada en papel sin membrana de intercambio de protones (Esquivel *et al*, 2014)

Al final de la celda de combustible basada en papel se encuentra un exceso de papel filtro el cual sirve para absorber el exceso de solución y permitir la continuación de flujo a través de la zona con la cual tienen contacto los electrodos. Se han reportado celdas de combustible basadas en papel con forma de Y en las cuales cada extremo del papel tiene contacto con una solución distinta, permitiendo la absorción de las sustancias (Nath *et al*, 2020).

4.1.3 Celdas de combustible microfluídicas de un solo canal

Las celdas de combustible basadas en papel pueden hacer pasar 2 flujos paralelos a través de sí sin que se mezclen, permitiendo el intercambio de protones. Sin embargo han sido desarrolladas celdas de combustible basadas en papel a través de las cuales fluye solo una sustancia, el anolito, y que hace uso de un electrodo que tiene contacto directo con el aire, reduciendo así el oxígeno del mismo. Esto simplifica el proceso de uso de una celda de combustible al hacer necesaria solo una solución que contenga los sustratos orgánicos a oxidar por parte del microorganismo presente en el ánodo (Castillo *et al*, 2018).

Este tipo de celdas de combustible pueden ser utilizadas en pruebas de VIH, haciendo uso de la sangre de la muestra para obtener energía. Celdas de combustible basadas en papel de un solo canal que hacen uso de glucosa oxidasa en el ánodo se han reportado para obtener

energía de una muestra de sangre, con densidades de potencia de hasta 0.12 mW/cm^2 . (Dector *et al*, 2017).

También han sido reportadas celdas de combustible microfluídicas de papel de un solo canal en las cuales el material biótico utilizado en el ánodo es reemplazado por nanopartículas metálicas, como lo son el oro, el paladio y níquel/zeolita (Gómez *et al*, 2021) (Carrera *et al*, 2021) (Castillo, 2020) (Bocarando *et al*, 2020)

4.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras son organismos que varían con respecto al tamaño, forma y color, e incluyen especies tanto patógenas como inocuas. Son un grupo de hongos unicelulares de forma simple, que existen en forma de células redondas u ovaladas, que no generan filamentos ramificados y se multiplican por gemación.

Las levaduras no contienen clorofila, por lo que no pueden producir los compuestos orgánicos necesarios para su desarrollo. Necesitan tomar oxígeno y fuentes de carbono y nitrógeno de su entorno, así como estar en condiciones adecuadas de temperatura, pH y humedad.

Suelen ser incoloras, de cuerpo ovalado o redondo, con diámetro de 10 a 15 μm aproximadamente. Las levaduras están compuestas de proteínas, glicoproteínas, polisacáridos, polifosfatos, lípidos y ácidos nucleicos. Su pared celular conforma entre el 15 y 20% de la masa seca de la célula. Las proteínas comprenden entre el 40 y el 50% de su peso seco y tienen una excelente calidad en función de su perfil de ácidos esenciales.

Las levaduras que pueden reproducirse sexualmente se conocen como verdaderas, y lo hacen en un proceso en el cual forman ascosporas. Las levaduras falsas que producen ascosporas pertenecen a los hongos imperfectos. Las levaduras poseen muchas aplicaciones en el ámbito de la biotecnología, ya sea como fermentadores para bebidas alcohólicas o para la fabricación de pan, además de tomar parte en procesos de producción de alimentos para obtener productos de valor añadido y en procesos de obtención de vitaminas del complejo B, pigmentos, biomasa, etc. Sin embargo pueden llegar a ocasionar pérdidas económicas en la

conservación y producción de alimentos y bebidas, además de que algunas son causantes de enfermedades en el ser humano (Ratón, 2004).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es de gran importancia en la actualidad debido a su uso en la fabricación de cerveza, vino y pan, y a su capacidad de generar fermentación. Este proceso, en el cual la levadura convierte glucosa en alcohol, se realiza por medio de la acción de la enzima zimasa. Es una levadura heterótrofa, y puede aislarse con facilidad en plantas y tierra (Schuller & Casal, 2005).

Tiene gran importancia debido a su alto contenido de aminoácidos como la lisina y vitaminas del grupo B, su bajo contenido de ácidos nucleicos y ninguna sustancia tóxica, alergénica o carcinógena. También mejora la digestibilidad y absorción de nutrientes e inhibe la colonización y proliferación de bacterias patógenas. Además disminuye el efecto nocivo causado por aflatoxinas (Miazzo *et al*, 2005).

Se han producido celdas de combustible microbianas (MFC, microbial fuel cell por sus siglas en inglés) basadas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en las cuales la fuente de carbono fue la glucosa. El compartimiento del ánodo debe de estar libre de oxígeno, de forma que los electrones producidos por la levadura se dirijan solamente al ánodo. El crecimiento de *S. cerevisiae* es óptimo a una temperatura de 30°C, lo cual es cercano a la temperatura ambiente, volviéndolo una fuerte opción para el desarrollo de MFC (Anuradh *et al*, 2008).

4.3 Carbohidratos de interés

4.3.1 Glucosa

La fórmula desarrollada más simple de la glucosa comprende una cadena con 5 carbonos ocupados con funciones alcohólicas y uno con un grupo funcional aldehído. Los carbonos 2, 3, 4 y 5 de la glucosa son asimétricos, por lo que su número posible de isómeros es 2^n , donde n es el número de carbonos asimétricos en la molécula, por lo tanto tiene 16 isómeros, 3 ejemplos comunes en la naturaleza serían la D-glucosa, D-galactosa y D-manosa (Laguna, 2013). La estructura de la glucosa se muestra en la Figura 7.

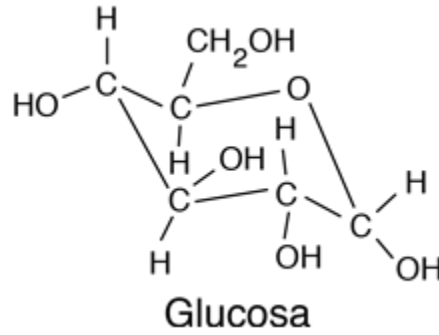


Figura 7: Estructura de la glucosa.

La glucosa es uno de los principales combustibles en las celdas de combustible microfluídicas, ya sean microbianas o enzimáticas, al hacer uso de glucosa oxidasa o de microorganismos como lo son la *Rhodospirillum rubrum* y *Proteus vulgaris* (Chadhuri, 2003) (Thurston *et al*, 1985).

4.3.2 Fructosa

La fructosa es un monosacárido del grupo de las cetosas, con 6 carbonos en su cadena y un enlace hemiacetal entre el carbono 2 y el carbono 5, obteniendo la estructura del furano por lo que se denomina furanosa. Se encuentra en los vegetales, la fruta y la miel, además de que es levógira y tiene 3 carbonos asimétricos. Su poder energético es de 4 kcal/g, el cual es el mismo para la glucosa (Laguna, 2013). La estructura de la fructosa se muestra en la Figura 8.

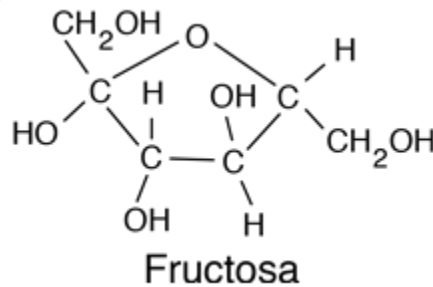


Figura 8: Estructura de la fructosa.

Han sido reportadas celdas de combustible microbianas que hacen uso tanto de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como de la fructosa como su sustrato, obteniendo valores de potencial de circuito abierto de hasta 768 mV con concentraciones de fructosa de hasta 40g/L (Jafary *et al*, 2011).

4.3.3 Maltosa

La maltosa es el resultado de la unión glucosídica entre dos moléculas de glucosa donde el OH del carbono 4 de una molécula se enlaza con el OH del carbono 1 de otra molécula de glucosa. La maltosa no existe de forma libre en la naturaleza, se obtiene por hidrólisis parcial de almidón y glucógeno. Al ser un disacárido, sus reacciones dependen de los monosacáridos que la constituyen y del tipo de enlace que los une. Una reacción típica es la hidrólisis, separando los monosacáridos de forma enzimática o no enzimática (Laguna, 2013). La estructura de la maltosa se muestra en la Figura 9.

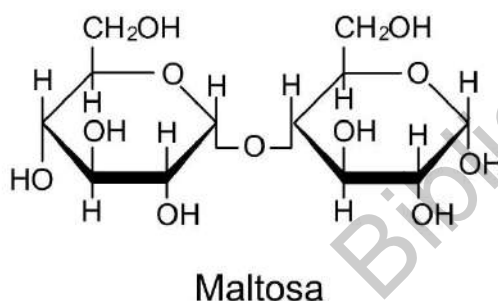
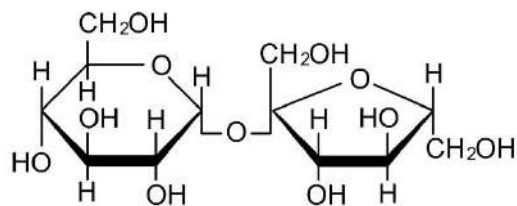


Figura 9: Estructura de la maltosa.

A pesar de no encontrarse de forma libre en la naturaleza, se han estudiado los efectos de la maltosa en celdas de combustible microbianas para distintos microorganismos como lo son las cepas *Proteus vulgaris* y *Bacillus licheniformis* (Kim N., 2000) (Choi Y., 2004).

4.3.4 Sacarosa

La sacarosa, al igual que la maltosa, es la unión de dos moléculas, glucosa y fructosa. La glucosa se encuentra en forma piranósica y la fructosa está en forma de tipo furanosa. Sus características se basan en los monosacáridos que la constituyen, como se había mencionado para la maltosa, y también se pueden separar sus constituyentes por medio de hidrólisis enzimática o no enzimática (Laguna, 2013). La estructura de la sacarosa se muestra en la Figura 10.



sacarosa

Figura 10: Estructura de la sacarosa.

Las celdas de combustible microbianas han sido muy estudiadas para obtener energía que la sacarosa que se encuentra en las aguas residuales para su aplicación en centros de tratamiento de agua en ciudades, y se ha demostrado que varias bacterias tienen la capacidad de adaptarse a la generación de energía al cambiar las condiciones ambientales (Kim *et al*, 2010) (Beecroft *et al*, 2012).

4.4 Óxido de grafeno

Durante la última década mucha investigación ha sido respecto al grafeno químicamente modificado, en particular al óxido de grafeno a causa de la posibilidad de obtener grafeno en masa a partir del óxido de grafito. Debido a los grupos funcionales con oxígeno que contiene el óxido de grafeno, es posible funcionalizarlo para distintas aplicaciones (Dreyer *et al*, 2009). La estructura del óxido de grafeno se muestra en la Figura 11.

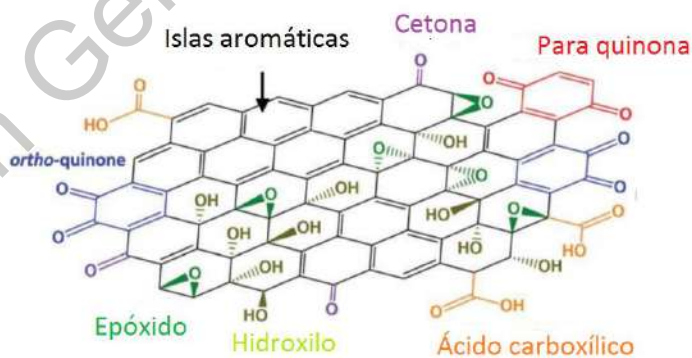


Figura 11: Estructura del óxido de grafeno (adaptado de Ahmad H, 2018).

El método de obtención del óxido de grafeno más usado en la actualidad es el método de Hummers, establecido desde 1958, en el cual el grafito se oxida con KMnO_4 y NaNO_3 en H_2SO_4 concentrado, en una reacción que desprende gases tóxicos como lo son NO_2 , N_2O_4 y

ClO_2 . Se ha reportado un método en donde no se usa el NaNO_3 , pero aumentando la cantidad de KMnO_4 , obteniendo una mayor cantidad de óxido de grafeno hidrófilo, pero sin reducir su conductividad eléctrica, además de que no genera gases tóxicos (Marcano *et al*, 2010).

El óxido de grafeno puede ser utilizado para inmovilización de material biótico como lo son las enzimas sin necesidad de reactivos de reticulación, debido a la gran cantidad de grupos funcionales que contienen. Esto permite que las enzimas generen una unión electrostática con el óxido de grafeno, adhiriéndose a él sin ser afectado su rendimiento catalítico (Zhang *et al*, 2010).

Se ha demostrado que el uso de óxido de grafeno sobre electrodos de carbono para celdas de combustible microfluídica mejora su rendimiento debido a su gran área superficial y a su alta conductividad. También se atribuye su mejora a una mejor colonización bacteriana, mayor capacidad de almacenamiento de carga y menor resistencia a la transferencia de carga (Pareek *et al*, 2019).

También se ha experimentado con materiales compósitos basados en grafeno para modificar sus propiedades y volverlo aún más eficiente como lo es el caso con NiWO_4 /óxido de grafeno y polipirrol/óxido de grafeno, al aumentar su área superficial, conductividad eléctrica, biocompatibilidad y estabilidad (Rani *et al*, 2019) (Lv *et al*, 2013).

4.5 Carbón Vulcan

Los materiales de carbono son la mejor elección como soporte de catalizador debido a que poseen gran área superficial resistencia a la corrosión y bajo costo. El más utilizado entre los materiales de carbono es el Vulcan XC-72R, el cual es un tipo de carbón negro producido por la corporación Cabot en los Estados Unidos. Su área superficial específica es de $250 \text{ m}^2/\text{g}$ y su conductividad eléctrica es de 2.77 S/cm (Shuihua T, 2010).

El carbón Vulcan ha sido utilizado en celdas de combustible microfluídicas, principalmente en el cátodo donde se reduce el oxígeno debido a su gran área superficial para ser aplicado en celdas de combustible de un solo canal en las cuales es necesario tomar el oxígeno del aire (Duneatu *et al*, 2010) (HaoYu *et al*, 2007).

4.6 Platino

En las celdas de combustible microfluídicas en las que se hace uso de un microorganismo en el ánodo para la oxidación de componentes orgánicos, se requiere de un sistema en el cátodo capaz de llevar a cabo la reacción de reducción de oxígeno para completar el funcionamiento de la celda. Esta tarea hasta la fecha ha sido efectuada por nanopartículas de platino que se localizan en el cátodo para lograr reducir el oxígeno en que se encuentra en el aire, en particular para las celdas de combustible microfluídicas de flujo lateral en las cuales no se hace uso de una solución como lo es el catolito, sino que se obtiene el oxígeno del aire.

El desarrollo de catalizadores para la reacción de reducción de oxígeno sigue siendo hoy en día un desafío. Sin embargo, los nanomateriales basados en platino son los más prometedores para este tipo de reacción. Sin embargo, al ser un metal noble, son aún más escasos que el oro (Zhang C, 2017).

La interacción entre el platino y un soporte de carbono tiene efectos en el crecimiento, la estructura y la dispersión de las partículas de platino en los soportes de carbono que genera una mejora en las propiedades catalíticas y en la estabilidad del electrocatalizador. El platino es el metal puro que posee la mayor actividad catalítica para la reacción de reducción de oxígeno. El carbón ha sido utilizado por muchos años como soporte para catalizadores metálicos, y se ha demostrado que la forma del carbón puede afectar la dispersión de las partículas de platino. Los dos principales métodos químicos utilizados para obtener catalizadores soportados en carbono son el método de impregnación y el método coloidal (Yu X., 2007).

4.7 Mecanismo de transferencia de electrones

El proceso por medio del cual los electrones pasan del microorganismo al electrodo aún no está completamente descrito debido a que es muy complejo, sin embargo se reconoce que los electrones se generan en la cadena respiratoria celular de la mitocondria. Existen 2 tipos de transferencia de electrones en las celdas de combustible microbianas: transferencia directa y transferencia mediada (Uria N, 2017).

En la transferencia de electrones directa, a partir de la cadena respiratoria celular los electrones se transportan a la superficie de la célula desde donde pasan al hacer contacto directo con un electrodo por medio de proteínas como lo son los citocromos. También se ha descubierto que algunos microorganismos tienen la capacidad de generar nanoalambres para poder hacer contacto a mayor distancia para liberar los electrones (Schröder U, 2007). En la Figura 12 se muestra un diagrama de la transferencia de electrones directa.

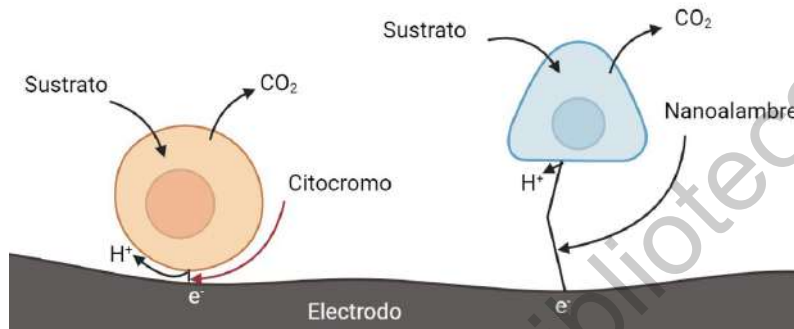


Figura 12: Transferencia directa de electrones por medio de citocromo (izquierda) y nanoalambre (derecha)

En la transferencia de electrones mediada, el microorganismo se encuentra en una solución iónica en la cual hay agentes que pueden oxidarse y reducirse continuamente llamados mediadores, los cuales hacen contacto con el microorganismo donde se reducen, para luego viajar al electrodo donde se oxidan y después repetir el proceso. Los mediadores pueden ser artificiales o pueden ser producidos por los mismos microorganismos para transferir sus electrones (Aiyer K., 2020). En la Figura 13 se muestra un diagrama de la transferencia de electrones por medio de un mediador

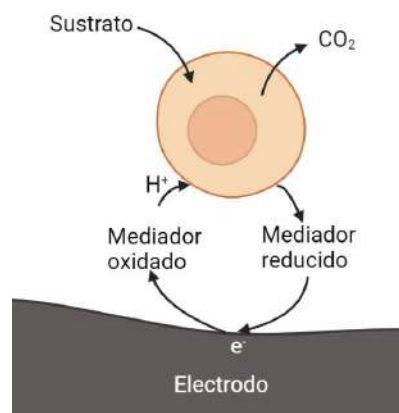


Figura 13: Transferencia de electrones por medio de un mediador.

5. Hipótesis y objetivos

5.1 Hipótesis

La inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* sobre óxido de grafeno podrá brindar a la levadura una buena termoestabilidad, durabilidad y estabilidad química para ser aplicada en la construcción de electrodos microbianos para μ MGFC's utilizando fuentes ricas en distintos carbohidratos como lo son la glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa como combustible.

5.2 Objetivo general

Inmovilizar la *Saccharomyces Cerevisiae* sobre óxido de grafeno para el desarrollo de electrodos microbianos para aplicación en μ MGFC's.

5.3 Objetivos específicos

- A. Inmovilizar las células de *Saccharomyces cerevisiae* sobre óxido de grafeno.
- B. Desarrollar electrodos para la cámara del ánodo de una celda de combustible microfluídica con la levadura *Sacharomyces cerevisiae* inmovilizada.
- C. Evaluar el efecto del pH, el efecto de la temperatura y la actividad de la cepa microbiana de *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada en los diferentes soportes de carbono (óxido de grafeno y carbón vulcan) para poder compararlos.
- D. Caracterizar electroquímicamente los electrodos desarrollados mediante voltametría cíclica para la oxidación de glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa.
- E. Evaluar electroquímicamente las celdas de combustible microfluídicas desarrolladas empleando Pt/C como cátodo y la cepa *Saccharomyces cerevisiae* como ánodo en el consumo de glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa como fuentes de combustible.

6. Metodología

6.1 Inoculación de levadura

El medio de cultivo para el aislamiento de levadura *Saccharomyces cerevisiae* se preparó siguiendo parámetros de esterilidad para garantizar un crecimiento óptimo. Los materiales y el equipo para el desarrollo del medio de obtuvieron del laboratorio de microbiología y de la unidad de investigación de la Universidad Tecnológica de San Juan del Río. Para la preparación de la solución tampón pH 5 se usaron fosfatos de potasio: fosfato de potasio monobásico (6.5 g) y fosfato de potasio dibásico (0.6 g), el cual se llevó a 500 mL con agua destilada.

Se utilizó un medio de cultivo YPglu agregando 0.5% de Extracto de levadura (DIBICO®), 0.8% de Peptona (MCD®) y 3% de Glucosa (SIGMA®); esta mezcla de nutrientes se adicionó a la solución tampón de 500 mL pH 5. Posteriormente se esterilizó en autoclave por 15 min a presión de 1 atm a 120°C.

Después de que el medio de cultivo se esterilizó, se puso a baño maría con agua fría para que el medio se encontrara a temperatura ambiente y de esta manera poder agregar la levadura inocua convencional, de lo cual se agregaron 1.8 g para 500 mL. Enseguida se agitó el medio para homogeneizar y así llevar a la incubadora por 24 horas a 27°C. De esta forma se realizó la activación de la levadura.

El proceso de centrifugación se llevó a cabo para eliminar residuos que posiblemente afectarían en el desempeño electroquímico al emplear la levadura como ánodo, por lo tanto, se obtuvo un sedimento el cual se separó del medio de cultivo. La centrifugación se realizó tomando alícuotas de 8 mL del medio de cultivo pH 4.8, así como del medio de pH 5 y se procedió a liofilización.

6.2 Preparación de tintas catalíticas

Se desarrollaron 3 tintas catalíticas, una para el cátodo y dos para el ánodo. La tinta catalítica del cátodo incluye platino para llevar a cabo el proceso de reducción de oxígeno, mientras que las tintas catalíticas anódicas contienen la cepa *Saccharomyces cerevisiae* para la oxidación en el consumo de sustrato de azúcares.

La tinta catalítica del ánodo fue desarrollada con la cepa *Saccharomyces cerevisiae*, carbón Vulcan, TBAB, Nafion y buffer de fosfatos con un pH de 7. Estos ingredientes fueron mezclados y colocados en vórtex durante 30 segundos.

La tinta catalítica de Pt/C (30 wt.% de E-TEK) para el cátodo, fué preparada con alcohol isoprópilico (J. T. Baker) y Nafion al 5% (Sigma Aldrich) además del catalizador.

Se elaboró también una tinta catalítica en la cual el carbón Vulcan fue reemplazado por óxido de grafeno, para determinar las propiedades de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* Inmovilizada sobre el mismo. La tinta fue desarrollada con levadura, de óxido de grafeno, TBAB, Nafion y buffer de fosfatos con un pH de 7. Estos ingredientes fueron mezclados y colocados en vórtex durante 30 segundos. Al igual que la otra tinta catalítica que contiene levadura, esta tinta fue utilizada para el ánodo de la celda de combustible. El proceso de preparación de las tintas catalíticas anódicas se ilustra en la Figura 14.

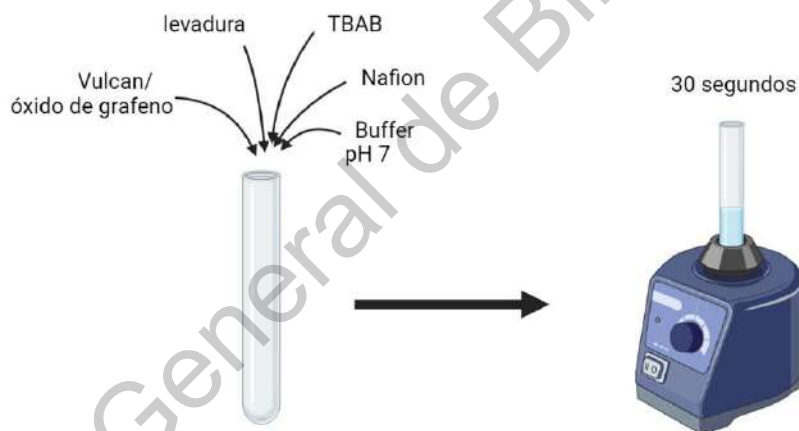


Figura 14: Proceso de preparación de tintas catalíticas anódicas.

6.3 Caracterización fisicoquímica

6.3.1 Tinción de levadura y observación a microscopio óptico

Para la preparación del frotis se esterilizó el asa pasándola por el mechero hasta adquirir un rojo vivo y esperando un poco a que se enfriara. Se puso en contacto con la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* y luego se frotó suavemente con la superficie previamente

esterilizada de un portaobjetos. Para fijar la levadura al portaobjetos, éste se pasó por la llama del mechero 2 segundos.

Para la tinción se utilizaron soluciones de etanol, azul de metileno y KOH. En la placa a la que previamente se inoculó levadura se colocaron unas gotas de etanol hasta cubrirla y se dejaron ahí durante 10 minutos. Después se colocó solución de KOH y se dejó ahí durante 30 minutos. Después de ese tiempo se retiró el exceso de KOH y se colocó solución de azul de metileno durante 2 minutos. Transcurrido ese tiempo, se utilizó agua destilada para retirar el exceso de azul de metileno y se colocó un poco de etanol para secar el portaobjetos. Se procedió a observar la levadura del portaobjetos en el microscopio óptico.

6.3.2 Observación de levadura con microscopía electrónica de barrido

Las pruebas de microscopía electrónica de barrido fueron proporcionadas por parte de la Universidad Tecnológica de San Juan del Rio, y fueron llevadas a cabo con un microscopio electrónico de barrido marca Hitachi SU3500.

6.4 Pruebas electroquímicas de tintas

Para las voltametrías cíclicas y las voltametrías de pulso diferencial con los carbohidratos de interés glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa se utilizó el equipo Gamry Instruments Reference 3000. Se utilizó la tinta catalítica del ánodo con la levadura inmovilizada sobre el carbón Vulcan descrita previamente, para probar la eficiencia de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con distintas azúcares. Se prepararon 6 soluciones de glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa respectivamente, a diferentes concentraciones, de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM, agregando 1 mM de ferrocianuro de potasio a cada solución. Se depositaron 2 μ L de la tinta catalítica anódica por cada prueba, removiendo la tinta y aplicándola de nuevo para cada prueba en el potencióstato.

También se llevaron a cabo voltametrías cíclicas y voltametrías de pulso diferencial con los carbohidratos de interés para la levadura inmovilizada en tinta catalítica con óxido de grafeno, en las que se utilizó el equipo Gamry Instruments Reference 3000. Se utilizó la tinta catalítica del ánodo con la levadura inmovilizada en óxido de grafeno descrita previamente,

para probar la eficiencia de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con distintos azúcares. Se prepararon 6 soluciones de glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa respectivamente, a diferentes concentraciones, de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM, agregando 1 mM de ferrocianuro de potasio a cada solución. Se depositaron 2 μ L de la tinta catalítica anódica por cada prueba, removiendo la tinta y aplicándola de nuevo para cada prueba en el potenciostato. Las soluciones preparadas para cada carbohidrato con su respectiva concentración se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Soluciones preparadas para los carbohidratos de interés. Cada solución además del carbohidrato cuenta con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

Carbohidrato	Concentración de carbohidrato (mM)					
Glucosa	1	2	3	5	10	20
Fructosa	1	2	3	5	10	20
Maltosa	1	2	3	5	10	20
Sacarosa	1	2	3	5	10	20

Las pruebas se llevaron a cabo de media celda de -0.6 a 0.6 V con una tasa de escaneo de 20 mV/s en un electrodo de carbón vítreo modificado con las tintas mencionadas previamente, contra un electrodo de referencia de Ag/AgCl, para el caso de las voltametrías cíclicas. Para las voltametrías de pulso diferencial la tasa de escaneo fue de 20 mV/s de 0 a 0.5 V.

6.5 Pruebas bioquímicas de tintas

Se llevaron a cabo pruebas para probar el comportamiento del consumo de glucosa por parte de la levadura, con diferentes valores de temperatura y de pH. Para ello, se preparó una solución de 500 mL de 50 mM de buffer de acetato de sodio. También se preparó una solución de 0.21 mM de dihidrocloruro de o-Dianisidina, disolviendo 20 mg de dihidrocloruro de o-dianisidina en 8 mL de agua destilada en un envase color ambar para protegerlo de la luz y luego se diluyeron 5.35 mL a 200 mL con la solución de buffer de acetato preparada previamente.

Primero se llevaron a cabo pruebas para determinar el pH óptimo de las 2 tintas catalíticas anódicas. Para ello se preparó una solución de 500 mL de 50 mM de buffer de acetato de sodio. También se preparó una solución de 0.21 mM de dihidrocloruro de o-Dianisidina,

disolviendo 20 mg de dihidrocloruro de o-dianisidina en 8 mL de agua destilada en un envase color ámbar para protegerlo de la luz y luego se diluyeron 5.35 mL a 200 mL con la solución de buffer de acetato preparada previamente. Después se preparó una solución 0.17 mM de o-dianisidina y 1.72% (w/v) de glucosa, aforando a 232 mL con 192 mL de la solución de dianisidina, agregando glucosa y aforando con agua destilada. Se preparó también una solución conteniendo 60 unidades de purpurogalina de peroxidasa de rábano picante, y una solución de levadura *Saccharomyces Cerevisiae* de 1 mg/mL. También se elaboraron pequeños cuadros de 5x5 mm de papel Toray con 2 μ L de cada tinta catalítica anódica de *Sacharomyces Cerevisiae*, para hacer pruebas con la levadura inmovilizada.

De la solución de 0.17 mM de o-Dianisidina y 1.72% de glucosa, se obtuvieron 8 soluciones cuyos pH fueron manipulados con HCl y KOH para tener valores de 6, 6.5, 7, 7.5, 8 y 8.5. El blanco se mantuvo a un pH de 7, y consistió de 1.45 mL de la solución de 0.17 mM de o-Dianisidina y 1.72% de glucosa, con 50 μ L de la solución de peroxidasa y 50 μ L de buffer de acetato de sodio 50 mM. Para las muestras de cada pH distinto, se tomó 1.45 mL de la solución de o-Dianisidina y 1.72% de glucosa, 50 μ L de la solución de peroxidasa y 50 μ L de la solución de levadura. Se contaron 15 minutos a partir del momento en que se agregaron las soluciones de peroxidasa y de levadura para cada muestra de pH. También se hicieron pruebas con la levadura inmovilizada, en las que se utilizaron 1.45 mL de la solución de o-Dianisidina y 1.72% de glucosa, 50 μ L de la solución de peroxidasa y un pequeño cuadro de papel toray con la levadura inmovilizada. Se contaron 15 minutos a partir del momento en que añadieron la solución de peroxidasa y el cuadro con la levadura inmovilizada a cada muestra de pH distinto. Finalmente todas las pruebas se analizaron por medio de un espectrofotómetro a 500 nm para determinar su absorbancia.

A continuación se llevaron a cabo pruebas para determinar la temperatura óptima para las distintas tintas catalíticas anódicas. Para ello se preparó una solución de 500 mL de 50 mM de buffer de acetato de sodio. También se preparó una solución de 0.21 mM de dihidrocloruro de o-Dianisidina, disolviendo 20 mg de dihidrocloruro de o-dianisidina en 8 mL de agua destilada en un envase color ámbar para protegerlo de la luz y luego se diluyeron 5.35 mL a 200 mL con la solución de buffer de acetato preparada previamente. Después se preparó una solución 0.17 mM de o-dianisidina y 1.72% (w/v) de glucosa, aforando a 232 mL con 192

mL de la solución de dianisidina, agregando glucosa y aforando con agua destilada. Se preparó también una solución conteniendo 60 unidades de purpurogalina de peroxidasa de rábano picante, y una solución de levadura *Saccharomyces Cerevisiae* de 1 mg/mL.

De la solución de 0.17 mM de o-Dianisidina y 1.72% mM de glucosa, se obtuvieron 5 soluciones cuya temperatura fué manipulada para tener valores de 15, 25, 35, 45 y 55 °C respectivamente. El blanco se mantuvo a una temperatura de 25 °C, y consistió de 1.45 mL de la solución de 0.17 mM de o-Dianisidina y 1.72% de glucosa, con 50 µL de la solución de peroxidasa y 50 µL de buffer de acetato de sodio 50 mM. Para las muestras de cada temperatura distinta, se tomaron 1.45 mL de la solución de o-Dianisidina y 1.72% de glucosa, 50 µL de la solución de peroxidasa y 50 µL de la solución de levadura. Se contaron 15 minutos a partir del momento en que se agregaron las soluciones de peroxidasa y de levadura para cada muestra de temperatura distinta y se analizaron por medio de un espectrofotómetro a 500 nm para determinar su absorbancia.

La Figura 15 muestra un diagrama donde se ilustra el proceso de preparación de las soluciones requeridas para las pruebas bioquímicas. La solución 5 que se ilustra es la que se toma como base para las pruebas. A partir de ella se modifican el pH y la temperatura para luego juntarla con la levadura y la solución de peroxidasa.

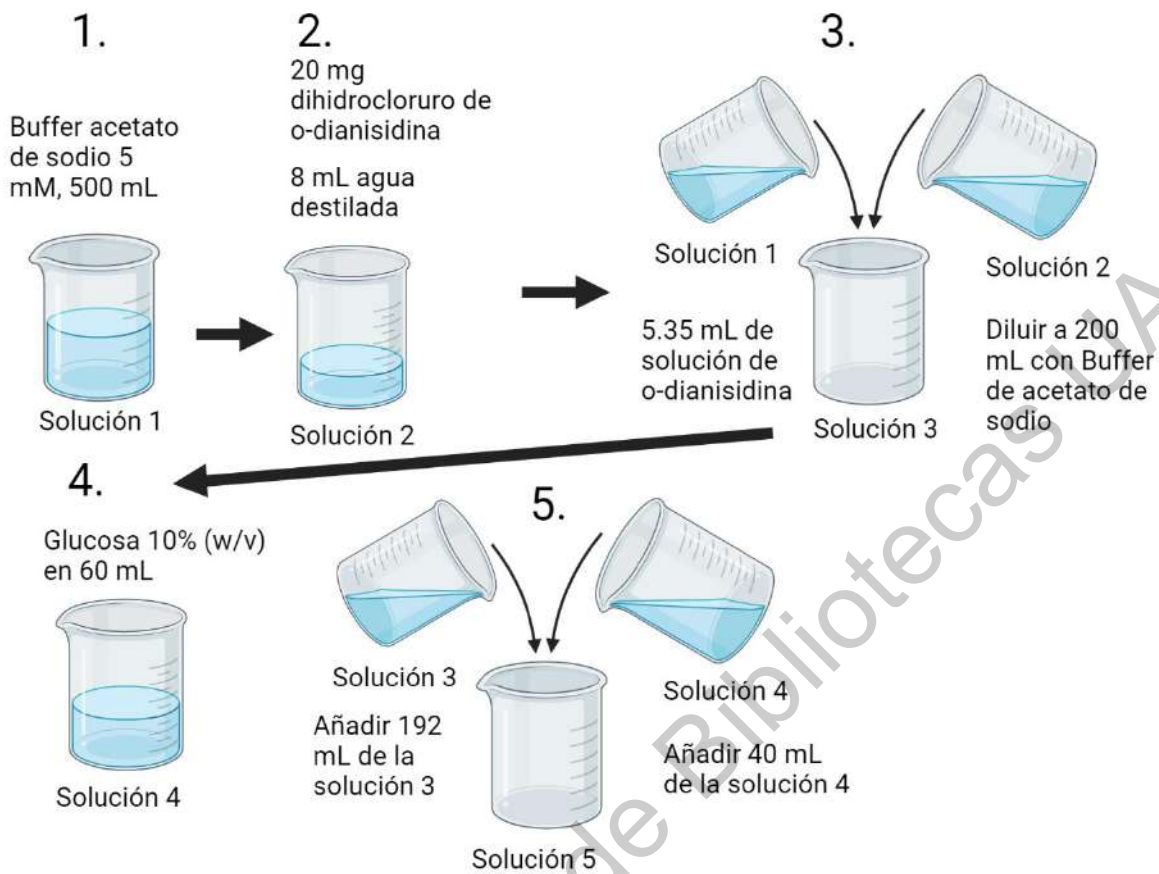


Figura 15: Esquema de elaboración de soluciones para pruebas bioquímicas. A partir de la solución 5 se manipula el pH y la temperatura para comenzar las pruebas.

6.6 Construcción de celdas de combustible

6.6.1 Celda basada en carbón Vulcan

Para realizar los experimentos se construyeron las celdas completas, los compartimientos de ánodo y cátodo están separados por una tira de papel filtro. Esta tira de papel fue ajustada y ayudó en el intercambio de protones mediante una configuración tipo sándwich. El biocatalizador, *Saccharomyces cerevisiae*, se colocó en el compartimiento del ánodo y se utilizó glucosa como combustible. El proceso metabólico de *S. cerevisiae* es una serie de reacciones redox enzimáticas endógenas. La glucosa se convierte primero en Piruvato a través de la vía glucolítica y luego se cataboliza en moléculas simples, que incluyen dióxido de carbono y agua, a través del ciclo del ácido tricarboxílico. Durante el proceso

multienzimático, la energía química se captura a lo largo de la cadena de transporte de electrones. La celda de papel en el intercambio de protones impide que el gas y el electrón se crucen, pero prefiere la transmisión de protones a través de los dos compartimentos de los electrodos, mientras que la diferencia de potencial entre el ánodo y el cátodo impulsa el flujo de electrones a través de un circuito externo.

Se utilizó papel filtro Walkman 5, de dimensiones de 4.5 cm de largo, 0.7 cm de grosor, 0.3 cm de grosor de canal de flujo, cuyo largo fue de 1 cm. Para los electrodos se utilizó papel Toray de dimensiones de 1 cm por 5 mm. La mitad del papel Toray fue cubierta con papel aluminio, para de ahí tomar el contacto con los caimanes y hacer las pruebas. La parte descubierta del electrodo se utilizó para depositar el material catódico y anódico, respectivamente. Para el cátodo, se depositaron 10 μL de la tinta catalítica con Pt/C 30%, y para el ánodo se depositaron 10 μL de la tinta catalítica con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada en carbón Vulcan. Se colocaron los electrodos con el lado depositado haciendo contacto con el papel filtro, teniendo cuidado de no poner en contacto el papel aluminio con el papel filtro. Luego fueron fijados en su sitio con cinta adhesiva. El cátodo fue fijado con la cinta, teniendo especial cuidado de cubrir lo menos del mismo con ella, ya que tiene que estar en contacto con el aire para llevar a cabo el proceso de oxidación.

6.6.2 Celda basada en óxido de grafeno

Se siguió el mismo procedimiento que se utilizó para el desarrollo de la celda basada en carbón Vulcan, haciendo uso de papel filtro Walkman 5 de dimensiones de 4.5 cm de largo, 0.7 cm de grosor, 0.3 cm de grosor de canal de flujo, cuyo largo fue de 1 cm. Los electrodos se basaron nuevamente en papel Toray con dimensiones de 1 cm por 5 cm. La mitad del papel Toray se cubrió con papel aluminio para hacer contacto con el equipo de medición, mientras que la otra mitad fue cubierta con tinta catalítica. Se cubrió un electrodo con 10 μL de la tinta catalítica de platino, convirtiéndolo así en el cátodo, mientras que el otro electrodo fue cubierto con 10 μL de la tinta catalítica con *Saccharomyces cerevisiae* en óxido de grafeno, para cumplir la función del ánodo. Estos electrodos fueron fijados con la cara de la tinta depositada haciendo contacto con el papel filtro en forma de sándwich y fueron fijados en su sitio con cinta adhesiva. Se tuvo especial cuidado de cubrir lo menos posible del cátodo con

la cinta adhesiva para que tuviera buen contacto con el aire y así hacer más eficiente la reacción de reducción de oxígeno. La Figura 16 ilustra el proceso de fabricación de la celda de combustible.

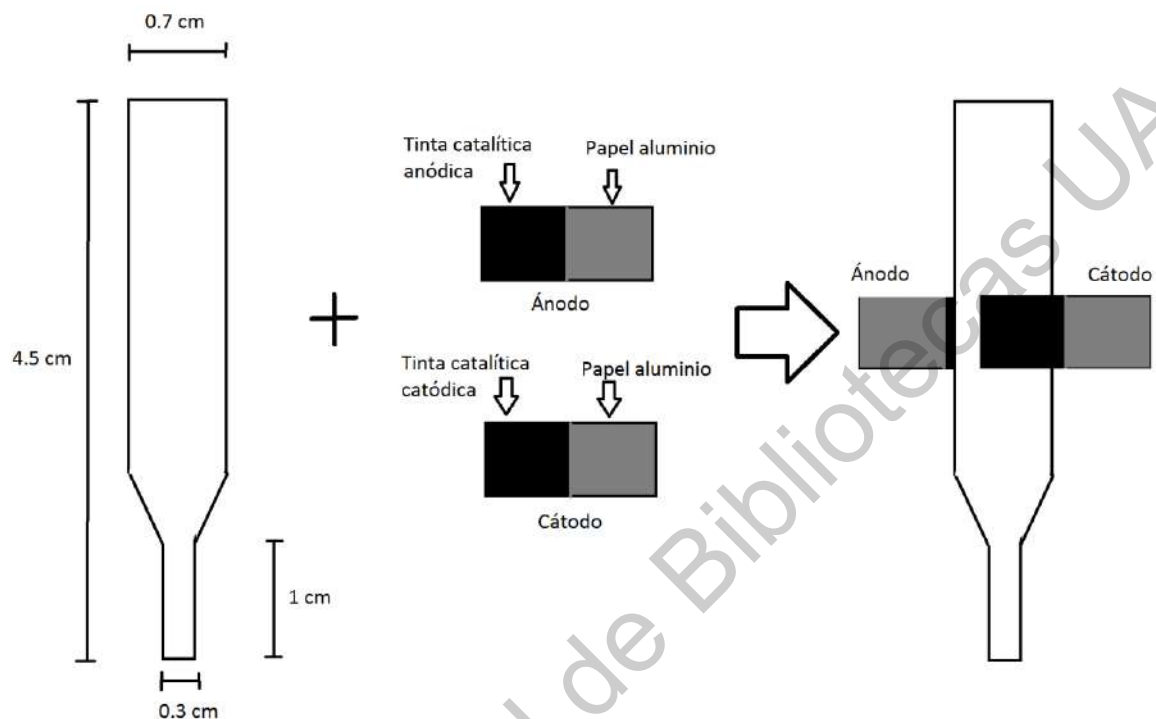


Figura 16: Diseño de celda de combustible microfluídica basada en papel de un solo canal.

6.7 Evaluación electroquímica de celdas de combustible

Se utilizó cada celda de combustible fabricada, nos referiremos a la de la levadura inmovilizada en carbón Vulcan como “sistema A” y a la de la levadura inmovilizada en óxido de grafeno como “sistema B”. Para las pruebas cada celda se colocó sobre una base aislante, se puentearon los electrodos de trabajo y de referencia del potenciostato y se fijó el electrodo de trabajo con el cátodo de la celda, y el contra electrodo se fijó con el ánodo. Se utilizaron las soluciones de glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa con las concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con ferrocianuro de potasio al 1 mM, y se añadieron alícuotas de 20 μ L de cada solución sobre la zona de papel filtro de la celda fabricada. Se hicieron pruebas de potencial de circuito abierto con una duración de 330 segundos. También se llevaron a cabo pruebas de cronoamperometría, con un voltaje de 0.2 V y un tiempo de 300 segundos. Para determinar

la densidad de potencia y de corriente se hicieron curvas de descarga con cada celda y con las soluciones a distintas concentraciones de los distintos carbohidratos.

7. Análisis y resultados

7.1 Microscopía

7.1.1 Microscopía óptica

En la Figura 17 se puede observar la levadura con la tinción descrita en la sección 6.3.1, como se puede observar cuenta con una forma ovalada. También se puede observar que hay material azul entre cada célula lo cual podría ser exceso de azul de metileno, levadura desnaturalizada o un material de matriz extracelular característico de *Saccharomyces cerevisiae* que conecta las colonias de la levadura (Kuthan *et al*, 2003)

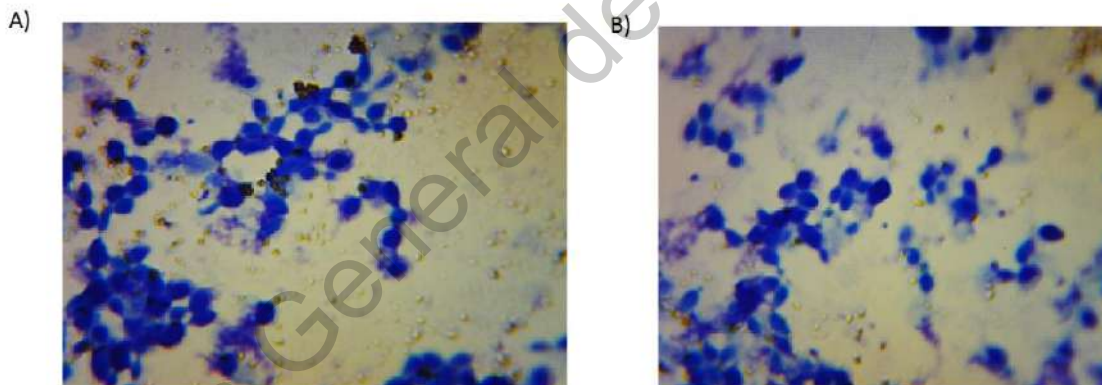


Figura 17: *Saccharomyces cerevisiae* vista con microscopio óptico.

7.1.2 Microscopía electrónica de barrido

En la Figura 18 se puede observar la cepa *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada sobre el sustrato de carbono (papel Toray). Como se puede observar tiene buen contacto con los filamentos de carbono, creciendo sobre su superficie. Siendo un material tan poroso, la colonia de la cepa se puede expandir en las 3 dimensiones. En la Figura 18 B) se puede

observar que la levadura tiene aproximadamente 5 μm de largo, lo cual concuerda con el tamaño de la cepa reportada en la literatura (Tyson C. *et al*, 1979) (Johnston G. *et al*, 1979).

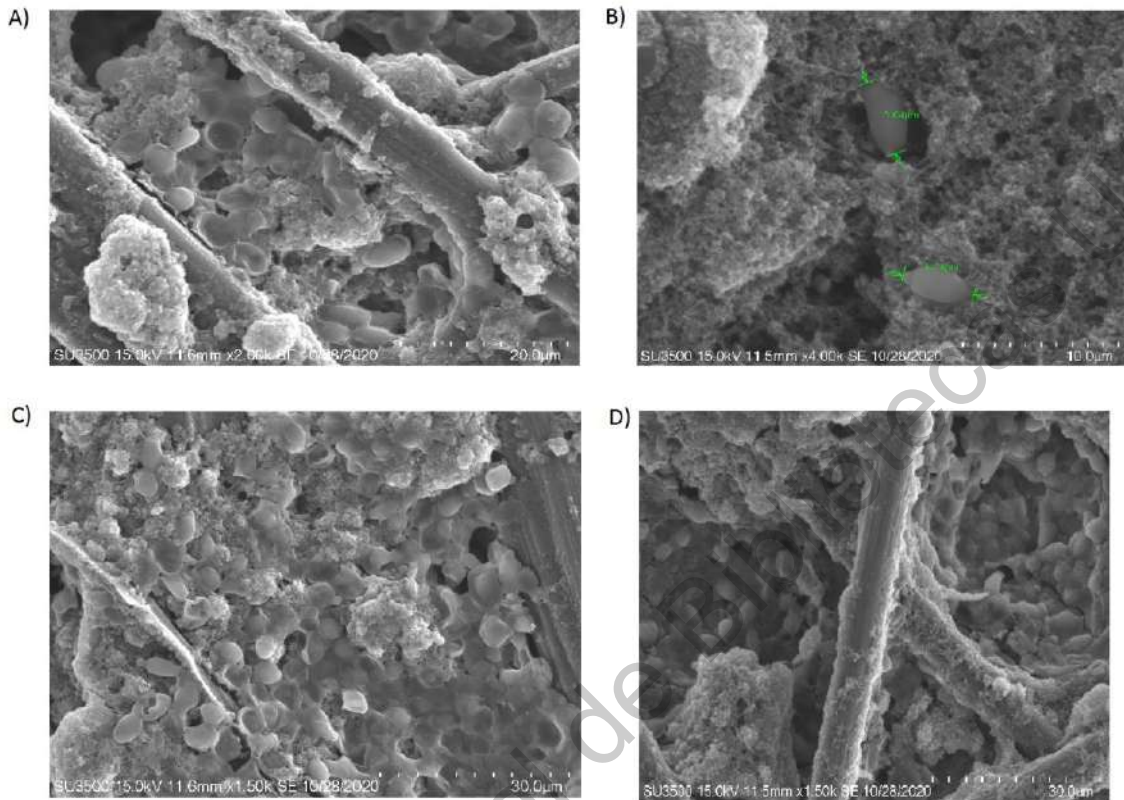


Figura 18: *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada en sustrato de carbono observada con microscopio electrónico de barrido.

7.2 Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas llevadas a cabo para la cepa *S. cerevisia* en solución y sin inmovilización se muestran en las Figuras 19 y 20. En la Figura 19 se observa su actividad enzimática con respecto al pH. A un pH de 6 se obtuvo la mayor actividad enzimática, y a partir de ese punto continúa bajando hasta llegar a un valor de pH de 8.5. Está reportado en la literatura que la cepa *Saccharomyces cerevisiae* presenta mejor crecimiento en medios ácidos que varían en pH de 4 a 6, por lo que este resultado va de acuerdo a lo reportado previamente (Narendranath N, 2005).

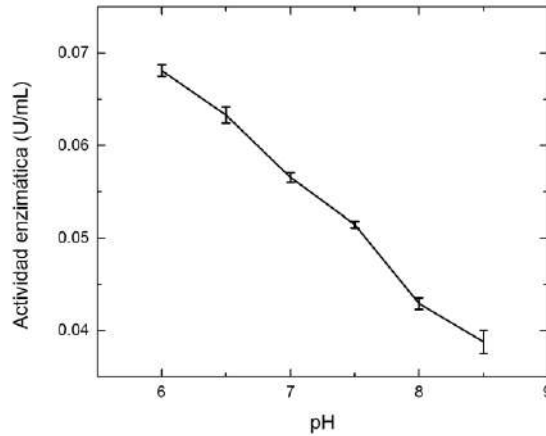


Figura 19: Actividad enzimática para levadura en solución con respecto al pH.

En la Figura 20 se observa la actividad enzimática de la levadura en solución con respecto a la temperatura. A una temperatura de 35 °C se obtuvo la mayor actividad enzimática, lo que indica que es la temperatura óptima para la actividad de la levadura. La temperatura de crecimiento óptima para la cepa *Saccharomyces cerevisiae* es de 33-34 °C por lo que el resultado va de acuerdo a lo reportado en otros trabajos (Serra, 2005.)

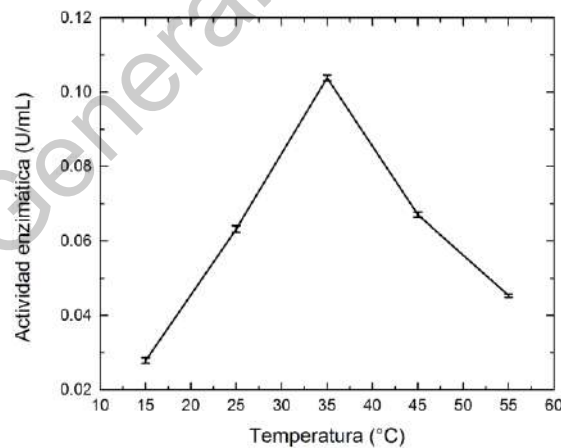


Figura 20: Actividad enzimática para levadura en solución con respecto a la temperatura.

La actividad enzimática para la levadura inmovilizada en carbón Vulcan se muestra en las Figuras 21 y 22. En la Figura 21 se muestra la actividad de la levadura con respecto al pH. Se puede apreciar que hay una diferencia en el pH para la actividad enzimática óptima, que ahora es de 6.5 a diferencia de la levadura en solución y de lo reportado en la literatura

(Chiang et al, 1981), lo cual indica que el sistema que se usa para inmovilizar desplaza el pH de su actividad enzimática óptima. La inmovilización dentro del polímero conductor Nafion además del efecto del carbón Vulcan altera el potencial de hidrógeno que entra en contacto con la levadura, de forma que a un pH más cercano al valor neutro se obtiene una actividad enzimática óptima.

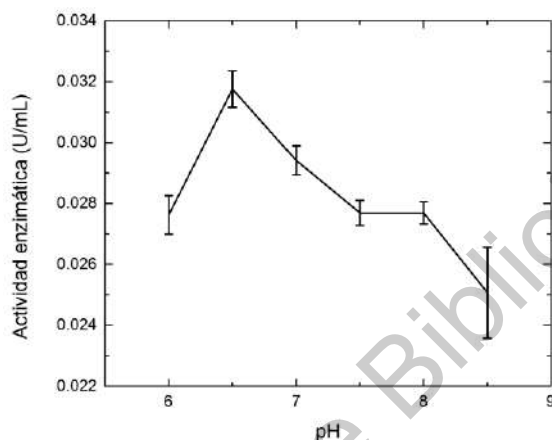


Figura 21: Actividad enzimática para levadura inmovilizada en Vulcan con respecto al pH.

En la Figura 22 se muestra la actividad enzimática de la levadura inmovilizada con carbón Vulcan con respecto a la temperatura. El valor óptimo de temperatura que se aprecia para la actividad enzimática es de 35 °C, el cual permanece similar al valor obtenido con la levadura no inmovilizada y a los valores reportados en la literatura, en los que el crecimiento de la levadura aumenta conforme se acerca a los 35 °C (Arroyo-López, 2009). Con esto se observa que el sistema elaborado para inmovilizar a la cepa no actúa como un aislante térmico para la misma, y sus funciones metabólicas continúan de manera normal en el sistema inmovilizado.

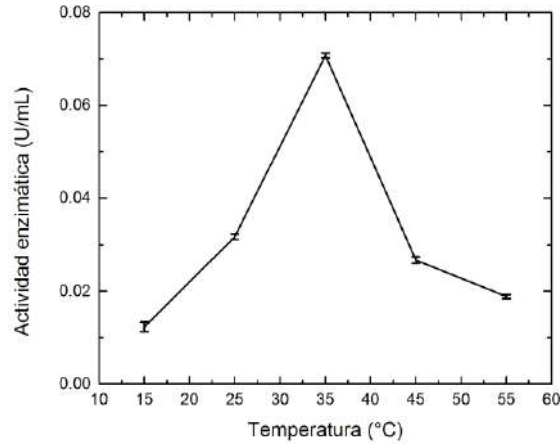


Figura 22: Actividad enzimática para levadura inmovilizada en Vulcan con respecto a la temperatura.

En la Figura 23 se muestra la actividad enzimática de la levadura inmovilizada en óxido de grafeno con respecto al pH. De forma similar a la Figura 21, se observa que la actividad enzimática óptima se presenta a un pH de 6.5, lo cual está ligeramente desplazado a valores más básicos que aquellos reportados en la literatura para la cepa *Saccharomyces cerevisiae* (Chiang et al, 1981). Los enlaces que se forman entre el óxido de grafeno, además de la presencia el polímero Nafion alteran el potencial de hidrógeno que afecta a la levadura, y acerca el pH de su actividad enzimática óptima a valores más cercanos al pH neutro. Esto resulta beneficioso debido a posibles aplicaciones en alimentos o con sustancias de origen biológico las cuales por lo general tienen valores más cercanos al pH neutro y no a un pH ácido.

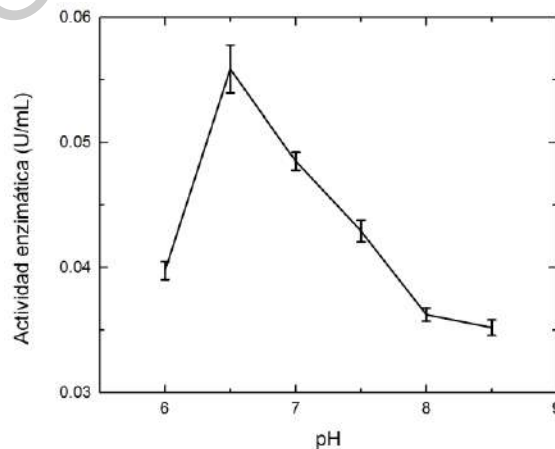


Figura 23: Actividad enzimática para la levadura inmovilizada en óxido de grafeno con respecto al pH.

En la Figura 24 se muestra la actividad enzimática de la levadura inmovilizada en óxido de grafeno con respecto a la temperatura. Nuevamente se observa que el valor óptimo de temperatura para la actividad enzimática es de 35°C, lo cual es similar a lo reportado en la literatura (Serra, 2005). De nuevo, el sistema elaborado para la inmovilización no ejerce la función de aislante térmico por lo que la levadura lleva a cabo sus funciones metabólicas como si estuviera en solución con respecto a la temperatura.

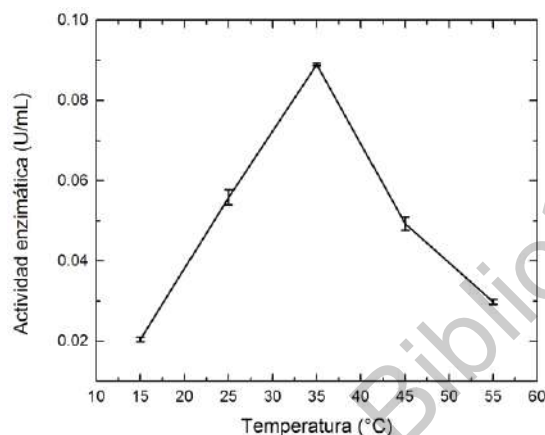


Figura 24: Actividad enzimática para la levadura inmovilizada en óxido de grafeno con respecto a la temperatura.

Es interesante observar que los valores de actividad enzimática óptimos para pH y para temperatura fueron superiores para el sistema inmovilizado en óxido de grafeno que para el sistema inmovilizado en carbón Vulcan., teniendo el sistema de óxido de grafeno valores de 0.056 U/mL para pH y 0.089 U/mL para temperatura, mientras que el sistema con carbón Vulcan obtuvo valores de 0.032 U/mL para pH y 0.071 U/mL para temperatura. Sin embargo, el sistema que obtuvo mayor actividad enzimática fue el de la levadura en solución, para el cual se obtuvieron valores máximos de 0.068 U/mL para pH y 0.104 U/mL para temperatura.

7.3 Sistema A: Celda con carbón Vulcan

7.3.1 Voltametrías cíclicas

Las pruebas de voltametría cíclica con electrodo de carbón vítreo modificado con la tinta catalítica anódica de levadura con carbón Vulcan se muestran en las Figuras 25, 26, 27, 28 y 29. La Figura 25 muestra la voltametría cíclica con el blanco, una solución sin ningún

carbohidrato de interés con el mediador $C_6FeK_4N_6$ 1 mM. Se logran observar 2 pequeños picos, uno anódico y uno catódico en 0.385 y en 0.267 V, respectivamente, con una amplitud de $5.96 \mu A$ para el pico anódico y una de $13.5 \mu A$ para el pico catódico. Es posible que estos picos se deban a las reservas de carbohidratos propios de la levadura al momento de llevar a cabo el experimento.

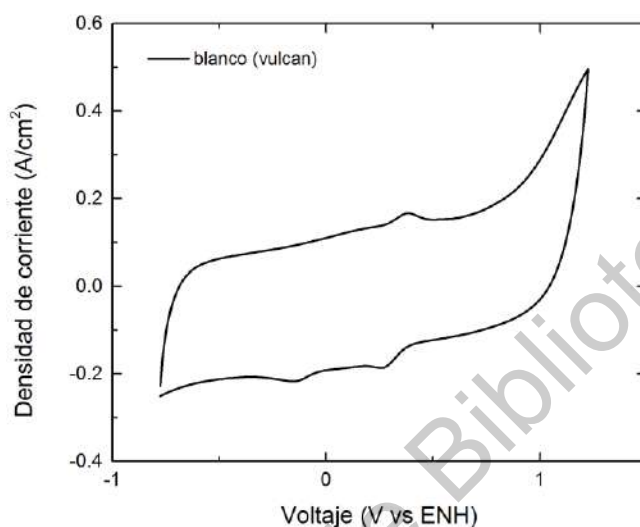


Figura 25: Voltametría cíclica de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con Vulcan para $C_6FeK_4N_6$ 1 mM en ausencia de los azúcares de interés.

La generación de energía a partir de carbohidratos dentro de la mitocondria celular se muestra en la Figura 26. Los carbohidratos pasan a formar Acetil CoA y entran al ciclo de Krebs desde donde se produce la molécula energética elemental de todo ser vivo: ATP. Más ATP se forma en la cadena respiratoria, la cual es la causante principal de la producción de electrones por parte de la célula.

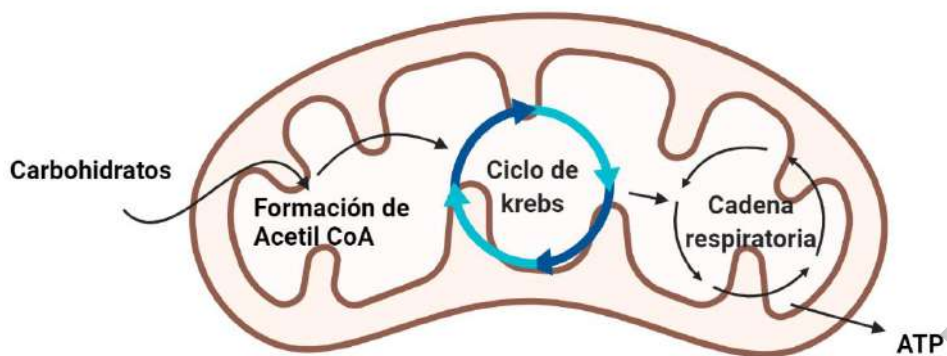


Figura 26: Conversión de energía de los carbohidratos en ATP en la mitocondria.

Las voltametrías cíclicas de glucosa aplicadas al electrodo de carbón vítreo modificado con la tinta catalítica de levadura con Vulcan se muestran en la Figura 27. Se pueden observar los picos anódicos a aproximadamente 0.4 V para todas las concentraciones de glucosa, así como picos catódicos a 0.35 V aproximadamente. Es interesante notar que para los picos anódicos no se puede observar una correlación entre la corriente de pico y la concentración de la glucosa, mientras que para los picos catódicos sí hay un aumento en la corriente con respecto a la concentración. Los picos se deben a la cadena de respiración celular en la que se genera energía a partir del catabolismo de la glucosa.

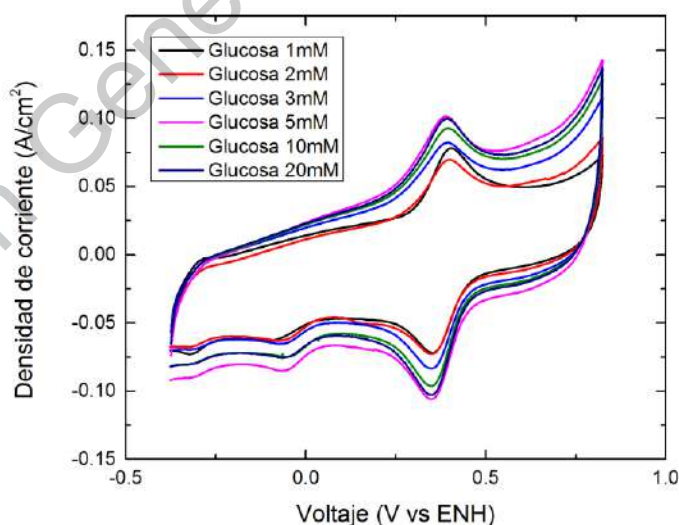


Figura 27: Voltametrías cíclicas de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con Vulcan para glucosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

En la Figura 28 se muestra la ruta metabólica que sigue la glucosa dentro de la cepa *Saccharomyces cerevisiae*. Como se puede observar, en esta ruta también se encuentra la fructosa lo que indica que siguen un camino muy similar en el consumo. Además de la producción de energía química en forma de ATP y NADH, cada paso influye en la generación de electrones por parte de la célula.

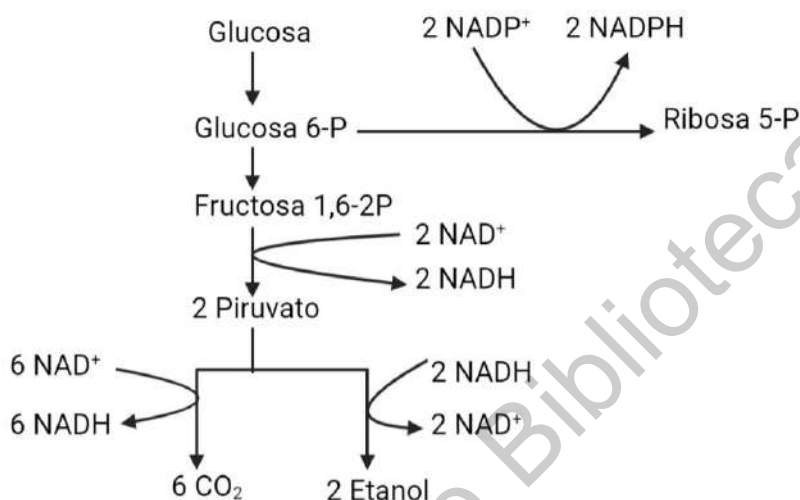


Figura 28: Catabolismo de la glucosa en *Saccharomyces cerevisiae* (adaptado de Zhao J. et al, 2005).

En la Figura 29 se muestran las voltametrías cíclicas aplicadas a fructosa con el electrodo de carbón vítreo modificado con la tinta catalítica de levadura con carbón Vulcan. Los picos anódico y catódico se encuentran aproximadamente a 0.4 y 0.35 respectivamente. El catabolismo de glucosa y de fructosa por parte de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* sigue un mismo camino para la obtención de energía por medio de la mitocondria, ya sea para la generación de dióxido de carbono o de etanol (Zhao J. et al, 2005).

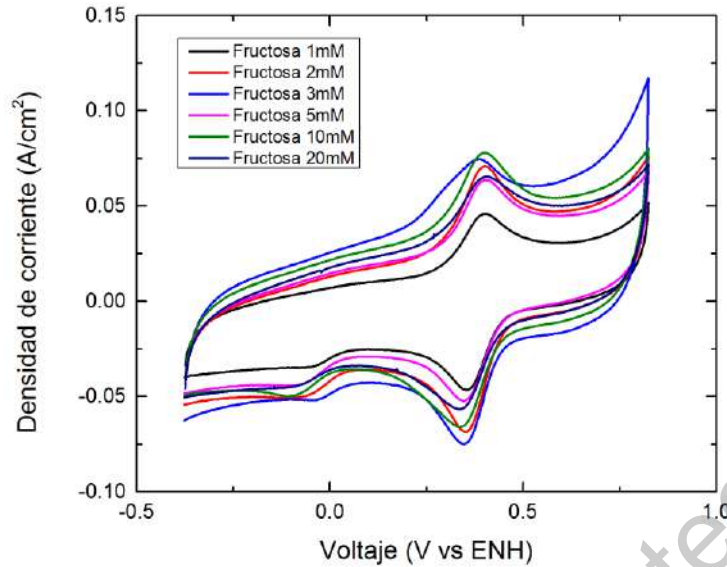


Figura 29: Voltametrías cíclicas de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con Vulcan para fructosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

Las voltametrías cíclicas aplicadas a maltosa con un electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con Vulcan se muestran en la Figura 30. Se puede observar el pico anódico a aproximadamente 0.4 V y el pico catódico a aproximadamente 0.35 V, lo cual es muy cercano a los valores obtenidos para glucosa y fructosa. Esto podría indicar que la maltosa se separa en sus monosacáridos constituyentes y sigue la misma ruta metabólica. Ha sido reportado en la literatura que la enzima maltasa es producida por la cepa *Saccharomyces cerevisiae* por inducción por maltosa. La maltasa es la enzima encargada de la hidrólisis de la maltosa para separarla en sus monosacáridos de glucosa (Zimmerman F., 1974)

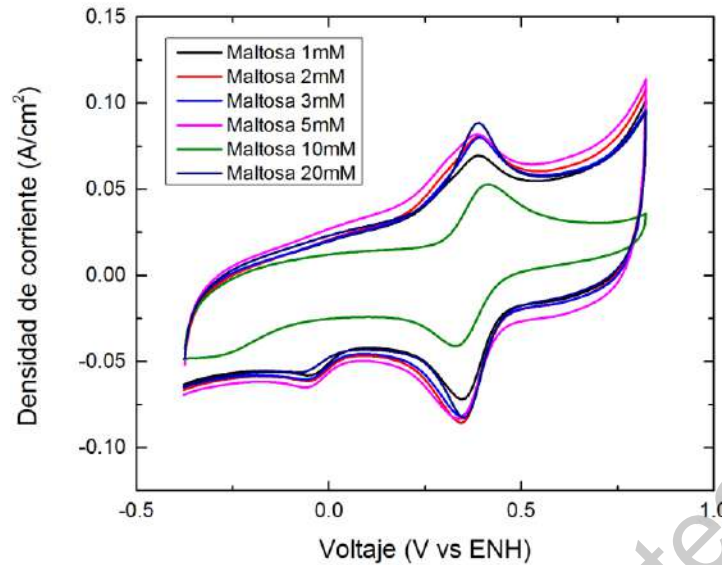


Figura 30: Voltametrías cíclicas de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con Vulcan para maltosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

La Figura 31 muestra las voltametrías aplicadas a sacarosa con un electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con Vulcan. Nuevamente el pico anódico se puede observar a aproximadamente 0.4 V y el pico catódico a 0.34 V, muy cercanos a los valores de glucosa y fructosa. De nuevo esto sugiere que la sacarosa es separada vía enzimática en sus monosacáridos constituyentes, glucosa y fructosa. Está reportado que la cepa *Saccharomyces cerevisiae* expresa una cantidad significativa de sacarasa, enzima encargada de la hidrólisis de la sacarosa, por lo que se podría concluir que ésta es separada en sus monosacáridos constituyentes que luego son consumidos por la levadura (Herbrecht R., 2005). Al ser separada la sacarosa en glucosa y fructosa, ambas son convertidas en piruvato y otros productos metabólicos y al mismo tiempo se genera energía que es consumida por el microorganismo, del cual a partir de la respiración celular se generan electrones que generan una corriente la cual se observa en los picos de la voltametría.

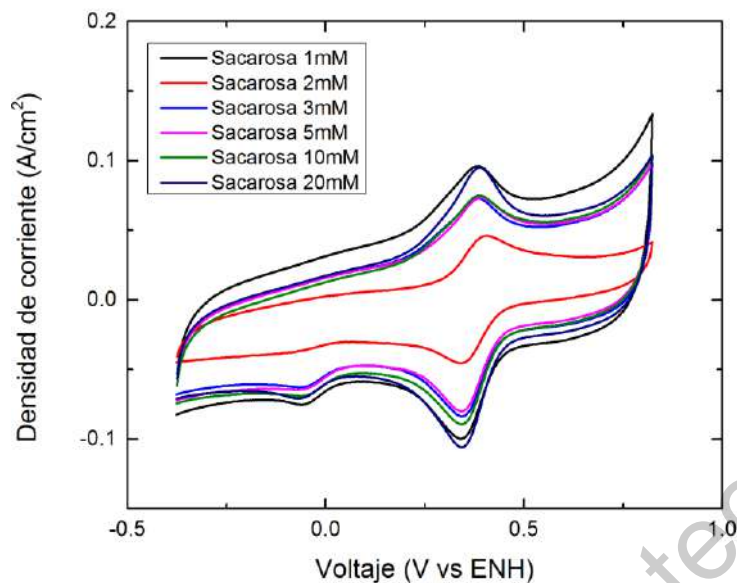


Figura 31: Voltametrías cíclicas de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con Vulcan para sacarosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

7.3.2 Voltametrías de pulso diferencial

La Figura 32 muestra las voltametrías de pulso diferencial aplicadas a glucosa con un electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con Vulcan. Nuevamente los picos anódicos se observan a aproximadamente 0.4 V lo cual concuerda con las voltametrías cíclicas. Conforme aumenta la concentración aumenta la corriente de pico hasta llegar a 5 mM donde aparentemente deja de aumentar.

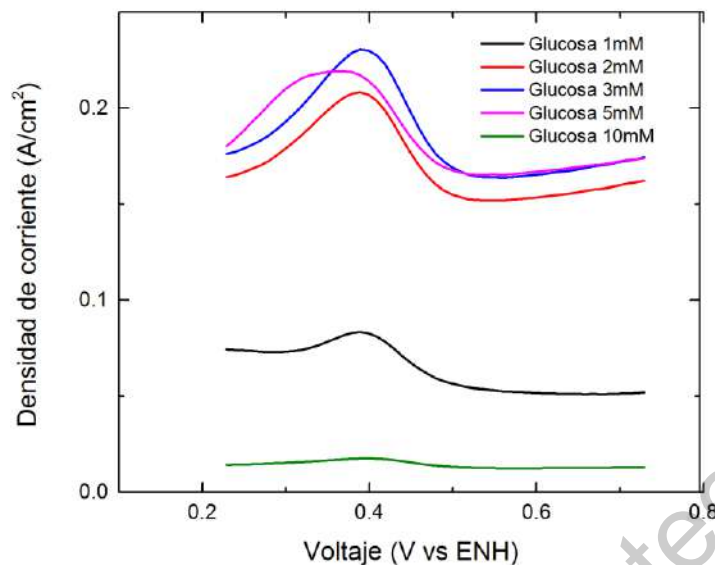


Figura 32: Voltametrías de pulso diferencial de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con Vulcan para glucosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

La Figura 33 muestra las voltametrías de pulso diferencial aplicadas a fructosa con un electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con Vulcan. En este caso los picos se ven un poco desplazados hacia la izquierda con respecto a la glucosa, a aproximadamente 0.38 V. Es interesante notar que la corriente aumenta conforme aumenta la concentración hasta que llega a 3 mM, donde empieza a bajar hasta llegar a 20 mM

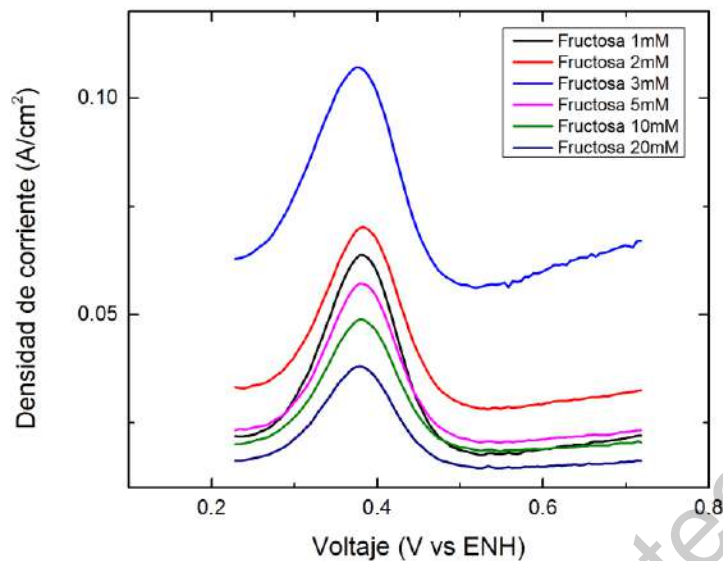


Figura 33: Voltametrías de pulso diferencial de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con Vulcan para fructosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

En la Figura 34 se pueden observar las voltametrías de pulso diferencial aplicadas a maltosa con un electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con Vulcan. El pico anódico nuevamente se ve desplazado ligeramente hacia la izquierda con respecto a las voltametrías cíclicas, a un valor de 0.38 V.

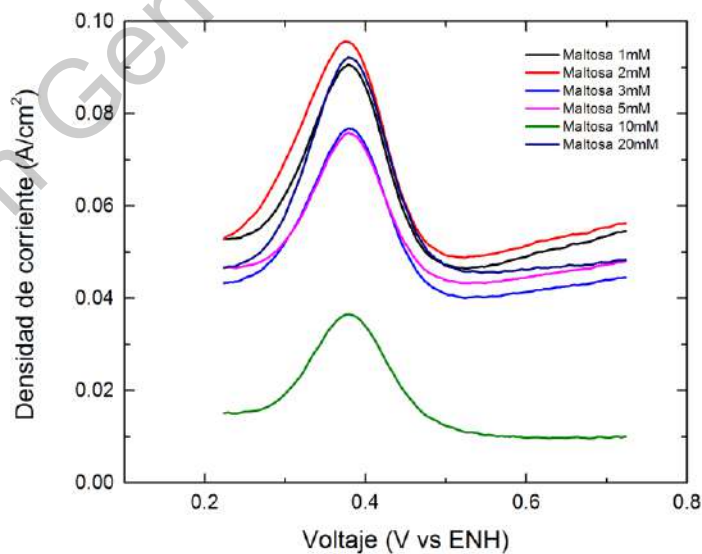


Figura 34: Voltametrías de pulso diferencial de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con Vulcan para maltosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

La Figura 35 muestra las voltametrías de pulso diferencial aplicadas a sacarosa con un electrodo de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con Vulcan. El pico anódico se puede observar a aproximadamente 0.38 V llegando a un valor máximo de corriente de pico de 0.105 A/cm² para la concentración de 10 mM.

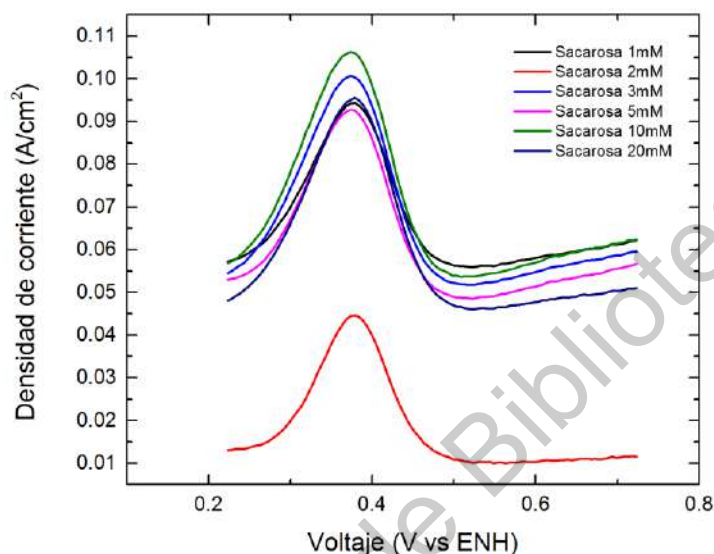


Figura 35: Voltametrías de pulso diferencial de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con Vulcan para sacarosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con C₆FeK₄N₆ 1 mM.

7.3.3 Potencial de circuito abierto

En la Figura 36 se puede observar el potencial de circuito abierto para la celda completa con tinta catalítica anódica de levadura con Vulcan. Se puede observar que el voltaje se estabiliza conforme se va acercando a los 150 segundos. El valor máximo obtenido en el blanco fue de 0.47 V.

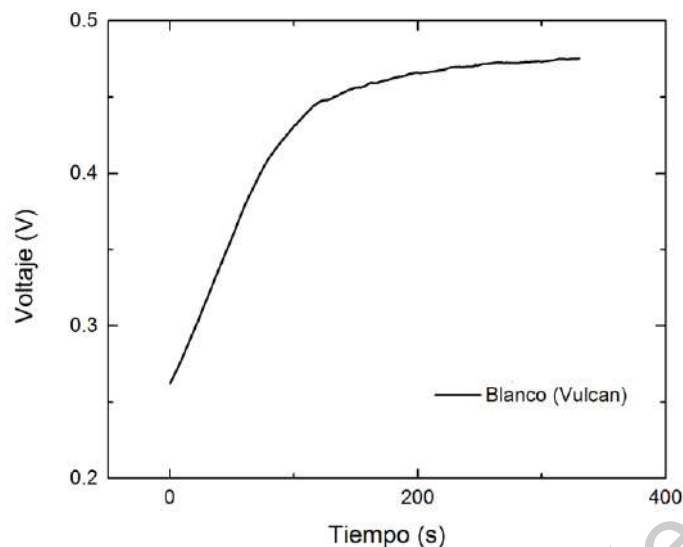


Figura 36: Potencial de circuito abierto para celda de combustible microfluidica con tinta catalitica de levadura con Vulcan en el ánodo para $C_6FeK_4N_6$ 1 mM en ausencia de los azúcares de interés.

En la Figura 37 se pueden observar los potenciales de circuito abierto para la celda completa del sistema A con glucosaa diferentes concentraciones. El valor máximo de voltaje se obtuvo con la concentración de glucosa de 10 mM y fue de 0.38 V. Se han obtenido valores superiores de hasta 0.886 V en sistemas que usan como mediador de electrones al azul de metileno lo que indica que podría ser un mediador más eficiente (Permana D. et al, 2015). Al comienzo de la prueba se deposita una alícuota de la solución de concentración variante de glucosa, la cual al llegar a tener contacto con los electrodos comienza su proceso de oxidación por parte de la levadura, la cual al consumirla genera energía hasta que llega a estabilizarse.

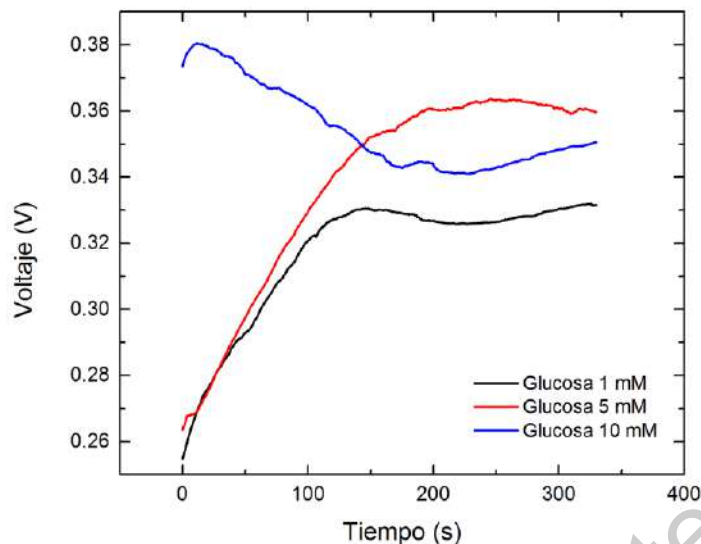


Figura 37: Potencial de circuito abierto para celda de combustible microfluidica con tinta catalitica de levadura con Vulcan en el ánodo para glucosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

En la Figura 38 se pueden observar los potenciales de circuito abierto para la celda completa del sistema A con fructosa a diferentes concentraciones. El valor máximo de potencial se obtuvo con una concentración de 10 mM y fue de 0.432 V. Se puede observar que no hay mucha diferencia con respecto a la concentración de 5 mM, con la que se obtuvo un valor de 0.43 V. De nuevo en la prueba se depositó una alícuota sobre el papel filtro, hasta que por medio de capilaridad llegó a los electrodos, donde comenzó el proceso de oxidación de la fructosa por parte de la levadura. Esta oxidación va en aumento hasta que llega a estabilizarse generando un potencial continuo que varía poco con respecto al tiempo.

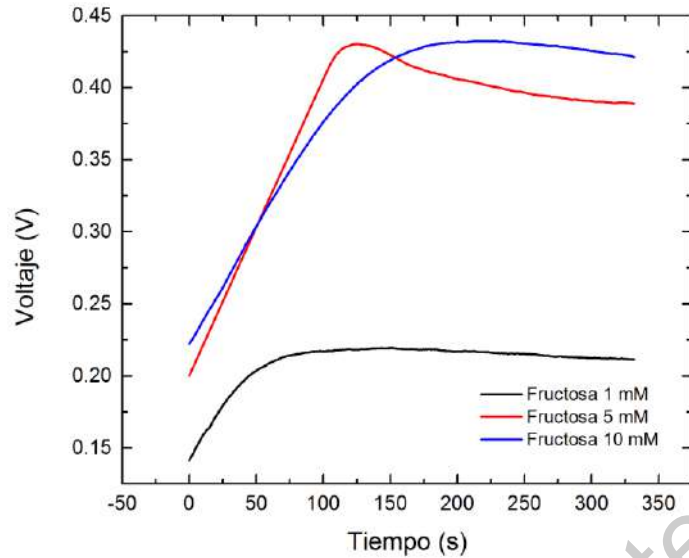


Figura 38: Potencial de circuito abierto para celda de combustible microfluidica con tinta catalitica de levadura con Vulcan en el ánodo para fructosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

En la Figura 39 se pueden observar los potenciales de circuito abierto para la celda completa del sistema A con maltosa a diferentes concentraciones. Se observa que el mayor potencial se obtuvo para una concentración de 1 mM, con un valor de 0.536 V. Es posible que al tratarse del disacárido maltosa y debido a que la levadura no comienza a producir la enzima maltasa hasta que tiene contacto con la maltosa, haya habido distintos tiempos de respuesta. Sin embargo se observa que se lleva a cabo la reacción, lo cual indica que efectivamente la maltosa se separa en sus monosacáridos constituyentes que luego son oxidados por los procesos metabólicos del microorganismo para generar un potencial.

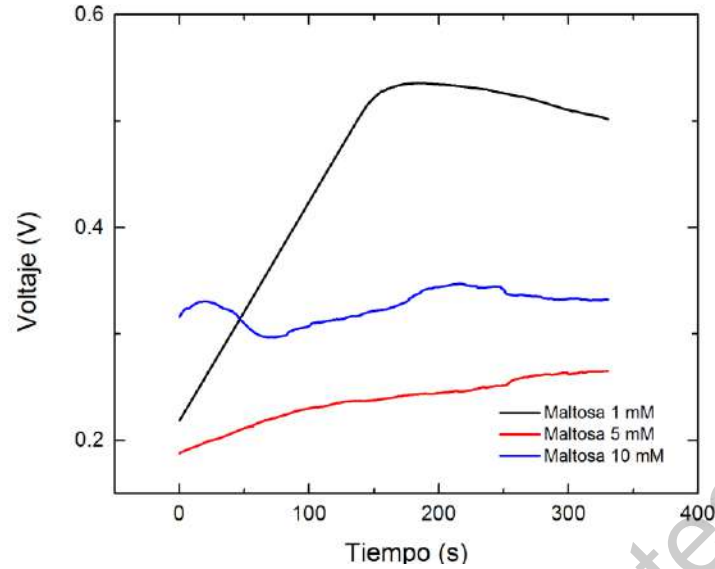


Figura 39: Potencial de circuito abierto para celda de combustible microfluidica con tinta catalítica de levadura con Vulcan en el ánodo para maltosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

En la Figura 40 se pueden observar los potenciales de circuito abierto para la celda completa del sistema A con sacarosa a diferentes concentraciones. El mayor potencial se puede observar para el caso de sacarosa 5 mM. Es interesante también mencionar la caída y la posterior subida que tiene la línea de la concentración de 5 mM, la cual podría deberse a una ausencia y una posterior producción de la enzima sacarasa para hidrolizar el disacárido en sus monosacáridos constituyentes, teniendo en cuenta que la sacarasa es un metabolito el cual su producción se ve influida por la presencia de sacarosa. Sin embargo se observa que efectivamente sus monosacáridos constituyentes son consumidos por el microorganismo para de esta forma pasar por medio de sus procesos metabólicos y generar energía a través de la respiración celular.

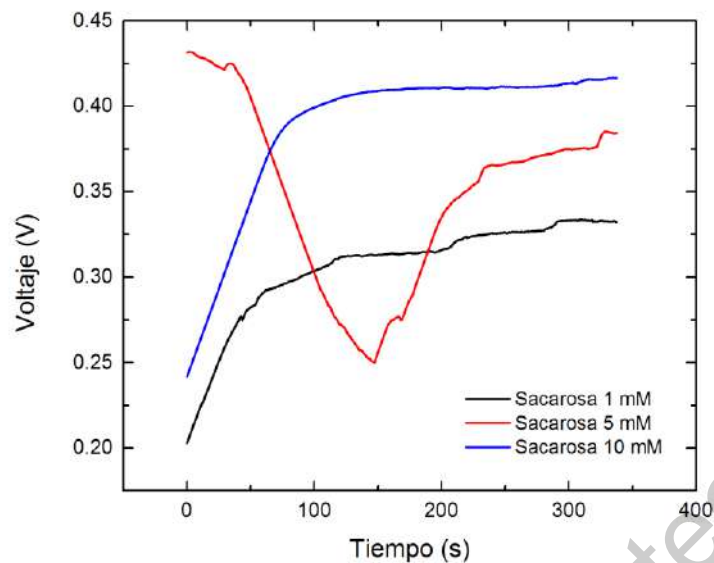


Figura 40: Potencial de circuito abierto para celda de combustible microfluidica con tinta catalitica de levadura con Vulcan en el ánodo para sacarosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

7.3.4 Cronoamperometría

La Figura 41 muestra la prueba de cronoamperometría para la celda completa del sistema A con una solución blanco, con ausencia de carbohidratos pero presencia de mediador $C_6FeK_4N_6$ 1 mM. Los resultados de la medición indican que el desempeño del dispositivo decrece respecto al tiempo debido a que va disminuyendo la concentración de los carbohidratos con que cuenta la levadura inicialmente, de su propia reserva energética.

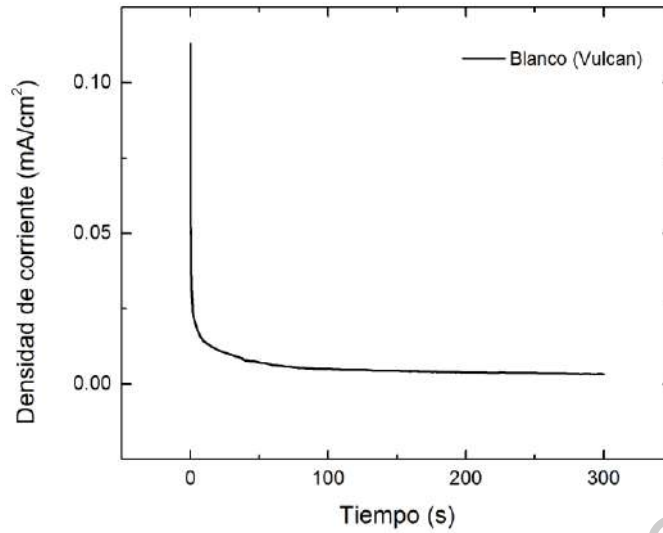


Figura 41: Cronoamperometría para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con Vulcan en el ánodo para $C_6FeK_4N_6$ 1 mM en ausencia de los azúcares de interés.

La Figura 42 muestra la prueba de cronoamperometría para la celda completa del sistema A con glucosa. Se observa que la corriente decrece rápidamente debido a que se consume el carbohidrato presente. Sin embargo para la concentración de 10 mM la caída de la densidad de corriente se ralentiza a 0.05 mA/cm^2 .

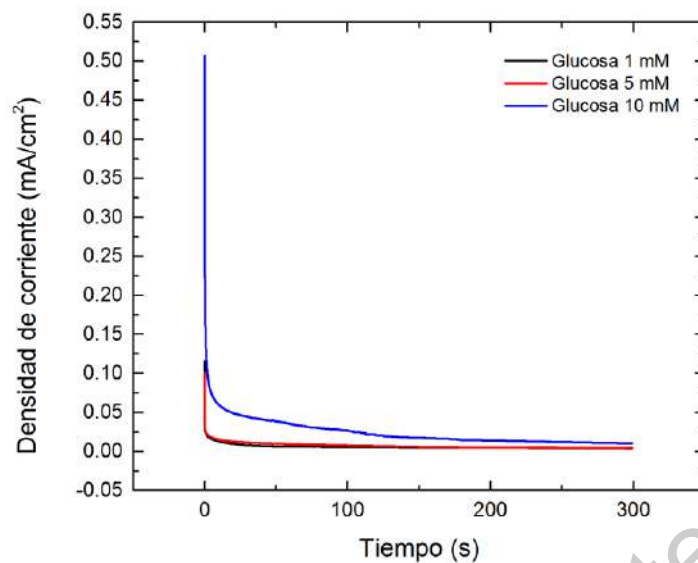


Figura 42: Cronoamperometría para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con Vulcan en el ánodo para glucosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

La Figura 43 muestra la prueba de cronoamperometría para la celda completa del sistema A con fructosa. La densidad de corriente decrece rápidamente para todas las concentraciones indicando que el consumo del carbohidrato ocurre de forma instantánea.

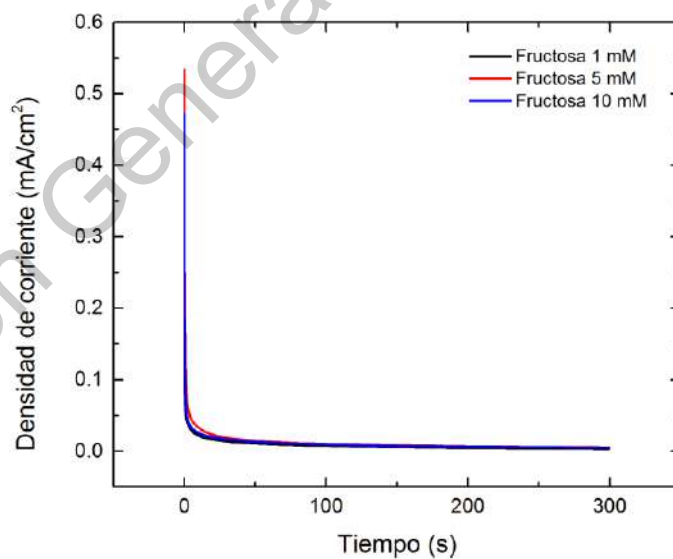


Figura 43: Cronoamperometría para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con Vulcan en el ánodo para fructosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

La Figura 44 muestra la prueba de cronoamperometría para la celda completa del sistema A con maltosa. Se observa una caída en la densidad de corriente hasta llegar a valores de 0.03

mA/cm^2 para el caso de la concentración de 1 mM. En el caso de las concentraciones de 5 y 10 mM se observa que la densidad de corriente decrece más rápidamente.

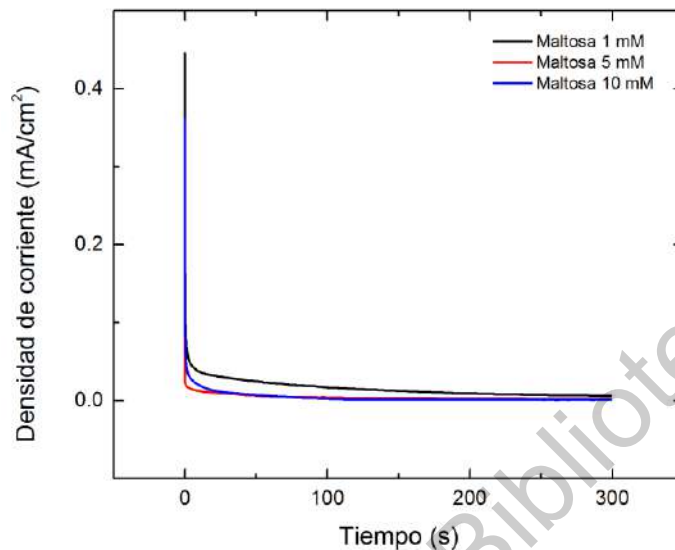


Figura 44: Cronoamperometría para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con Vulcan en el ánodo para maltosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $\text{C}_6\text{FeK}_4\text{N}_6$ 1 mM.

La Figura 45 muestra la prueba de cronoamperometría para la celda completa del sistema A con sacarosa. Nuevamente la densidad de corriente decrece rápidamente hasta llevar a valores de $0.05 \text{ mA}/\text{cm}^2$ para el caso de la concentración de 5 mM, a partir de donde comienza a bajar más lentamente. La concentración de 10 mM decrece hasta llegar a una densidad de corriente de $0.02 \text{ mA}/\text{cm}^2$, desde donde continúa decreciendo lentamente.

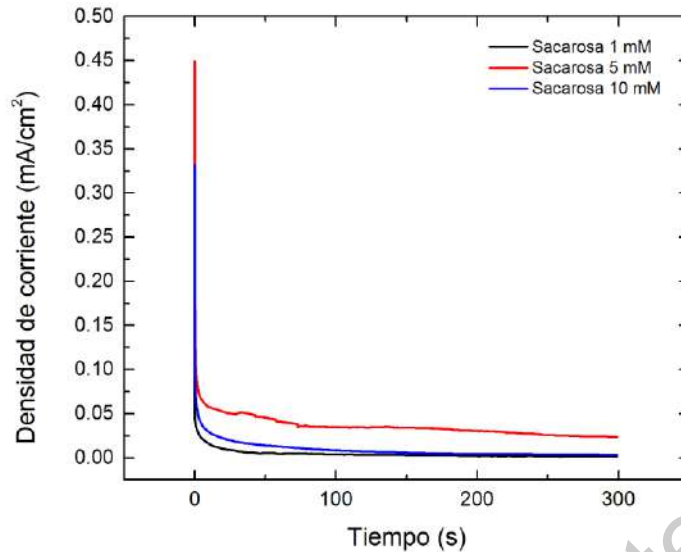


Figura 45: Cronoamperometría para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con Vulcan en el ánodo para sacarosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

7.3.5 Curvas de descarga y polarización

Las curvas de descarga para la celda completa del sistema A con el blanco y los distintos carbohidratos se muestran en las Figuras 46, 47, 48, 49 y 50. Se puede observar el mismo perfil para las curvas de descarga de cada gráfica. Lo primero que se puede notar es que no hay caídas de potencial a bajas densidades de corriente, lo cual indica que no hay pérdidas por polarización de activación, lo que se refiere a que el carbohidrato se consume directamente por el microorganismo al entrar en contacto con el mismo. A continuación, se sigue una caída de potencial debida a pérdidas óhmicas la cual no es completamente lineal hasta llegar a densidades de corriente altas, por lo que se puede indicar que además de pérdidas óhmicas, desde densidades de corriente bajas la polarización de concentración tiene un efecto negativo en la celda de combustible. La polarización de concentración se debe a que los productos de la reacción de oxidación del carbohidrato permanecen en la zona de contacto entre el carbohidrato y la levadura, por lo que entran en su camino y dificultan el consumo correcto del mismo por parte del microorganismo. En la Figura 46 se pueden observar las curvas de descarga y de polarización para la celda completa del sistema A con una solución blanco en ausencia de carbohidratos pero con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM. Se puede

observar que el valor máximo de densidad de corriente obtenido en esta gráfica es de 0.0311 mA/cm² y el valor máximo de densidad de potencia es de 0.00395 mW/cm².

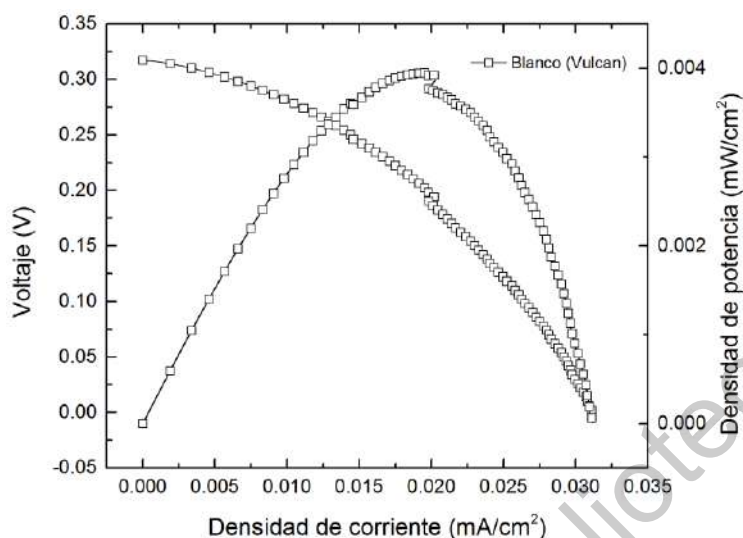


Figura 46: Curva de descarga y polarización para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con Vulcan en el ánodo para C₆FeK₄N₆ 1 mM en ausencia de los azúcares de interés.

La Figura 47 muestra las curvas de descarga de la celda completa del sistema A para glucosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM. Nuevamente se puede observar en la curva de descarga que no se presentan pérdidas apreciables por polarización de activación, lo que se debe a que la glucosa es oxidada y consumida por el microorganismo al momento de entrar en contacto con el mismo, pero se pueden observar pérdidas por polarización de concentración conforme se acerca a valores altos de densidad de corriente, lo que indica que no hay remoción de los productos de la reacción con la glucosa y permanecen como un obstáculo para el consumo de la glucosa por parte de la levadura. Para glucosa 1 mM se obtuvieron valores máximos de 0.008 mA/cm² y de 0.000608 mW/cm² para densidad de corriente y densidad de potencia respectivamente. Para la concentración de 5 mM estos valores fueron de 0.0109 mA/cm² y de 0.00093 mW/cm² y para la concentración de 10 mM los valores fueron de 0.015 mA/cm² y de 0.000954 mW/cm² lo que indica un aumento en densidades de corriente y de potencia conforme aumenta la concentración.

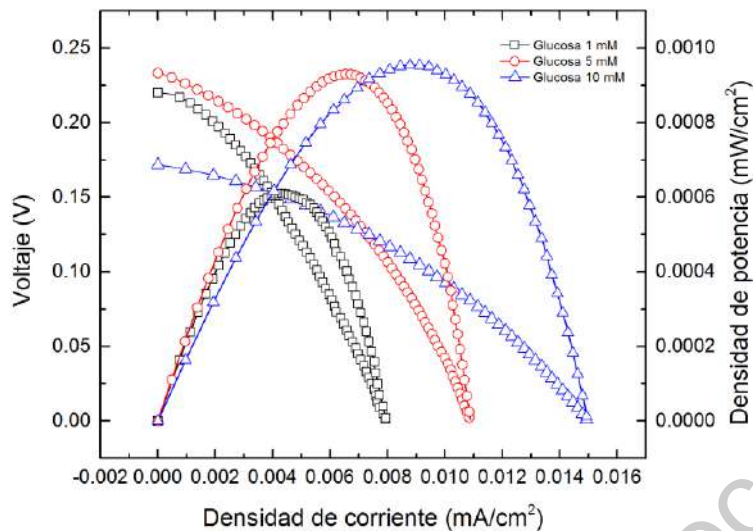


Figura 47: Curvas de descarga y polarización para celda de combustible microfluidica con tinta catalitica de levadura con Vulcan en el ánodo para glucosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

La Figura 48 muestra las curvas de descarga para la celda completa del sistema A con fructosa a concentraciones de 1, 5 y 10 mM. Para este caso, de manera similar a la glucosa, no se observan pérdidas apreciables por polarización de activación por lo que la fructosa también se consume por parte de la levadura al entrar en contacto directo con la misma, pero se ve un aumento en las pérdidas por polarización de concentración conforme se acerca a valores mayores de densidad de corriente, lo cual se debe a que se acumulan los productos de la reacción de oxidación de fructosa en la celda de combustible. Los valores máximos de densidad de corriente y densidad de potencia son de 0.0248 mA/cm^2 y 0.0014 mW/cm^2 para 1 mM, 0.0244 mA/cm^2 y 0.00176 mW/cm^2 para 5 mM y de 0.0192 mA/cm^2 y 0.00169 mW/cm^2 para 10 mM.

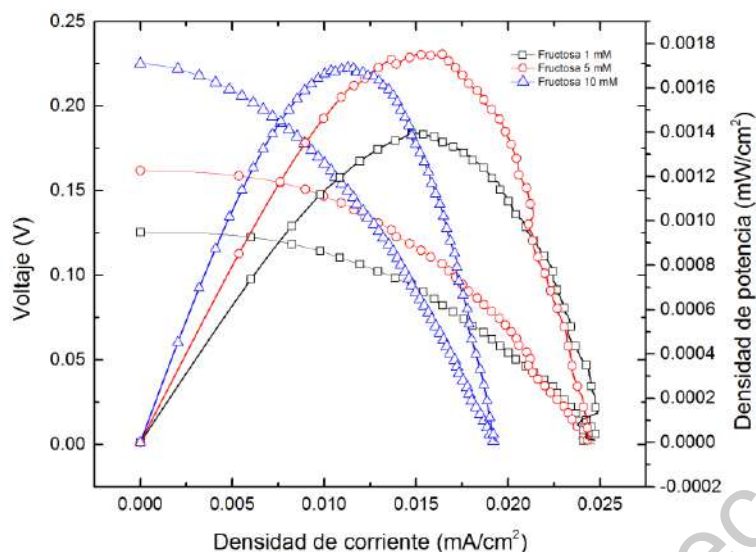


Figura 48: Curvas de descarga y polarización para celda de combustible microfluidica con tinta catalitica de levadura con Vulcan en el ánodo para fructosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

La Figura 49 muestra las curvas de descarga para la celda completa del sistema A con maltosa a concentraciones de 1, 5 y 10 mM. De nuevo se observa la forma de la gráfica mencionada previamente para glucosa y fructosa, lo cual concuerda con el hecho de que la maltosa es un disacárido constituido de glucosa y fructosa, separado por hidrólisis por la enzima maltasa por lo que se siguen las mismas vías de consumo que para la glucosa y para la fructosa. Los valores máximos de densidad de corriente y densidad de potencia son de 0.028 mA/cm^2 y 0.002 mW/cm^2 para 1 mM, 0.035 mA/cm^2 y 0.0031 mW/cm^2 para 5 mM y de 0.0265 mA/cm^2 y 0.00334 mW/cm^2 para 10 mM. Nuevamente no se presentan pérdidas por polarización de activación lo que indica que el metabolito y enzima maltasa se encuentran presentes dentro de la levadura desde antes de llevar a cabo la reacción de oxidación de la maltosa, a pesar de que la producción de maltasa por parte de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* se lleva a cabo cuando se tiene contacto con la maltosa por parte de la cepa. De nuevo se observan pérdidas por polarización de concentración debidas a que se acumulan los productos de la oxidación de la maltosa y de sus monosacáridos constituyentes dentro de la celda de combustible.

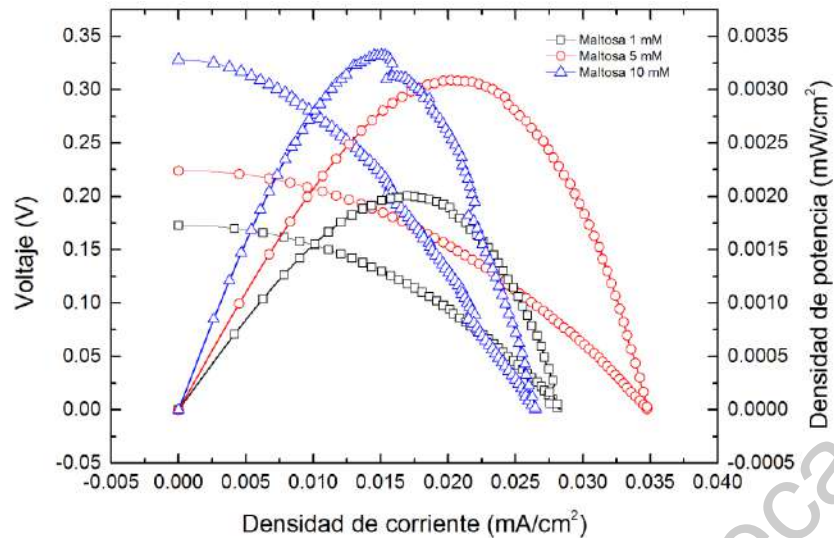


Figura 49: Curvas de descarga y polarización para celda de combustible microfluidica con tinta catalitica de levadura con Vulcan en el ánodo para maltosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

La Figura 50 muestra las curvas de descarga para la celda completa del sistema A con sacarosa a concentraciones de 1, 5 y 10 mM. De nuevo se observa la forma de la gráfica mencionada previamente para glucosa, lo cual se debe al hecho de que la sacarosa es un disacárido constituido de dos moléculas de glucosa, separada por hidrólisis por la enzima sacarasa por lo que se siguen las mismas vías de consumo que para la glucosa. Los valores máximos de densidad de corriente y densidad de potencia son de 0.0124 mA/cm^2 y 0.001 mW/cm^2 para 1 mM, 0.0159 mA/cm^2 y 0.0018 mW/cm^2 para 5 mM y de 0.0191 mA/cm^2 y 0.00184 mW/cm^2 para 10 mM. En este caso las pérdidas por polarización de activación se pueden considerar nulas, al igual que en los casos anteriores lo que indica que la levadura comienza a consumir la sacarosa al momento de entrar en contacto con ella. Esto solo es posible si hay presencia de la enzima sacarasa desde antes de que la cepa tenga contacto con la sacarosa. Las pérdidas por polarización de concentración van aumentando conforme aumenta la densidad de corriente dentro de la gráfica, lo que indica que se acumulan los productos de la oxidación de la sacarosa y de sus monosacáridos constituyentes dentro de la celda de combustible.

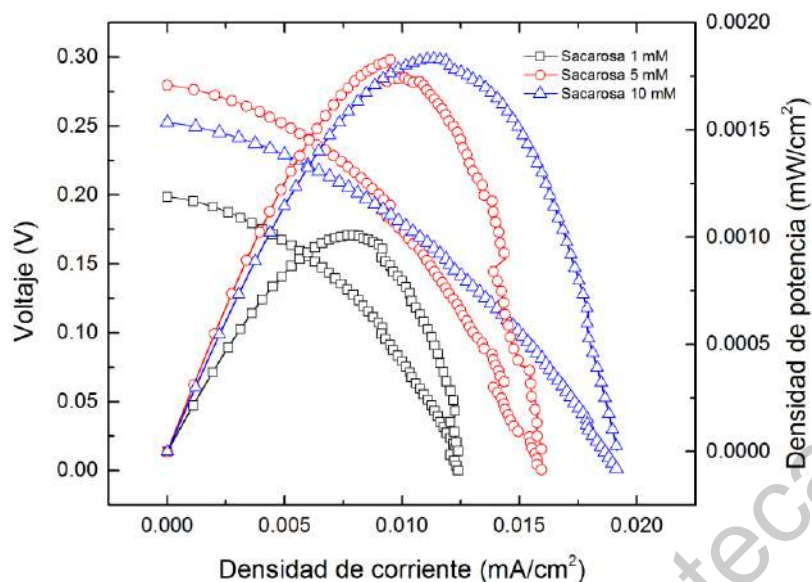


Figura 50: Curvas de descarga y polarización para celda de combustible microfluidica con tinta catalitica de levadura con Vulcan en el ánodo para sacarosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

Es interesante observar que para el sistema A el potencial de circuito abierto así como las densidades de corriente para el blanco fueron superiores que para la mayoría de las soluciones con presencia de carbohidratos. Esto podría deberse a que el coeficiente de difusión en el sistema para el mediador ferrocianuro de potasio se ve afectado en presencia de los carbohidratos de interés, lo que afecta la transferencia de electrones. La alta porosidad del carbón Vulcan es una propiedad deseable para la reacción de reducción de oxígeno en el cátodo, sin embargo podría afectar a la conductividad en el ánodo. La maltosa al liberar dos moléculas de glucosa al separarse produce un potencial de circuito abierto superior al de los demás, de 0.536 V para una concentración de 1 mM lo que indica que al consumir el doble de la cantidad de glucosa se genera mayor energía.

7.4 Sistema B: Celda con óxido de grafeno

7.4.1 Voltametrías cíclicas

Las pruebas de voltametría cíclica con electrodo de carbón vítreo modificado con la tinta catalítica anódica de levadura con óxido de grafeno se muestran en las Figuras 51, 52, 53 y 54. En la Figura 51 se muestran las voltametrías cíclicas para glucosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10, 20 mM. Los picos anódicos se encuentran a aproximadamente 0.43 V, el

cual es un voltaje ligeramente superior al obtenido para las voltametrías de glucosa con el sistema A. También se pueden observar picos catódicos a 0.33 V. Estos picos se deben a la reacción de la levadura con la glucosa, a la cual consume para su propia energía y por medio de la cadena respiratoria mitocondrial produce electrones.

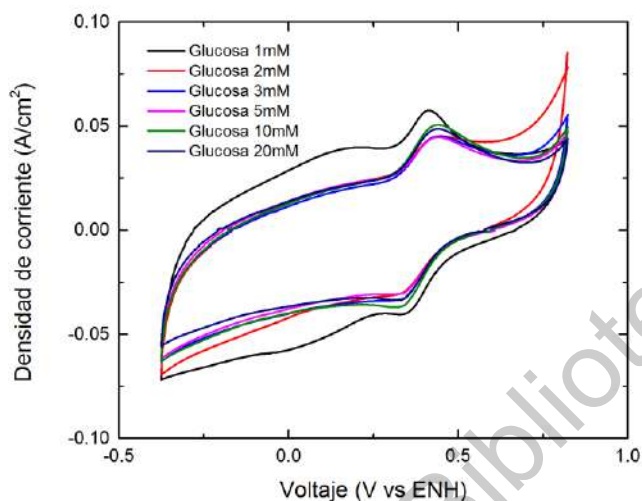


Figura 51: Voltametrías cíclicas de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno para glucosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

En la Figura 52 se muestran las voltametrías cíclicas para fructosa con la tinta catalítica del sistema B con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10, 20 mM. Se observan los picos anódicos a aproximadamente 0.43 V para todas las concentraciones y los picos catódicos a 0.33 V para todas las concentraciones. Estos picos se deben al consumo de fructosa por parte de la levadura por medio del proceso que se muestra en la Figura 28, para producir energía para el microorganismo. A lo largo de la cadena respiratoria del microorganismo, se produce energía eléctrica la cual es captada por el electrodo de carbón vítreo de la prueba de voltametría cíclica. La levadura forma enlaces con los distintos grupos funcionales que se encuentran en el óxido de grafeno, lo cual facilita el mecanismo de transferencia de electrones con el electrodo.

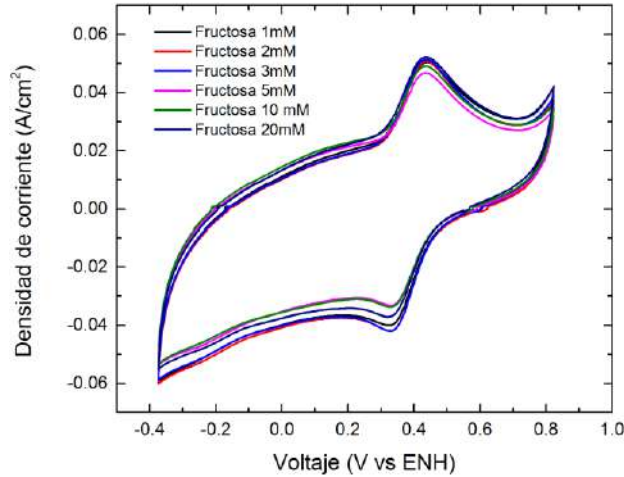


Figura 52: Voltametrías cíclicas de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno para fructosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

En la Figura 53 se muestran las voltametrías cíclicas para maltosa con la tinta catalítica del sistema B con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10, 20 mM. Los picos anódicos y catódicos se pueden observar a 0.43 V y 0.33 V respectivamente, muy similar a los observados para glucosa y fructosa lo cual se debe a que es un disacárido conformado por ambos monosacáridos como ha sido mencionado previamente, por lo que sigue las mismas vías metabólicas dentro de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La maltosa es separada en sus monosacáridos constituyentes por medio de la enzima maltasa, los cuales son consumidos por el microorganismo para obtener energía de los mismos.

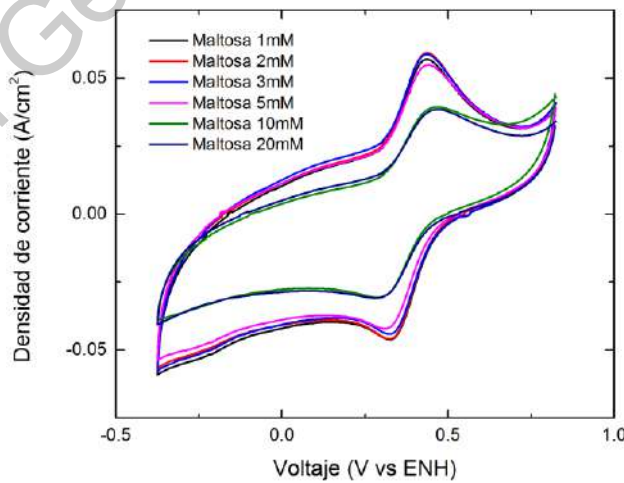


Figura 53: Voltametrías cíclicas de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno para maltosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

En la Figura 54 se muestra la voltametría cíclica para sacarosa con la tinta catalítica del sistema B con concentración de 1 mM. El pico anódico se encuentra a 0.449 V y el pico catódico se encuentra a 0.315 V, Nuevamente similares a los mostrados para glucosa ya que es un disacárido de glucosa, por lo que sigue su misma vía metabólica. El disacárido sacarosa se separa en dos moléculas de glucosa por medio de la enzima sacarasa la cual está presente dentro de la cepa *Saccharomyces cerevisiae*. Estos monosacáridos de glucosa son consumidos por la vía metabólica mencionada en la Figura 28.

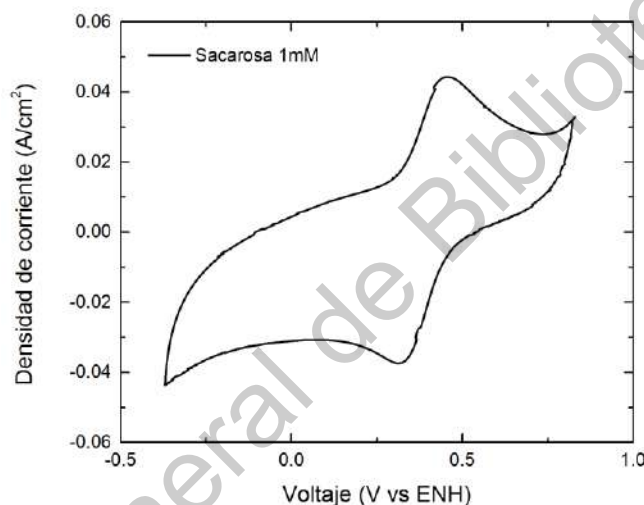


Figura 54: Voltametría cíclica de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno para sacarosa con concentración de 1 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

7.4.2 Voltametrías de pulso diferencial

Las Figuras 55, 56 y 57 muestran las voltametrías de pulso diferencial aplicadas a glucosa, fructosa y maltosa para un sistema de media celda con un electrodo de carbón vítreo modificado con la tinta catalítica del sistema B que contiene levadura y óxido de grafeno. En la Figura 55 se muestran las voltametrías de pulso diferencial para la glucosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM. Los picos se pueden observar a 0.38 V. Se puede observar una diferencia característica en todas las pruebas de voltametría de pulso diferencial del sistema B con respecto al sistema A y es que las del sistema B comienzan con una

densidad de corriente mayor, la cual se debe a que el contacto de la levadura con el carbón Vulcan es distinto al contacto que tiene con el óxido de grafeno, al formar enlaces iónicos con los grupos funcionales que se encuentran en el mismo.

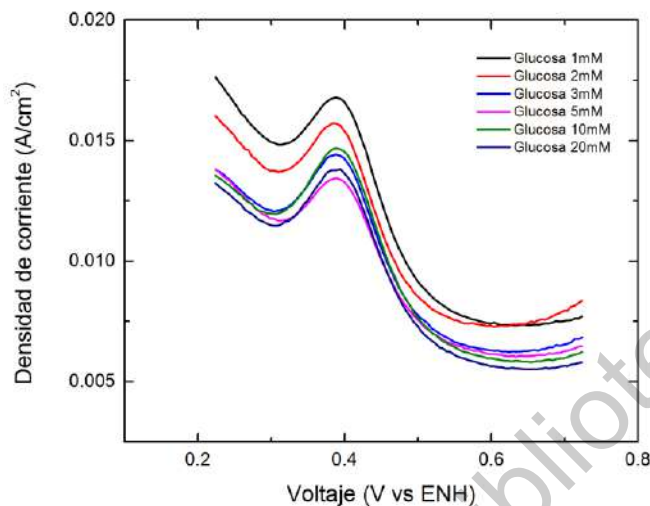


Figura 55: Voltametrías de pulso diferencial de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno para glucosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

En la Figura 56 se muestran las voltametrías de pulso diferencial para la fructosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM. Los picos se observan nuevamente a aproximadamente 0.38 V para todas las concentraciones, muy cercano a los valores obtenidos para la glucosa, debido a que siguen una vía metabólica similar (Figura 28). De nuevo se observa que los valores de densidad de corriente comienzan más altos que aquellos observados en las pruebas del sistema A, lo que indica que hay mayor flujo de electrones desde el comienzo de la prueba debido a los enlaces que forma la levadura con los grupos funcionales del óxido de grafeno del sistema B

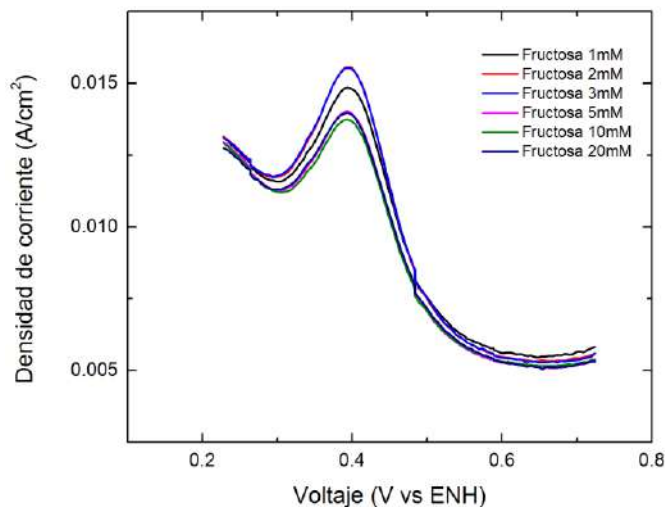


Figura 56: Voltametrías de pulso diferencial de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno para fructosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

En la Figura 57 se muestran las voltametrías de pulso diferencial para la maltosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM. El pico se encuentra a 0.38 V, similar a los resultados obtenidos para la glucosa y la fructosa debido a que la maltosa es un disacárido de las mismas, por lo cual sigue las mismas vías metabólicas dentro del microorganismo *Saccharomyces cerevisiae*. Al ser separada en sus monosacáridos constituyentes por la enzima maltasa, se convierte en glucosa y fructosa, las cuales son consumidas de forma similar a la observada en las Figuras 56 y 55. La densidad de corriente comienza con valores superiores a los del sistema A debido al mecanismo de transferencia de electrones que se ve modificado por el óxido de grafeno, con el cual forma enlaces debido a los grupos funcionales con los que cuenta.

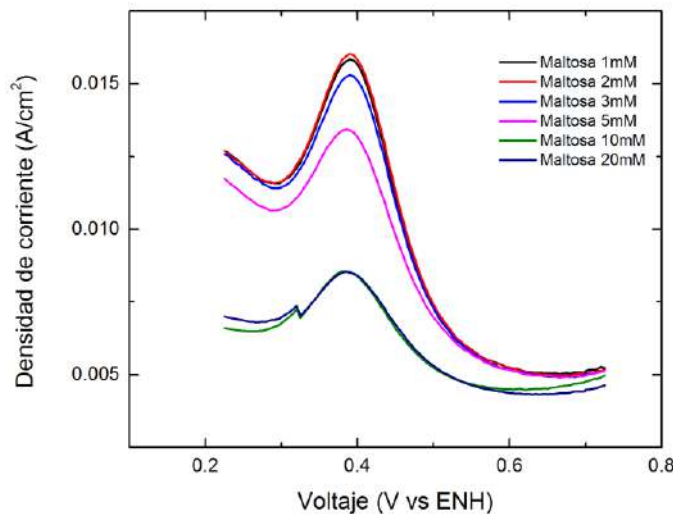


Figura 57: Voltametrías de pulso diferencial de carbón vítreo modificado con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno para maltosa con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 y 20 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

7.4.3 Potencial de circuito abierto

En las Figuras 58, 59, 60, 61 y 62 se muestran las pruebas de potencial de circuito abierto para el blanco, la glucosa, la fructosa, la maltosa y la sacarosa con la celda completa del sistema B. En la Figura 58 Se observa el potencial con una solución blanco en ausencia de carbohidratos con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM. El potencial máximo alcanzado con esta prueba fue de 0.67 V. A pesar de haber una ausencia de carbohidratos, los valores de potencial obtenidos en esta prueba son superiores a aquellos obtenidos en las pruebas de potencial de circuito abierto del sistema A. El óxido de grafeno favorece el mecanismo de transferencia de electrones al formar enlaces con la cepa *Saccharomyces cerevisiae* para pasar los electrones generados en la respiración celular hacia el electrodo de la celda de combustible.

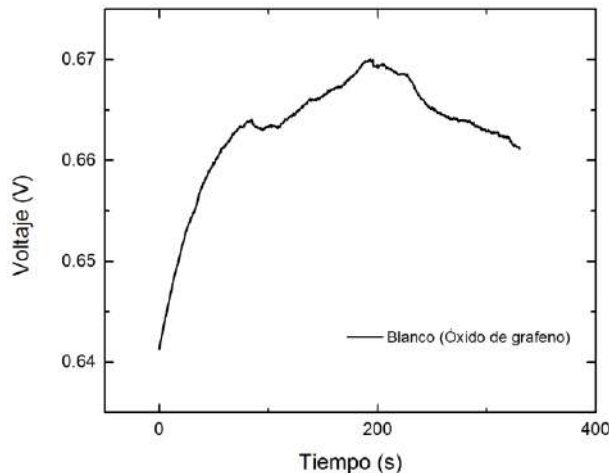


Figura 58: Potencial de circuito abierto para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para $C_6FeK_4N_6$ 1 mM en ausencia de las azúcares de interés.

En la Figura 59 se muestran los resultados de la prueba de potencial de circuito abierto para la glucosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM. Los valores máximos de voltaje obtenidos para cada prueba fueron de 0.887 V, 0.936 V y 0.85 V para las concentraciones de 1, 5 y 10 mM, respectivamente. Han sido reportadas en la literatura celdas de combustible que hacen uso de glucosa, *Saccharomyces cerevisiae* que han obtenido valores de potencial de circuito abierto máximos de 0.479 V y 0.689 V, lo que indica que la celda de combustible desarrollada puede producir potenciales de circuito abierto comparables con los valores reportados previamente (Rossi R. et al, 2015) (Permana D., 2015). Los valores que se observan son muy superiores a aquellos que se observan en las pruebas con el sistema A el cual contiene carbón Vulcan, lo cual se debe a que la levadura forma enlaces con el óxido de grafeno que facilitan el mecanismo de transferencia de electrones directa con el electrodo de la celda de combustible. Se observa un decremento en los valores de voltaje a partir de que llegan a su valor máximo, lo cual se debe a que la cepa consume la glucosa y los productos de la oxidación de la misma permanecen en la zona de contacto con la levadura, lo cual permanece como un obstáculo para el consumo de nuevas moléculas de glucosa.

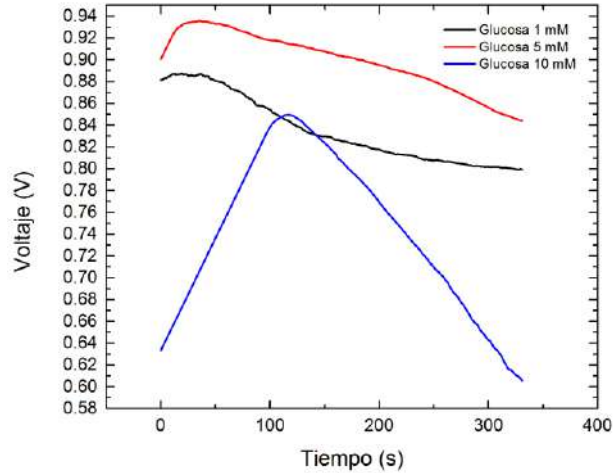


Figura 59: Potencial de circuito abierto para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para glucosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

En la Figura 60 se muestran los resultados de la prueba de potencial de circuito abierto para la fructosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM. Los valores máximos de voltaje obtenidos para cada concentración fueron de 0.722 V para 1 mM, 0.713 V para 5 mM y 0.764 V para 10 mM, lo que indica que hubo un aumento en el potencial de circuito abierto para cada aumento en la concentración. Se puede observar también que después de llegar al valor máximo, decrece lentamente el valor del voltaje, lo cual podría deberse al consumo del carbohidrato por parte de la levadura, por medio del cual se generan productos que permanecen en la misma zona que la levadura y obstaculizan la llegada de nuevas moléculas de glucosa para ser consumidas por parte de la cepa. Los valores obtenidos en esta prueba son superiores a los obtenidos en el sistema A debido a la presencia de óxido de grafeno el cual facilita el mecanismo de transferencia de electrones directa, a comparación del carbón Vulcan el cual no cuenta con grupos funcionales para formar enlaces con la cepa *Saccharomyces cerevisiae*.

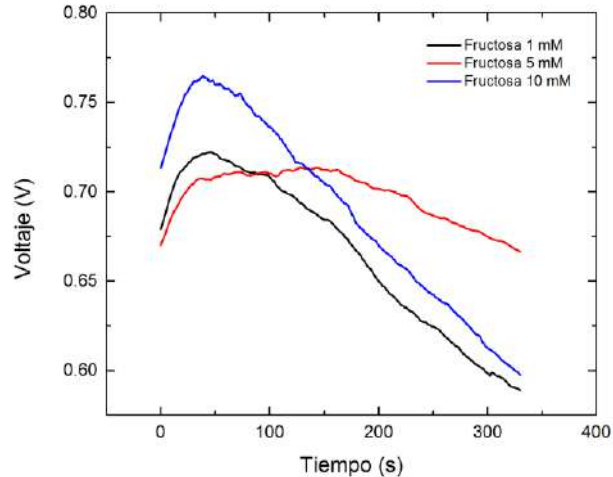


Figura 60: Potencial de circuito abierto para celda de combustible microfluidica con tinta catalitica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para fructosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

En la Figura 61 se muestran los resultados de la prueba de potencial de circuito abierto para la maltosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM. Los valores máximos de voltaje obtenidos para cada concentración fueron de 0.779 V para 1 mM, 0.695 V para 5 mM y 0.737 V para 10 mM. De nuevo se observa que el potencial decrece lentamente, lo cual podría estar asociado al consumo del carbohidrato por parte de la levadura y la ausencia de capilaridad para remover los productos de la oxidación de la maltosa y de sus monosacáridos constituyentes los cuales son glucosa y sacarosa. La enzima maltasa se encarga de separar a la maltosa por medio de hidrólisis para luego hacer pasar a la glucosa y a la fructosa por sus vías metabólicas. Posteriormente pasan a la cadena de respiración celular donde se generan electrones que viajan de forma extracelular a través de proteínas como lo es el citocromo hacia el óxido de grafeno por medio de enlaces no covalentes. Debido a la alta conductividad del óxido de grafeno, éste hace pasar los electrones al electrodo de la celda de combustible.

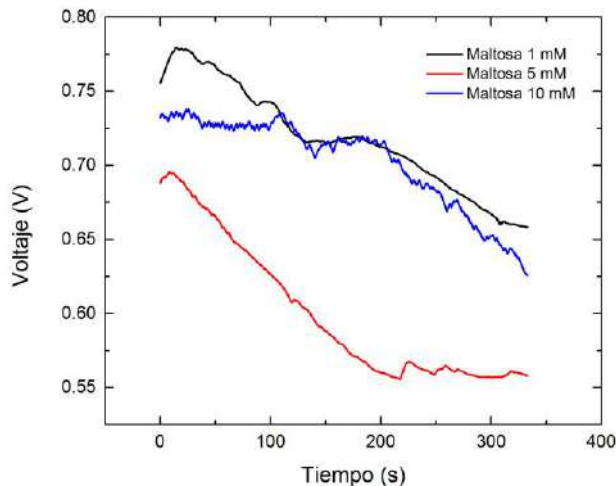


Figura 61: Potencial de circuito abierto para celda de combustible microfluidica con tinta catalitica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para maltosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

En la Figura 62 se muestran los resultados de la prueba de potencial de circuito abierto para la sacarosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM. Los valores máximos de voltaje obtenidos para cada concentración fueron de 0.855 V para 1 mM, 0.832 V para 5 mM y 0.709 V para 10 mM. Al igual que en las gráficas anteriores, se observa un decrecimiento del valor de voltaje con respecto al tiempo asociado al consumo del carbohidrato por parte de la levadura y a la falta de remoción de los productos de la oxidación de los monosacáridos constituyentes de la sacarosa, obtenidos por medio de la hidrólisis de la misma por parte de la enzima sacarasa. Los electrones que se generan en la cadena respiratoria celular pasan al óxido de grafeno que posteriormente tiene contacto con el electrodo del ánodo de la celda de combustible.

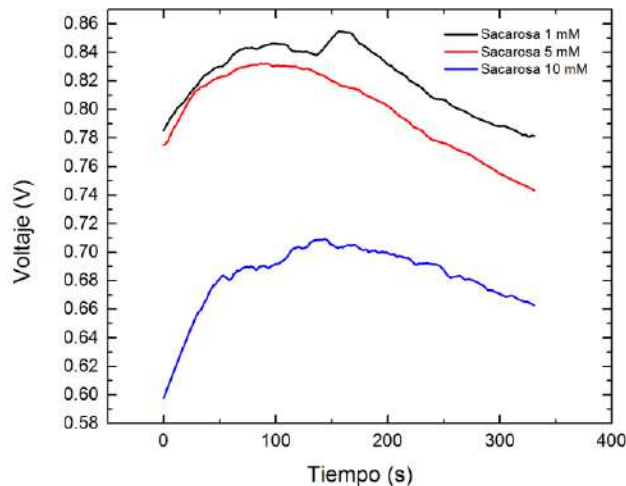


Figura 62: Potencial de circuito abierto para celda de combustible microfluidica con tinta catalitica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para sacarosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

7.4.4 Cronoamperometría

Las Figuras 63, 64, 65, 66 y 67 muestran las pruebas de cronoamperometria para la celda completa del sistema B con el blanco y los distintos carbohidratos glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa. La Figura 63 muestra la prueba de cronoamperometría para la celda completa del sistema B con una solución blanco, con ausencia de carbohidratos pero presencia de mediador $C_6FeK_4N_6$ 1 mM. Se muestra que la densidad de corriente decrece rápidamente hasta llegar a un valor aproximado de 0.02 mA/cm^2 , donde decrece más lentamente.

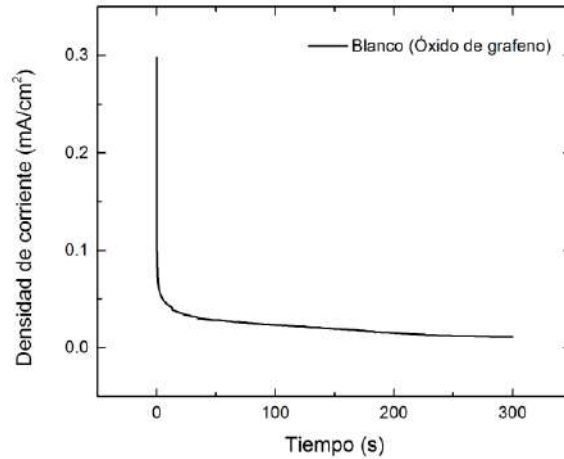


Figura 63: Cronoamperometría para celda de combustible microfluidica con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para $C_6FeK_4N_6$ 1 mM en ausencia de los azúcares de interés.

La Figura 64 muestra la prueba de cronoamperometría para la celda completa del sistema B con glucosa para concentraciones de 1, 5 y 10 mM. Se observa que la corriente decrece rápidamente debido a que se consume el carbohidrato presente. Sin embargo la corriente se estabiliza para valores de 0.1 mA/cm^2 en el caso de la concentración de 5 mM, y en 0.025 mA/cm^2 para el caso de la concentración de 10 mM.

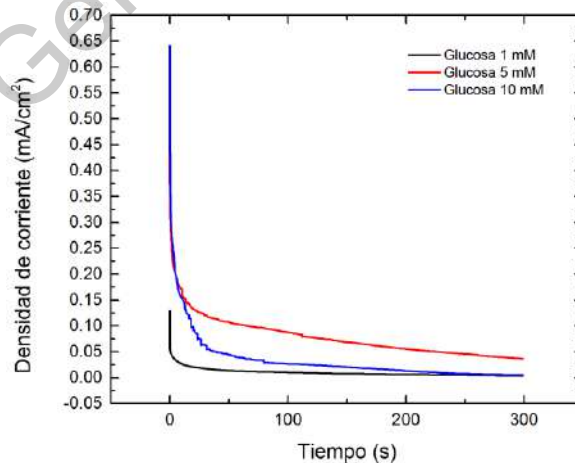


Figura 64: Cronoamperometría para celda de combustible microfluidica con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para glucosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

La Figura 65 muestra la prueba de cronoamperometría para la celda completa del sistema B con fructosa para concentraciones de 1, 5 y 10 mM. Se observa que la densidad de corriente se estabiliza a valores de 0.4 mA/cm² para la concentración de 5 mM y a 0.2 mA/cm² para las concentraciones de 1 y 10 mM.

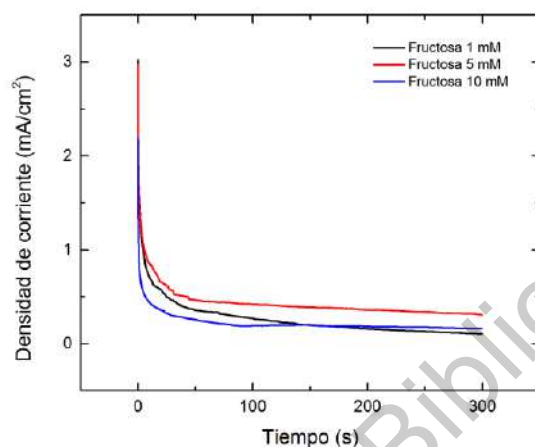


Figura 65: Cronoamperometrías para celda de combustible microfluidica con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para fructosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

La Figura 66 muestra la prueba de cronoamperometría para la celda completa del sistema B con maltosa para concentraciones de 1, 5 y 10 mM. Se observa que para la concentración de maltosa de 1 mM la densidad de corriente se estabiliza a 0.5 mA/cm² a partir de donde comienza a decrecer más lentamente. En el caso de la concentración de 10 mM la corriente se estabiliza a 0.3 mA/cm².

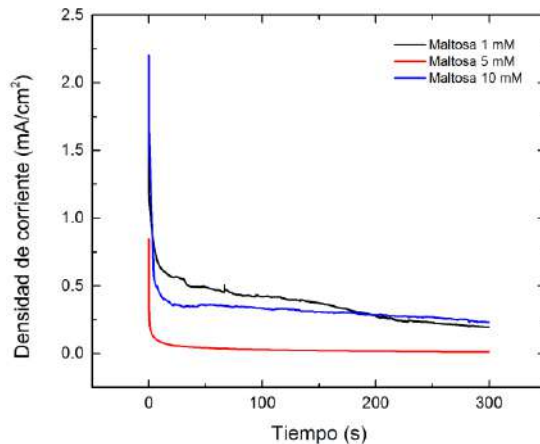


Figura 66: Cronoamperométricas para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para maltosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

La Figura 67 muestra las pruebas de cronoamperometría para la celda completa del sistema B con sacarosa para concentraciones de 1, 5 y 10 mM. Se observa que la densidad de corriente se estabiliza a 0.4 mA/cm^2 para la concentración de 10 mM, mientras que se estabiliza a valores de 0.1 mA/cm^2 para las concentraciones de 1 y 5 mM.

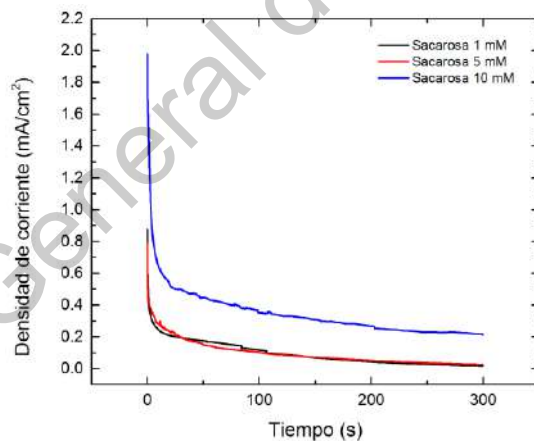


Figura 67: Cronoamperométricas para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para sacarosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

7.4.5 Curvas de descarga y polarización

Las curvas de descarga para la celda completa del sistema B con el blanco y los distintos carbohidratos se muestran en las Figuras 68, 69, 70, 71 y 72. Se puede observar el mismo perfil para las curvas de descarga de cada gráfica. Lo primero que se puede notar es que no hay caídas de potencial a bajas densidades de corriente, lo cual indica que no hay pérdidas por polarización de activación, por lo que las distintas azúcares son consumidas desde el momento en que entran en contacto con la levadura. A continuación, se sigue una caída de potencial debida a pérdidas óhmicas la cual, a diferencia de las que se pudieron observar para las gráficas del sistema A, son más lineales, las cuales representan pérdidas óhmicas debidas al sistema de la celda de combustible ya sea el contacto con los electrodos, el electrolito de la solución y etc. En la Figura 68 se pueden observar las curvas de descarga y de polarización para la celda completa del sistema B con una solución blanco en ausencia de carbohidratos pero con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM. Se puede observar que el valor máximo de densidad de corriente obtenido en esta gráfica es de 0.0256 mA/cm^2 y el valor máximo de densidad de potencia es de 0.003 mW/cm^2 .

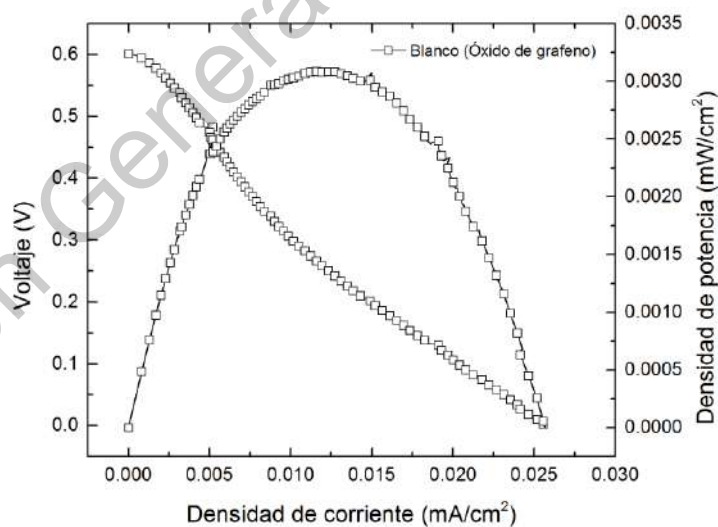


Figura 68: Curva de descarga y polarización para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para $C_6FeK_4N_6$ 1 mM en ausencia de las azúcares de interés.

La Figura 69 muestra las curvas de descarga de la celda completa del sistema B para glucosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM. Se puede observar en la curva de descarga que no se presentan pérdidas apreciables por polarización de activación lo que indica que la levadura consume la glucosa desde el momento en que entra en contacto con ella, pero se observa un comportamiento lineal en la caída de potencial que se debe a pérdidas óhmicas del sistema de la celda de combustible. También se observa una caída al final de las curvas de descarga que se debe a la polarización de concentración, sin embargo no es tan notoria como las que se pueden observar en la Figura 41 para el sistema A. Para glucosa 1 mM se obtuvieron valores máximos de 0.0716 mA/cm^2 y de 0.0086 mW/cm^2 para densidad de corriente y densidad de potencia respectivamente. Para la concentración de 5 mM estos valores fueron de 0.1424 mA/cm^2 y de 0.0174 mW/cm^2 y para la concentración de 10 mM los valores fueron de 0.3372 mA/cm^2 y de 0.063 mW/cm^2 lo que indica un aumento en densidades de corriente y de potencia conforme aumenta la concentración. Los valores de densidad de corriente y densidad de potencia son superiores a los obtenidos para el sistema A, lo cual se debe a la transferencia de electrones que se ve modificada por el uso de óxido de grafeno en las celdas de combustible del sistema B.

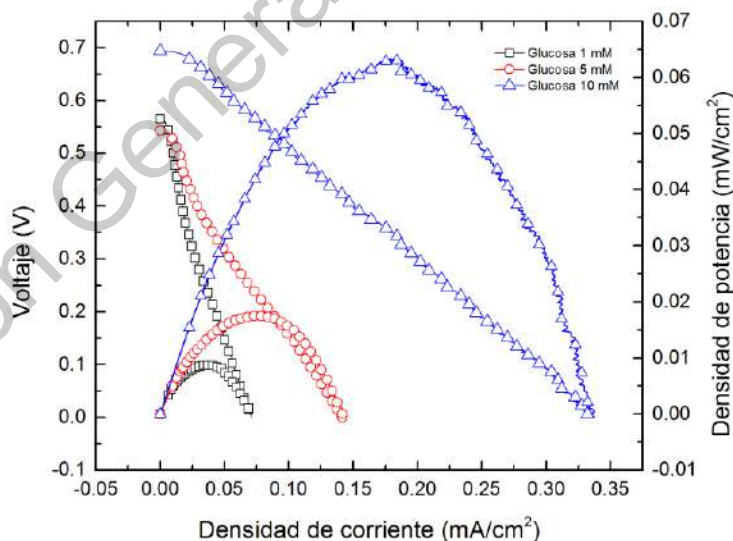


Figura 69: Curvas de descarga y polarización para celda de combustible microfluidica con tinta catalitica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para glucosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $C_6FeK_4N_6$ 1 mM.

La Figura 70 muestra las curvas de descarga para la celda completa del sistema B con fructosa a concentraciones de 1, 5 y 10 mM. Se puede observar que no hay pérdidas debido a cruce de combustible, ya que solo se trabaja con una solución mientras que el oxígeno se obtiene del aire. De nuevo no se observan pérdidas debido a la polarización de activación debido a que la fructosa se consume al entrar en contacto con la levadura, sin embargo comenzando la curva de descarga se observa una ligera caída de potencial debida a pérdidas óhmicas que se estabilizan. Otra característica a destacar es que no se perciben pérdidas debido a polarización de concentración al llegar a densidades de corriente altas lo que indica que la acumulación de productos de la oxidación de fructosa es nula en la zona de contacto con el electrodo. Los valores máximos de densidad de corriente y densidad de potencia son de 0.1722 mA/cm^2 y 0.0365 mW/cm^2 para 1 mM, 0.254 mA/cm^2 y 0.0492 mW/cm^2 para 5 mM y de 0.1889 mA/cm^2 y 0.033 mW/cm^2 para 10 mM.

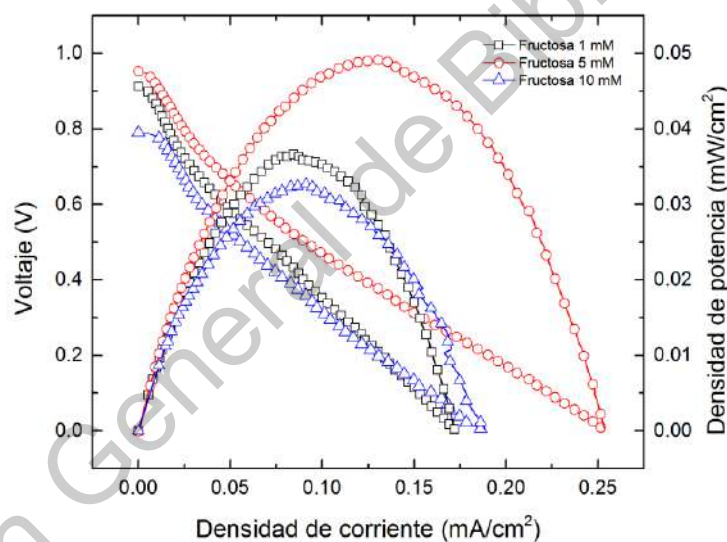


Figura 70: Curvas de descarga y polarización para celda de combustible microfluidica con tinta catalitica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para fructosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $\text{C}_6\text{FeK}_4\text{N}_6$ 1 mM.

La Figura 71 muestra las curvas de descarga para la celda completa del sistema B con maltosa a concentraciones de 1, 5 y 10 mM. Se observa que no hay pérdidas de voltaje debido a cruce de combustible al igual que en el caso de la fructosa, y de nuevo no caída de potencial debido a pérdidas por polarización de activación, lo que indica que se lleva a cabo hidrólisis de la maltosa por medio de la enzima maltasa y es separada en sus monosacáridos constituyentes que luego son consumidos desde el comienzo de la curva de descarga. Es interesante observar que hay una caída de potencial a altas densidades de corriente, asociada a polarización de

concentración, lo que indica que los productos de la oxidación de la maltosa y de los monosacáridos constituyentes de la misma. Los valores máximos de densidad de corriente y densidad de potencia son de 0.0468 mA/cm^2 y 0.0108 mW/cm^2 para 1 mM, 0.0862 mA/cm^2 y 0.0154 mW/cm^2 para 5 mM y de 0.098 mA/cm^2 y 0.0192 mW/cm^2 para 10 mM. Estos valores son muy superiores a los obtenidos en el sistema A. El óxido de grafeno favorece la transferencia de electrones entre la levadura y el electrodo a comparación del carbón Vulcan.

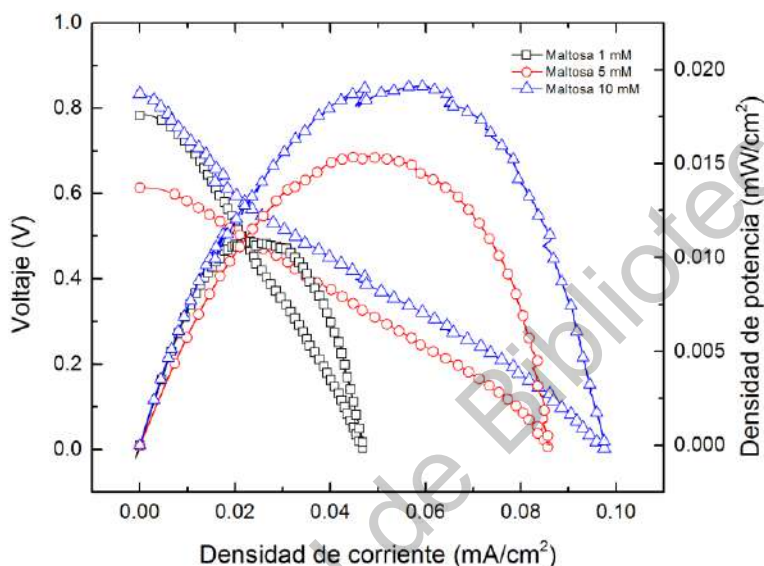


Figura 71: Curvas de descarga y polarización para celda de combustible microfluidica con tinta catalitica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para maltosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $\text{C}_6\text{FeK}_4\text{N}_6$ 1 mM.

La Figura 72 muestra las curvas de descarga para la celda completa del sistema B con sacarosa a concentraciones de 1, 5 y 10 mM. Se observa que no hay pérdidas de voltaje debido a cruce de combustible además de que no hay pérdidas por polarización de activación lo que indica que al entrar en contacto la levadura con la sacarosa, la enzima sacarasa lleva a cabo la hidrólisis de la misma y la separa en sus monosacáridos constituyentes, los cuales son dos moléculas de glucosa que posteriormente son consumidos por el microorganismo. Sin embargo se presenta una caída de potencial que podría asociarse a pérdidas óhmicas del mismo diseño de la celda de combustible que se va volviendo lineal paulatinamente. No se observa una caída de potencial apreciable a altas densidades de corriente, asociada a polarización de concentración lo que indica que no hay un efecto negativo por parte de la acumulación de los productos de la oxidación de los carbohidratos. Los valores máximos de

densidad de corriente y densidad de potencia son de 0.0418 mA/cm^2 y 0.0085 mW/cm^2 para 1 mM, 0.0756 mA/cm^2 y 0.0174 mW/cm^2 para 5 mM y de 0.2941 mA/cm^2 y 0.0258 mW/cm^2 para 10 mM. Nuevamente estos valores son superiores a los valores obtenidos en las pruebas del sistema A con carbón Vulcan. El óxido de grafeno favorece la transferencia de electrones directa dentro de la celda de combustible.

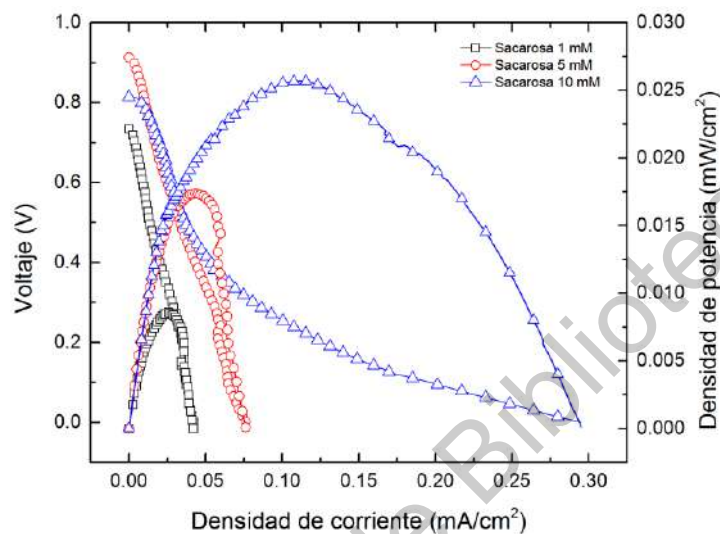


Figura 72: Curvas de descarga y polarización para celda de combustible microfluídica con tinta catalítica de levadura con óxido de grafeno en el ánodo para sacarosa con concentraciones de 1, 5 y 10 mM con $\text{C}_6\text{FeK}_4\text{N}_6$ 1 mM.

7.5 Comparación de sistemas

7.5.1 Pruebas electroquímicas

A partir de las voltametrías cíclicas aplicadas a los electrodos de carbón vítreo con las tintas catalíticas de los sistemas A y B, se obtuvieron las corrientes de pico y los voltajes de pico para cada carbohidrato con su respectiva concentración. Se observa un pequeño desplazamiento entre el sistema A el sistema B para los valores de voltaje de pico anódico y catódico, siendo los de pico anódico del sistema A de 0.4 V aproximadamente y de 0.43 para el sistema B. Los picos catódicos del sistema A permanecieron cercanos al valor de 0.35 V mientras que para el sistema B se mantuvieron cercanos a 0.33 V.

Existe una consideración muy importante a tomar en cuenta debido al mecanismo de transferencia de electrones en una celda de combustible microbiana, y es que a partir de los

sustratos orgánicos consumidos no se pueden obtener todos los electrones que se obtendrían de su degradación debido a que el microorganismo usa una parte de estos electrones para su propio consumo energético. Las pérdidas energéticas se ilustran en la Figura 73.

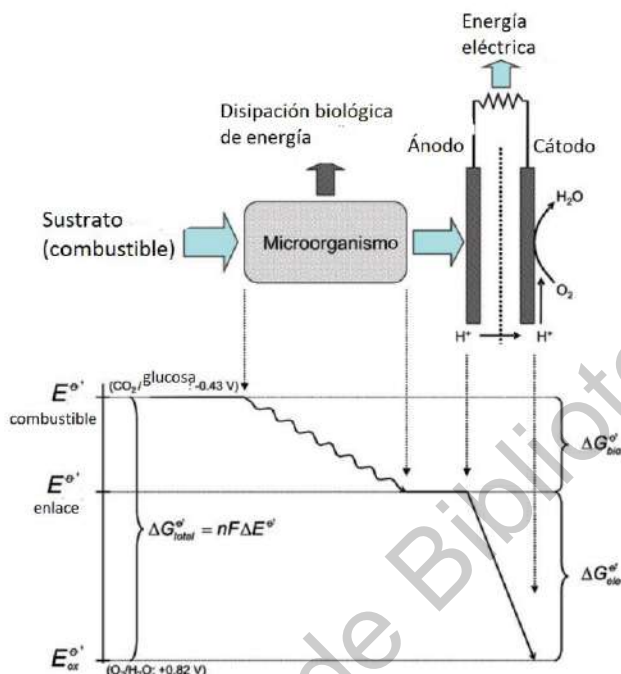


Figura 73: Pérdidas energéticas en celda de combustible microbiana (adaptado de Schröder U., 2007)

Es debido a esto que no se conoce con exactitud la cantidad de energía obtenida a partir de cada mol de sustrato orgánico, pues se requiere aún mucha investigación en el campo de los mecanismos de transferencia de electrones en celdas de combustible microbianas. Por lo tanto, cálculos aplicables como la ecuación de Randles-Sevcik no se pueden llevar a cabo para obtener los coeficientes de difusión de los sustratos orgánicos en el ánodo. La ecuación de Randles-Sevcik tiene la siguiente forma:

$$i_p = 2.686 * 10^5 n^{3/2} A c D^{1/2} v^{1/2}$$

En donde i_p es la corriente de pico, A es el área del ánodo, D es el coeficiente de difusión, c es la concentración, v es la velocidad de barrido y n es el número de electrones que participan en la semireacción. Al no conocer el número de electrones que participan en la semireacción, no se puede aplicar la fórmula, por lo que se requerirían otras técnicas para determinar los coeficientes de difusión

Para los cálculos de capacitancia específica no es necesario conocer la cantidad de carga obtenida por cada mol de sustrato, por lo que se puede obtener a partir de las voltametrías cíclicas. El procedimiento para obtener la capacitancia específica se muestra en anexos. La Tabla 3 muestra los valores obtenidos para cada sistema, tomando en cuenta la tinta catalítica anódica sobre un electrodo de carbón vítreo en pruebas de media celda.

Tabla 2: Capacitancia específica de los materiales anódicos de los sistemas A y B

Capacitancia específica (F/g)	
Sistema A	2.955234106
Sistema B	1.352898937

Han sido reportados trabajos donde se usa un aerogel de grafeno para un bioánodo en celdas de combustible microbianas con capacitancia específica de 3670 F/m², lo cual indica que el grafeno ha sido utilizado específicamente para añadir propiedades capacitivas a celdas de combustible microbianas (Yu F. et al, 2018). Además de óxido de grafeno han utilizado nanopartículas para modificar bioánodos y mejorar su capacitancia específica, en particular se puede mencionar un trabajo que utilizó RuO₂ y obtuvo una capacitancia específica de 3.74 F/cm² (Lv Z. et al, 2014).

Los valores de voltaje máximos obtenidos en las pruebas de potencial de circuito abierto para los sistemas A y B se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Potencial máximo obtenido para los sistemas A y B con los distintos carbohidratos en las pruebas de potencial de circuito abierto.

	Sistema A	Sistema B
	Potencial de circuito abierto (V)	Potencial de circuito abierto (V)
Blanco	0.47	0.67
Glucosa 1 mM	0.332	0.887
Glucosa 5 mM	0.363	0.936
Glucosa 10 mM	0.38	0.85
Fructosa 1 mM	0.219	0.722
Fructosa 5 mM	0.43	0.713
Fructosa 10 mM	0.432	0.764
Maltosa 1 mM	0.536	0.779
Maltosa 5 mM	0.265	0.695
Maltosa 10 mM	0.347	0.737
Sacarosa 1 mM	0.334	0.855

Sacarosa 5 mM	0.432	0.832
Sacarosa 10 mM	0.416	0.709

Se puede observar que se obtuvieron valores superiores en general para las pruebas del sistema B, el cual incluye el óxido de grafeno. El valor máximo obtenido fue de 0.936 V el cual se obtuvo con glucosa a una concentración de 5 mM con una celda completa del sistema B. Han sido reportados valores de 0.32 V en pruebas de potencial de circuito abierto para la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en una celda de combustible micro fabricada con polidimetil siloxano (Chiao M., 2008). También se han reportado trabajos de celdas de combustible que hacen uso de nanotubos de carbono con *Escherichia coli* en el ánodo para celdas de combustible sin membrana de intercambio iónico, en las cuales se obtuvieron valores de pruebas de OCP de hasta 0.35 V (Nath D. et al, 2019).

Los valores de densidad de corriente y densidad de potencia máximos obtenidos en las pruebas de curvas de descarga para los sistemas A y B con los distintos carbohidratos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Densidad de corriente máxima y densidad de potencia máxima obtenidas para los sistemas A y B con los distintos carbohidratos.

	Sistema A		Sistema B	
	mA/cm ²	mW/cm ²	mA/cm ²	mW/cm ²
Blanco	0.0311	0.00395	0.0256	0.003
Glucosa 1 mM	0.008	0.000608	0.0716	0.0086
Glucosa 5 mM	0.0109	0.00093	0.1424	0.0174
Glucosa 10 mM	0.015	0.000954	0.3372	0.063
Fructosa 1 mM	0.0248	0.0014	0.1722	0.0365
Fructosa 5 mM	0.0244	0.00176	0.254	0.0492
Fructosa 10 mM	0.0192	0.00169	0.1889	0.033
Maltosa 1 mM	0.028	0.002	0.0468	0.0108
Maltosa 5 mM	0.035	0.0031	0.0862	0.0154
Maltosa 10 mM	0.0265	0.00334	0.098	0.0192
Sacarosa 1 mM	0.0124	0.001	0.0418	0.0085
Sacarosa 5 mM	0.0159	0.0018	0.0756	0.0174
Sacarosa 10 mM	0.0191	0.00184	0.2941	0.0258

Se puede observar, al igual que en las pruebas de potencial de circuito abierto, que se obtuvieron valores superiores en general con el sistema B, el cual contiene óxido de grafeno. Los valores máximos obtenidos de todas las pruebas se consiguieron con el sistema B aplicado a glucosa con una concentración de 10 mM, y los valores fueron de 0.3372 mA/cm² para la densidad de corriente y de 0.063 mW/cm² para la densidad de potencia, respectivamente. En un trabajo mencionado previamente en que se hacía uso de *Escherichia coli* con nanotubos de carbono el valor máximo que se obtuvo de densidad de potencia fue de 0.004 mW/cm² (Nath D. et al, 2019). En otro trabajo que hacía uso de una celda de combustible microbiana de un solo canal se obtuvieron valores de densidad de potencia de 500 mW/m² (Cristiani P. et al, 2013).

8. Conclusiones

El análisis SEM mostró la morfología de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada sobre un sustrato de carbono donde se observó una gran adherencia y distribución por parte de la levadura en el material poroso.

En las pruebas bioquímicas se observó un desplazamiento en el pH óptimo para la actividad enzimática de la levadura en ambos sistemas de inmovilización con respecto a la levadura en solución, siendo este valor de pH 6.5 para ambos sistemas de inmovilización y de pH 6 para la levadura en solución. En el caso de las pruebas con respecto a la temperatura no hubo cambios para la temperatura óptima de la actividad enzimática en los sistemas con la levadura inmovilizada y en el sistema con levadura en solución. Además se observó un aumento en la actividad enzimática en el sistema con la levadura inmovilizada en óxido de grafeno con respecto al sistema con la levadura inmovilizada en carbón Vulcan, pero el valor óptimo se obtuvo con la levadura en solución.

Las pruebas de voltametría cíclica corroboraron el consumo por parte de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* de los distintos carbohidratos, siendo estos glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa, y generando una corriente a partir del consumo de cada uno de los mismos. El mismo resultado se comprobó con las pruebas de voltametría de pulso diferencial, donde de igual manera se obtuvo una corriente asociada a la oxidación de cada carbohidrato tanto en el sistema con la levadura inmovilizada en carbón Vulcan como en el sistema con la

levadura inmovilizada en óxido de grafeno. Debido a la similitud en las vías metabólicas de consumo entre los distintos carbohidratos, los valores de voltaje de pico permanecieron similares para todos los casos, con ligeros desplazamientos en los voltajes de pico debidos al material en que se inmovilizó la levadura, ya sea carbón Vulcan u óxido de grafeno.

Las pruebas de potencial de circuito abierto indicaron un aumento en el voltaje obtenido de las celdas del sistema B en la cual la levadura se encuentra en óxido de grafeno, con respecto a las celdas del sistema A, en las cuales la levadura se encuentra en carbón Vulcan, con valores de potencial de circuito abierto máximos de 0.936 V y de 0.536 V para las celdas del sistema B y del sistema A, respectivamente. El valor máximo de potencial de circuito abierto para el sistema B se obtuvo con glucosa a una concentración de 5 mM y para el sistema A se obtuvo con maltosa a una concentración de 1 mM.

Las curvas de descarga y polarización mostraron un aumento en la densidad de corriente y en la densidad de potencia obtenidos para las celdas del sistema B con respecto al sistema A, obteniendo valores máximos para el sistema B de 0.3372 mA/cm² para glucosa con una concentración de 10 mM y de 0.063 mW/cm² para glucosa con 10 mM, mientras que para el sistema A se obtuvieron valores máximos de 0.035 mA/cm² para maltosa con una concentración de 5 mM y de 0.00334 mW/cm² para maltosa con una concentración de 10 mM.

Los resultados observables en el aumento de tanto la densidad de corriente como la densidad de potencia así como el potencial de circuito abierto obtenidos por parte del sistema B con respecto al sistema A, implican que existe transferencia de electrones directa para la cepa *Saccharomyces cerevisiae*, debido a que ambos sistemas trabajaron con mediador ferrocianuro de potasio a una concentración de 1 mM, con la única diferencia entre ambos sistemas siendo la base en que se inmovilizó la levadura, comprobando que la cepa tiene mayor contacto y transferencia de electrones con el óxido de grafeno que con el carbón Vulcan.

9. Perspectivas a futuro

Ha sido reportado que el cianuro inhibe el complejo IV de la cadena respiratoria, de modo que puede suspender por completo la respiración celular (Murray, 2010). Es por eso que para trabajos futuros se sugiere indagar en otras sustancias que cumplan la función de mediador para el sistema.

Para indagar más acerca de la cinética de la reacción entre la levadura y los distintos carbohidratos se sugiere llevar a cabo voltametrías cíclicas en las que se varíe la velocidad de barrido.

Se propone también llevar a cabo pruebas sin presencia de mediador para evaluar el mecanismo de transferencia de electrones directa por parte de la levadura en la celda de combustible.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

10. Referencias

- Ahmad, H., Fan, M., & Hui, D. (2018). Graphene oxide incorporated functional materials: A review. *Composites Part B: Engineering*, 145, 270-280.
- Aiyer K., (2020). How does electron transef occur in microbial fuel cells?, *World Journal of Microbiolpogy and Biotechnology*, 36(19) pp. 1-9.
- Allen, R. M., & Bennetto, H. P. (1993). Microbial fuel-cells. *Applied biochemistry and biotechnology*, 39(1), 27-40.
- Arroyo-López, F. N., Orlic, S., Querol, A., & Barrio, E. (2009). Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *International journal of food microbiology*, 131(2-3), 120-127.
- Baughman R., Anvar A. Zakhidov, Walt A. de Heer (2002) Carbon Nanotubes – the Route Toward Applications, *Science*, Vol. 297, No. 5582, pages 787-792.
- Beecroft, N. J., Zhao, F., Varcoe, J. R., Slade, R. C., Thumser, A. E., & Avignone-Rossa, C. (2012). Dynamic changes in the microbial community composition in microbial fuel cells fed with sucrose. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(1), 423-437.
- Bocarando J, Dector A, Vargas D, Olivares J, Amaya D, Goyes C, Castillo L, Ledesma A, Desarrollo y evaluación de una microcelda de combustible de urea que emplea ánodo de níquel/zeolita, (2020), *Revista Nthe*, pp. 28-35.

- Bruce E. Logan, B. Hamelers, R. Rozendal, U. Schröder, J. Keller, S. Freguia, P. Aelterman, W. Vertstraete, K. Rabaey, (2006). Microbial fuel cells: methodology and technology, Volume 40, No. 17, Environmental science and technology, pages 5181-5192.
- Carrera R, Fuentes R, Olivares J, Amaya D, Dector A, Galindo E, Galván F, Morales J, (2021). The potential of Pd/CX100 to Use as Anode in a Paper-based Microfluidic Fuel Cell for the Oxidation of Crude Glycerol Samples, ECS Transactions, 100 (1) 45-54.
- Castillo L, Amaya D, Gachuz J, Ortega D, Olivares J, Dector D, Duarte A, Villa A, Dector A, (2018), Urea oxidation in a paper based microfluidic fuel cell using *Escherichia coli* anode electrode, Colombian Congress of Electrochemistry, Series 1119.
- Castillo L, Dector A, Olivares J, Amaya D, Vera J, Ávila L, Marroquín A, Oaxaca H, Santana I, (2020). Evaluación del flujo de una celda de combustible microfluídica, Revista Nthe, pp. 9-15.
- Chaudhuri, S. K., & Lovley, D. R. (2003). Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. Nature biotechnology, 21(10), 1229-1232.
- Chiang, L. C., Gong, C. S., Chen, L. F., & Tsao, G. T. (1981). D-Xylulose fermentation to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Environmental Microbiology, 42(2), 284-289.
- Chiao, M. (2008). A microfabricated PDMS microbial fuel cell. Journal of Microelectromechanical systems, 17(6), 1329-1341.
- Choi, Y. J., Jung, E. K., Park, H. J., Paik, S. R., Jung, S. H., & Kim, S. H. (2004). Construction of microbial fuel cells using thermophilic microorganisms, *Bacillus licheniformis* and *Bacillus thermoglucosidasius*. Bulletin of the Korean Chemical Society, 25(6), 813-818.

- Cracknell, J. A., Vincent, K. A., & Armstrong, F. A. (2008). Enzymes as working or inspirational electrocatalysts for fuel cells and electrolysis. *Chemical Reviews*, 108(7), 2439-2461.
- Cristiani, P., Carvalho, M. L., Guerrini, E., Daghighi, M., Santoro, C., & Li, B. (2013). Cathodic and anodic biofilms in single chamber microbial fuel cells. *Bioelectrochemistry*, 92, 6-13.
- Dector A, Galindo J, Amaya D, Ortíz A, Guerra M, Olivares J, Arriaga L, Ledesma J, (2017). Towards autonomous lateral flow assays: Paper-based microfluidic fuel cell inside an HIV-test using a blood sample as fuel, *International Journal of Hydrogen Energy*, pp. 1-8.
- Dingding Y., Yang Y., Li J., Zhu X., Liao Q., Deng B., Chen R., “Performance of a microfluidic microbial fuel cell based on graphite electrodes”, *International Journal of Hydrogen Energy*, (2013), 38, 15710-15715.
- Dresselhaus M., G. Dresselhaus, P. C. Eklund, A. M. Rao (2000) *Carbon Nanotubes, The Physics of Fullerene – Based and Fullerene – Related Materials*, pages 331-379.
- Dreyer D., Sungjin Park, Christopher W. Bielawski, R. Ruoff, (2009) *The chemistry of graphene oxide*, *The Royal Society of Chemistry*, 39, pages 228-240.
- Duteanu, N., Erable, B., Kumar, S. S., Ghangrekar, M. M., & Scott, K. (2010). Effect of chemically modified Vulcan XC-72R on the performance of air-breathing cathode in a single-chamber microbial fuel cell. *Bioresource technology*, 101(14), 5250-5255.
- Enache-Angoulvant A, Hennequin C, (2005). Invasive *Saccharomyces* Infection: A Comprehensive Review, *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 41, No. 11, pp. 1559-1568.
- Eric R. Choban, Larry J. Markosky, Andrzej Wieckowski, Paul J. A. Kenis (2004) Microfluidic fuel cell based on laminar flow, *Journal of Power Sources*, Vol. 128, pages 54-60.

- Esquivel J. P., Del Campo F. J., Gómez de la Fuente J. L., Rojas S., Sabaté N., “Microfluidic fuel cells on paper: meeting the power needs of next generation lateral flow devices”, *Energy Environmental Sciences*, (2014), 7, 1744.
- Fraiwan, A., & Choi, S. (2016). A stackable, two-chambered, paper-based microbial fuel cell. *Biosensors and Bioelectronics*, 83, 27-32.
- Fraiwan A, Mukherjee S, Sundermier S, Lee H, Choi S, (2013). A paper-based microbial fuel cell: Instant battery for disposable diagnostic devices, *Bisoensors and bioelectronics*, Vol. 49, pp. 410-414.
- Gao Y., I. Kyratzis, (2008) Covalent Immobilization of Proteins on Carbon Nanotubes Using the Cross-Linker 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide—a Critical Assessment , *Bioconjugate Chemistry*, Vol. 19, No. 10, doi: 10.1021/bc800051c
- Geun-Cheol Gil, In-Seop Chang, Byung Hong Kim, Mia Kim, Jae-Kyung Jang, Hyung Soo Park, Hyung Joo Kim (2003) Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell, *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 18, pages 327-334.
- Gómez M, Dector A, Amaya D, Alamilla D, Olivares J, Rojas N, Sosa A, Morales J, (2021). Effect of the AuNPs Biosynthesized Used as Anodes on the Performance of a Human Blood Paper-based Microfluidic Fuel Cell, *ECS Transactions*, 100 (1) 109-116.
- Gunawardena Anuradh, Fernando Sandun, To Filip, (2008) Performance of a Yeast-mediate Biological Fuel Cell, *International Journal of Molecular Sciences*, 9(10), pages 1893-1907.
- HaoYu, E., Cheng, S., Scott, K., & Logan, B. (2007). Microbial fuel cell performance with non-Pt cathode catalysts. *Journal of power sources*, 171(2), 275-281.

Heilmann J., Bruce E. Logan (2006) Production of Electricity from Proteins Using a Microbial Fuel Cell, *Water Environment Research*, Vol. 78, pages 531-537.

Herbrecht, R., & Nivoix, Y. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: an adverse effect of *Saccharomyces boulardii* probiotic administration.

Hermanová, S., Zarevúcká, M., Bouša, D., Pumera, M., & Sofer, Z. (2015). Graphene oxide immobilized enzymes show high thermal and solvent stability. *Nanoscale*, 7(13), 5852-5858.

Ieropoulos I., John Greenman, Chris Melhuish, John Hart (2005) Comparative study of three types of microbial fuel cell, *Enzyme and Microbial technology*, Vol. 37, pages 238-245.

Jafary, T., Najafpour, G. D., Ghoreyshi, A. A., Haghparast, F., Rahimnejad, M., & Zare, H. (2011). Bioelectricity power generation from organic substrate in a Microbial fuel cell using *Saccharomyces cerevisiae* as biocatalysts. *Fuel Cells*, 4, 1182.

Johnston, G. C., Ehrhardt, C. W., Lorincz, A., & Carter, B. L. (1979). Regulation of cell size in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 137(1), 1-5.

Kim, B. H., Chang, I. S., & Gadd, G. M. (2007). Challenges in microbial fuel cell development and operation. *Applied microbiology and biotechnology*, 76(3), 485-494.

Kim B., I. Lee, S. J. Kwon, Y. Wee, K. Y. Kwon, C. Jeon, H. J. An, H. T. Jung, S. Ha, J. S. Dordick, J. Kim (2017) Fabrication of enzyme-based coatings on intact multi-walled carbon nanotubes as highly effective electrodes in biofuel cells, *Scientific Reports, Nature, Sci. Rep.* 7, 40202; doi: 10.1038/srep40202

- Kim, J. R., Premier, G. C., Hawkes, F. R., Rodríguez, J., Dinsdale, R. M., & Guwy, A. J. (2010). Modular tubular microbial fuel cells for energy recovery during sucrose wastewater treatment at low organic loading rate. *Bioresource technology*, 101(4), 1190-1198.
- Kim, N., Choi, Y., Jung, S., & Kim, S. (2000). Effect of initial carbon sources on the performance of microbial fuel cells containing *Proteus vulgaris*. *Biotechnology and bioengineering*, 70(1), 109-114.
- Kuthan, M., Devaux, F., Janderová, B., Slaninová, I., Jacq, C., & Palková, Z. (2003). Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. *Molecular microbiology*, 47(3), 745-754.
- Laguna J, Martínez F, Piña E, *Bioquímica de Laguna, Manual Moderno*, 7th ed., México, 2013.
- Liu H., Ramanatham Ramnarayanan, Bruce E. Logan (2004) Production of Electricity during Wastewater Treatment Using a Single Chamber Microbial Fuel Cell, *Environmental Science & Technology*, Vol. 38, pages 2281-2285
- Logan B., Cassandro Murano, Keith Scott, Neil D. Gray, Ian M Head (2005) Electricity generation from cysteine in a microbial fuel cell, *Water Research*, Vol. 39, pages 942-952.
- Logan, B. E. (2009). Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nature Reviews Microbiology*, 7(5), 375-381.
- Logan, B. E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., ... & Rabaey, K. (2006). Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environmental science & technology*, 40(17), 5181-5192.
- Logan, B. E., & Regan, J. M. (2006). Microbial fuel cells—challenges and applications.

- Lovley, D. R. (2006). Microbial fuel cells: novel microbial physiologies and engineering approaches. *Current opinion in biotechnology*, 17(3), 327-332.
- Lv, Z., Chen, Y., Wei, H., Li, F., Hu, Y., Wei, C., & Feng, C. (2013). One-step electrosynthesis of polypyrrole/graphene oxide composites for microbial fuel cell application. *Electrochimica Acta*, 111, 366-373.
- Lv, Z., Xie, D., Li, F., Hu, Y., Wei, C., & Feng, C. (2014). Microbial fuel cell as a biocapacitor by using pseudo-capacitive anode materials. *Journal of Power Sources*, 246, 642-649.
- Marcano D., Dmitry V. Kosynkin, Jacob M. Berlin, A. Sinitskii, Z. Sun, A. Slesarev, Lawrence B. Alemany, W. Lu, James M. Tour (2010) Improved Synthesis of Graphene Oxide, *American Chemical Society*, Vol. 4, No. 8, pages 4806-4814.
- Murray, R. K., Bender, D. A., & Botham, K. M. (2010). Harper: bioquímica ilustrada. McGraw-Hill.
- Narendranath, N. V., & Power, R. (2005). Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. *Applied and environmental microbiology*, 71(5), 2239-2243.
- Nath D, Kallepalli S, Rao L, Dubey S, Javed A, Goel S, (2020). Microfluidic paper microbial fuel cell powered by *Shewanella putrefaciens* in IoT cloud framework, *International Journal of Hydrogen Energy*, pp. 1-10.
- Nath, D., Kiran, P. S., Rewatkar, P., Krishnamurthy, B., Ganesh, P. S., & Goel, S. (2019). *Escherichia coli* fed paper-based microfluidic microbial fuel cell with MWCNT composed bucky paper bioelectrodes. *IEEE Transactions on nanobioscience*, 18(3), 510-515.

Pareek, A., Sravan, J. S., & Mohan, S. V. (2019). Exploring chemically reduced graphene oxide electrode for power generation in microbial fuel cell. *Materials Science for Energy Technologies*, 2(3), 600-606.

Parkhey P, Sahu R, (2020), Microfluidic microbial fuel cells: Recent advancements and future prospects, *International Journal of Hydrogen Energy*, pp. 1-19.

Parkhey P, Sahu R, (2020). Microfluidic microbial fuel cells: Recent advancements and future prospects, *International Journal of Hydrogen Energy*, pages 1-18
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.07.019>

Permana, D., Rosdianti, D., Ishmayana, S., Rachman, S. D., Putra, H. E., Rahayuningwulan, D., & Hariyadi, H. R. (2015). Preliminary investigation of electricity production using dual chamber microbial fuel cell (dcMFC) with *Saccharomyces cerevisiae* as biocatalyst and methylene blue as an electron mediator. *Procedia Chemistry*, 17, 36-43.

Qian F., Morse D., "Miniaturizing microbial fuel cells", *Trends in biotechnology*, (2011), Vol. 29, No. 2.

Rabaey K., Geert Lissens, Steven D. Siciliano, Willy Verstraete (2003) A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency, *Biotechnology Letters*, Vol. 25, pages 1531-1535.

Rabaey, K., & Verstraete, W. (2005). Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *TRENDS in Biotechnology*, 23(6), 291-298.

Rahimnejad, M., Najafpour, G. D., Ghoreyshi, A. A., Talebnia, F., Premier, G. C., Bakeri, G., ... & Oh, S. E. (2012). Thionine increases electricity generation from microbial fuel cell using

Saccharomyces cerevisiae and exoelectrogenic mixed culture. *Journal of Microbiology*, 50(4), 575-580.

Rani, R., Sharma, D., & Kumar, S. (2019). Optimization of operating conditions of miniaturize single chambered microbial fuel cell using NiWO₄/graphene oxide modified anode for performance improvement and microbial communities' dynamics. *Bioresource technology*, 285, 121337.

Raúl D. Miazso, María F. Peralta, M. Picco, (2005). Productive Performance and Carcass quality in Broilers fed yeasts (*S. cerevisiae*), *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*, Volumen 4, No. 12. Páginas 1-9.

Revelo, D. M., Hurtado, N. H., & Ruiz, J. O. (2013). Celdas de combustible microbianas (CCMs): Un reto para la remoción de materia orgánica y la generación de energía eléctrica. *Información tecnológica*, 24(6), 17-28.

Rossi, R., Fedrigucci, A., & Setti, L. (2015). Characterization of electron mediated microbial fuel cell by *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemical Engineering Transactions*, 43.

Saucedo-Acuña R., (Junio 2017). Manual para la preparación de muestras para su análisis por microscopía electrónica y difracción de rayos X. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.

Schröder U., (2007). Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 9, 2619-2629.

Schuller D., M. Casal (2005) The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry, *Appl Microbiol Biotechnol*, 68: 292–304 doi: 10.1007/s00253-005-1994-

- Serra, A., Strehaiano, P., & Taillandier, P. (2005). Influence of temperature and pH on *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* growth; impact of a wine yeast interspecific hybridization on these parameters. *International journal of food microbiology*, 104(3), 257-265.
- Serrano E, Rus G, García-Martínez J, (2009). Nanotechnology for sustainable energy, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 13, No. 9, pp. 2373-2384.
- Shuihua, T. A. N. G., Gongquan, S. U. N., Jing, Q. I., Shiguo, S. U. N., Junsong, G. U. O., Qin, X. I. N., & Haarberg, G. M. (2010). Review of new carbon materials as catalyst supports in direct alcohol fuel cells. *Chinese Journal of Catalysis*, 31(1), 12-17.
- Silva G, (2004). Introduction to nanotechnology and its applications to medicine, *Surgical Neurology*, vol. 61, No. 3, pp. 216-220.
- Skoog D., West D., Holler J., Crouch S., (2005), *Fundamentos de Química Analítica*, 8va ed., International Thomson Editores, S. A. de C. V., México, D.F.
- Teresa O. Ratón, (2004) Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico, *Revista Iberoamericana de Micología*, Volumen 21, páginas 15-19.
- Thurston, C. F., Bennetto, H. P., Delaney, G. M., Mason, J. R., Roller, S. D., & Stirling, J. L. (1985). Glucose metabolism in a microbial fuel cell. Stoichiometry of product formation in a thionine-mediated *Proteus vulgaris* fuel cell and its relation to coulombic yields. *Microbiology*, 131(6), 1393-1401.
- Tyson, C. B., Lord, P. G., & Wheals, A. E. (1979). Dependency of size of *Saccharomyces cerevisiae* cells on growth rate. *Journal of bacteriology*, 138(1), 92-98.

- Uria, N., Ferrera, I., & Mas, J. (2017). Electrochemical performance and microbial community profiles in microbial fuel cells in relation to electron transfer mechanisms. *BMC microbiology*, 17(1), 1-12.
- Wang H, Su j, Membraneless microfluidic microbial fuel cell for rapid detection of electrochemical activity of microorganism, *Bioresource technology*, (2013), Vol. 145, pp. 271-274.
- Yang, W., Li, J., Fu, Q., Zhang, L., Zhu, X., & Liao, Q. (2017). A simple method for preparing a binder-free paper-based air cathode for microbial fuel cells. *Bioresource technology*, 241, 325-331.
- Yang, D. Ye, J. Li, X. Zhu, Q. Liao, B. Zhang (2016) Microfluidic microbial fuel cells: from membrane to membrane free, *Journal of Power Sources*, 324, 113-125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpowsour.2016.05.078>
- Yang Y, Ye D, Li J, Zhu X, Liao Q, Zhang B, (2016). Microfluidic microbial fuel cells: from membrane to membrane free, *Journal of Power Sources*, Vol. 324, pp. 113-125.
- Yan Y., O. Yehezkeli, I. Willmer (2007) Integrated, Electrically Contacted NAD(P)⁺-Dependent Enzyme—Carbon Nanotube Electrodes for Biosensors and Biofuel Cell Applications, *Chemistry European Journal*, 13, 10168-10175, doi: 10.1002/chem.200700806
- Yu, F., Wang, C., & Ma, J. (2018). Capacitance-enhanced 3D graphene anode for microbial fuel cell with long-time electricity generation stability. *Electrochimica Acta*, 259, 1059-1067.
- Yu, X., & Ye, S. (2007). Recent advances in activity and durability enhancement of Pt/C catalytic cathode in PEMFC. *Journal of Power Sources*, 1(172), 133-144.

Zhang, C., Shen, X., Pan, Y., & Peng, Z. (2017). A review of Pt-based electrocatalysts for oxygen reduction reaction. *Frontiers in Energy*, 11(3), 268-285.

Zhang J., F. Zhang, H. Yang, X. Huang, H. Liu, J. Zhang, S. Guo (2010) Graphene Oxide as a Matrix for Enzyme Immobilization, *American Chemical Society*, 26(9), pages 6083-6085.

Zhao, J., Yang, Z., Gong, Q., Lu, Y., Yang, Z., & Wang, M. (2005). Electrochemical insights into the glucose metabolism pathways within *Saccharomyces cerevisiae*. *Analytical letters*, 38(1), 89-98.

Zimmermann, F. K., & Eaton, N. R. (1974). Genetics of induction and catabolite repression of maltase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics MGG*, 134(3), 261-272.

11. Anexos

11.1 Técnicas de caracterización

11.1.1 Microscopía electrónica de barrido

El SEM o MEB surge antes de la primera guerra mundial en Alemania. Este microscopio permite obtener imágenes de gran resolución en tres dimensiones en materiales pétreos, metálicos y orgánicos. La microscopía electrónica y sus métodos de análisis de morfología, composición y de estructura microscópica, son una vía de caracterización microestructural. La importancia de la microscopía se debe a la alta resolución espacial obtenida de manera eficiente y simultánea a la información topográfica, cristalográfica y composicional del material en estudio. El cañón de electrones debe emitir los electrones del cátodo y acelerarlos hacia el ánodo, y producir un haz de alto brillo y coherencia. Para lograr dicho haz los microscopios electrónicos operan en vacío. La importancia de la microscopía se debe a la alta resolución espacial obtenida de manera eficiente y simultánea y a la información topográfica, cristalográfica y composicional del material en estudio. Esta información se obtiene de la muestra a partir de la interacción entre los electrones y el espécimen analizado, con lo cual se generan diversas imágenes.

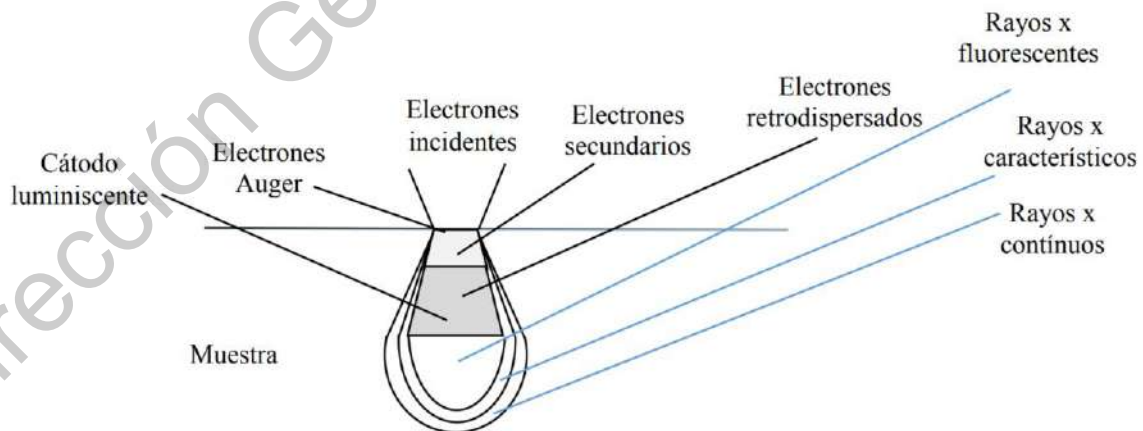


Figura 74: Interacción entre electrones y espécimen a analizar en microscopía electrónica de barrido.

Los electrones secundarios (SEI) salen de la muestra excitados por el haz de electrones incidente a la misma. Se detectan todos aquellos generados en la región de incidencia (10 nm), y una ligera extensión de zona provocada por la excitación de electrones de los átomos vecinos a la región de incidencia; en total se tiene una región de aprox. 15 nm. La difusión de los electrones incidentes en la especie tiene una pequeña influencia en la imagen. El contraste en la imagen obtenida por electrones secundarios depende principalmente del ángulo de inclinación y la topografía de la superficie de la muestra. Las imágenes obtenidas son muy parecidas a las que vemos en una "pantalla de televisión a blanco y negro", nos resultan muy útiles para el análisis morfológico, sin embargo este tipo de imágenes pueden conducir a errores en el análisis topográfico puesto que no es claro distinguir las elevaciones y desniveles en algunas muestras, de ahí que para topografía se recurra más al uso de imágenes obtenidas con electrones retro dispersados. Después de que los electrones retro dispersados incidentes (BEI) llegan e interactúan con la muestra, algunos de ellos son rebotados o retro dispersados manteniendo una alta energía, misma que les permite salir de nueva cuenta de la superficie de la muestra. El contraste en la imagen de electrones retro dispersados depende del ángulo de incidencia, el cambio en la intensidad de los electrones retro dispersados, y la velocidad de generación de los mismos depende del número de masa atómica de las sustancias que constituyen dicha muestra. La cantidad y dirección de los electrones retro dispersados dependen de la composición, topografía de la superficie, cristalinidad, y magnetización de la muestra.

La espectroscopia de electrones Auger o AES es la técnica más utilizada. Se emplea un haz de electrones para excitar los electrones (denominados electrones Auger) de los átomos localizados en la superficie. Debido a que los electrones del haz inicial interactúan fuertemente con los electrones Auger, los electrones incidentes penetran realmente poco en la muestra, por lo que se resulta ser una técnica de análisis superficial. Una de las limitaciones de esta técnica es el estudio de las superficies de materiales aislantes, ya que como se están enviando cargas eléctricas puede haber problemas con la acumulación de carga sobre la muestra. Esta técnica con barrido se le denomina SAM por sus siglas en inglés (Scanning Auger Microprobe). En cambio, en la espectroscopia de fotoelectrones producidos con rayos

x (XPS), un haz de rayos X es el que excita los electrones de la superficie. Esta técnica permite conocer con precisión la naturaleza química de los átomos de la superficie ya que la energía de los fotoelectrones depende directamente de la configuración energética de los átomos de los que proviene. Prácticamente no causa daños en la superficie y puede usarse en materiales delicados, el inconveniente es que no tiene gran resolución en área ni en profundidad. En la espectrometría de masa de iones secundarios (SIMS por sus siglas en inglés), los átomos de la superficie son arrancados usando un haz de iones de baja energía. En esta técnica los fragmentos ionizados se miden directamente con un espectrómetro de masas, proporcionando gran información acerca del contenido químico de la superficie. A diferencia de las otras técnicas, presenta la ventaja de detectar hidrógeno y distinguir entre diferentes isótopos. Tiene una buena resolución espacial y proporciona excelente información sobre el perfil de concentraciones con la profundidad, pero es una técnica destructiva. Finalmente, en la espectroscopia de esparcimiento de iones (LEIS) un haz de iones con energía fija se lanza sobre la superficie esparciéndose por los átomos superficiales. Los iones tienen energías que dependen de la masa de los átomos superficiales y son analizados mediante espectrómetros de masa. La técnica es altamente sensible a la superficie y puede dar información sobre la estructura de la superficie por medio de la variación de los ángulos de incidencia, pero como no penetra más allá de la superficie, no tiene capacidad para estudiar perfiles a profundidad. (Saucedo, 2017)

11.1.2 Voltametría cíclica

La voltametría cíclica es una técnica electroanalítica muy usada e importante. Es de considerable aplicación en el estudio de reacciones de oxidación/reducción, detección de productos intermedios de reacción y .a observación de reacciones de seguimiento de productos formados en los electrodos. En la voltametría cíclica, el potencial aplicado se barre primero en una dirección y luego en la otra mientras se mide la corriente. Un experimento de voltametría cíclica puede abarcar un ciclo completo, un ciclo parcial o varios ciclos.

Durante un experimento de voltametría cíclica, la respuesta de corriente de un pequeño electrodo fijo en una disolución no agitada se excita mediante una onda triangular de potencial. El ciclo suele repetirse varias veces. Los potenciales a los que se realiza la

inversión se llaman potenciales de cambio. En un experimento dado estos potenciales se seleccionan de modo que se puedan observar la oxidación o reducción controladas por difusión de una o más especies. Según la composición de la muestra, la dirección del barrido inicial puede ser negativa o positiva. Un barrido en la dirección de potenciales más negativos se llama barrido directo, y en la dirección opuesta, barrido inverso. En general, la duración del ciclo varía de 1 ms o menos a 100 s o más.

Los parámetros importantes en un voltamograma cíclico son el potencial de pico catódico E_{pc} , el potencial de pico anódico E_{pa} , la corriente de pico catódica i_{pc} y la corriente de pico anódica i_{pa} . En el caso de una reacción de electrodo reversible, las corrientes de pico anódica y catódica son casi iguales en valor absoluto, pero de signo contrario. En cuanto a una reacción de electrodo reversible a 25 °C, se espera que la diferencia entre los potenciales pico sea

$$\Delta E_p = |E_{pa} - E_{pc}| = 0.059/n$$

Donde n es el número de electrones que participan en la semirreacción. La irreversibilidad a consecuencia de una cinética lenta de transferencia de electrones hace que la diferencia de los potenciales pico exceda el valor esperado. Una reacción de transferencia de electrones puede parecer reversible a una velocidad de barrido lenta, mientras que al aumentar la velocidad se obtienen valores crecientes de ΔE_p , signo claro de irreversibilidad. Por tanto, para detectar cinéticas lentas de transferencia de electrones y obtener constantes de velocidad, se mide ΔE_p a diferentes velocidades de barrido.

La información cuantitativa se obtiene a partir de la ecuación de Randles-Sevcik, que a 25 °C es

$$i_p = 2.686 \times 10^5 n^{3/2} A c D^{1/2} \nu^{1/2}$$

Donde i_p es la corriente de pico en Amperes, A es el área del electrodo (cm^2), D es el coeficiente de difusión (cm^2/s), c es la concentración (mol/cm^3) y ν es la velocidad de barrido (V/s). Si se conocen la concentración, el área del electrodo y la velocidad de barrido, la voltametría cíclica es una forma de determinar los coeficientes de difusión.

La voltametría cíclica se usa mucho en química orgánica e inorgánica. Es frecuente que sea la técnica elegida en primera instancia para investigar un sistema con especies electroactivas. En muchos casos el voltamograma cíclico revela la presencia de compuestos intermedios en reacciones de oxidación/reducción. (Skoog et al, 2005)

Dirección General de Bibliotecas UAQ