



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Especialidad en Nanotecnología

Desarrollo de un bioánodo basado en la enzima Alcohol deshidrogenasa para la obtención de energía.

Opción de titulación
Tesis

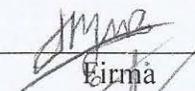
Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencias en Nanotecnología

Presenta:

Ing. Juan de Dios Galindo de la Rosa

Dirigido por: Dra. Minerva Guerra Balcázar

Dra. Minerva Guerra Balcázar
Presidente


Firma

Dra. Janet Ledesma García
Secretario


Firma

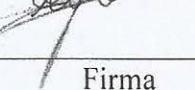
Dr. Carlos Guzmán Martínez
Vocal

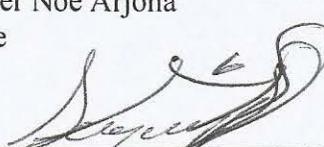

Firma

Dra. Ainhoa Arana Cuenca
Suplente

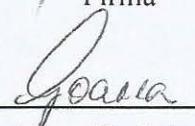

Firma

Dr Walter Noé Arjona
Suplente


Firma


Dr. Aurelio Domínguez González

Director de la Facultad


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Lorca Piña

Director de Investigación y Posgrado

RESUMEN

Las celdas de combustible enzimática de etanol muestran un rendimiento bajo debido principalmente al diseño de la celda de combustible y al método de inmovilización enzimática utilizado. Se realizó la construcción de un bioánodo donde la enzima alcohol deshidrogenasa se inmovilizó mediante la unión covalente a través de una matriz compuesta por papel carbón Toray como soporte con una capa de poli-(azul de metileno), Nafion, glutaraldehído, bromuro de tetrabutilamonio y nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) para la posterior evaluación en diversas celdas de combustible, probado con diferentes cátodos (Pt y Pd sobre comercial nanoesponja para celdas de combustible híbridas y enzima lacasa en nanoesponja para biocelda de combustible) donde el diseño de la inmovilización de células de combustible y fueron críticas para esta actuación. Por medio de caracterización electroquímica, bioquímica y fisicoquímicas se pudo comprobar la presencia de la enzima en el electrodo así como la retención de su actividad catalítica y obteniendo celdas de combustibles microfluidicas más potentes y estables comparadas con las reportadas hoy en día.

(Palabras clave: Alcohol deshidrogenasa, biocelda de combustible, celda de combustible microfluidica, inmovilización enzimática)

SUMMARY

Ethanol enzymatic fuel cells have shown low cell performance mainly due to the design of fuel cell and enzyme immobilization method used. Herein, we report and discuss using the evaluation of two membraneless fuel cell type air-breathing: hybrid and enzymatic. Using both a bioanode where Alcohol dehydrogenase enzyme was immobilized by covalent binding through a bioanode array composed by carbon Toray paper as support with a layer of poly(methylene blue), Nafion, glutaraldehyde, tetrabutylammonium bromide and nicotinamide adenine dinucleotide(NAD⁺); and was tested with two different cathodes(commercial Pt and Pd on nanofoam for hybrid fuel cell and laccase enzyme on nanofoam for biofuel cell) where the design of the fuel cell immobilization and were critical to this performance. By electrochemical, biochemical and physicochemical characterization we noted the presence of the enzyme on the electrode and the retention of its catalytic activity and obtaining cells more potent and stable compared to microfluidics fuel cells reported today.

(Key words: Alcohol dehydrogenase, biofuel cell, microfluidic fuel cell, enzyme immobilization)

Índice

1.Introducción	1
1.1 Justificación	2
1.2 Hipótesis	3
1.3 Objetivo general	4
1.3.1 Objetivos particulares	4
2. Antecedentes	5
2.1 Celdas de combustible	5
2.2.1 Aplicaciones de las celdas de combustibles	7
2.3 Celdas de etanol	8
2.4 Electro-oxidación del etanol	10
2.5 Desafíos de las celdas de etanol	11
2.6 Bioceldas de combustibles	14
2.6.1 Bioceldas microbianas	16
2.6.2 Bioceldas mitocondriales	19
2.6.3 Bioceldas Enzimáticas	20
3. Metodología	24
3.1 Diseño del bioánodo y preparación	24
3.2 Reactivos	25
3.3 Electrodo de papel carbón Toray y formación de capa de Nafion/agua.	26
3.4 Electro-polimeriación del azul de metileno.	36
3.5. Preparación de la tinta catalítica	27
3.3.5. Depositos de la tinta catalítica	28
4. Resultados y discusión	29

4.1 Espectroscopía Raman	29
4.2 Caracterización del bioánodo por microscopía de SEM	35
4.4 Caracterización del bioánodo por Potencial Z.	38
4.4. Caracterización del bioánodo por Fluorescencia de Rayo X.	41
4.5 Evaluación electroquímica del bioánodo.	44
4.5. Evaluación del arreglo del bioánodo con una solución de etanol 10Mm en buffer fosfato pH 8.86	44
4.5.2. Evaluación del bioánodo a diferentes concentraciones de etanol en media por voltamperometría cíclica.	45
4.5.3 Voltamperometría de pulso diferencial	47
4.6 Evaluación del bioánodo en celda de combustible microfluidica.	47
4.6.1 Celda de combustible híbrida Alcohol deshidrogenasa/Pt	51
4.6.2 Evaluación de los flujos en microcelda de combustible Alcohol deshidrogenasa/Pt	53
4.6.3. Estabilidad de la celda de combustible híbrida Alcohol deshidrogenasa/Pt	54
4.6.4 Celda de combustible híbrida Alcohol deshidrogenasa/Pd	57
4.6.5 Celda de combustible híbrida Alcohol deshidrogenasa/Lacasa	56

4.6.6 Comparación de los resultados obtenidos con los trabajos de investigación ya publicados.	63
5. Conclusiones	65
6. Referencias	66

Índice de figuras

2.1.2. Esquema del funcionamiento de una celda de combustible	6
2.2.1 Futuras aplicaciones de las celdas de combustible.	7
2.6.1. Diagrama del funcionamiento de una biocelda de combustible.	15
2.6.2 Tipos de biocatalizadores	16
2.6.1.1 Biocelda microbiana	18
2.6.2 Biocelda mitocondrial	19
2.6.3.1. Pruebas de bioceldas de combustibles implantadas en animales vivos.	22
2.6.3.2. Diagramas de bioceldas de combustible implantadas en animales.	23
3.1. Arreglo del bioánodo en las en la enzima Alcohol deshidrogenasa.	25
3.4.1. Voltametría de la electro-polimerización del azul de metileno sobre papel carbón Totay.	27
3.5.1 Esquema general de las capas que componen al bioánodo	28

Figura 4.1.1 Espectroscopia Raman de papel Toray	29
4.1.2. Espectroscopia Raman del papel carbón Toray con la capa 5:100 Nafion-agua.	30
4.1.3 Espectroscopia Raman del papel carbón Toray con la capa 5:100 Nafion-agua y electropolimerizado con azul de metileno.	31
4.1.4 Espectroscopia Raman del papel carbón Toray con la capa 5:100 Nafion-agua y electropolimerizado con azul de metileno y TBAB.	32
4.1.5 Espectroscopia Raman del papel carbón Toray con la capa 5:100 Nafion-agua y electropolimerizado con azul de metileno con capa de NAD ⁺ .	34
4.1.6 Espectroscopia Raman del papel carbón Toray con la capa 5:100 Nafion-agua y electropolimerizado con azul de metileno con capa de ADH	34
4.2.1 Imágenes por microscopia SEM de las capas del bioánodo de la enzima Alcohol deshidrogenasa	36
4.2.2 Análisis por EDS del bioánodo Alcohol deshidrogenasa	37
4.2.3 Mapeo del bioánodo de Alcohol deshidrogenasa	37

4.3.1. Esquemas que muestra la doble capa eléctrica que rodea una partícula en un medio acuoso y la posición de plano de deslizamiento.	39
4.4.2.2 Equipo de caracterización de Potencial Z, SurPASSElectrokinetic.	40
4.3.2. Medición del potencial Z de los componentes del bioánodo	41
4.4.1. Equipo de Fluorescencia de Rayos X.	42
4.2.2. Espectro del bioánodo obtenido de la técnica de fluorescencia de rayos X	43
4.5.2.1. Oxidación y reducción del cofactor NAD ⁺ a diferentes concentraciones de etanol utilizando el bioánodo de Alcohol deshidrogenasa desarrollado.	46
4.6.1. Esquemática de los diversos diseños en celdas de combustible microfluidicas.	48
4.6.2. Celda de combustible microfluidica tipo air-breathing utilizada para la evaluación del bioánodo.	50
4.6.1.1. Diagrama de la celda híbrida Alcohol deshidrogenasa/Platino	51
4.6.1.2. Curva de polarización y densidad de potencia de la celda de combustible híbrida Alcohol deshidrogenasa platino.	52
4.6.3.1. Cronoamperometría de la celda de combustible híbrida Alcohol deshidrogenasa/Pt	55

4.6.3.2. Evaluación de la durabilidad de la celda de combustible híbrida Alcohol deshidrogenasa/ Pt	56
4.6.4.1. Diagrama de la celda híbrida Alcohol deshidrogenasa/Paladio	58
4.6.4.2. Curva de polarización y densidad de potencia de la celda de combustible híbrida Alcohol deshidrogenasa/Paladio.	59
4.6.5.2 Diagrama de la celda híbrida Alcohol deshidrogenasa/Lacasa.	60
4.6.5.3 Curva de polarización y densidad de potencia de la biocelda de combustible Alcohol deshidrogenasa/Lacasa.	61
4.6.5.3. Curva de polarización y densidad de potencia de la biocelda de combustible Alcohol deshidrogenasa/ Lacasa por mediciones por lote	62

Índice de tablas

2.3.1 Número de electrones, potencial estándar, energía específica teórica y densidad de energía, capacidad de compuesto puro y la eficiencia de conversión de energía teórica para la oxidación.	9
4.4.1 Análisis del bioárido por Fluorescencia de Rayos X.	42

4.6.2.1. Tabla resultados de las celdas microfluidica Alcohol deshidrogenasa/Pt a diferentes flujos.	54
4.6.3.2. Durabilidad de la celda de combustible hibrida Alcohol deshidrogenasa/Pt	57
4.6.1. Comparación de los trabajos actualmente publicados con los elaborados en esta investigación.	63

Con especial dedicatoria a mi familia que siempre me han apoyado.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece de manera particular al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACY) por el apoyo y financiamiento y al todos los miembros del grupo de investigación “Sistemas electroquímicos de energías”.

1. INTRODUCCIÓN

La conexión entre la bioquímica y la electricidad se conoce desde hace mucho tiempo, ejemplo de ello son las bioceldas de combustible, las cuales son dispositivos electroquímicos que consumen hidrógeno y oxígeno para generar energía eléctrica, a través de una oxidación en el ánodo y una reacción de reducción en el cátodo. Se emplean catalizadores de origen biológico, que pueden ser microorganismos, mitocondrias o enzimas. Los electrones liberados en la oxidación se desplazan hacia el cátodo a través de un circuito externo, siendo este flujo electrónico utilizado para suplir los requerimientos energéticos de dispositivos electrónicos pequeños en el futuro.

El uso de biocatalizadores enzimáticos puede ofrecer ventajas sobre catalizadores metálicos, debido a su alta selectividad, dando una gran variedad de futuras aplicaciones, aunque su eficiencia catalítica depende de las condiciones del entorno, de la concentración de sustrato y del método de inmovilización enzimático utilizado.

El uso de enzimas de diferente naturaleza permite el funcionamiento de las bioceldas a través de diferentes moléculas orgánicas utilizadas como combustibles, como glucosa, fructuosa, alcoholes, ácido láctico, aminoácidos, cetonas, glicerol, aldehídos, hasta moléculas orgánicas más complejas como es el caso de almidones solubles. Entre los alcoholes, uno de los más importantes y de mayor interés es el etanol, también conocido como alcohol etílico, el cual es un compuesto químico líquido, incoloro e inflamable usado como combustible en distintas industrias. El etanol se puede producir de materia orgánica que contenga glucosa, como el almidón y la celulosa, mediante procesos fermentativos.

El etanol es uno de los compuestos que se presenta como una de las mejores alternativas para trabajar con celdas de combustible, pues es fácil de producir, es renovable, no es tóxico, fácil de transportar y tiene una alta densidad de energía. Las principales limitantes del etanol para su uso como combustible son: una cinética de reacción lenta y una baja selectividad de la reacción hacia la formación de CO_2 como producto principal, ya que múltiples electrocatalizadores metálicos siguen una ruta indirecta o de deshidratación, formando CO como subproducto no deseado. Hasta el día de hoy, no se ha encontrado un método eficiente

que utilice un biocatalizador capaz de romper los lazos entre los átomos de carbono del etanol.

Un biocatalizador que podría lograr este rompimiento eficazmente es la enzima Alcohol deshidrogenasa, la cual realiza la oxidación del etanol a aldehídos con ayuda del cofactor nicotinamida adenina dinucleotido. En estudios previos se ha mostrado su uso en bioceldas de combustible, sin embargo, su desempeño ha sido bajo debido a una deficiencia en la transferencia electrónica atribuida al tipo de inmovilización enzimática. De esta manera, nuevos métodos de inmovilización deben ser propuestos para incrementar la eficiencia en términos de potencia, densidad de corriente y el potencial de circuito abierto generados por la celda de combustible de etanol.

El presente trabajo se enfoca en la construcción de un bioánodo basado en la enzima Alcohol deshidrogenasa para celdas de combustibles, proponiendo un método de inmovilización por unión covalente, por medio del uso del colorante azul de metileno y de materiales que favorecen la formación de este tipo de uniones que e incrementan la estabilidad del electrodo, como es el caso del bromuro de tetrabutilamonio, el nafion y el glutaraldehído, utilizando como soporte papel carbón Toray. Realizando las caracterizaciones a este electrodo, se puede evaluar el papel que juega cada uno de los materiales que lo componen, así como su funcionamiento cuando se utiliza etanol como combustible. También se evaluó bioquímicamente el método de inmovilización para ver el comportamiento de la actividad catalítica de la enzima durante el proceso.

1.1 Justificación

La creación de un bioánodo basado en la actividad enzimática de la Alcohol deshidrogenasa y la Nicotinamida adenina dinucleótido, es una buena alternativa para la construcción de bioceldas que utilicen etanol como combustible. Las bioceldas en general, tienen como inconveniente una baja densidad de potencia, bajas estabilidades y bajas eficiencias de

almacenamiento. Al garantizar la inmovilización de la enzima al soporte se logra una mayor densidad de potencia, incrementando el rendimiento, así como el aumento de la estabilidad de la biocelda. Por otro lado, el uso de alcoholes como fuentes de energías renovables trae numerosos beneficios económicos, sociales y ambientales. La construcción de un bioánodo con materiales adecuados que incrementen su estabilidad y la catálisis del combustible generaran mayores densidades de potencia por tiempos más prolongados a los que se obtienen actualmente.

Con el estudio del efecto de la inmovilización covalente se podrán crear bioceldas que trabajen con combustibles más complejos, ya que se generaría información necesaria para el desarrollo de bioceldas que utilicen a la Alcohol deshidrogenasa y otras enzimas seleccionadas, dependiendo la naturaleza química del combustible, produciéndose mayor energía eléctrica que podría ser utilizada para suplir los requerimientos energéticos de dispositivos electrónicos pequeños.

1.2 Hipótesis

La inmovilización de la enzima Alcohol deshidrogenasa por el método de unión covalente favorecerá la retención de la actividad catalítica por tiempos prolongados, debido a las interacciones formadas entre los materiales utilizados en la construcción del bioánodo y el material de soporte, produciendo el incremento de la estabilidad y la eficiencia de una celda microfluidica que utilice etanol como combustible.

1.3 Objetivo General:

Desarrollar un bioánodo basado en la enzima Alcohol deshidrogenasa inmovilizada por unión covalente para el incremento de la eficiencia y de la estabilidad de celdas de combustibles que utilicen etanol.

1.3.1 Objetivos Particulares:

- ◆ Desarrollar un método de inmovilización enzimático que disminuya la pérdida de la actividad de la enzima Alcohol deshidrogenasa.
- ◆ Realizar la evaluación bioquímica del método de inmovilización por unión covalente de la enzima Alcohol deshidrogenasa propuesto.
- ◆ Realizar la caracterización electroquímica y fisicoquímica del bioánodo desarrollado para evaluar el comportamiento de cada uno de los materiales que lo componen.
- ◆ Evaluar el bioánodo desarrollado en celdas de combustibles microfluidicas tipo híbridas y bioceldas completa utilizando etanol.
- ◆ Evaluar la eficiencia de la densidad de corriente, potencial de circuito abierto y potencia generada por las celdas de combustibles microfluidicas que utilicen el bioánodo desarrollado.

2. ANTECEDENTES

2.1 Celdas de combustible.

Una celda de combustible es un dispositivo electroquímico que convierte la energía química proveniente de un combustible en electricidad y calor. En una celda típica, el combustible se alimenta de forma continua al compartimiento del ánodo (electrodo negativo) y un oxidante, es decir, el oxígeno del aire es alimentado continuamente al compartimiento del cátodo (electrodo positivo)(Sharafet *al.*, 2014). La oxidación electroquímica del combustible en el ánodo genera electrones que fluyen a través de una carga externa al cátodo, estos electrones causan la reducción electroquímica del oxidante en el cátodo, como se puede observar en la figura 2.1.1.

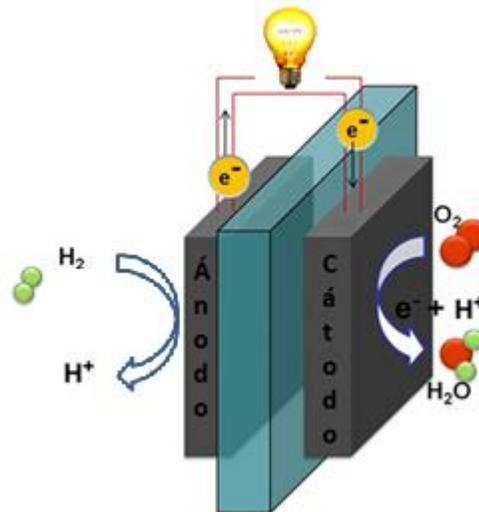


Figura 2.1.1 Diagrama de una celda de combustible.

Se pueden utilizar diferentes líquidos como combustible y ser sometidos a la oxidación en el ánodo de la celda de combustible mientras el fluido se suministre continuamente y que su oxidación química sea posible. Del mismo modo, el oxidante puede ser cualquier fluido que puede ser reducido a una velocidad suficiente. El combustible puede ser H_2 puro y también cualquier combustible como gas natural, metanol, gasolina o incluso biomasa si es acoplado a la celda de combustible (**Hoogerset al.**, 2003).

Las celdas de combustible se componen por electrodos (ánodo y cátodo, conductores eléctricos) y un electrolito (**figura 2.1.2**), donde: los conductores electrónicos permite la conducción por medio de electrones, mientras que el electrolito lo hace por medio de iones y de esta forma se cierra el circuito eléctrico (**Larminieet al.**, 2000). Convencionalmente, las celdas de combustible funcionan con compuestos simples, como compuestos inorgánicos, produciendo energía, agua, dióxido de carbono. También se utilizan combustibles como alcoholes de orden inferior y alcanos, que se utilizan para la producción de hidrógeno (**Larminieet al.**, 2000).

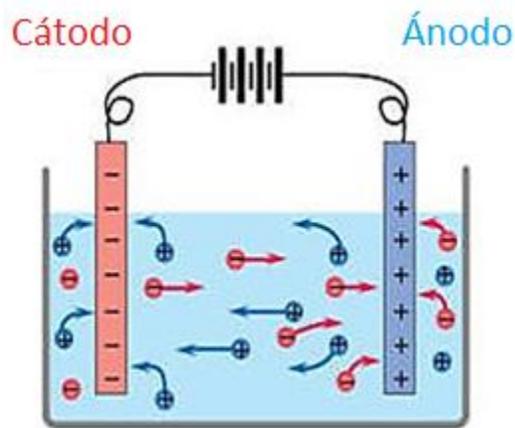


Figura 2.1.2. Esquema del funcionamiento de una celda de combustible

Las celdas de combustible ofrecen una opción limpia y eficiente para la generación de energía eléctrica. El rendimiento de la celda depende no sólo de la naturaleza química y física de los materiales del electrodo y electrolito, sino también en la compatibilidad física en las interfaces y de las condiciones durante el montaje de la celda de combustible (**Wei. et al.**,

2005). Se han hecho esfuerzos significativos dirigidos a la optimización de la utilización del catalizador del electrodo, basados en su actividad, en materiales de apoyo, dispersión, técnicas de carga y el desarrollo de materiales del electrolito, la cual es dependiente de muchos factores, especialmente de su conductividad iónica, estabilidad física y química a las temperaturas de operación. Todos los electrolitos a la fecha operan dentro de un conjunto limitado de parámetros, y muchos tienen una vida útil limitada, con inconvenientes económicos (**Wei***et. al.*, 2005).

Las celdas de combustible son dispositivos para la conversión de energía eléctrica a partir de fuentes renovables por medio de reacciones electroquímicas (**Bozbag***et. al.*, 2012). Son inherentemente más eficiente que la mayoría de los otros métodos de extracción de energía a partir de combustibles y ha habido mucho interés reciente en el desarrollo de celdas de combustible como la tecnología de conversión de energía más ecológica (**Gorte***et. al.*, 2009). Actualmente estas celdas son objeto de estudio en la mayoría de los campos de desarrollo de energía como futuras fuentes de energía verde, ya que son una tecnología importante que podría ser utilizadas para una variedad de aplicaciones como la electrónica portátil y micro escala (**Kamaruddin***et al.*, 2013).

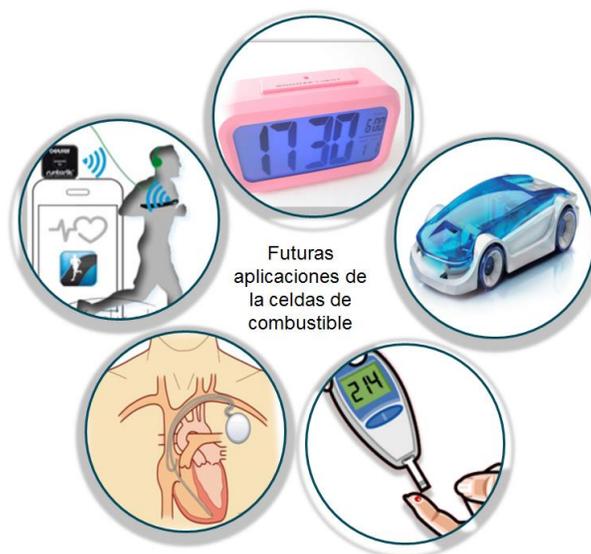


Figura 2.2.1. Futuras aplicaciones de las celdas de combustible.

Su uso es atractivo para aplicaciones estacionarias debido a su eficiencia eléctrica, e incluso a su carga parcial, a la producción de bajas emisiones, presenta un funcionamiento silencioso y una amplia flexibilidad respecto a los combustibles que pueden ser utilizados (**Elmeret et al.**, 2015). Debido a que se produce calor al generar electricidad, que es de interés específico para sistemas de cogeneración y tri-generación, sobre todo en el entorno doméstico. Debido a la variedad de tipos de celdas y su modularidad, tienen la capacidad de cubrir una amplia gama de aplicaciones, como se muestra en la figura 2.2.1 (**Elmeret et al.**, 2015).

Muchos tipos de celdas están actualmente en desarrollo, con una variedad de aplicaciones como fuentes de alimentación en miniatura. La mayoría aún no ha ido más allá de la fase de campo de prueba. Las celdas para equipos electrónicos portátiles se consideran como las próximas al mercado por algunas razones: pequeñas celdas de combustible microestructuradas permiten mayor densidad total de energía que las baterías; y el mercado de la electrónica tiene una tolerancia de coste inherentemente superior. (**Dyer, 2002**) Todavía hay algunos desafíos técnicos; celdas de hidrógeno exigen el almacenamiento de unidades de hidrógeno que son actualmente demasiado voluminosos para aplicaciones portátiles, y celdas a base de alcohol, sufren una reducción de voltaje debido a que se presenta en ocasiones una reducción en la cinética electroquímica entre el ánodo y el cátodo (**Larminie et al.**, 2003).

2.3 Celdas de etanol

Los alcoholes son compuestos orgánicos que contienen un grupo hidroxilo (-OH), que se encuentra unido a una cadena hidrocarbonada a través de un enlace covalente a un átomo de carbono con hibridación sp^3 ; además este carbono debe estar saturado, es decir, debe tener solo enlaces simples a sendos átomos; esto diferencia a los alcoholes de los fenoles. Los alcoholes también presentan mayor punto de ebullición que las aminas de igual peso molecular. La explicación a este hecho reside en la mayor electronegatividad del átomo de oxígeno en comparación con el átomo de nitrógeno, que hace que los puentes de hidrógeno O-H sean más fuertes que los puentes de hidrógeno N-H (**Abdullah et al.**, 2014).

Entre los alcoholes existentes el etanol es uno de los más seguros de manejar, menos tóxico y tiene una densidad energética de 8.03kWhkg^{-1} mayor que el metanol de 6.07kWhkg^{-1} (Carrera-Cerritos *et al.*, 2014), como se muestra en la tabla 2.3.1. Además, puede ser producido fácilmente en grandes cantidades a través de la fermentación de azúcares por medio de procesos biológicos, por lo que lo hace atractivo para su utilización y parece cumplir la mayor parte de los requisitos que tiene que tener un combustible de baja temperatura para ser utilizado en celdas de combustible, especialmente para las celdas de etanol directas (Rousseau *et al.*, 2006).

Cuando el etanol se necesita para uso industrial, se suele sintetizar a través de hidratación catalítica de etileno junto con ácido sulfúrico, que participa como catalizador. El etileno es un compuesto derivado del etano o también de nafta (que es un derivado del petróleo). Una vez sintetizado, se obtiene una mezcla compuesta por etanol y agua que deberá ser purificada posteriormente mediante diferentes procesos. Se suele decir que este tipo de proceso es menos costoso que la fermentación tradicional, aunque en la actualidad solo representa a un total del 5% de la producción mundial de etanol. La fermentación del etanol se realiza partiendo de la fermentación anaeróbica de azúcares junto a levadura, cuando se encuentran estos en una disolución acuosa, a través siempre de destilación. Siempre su principal uso ha sido la fabricación de bebidas alcohólicas (Crutzen *et al.*, 2007)

Tabla 1.3.1. Número de electrones, potencial estándar, la energía específica teórica y densidad de energía, capacidad de compuesto puro, y la eficiencia de conversión de energía teórica para la oxidación.

Combustible	n	E° (V)	W_s (kWh.kg^{-1})	W_e (kWh.l^{-1})	C (Ah.kg^{-1})	η (%)
Hidrogeno	1	1.23	32.80	0.18 ^a	26 668	83
Metanol	6	1.21	6.07	4.82	5 019	97
Etanol	12	1.15	8.03	6.28	6 981	97
1-Propanol	18	1.13	9.07	7.28	8 027	97
2-Propanol	18	1.12	8.99	7.07	8 027	97
Etilenglicol	10	1.22	5.27	5.87	4 318	99

Glicerol	14	1.25	5.09	6.42	4.074	
----------	----	------	------	------	-------	--

^aH₂ almacenado a 70 bar y 25°C

2.4 Electro-oxidación del etanol.

En varios informes, (Lamy *et al.*, 2009) han desarrollado en detalle las diferentes relaciones que nos permiten calcular varios parámetros termodinámicos importantes de para celdas directas de etanol. El cambio de energía de Gibbs de etanol (en condiciones estándar) es -1,326.7 kJ/mol, por lo tanto, la fuerza electromotriz de la celda es:

$$E^{\circ} = 1.145 \text{ V}$$

La eficiencia termodinámica de la celda, considerando un valor de $\Delta H^{\circ} = -1,367.9 \text{ kJ/mol}$ para el etanol es de 0.97.

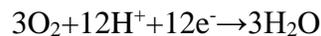
La oxidación anódica completa del etanol, la reducción del oxígeno y la reacción global de estas últimas celdas se puede describir como sigue:

Reacción en el ánodo:



($E_a = 0.084 \text{ V}$ & electrodo estándar de hidrógeno)

Reacción en el cátodo:



($E_c = 1.229 \text{ V}$ & electrodo estándar de hidrógeno)

Reacción global:



($E_{\text{celda}} = 1.145 \text{ V}$ & electrodo estándar de hidrógeno)

La electro-oxidación completa del etanol implica la liberación de 12 electrones por molécula y la escisión de enlace de C-C. Este último se cree que juega un papel clave en la electro-oxidación y tiene un efecto determinante en la eficiencia de la celda de combustible y el rendimiento de energía eléctrica (**Chetty et al.**, 2007).

Es crucial que el potencial de electrodo en el que se evalúa la corriente sea lo suficientemente bajo de modo que, cuando se combina con la reacción catódica el potencial resultante es significativo para el funcionamiento de la celda de combustible. Otra consideración importante es la formación de productos en la reacción de oxidación particular para la oxidación de alcoholes que contiene dos o más átomos de carbono. La oxidación de etanol es un buen ejemplo de este problema. Idealmente, la oxidación debe proceder al dióxido de carbono como producto final con la producción de 12 electrones. Sin embargo, varios catalizadores para la oxidación del etanol dan ácido acético como el producto final, con la producción de sólo 4 electrones. Aunque estos catalizadores se consideran buenos, ya que producen altas densidades de corriente, permanece el problema de la difícil implementación de una celda de combustible que produzca ácido acético como producto final. El problema se vuelve aún más complejo cuando se considera la oxidación de alcoholes superiores como es el caso del glicerol (**Murray et al.**, 1963).

2.5 Desafíos de las celdas de etanol.

Para la oxidación del etanol, el catalizador y su óptima relación atómica sigue siendo crucial. La preparación del catalizador afecta la naturaleza y estructura, desempeñando un papel fundamental en la absorción de etanol como lo es también el soporte; por lo que es necesario realizar investigaciones sobre la creación de electrodos (ya sea ánodo o cátodo) donde se le proporcione al catalizador las mejores condiciones de trabajo (**Jiang et al.**, 2005).

Otro aspecto que ha surgido en los últimos años en la electrocatálisis de oxidación de alcoholes es el uso de nanopartículas de catalizador. El soporte puede influir en la electrocatálisis de la reacción a través de más de un efecto, como en la dispersión de las

nanopartículas de catalizador, que por lo general un aumento de la dispersión incrementará la densidad de corriente (**Friedl et al.**, 2013).

El soporte también puede tener un efecto sobre la densidad electrónica del catalizador, afectando a la fuerza de adsorción de envenenamiento por productos intermedios de la reacción. Si el soporte es un óxido puede participar directamente en el proceso electrocatalítico proporcionando especies oxigenadas que actuarán a través del mecanismo bifuncional (**Sharma et al.**, 2012).

Las propiedades ideales de soporte incluyen la resistencia física a la compresión, hidrofobicidad, biocompatibilidad, resistencia al ataque microbiano, disponibilidad y bajo costo. Los soportes se pueden clasificar en orgánicos o inorgánicos de acuerdo con su composición química. Los soportes orgánicos pueden ser subdivididos en naturales y polímeros sintéticos. Las características físicas de las matrices que (tales como el diámetro de la partícula, resistencia mecánica y el comportamiento a la compresión) serán de gran importancia para el rendimiento de los sistemas inmovilizados. (**Brena et al.**, 2006).

Tradicionalmente, el carbón ha sido el soporte preferido y utilizado casi universalmente. Tiene un tamaño de partícula suficientemente pequeño y es relativamente barato. Sin embargo, tiene algunos problemas, el más importante de los cuales es quizás el hecho de que sufre la oxidación y la degradación, en particular bajo el alto potencial del cátodo (**Kim et al.**, 2004).

En las celdas de combustible directas de etanol se puede desarrollar un sistema electroquímico eficiente, para ello los catalizadores deben desarrollarse según las condiciones de funcionamiento de la celda para el fomento de la oxidación completa del etanol (**Zhou et al.**, 2005).

Varios estudios sobre la electro-oxidación de etanol se han enfocado principalmente a la identificación de los productos intermediarios adsorbidos en el electrodo y emular el mecanismo de reacción por medio de diversas técnicas, como diferencial electroquímico de espectroscopía de masas, transformada de Fourier in situ de espectroscopía infrarroja y espectroscopía de masas de desorción térmica (**Willsau et al.**, 1985, **Iwasita et al.**, 1994).

Tambiéne ha llevado a cabo la oxidación de etanol en medios alcalinos, debido a un posible uso del alcohol como combustible para celdas alcalinas. Se ha visto el efecto de la presencia de óxido en la actividad de catalizadores en medios alcalinos, específicamente de Pt para la oxidación de etanol en soluciones 0.1M de KOH por voltamperometría cíclica, cronopotenciometría y espectroscopía de impedancia electroquímica (**Verma** et al., 2005).

Celdas de combustible de oxidación directa alcalinas que utilizan varios combustibles líquidos, han atraído recientemente la atención debido a que presentan ventajas, por ejemplo el uso del etanol, ya sea por sus propiedades fisicoquímicas únicas, incluyendo la facilidad de transporte, almacenamiento, así como manipulación pero este tipo de celdas presentan inconvenientes como la dificultad de ser comercializadas, problemas de carbonatación asociada a la presencia de CO₂ en el cátodo cuando el aire es utilizado como oxidante. Por un lado, el carbonato que es producido por la reacción química entre el CO₂ en el aire y los iones OH⁻ en el cátodo, puede conducir una disminución de las conductividades iónicas, aumentando así la resistencia (**Anet** et al., 2011).

El álcali permeado desde el ánodo provoca la precipitación carbonato en el cátodo, que solo cubre sitios activos e incluso bloquea los poros del electrodo, sino que provoca la disminución de la cinética de la reacción y el aumento de la resistencia del transporte de masa de oxígeno, también reduce la hidrofobicidad del electrodo, la reducción de la capacidad de eliminación de agua. Por lo tanto es importante evitar la acumulación de CO₂ en la cátodo, una forma es consiste en incluir un filtro de aire fuera del cátodo que separa el CO₂ del aire, con el aire libre de CO₂, sin embargo se aumenta la complejidad del diseño de la celda de combustible, ya que tienden a volverse más voluminosas (**McLean** et al., 2002).

La comprensión del mecanismo de reacción de oxidación de etanol basado en el Pt a bajas temperaturas es de relevante importancia en las celdas directas de etanol. Varios estudios indican que la electrocatalizadores con mayor actividad son aleaciones Pt-Sn, aunque recientemente se ha encontrado que Pt modificado con tierras raras de óxidos parecen mejorar la actividad catalítica para esta reacción (**Zhou** et al., 2003; **Vigier** et al., 2004). El óxido de Cerio es un material interesante para este tipo de aplicaciones, ya que se ha informado que

pueden ser utilizados como co-catalizador o como co-soporte (**Antolini** et al., 2011). Las densidades de potencia obtenidas de celdas directas de etanol se han incrementado mediante el uso de aleaciones de Pt en ánodos. Xiny y colaboradores mostraron pruebas de aleaciones bi-metálicas y tri-metálicas, donde se encontró que la actividad catalítica disminuye en el orden Pt-Sn/C > Pt-Ru/C > Pt-W/C > Pt-Pd/C > Pt/C (**Xin** et al., 2006).

2.6 Bioceldas de combustible.

Las celdas de combustibles que utilizan catalizadores biológicos se denominan bioceldas de combustible, las cuales no se deben de interpretar como celdas que utilizan combustibles de origen biológico, ya que muchos de ellos pueden obtenerse tanto de una fuente biológica o no biológica (**Katz** et al., 2003). Una biocelda emula procesos electroquímicos que ocurren en la naturaleza, sin hacer uso de electrocatalizadores metálicos como el platino, por ejemplo, el proceso oxidativo del etanol en el hígado humano, catalizada por las enzimas alcohol y aldehído deshidrogenasa ejemplifica el proceso bioánodico (**Park** et al., 2000). Las bioceldas sin membrana pueden ser miniaturizadas y su construcción permite la utilización de oxidantes y combustibles que pueden ser obtenidos desde un ambiente circundante, tal es el caso de la sangre (**Heller**, 2004).

La conexión entre la biología y la electricidad se conoce desde los experimentos sobre electricidad animal de Luigi Galvani en la década de 1780, quien observó que cuando una rana desollada se sitúa cerca de una máquina electrostática, basta sacar o producir chispas en ésta y tocar los nervios crurales del batracio con un bisturí, para que sus patas se contraigan (**Piccolino**, 2006). Posteriormente, Grove invierte con éxito la acción de la electrólisis del agua, recombinación del hidrógeno y oxígeno para producir agua y corriente eléctrica, que es el fundamento de las celdas de combustible (**Grove**, 1839).

La expansión del interés en las bioceldas de combustible fue provocada por el programa espacial de Estados Unidos de América a finales de 1950 y comienzos de 1960, dirigido al desarrollo de celdas de combustible microbianas como una posible tecnología en un sistema de eliminación de residuos y generación de energía para los vuelos espaciales. También, a

finales de la década de 1960, utilizando sistemas enzimáticos libres de las células, comenzaron a ser utilizados, con el objetivo inicial de contar con una fuente de alimentación permanente para un corazón artificial (**Bullen** et al., 2006).

La biocelda está formada por dos electrodos separados por una membrana (un material especialmente tratado que permite el paso de iones). En el electrodo negativo (ánodo) tiene lugar la oxidación del y en el positivo (cátodo), la reducción del oxígeno del aire (**Ayato** Yusuke et a., 2014).

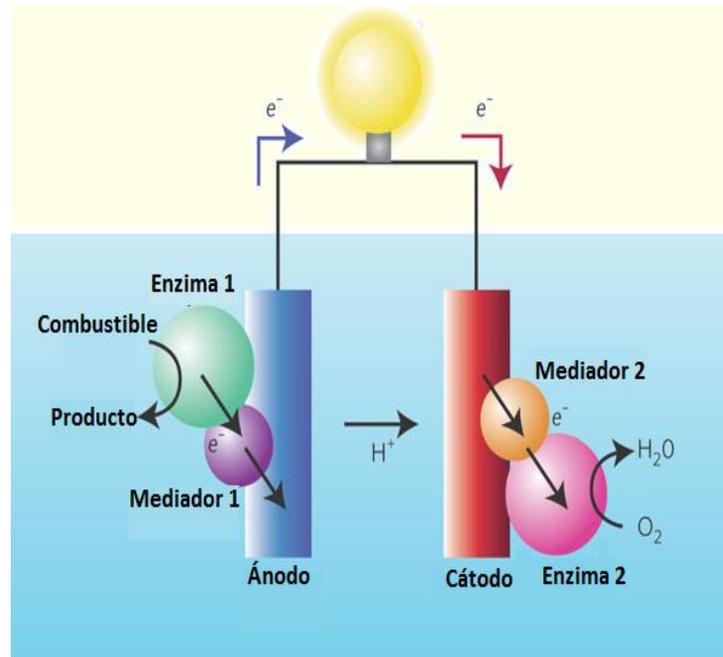


Figura 2.6.1. Diagrama del funcionamiento de una biocelda de combustible.

Las bioceldas de combustible tienen un gran potencial para la directa conversión de la energía bioquímica almacenada en electricidad (**Bullen** et al., 2006). Por lo general, los catalizadores enzimáticos o las vías bioquímicas de microorganismos se emplean para catalizar las reacciones en las bioceldas de combustible. De esta forma el uso de catalizadores metálicos costosos se elude y se utiliza el carbón como soporte (**Sané**, 2014). Sin embargo, una de las formas para que las bioceldas a escala laboratorio tengan una aplicación práctica, el

rendimiento del ánodo debe ser mejorado y se debe facilitar la transferencia de electrones hacia el cátodo que depende del intercambio electroquímico (**Harnisch et al.**, 2010).

Las bioceldas de combustible se pueden clasificar de acuerdo al biocatalizador utilizado, como se puede apreciar en la figura 21.6.2. Los sistemas que hacen uso de enzimas aisladas son conocidos como bioceldas de combustible enzimáticas, la utilización de organismos que contienen las vías enzimáticas completas se les conoce como bioceldas microbianas y existe un tercer grupo que ha surgido recientemente basado en orgánulos mitocondriales (**Davis, et al.**, 2007).

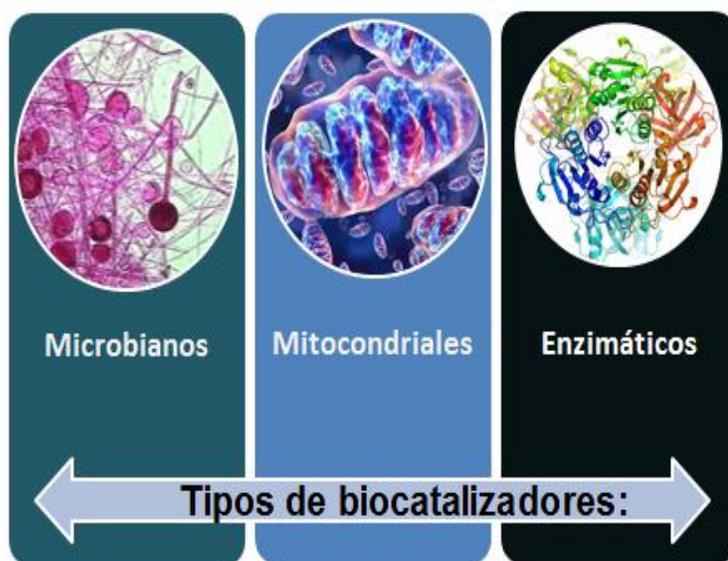


Figura 2.6.2. Tipos de biocatalizadores.

Varias diferencias operacionales existen entre estos tipos de bioceldas de combustible que pueden ser identificadas de inmediato. Las enzimas aisladas son muy selectivas a sustratos específicos, mientras que las enzimas contenidas en los organismos pueden ser utilizadas para una amplia gama de combustibles. Por otra parte, un desglose completo del combustible orgánico a dióxido de carbono y agua es por lo general posible en varias etapas de reacción. Esto es más fácil de lograr en las bioceldas mitocondriales aunque también se puede lograr con la combinación de una serie de enzimas específicas (**Arechederra et al.**, 2009).

1.6.1 Bioceldas microbiana

Las celdas de combustible microbianas son sistemas bioelectroquímicos capaces de digerir un amplio rango de sustancias orgánicas, incluyendo distintos tipos de aguas residuales, y generar energía eléctrica en ese proceso de digestión. Este tipo de bioceldas emplean bacterias para oxidar el combustible, materia orgánica, y transferir los electrones a un electrodo (ánodo), que está conectado a un cátodo a través de un material conductor que contiene una resistencia (**Santoro et al.**, 2014).

Las cámaras que albergan estos electrodos, la anódica (que suele ser anaeróbica, ya que el proceso de transferencia de electrones lo suelen hacer bacterias que respiran sustancias diferentes al oxígeno) y la catódica, están comunicadas por una membrana de intercambio catiónico que permite el paso de protones. De esta forma, los protones generados en la oxidación de la materia orgánica se combinan con el oxígeno y con los electrones que llegan al cátodo para formar agua (**Rinaldi et al.**, 2009).

Los análisis de las comunidades microbianas asociadas a los ánodos de las bioceldas microbianas muestran una gran diversidad de géneros bacterianos dependiendo de la naturaleza del inóculo, del combustible y del tipo de celda utilizada. Uno del grupo de microorganismos que se ha mostrado como muy eficaz en la transferencia de electrones a una biocelda microbiana es el de la delta-proteobacterias (**Santoro et al.**, 2013).

La gran revolución en el campo de las celdas microbianas se ha producido en el último lustro, con el descubrimiento de microorganismos electrogénicos que son capaces de transferir los electrones al ánodo en ausencia de mediadores redox artificiales (**Karra et al.**, 2013).

Se puede distinguir dos tipos de bacterias electrogénicas, aquellas que producen sus propios mediadores redox, que son secretados al medio y reaccionan con el electrodo, y aquellas que interaccionan de forma directa con el electrodo sin mediador soluble alguno. Así por ejemplo se han descrito que *Shewanella* secreta riboflavinas que actúan como mediadores redox entre la bacteria y el electrodo (**Santoro et al.**, 2013) En el segundo grupo, el de la transferencia directa por contacto bacteria-electrodo se encuentran las bacterias del género *Geobacter*.

Otros microorganismos como *Rhodospirillum rubrum*, *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium butyricum* y *Enterococcus gallinarum* también tienen la capacidad de ceder electrones, pero por mecanismos aún no conocidos” (Bourgeois et al., 2001).

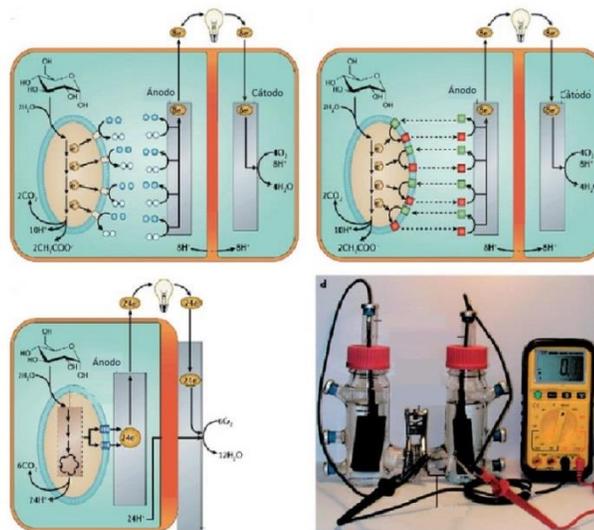


Figura 2.6.1.1. Biocelda microbiana

Las bacterias del género *Geobacter* son habitantes de forma natural del subsuelo y durante millones de años han utilizado los óxidos de hierro insolubles como aceptores de electrones para oxidar la materia orgánica. Los mecanismos responsables de establecer una comunicación redox entre la bacteria y la superficie de los óxidos de hierro han contribuido a “dar forma” a la corteza terrestre, y comprenderlos constituye uno de los retos de la microbiología medioambiental. *Geobacter* es capaz de producir magnetita en ambientes sedimentarios, así como de respirar uranio, biodegradar anaeróbicamente compuestos aromáticos contaminantes, respirar ácidos húmicos en ambientes naturales o transferir electrones a electrodos, con la consiguiente producción de electricidad (Wu et al., 2013).

A estos grupos de microorganismos que efectúan la degradación de contaminantes orgánicos por las vías aeróbica y anaeróbicas son de añadirse otros grupos de microorganismos de reciente descubrimiento, los cuales en vez de utilizar oxígeno como aceptor de electrones utilizan fuentes alternativas de aceptores de electrones bajo condiciones anaeróbicas o

anoxicas, cuya eficiencia energética es mucho menor que la del oxígeno(Santoro et al., 2014). Esto significa que los microorganismos obtienen más energía para su crecimiento y reproducción cuando utilizan oxígeno, que cuando utilizan otro aceptor de electrones. Debido a que en muchos tipos de suelos las sustancias que pueden ser utilizados como los aceptadores de electrones de menor eficiencia energética abundan, estos ayudan a reducir la carga de contaminantes de manera significativa, siempre y cuando estos y las bacterias asociadas a ellos se encuentren presentes (Lee et al., 2012).

1.6.2 Bioceldas mitocondriales.

Aunque las mitocondrias han sido consideradas el motor de la célula viva, son sólo recientemente empleadas para electrocatálisis en dispositivos de conversión de energía electroquímica. El concepto de usar entidades biológicas para la conversión de energía, comúnmente referido como una celda de biocombustible, se ha investigado durante casi un siglo, pero hasta hace poco las entidades biológicas se limita a microbios o enzimas aisladas. Sin embargo, desde la perspectiva de la conversión de energía eficiente y de alta actividad catalítica volumétrica, las mitocondrias pueden ser un posible compromiso entre la eficiencia de las células microbianas de biocombustibles y la alta actividad catalítica volumétrica de células de combustible biológico enzimáticas (Arechederra et al., 2008).

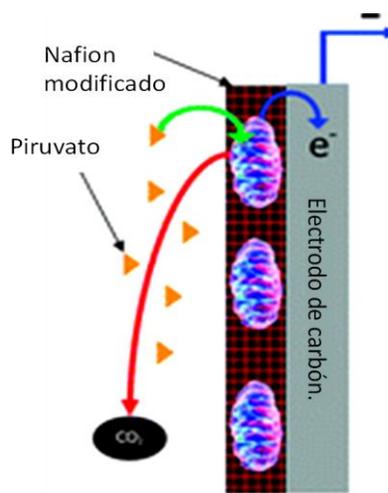


Figura 1.6.2.1. Biocelda mitocondrial.

Esta perspectiva se centra en la comparación de células de biocombustible mitocondriales a otros tipos de células de biocombustible, así como el estudio de la diversidad de combustible que puede ser empleado con las células de biocombustibles mitocondriales. Ácidos grasos piruvato y previamente han sido estudiados como combustibles, pero esta perspectiva muestra evidencia de que los aminoácidos se pueden emplear como combustibles también (**Davis, et al., 2007**).

2.6.3 Bioceldas enzimáticas.

Bioceldas de combustible enzimáticas son una fuente de energía potencial para alimentar dispositivos electrónicos a micro escala, teniendo aplicaciones en el campo de las telecomunicaciones, el espacio, investigaciones biomédicas y ambientales (**Barton et al., 2001**).

Las oxidorreductasas tiene muchas ventajas en relación a los catalizadores convencionales: pueden ser producidas a menores costos, utilizan temperaturas óptimas cercanas a las ambientales, el sobrepotencial electroquímico inherente es generalmente bajo, utilizan una gran variedad de combustibles y oxidantes. La especificidad de la catálisis enzimática introduce una amplia gama de beneficios adicionales: flujos de combustibles y oxidantes se pueden combinar en un solo colector; son es necesaria una membrana de intercambio de protones (**Moore et al., 2005**).

Convencionalmente, en una celda que utiliza enzimas, se trabaja con soluciones tamponadas con el sustrato a una determinada concentración en los compartimientos de la celda, los cuales incluyen un par redox que actúa como un mediador de electrones difusional (cofactor) que es necesaria para la utilización del catalizador eficiente (**Willner et al., 2000**). **Palmore et al.**, introdujeron NAD^+ como cofactor en bioánodos obteniendo un potencial de circuito abierto de 0.8V frente a un cátodo Pt convencional y una densidad de potencia máxima de 0.67mWcm^2 . La tasa de transferencia de electrones se limita generalmente por la velocidad de difusión de estas especies redox y la permeabilidad a los iones de la membrana que separa los compartimientos.

Las bioceldas de combustible que hacen uso de enzimas purificadas han surgido a partir del deseo de tener reacciones específicas y definidas en la biocelda (**Ikeda et al.**, 2001). Aunque, el desarrollo de dispositivos que empleen biocombustibles para su funcionamiento está en desarrollo, las investigaciones de electrodos biocatalíticamente modificados, en particular para aplicaciones de sensores, ha proporcionado información para el desarrollo de bioceldas de combustible. (**Barton et al.**, 2004). También la variedad de reacciones capaces de ser catalizadas por enzimas hace que el uso de una amplia gama de sustancias como glucosa y otros combustibles orgánicos como glicerol, alcoholes, aldehídos, cetonas, fructosa hastamoléculas más complejas como es el caso de almidones solubles. (**Osman et al.**, 2011).

La selección de las enzimas para la fabricación de bioelectrodo se basa en la elección del combustible utilizado para generar la densidad de potencia, por lo cual, los combustibles de naturaleza alcohólica, principalmente metanol y etanol han recibido cada vez más atención para el desarrollo de celdas de combustible químicas y biológicas. Las ventajas de los alcoholes como combustible son: su solubilidad acuosa y amplia disponibilidad, ya que estos compuestos pueden ser producidos fácilmente por medios fermentativos o químicos de combustibles renovables baratos (**Rincon. et al.**, 2011). La enzima Alcohol deshidrogenasa (ADH) depende del NAD^+ para poder llevar a cabo la oxidación de alcoholes y se utiliza en las bioceldas de combustible por su bajo potencial redox (**Bartlett et al.**, 2007).

Los catalizadores primarios utilizados en las bioceldas para iniciar la reacción redox para generar energía son enzimas redox. El número de diferentes enzimas redox reportados hasta ahora para el desarrollo de bioceldas es limitado y entre ellas se encuentran la glucosa oxidasa, alcohol deshidrogenasa (ADH), glucosa deshidrogenasa, fructosa deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, lacasa, billirubinoxidasa, microperoxidasa, y peroxidasa del rábano picante (**Ramanavicius et al.**, 2008). Hoy en día existen diversos estudios donde este tipo de celdas son implantadas incluso en organismos vivos como se muestra en la figura 2.6.3.1.

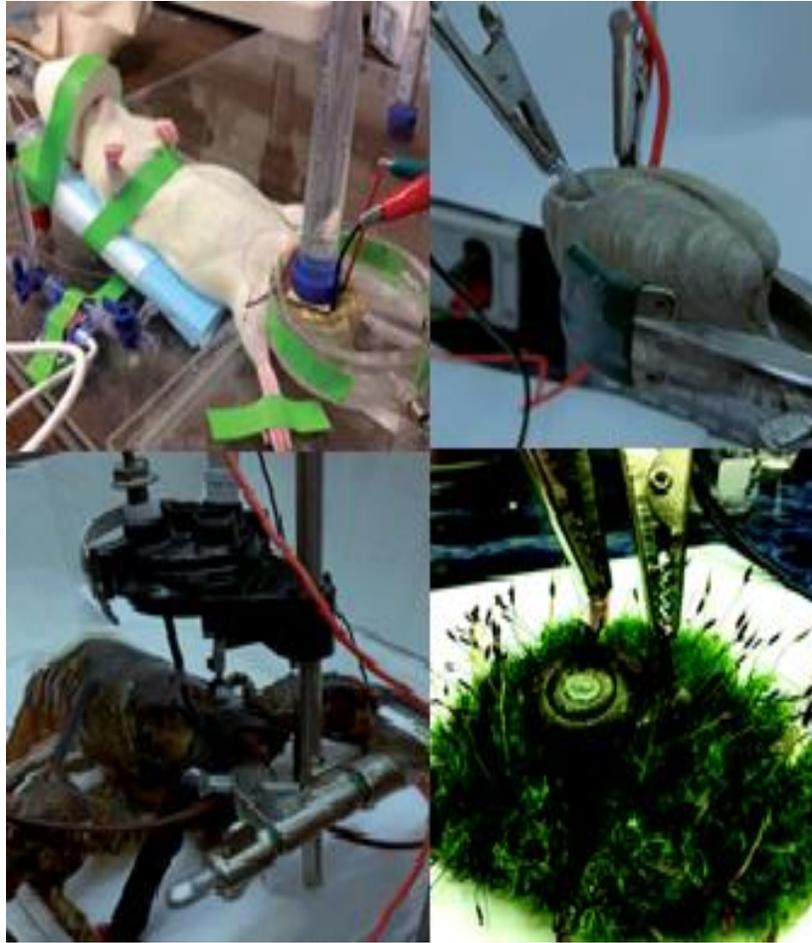


Figura 2.6.3.1. Pruebas de bioceldas de combustible implantadas en animales vivos.

Hay muy pocos informes sobre bioceldas de combustible para la producción de energía eléctrica en vivo, como se puede observar en los diagramas presentados en la figura 2.6.3.2. Obviamente hay una gran diferencia entre celdas potencialmente implantables y celdas de combustible ya implantadas. Mientras que las primeras podrían operar bajo condiciones que imitan el medio ambiente natural, este debe satisfacer numerosos factores existentes en el organismo vivo en condiciones fisiológicas, que es mucho más difícil de lograr. Aún existen diversos detalles en los que se trabaja, como la creación de electrodos con enzimas modificadas, que depende mucho de la inmovilización enzimática, utilizado para el proceso bioelectrocatalítico (Szczupak *et al.*, 2012).

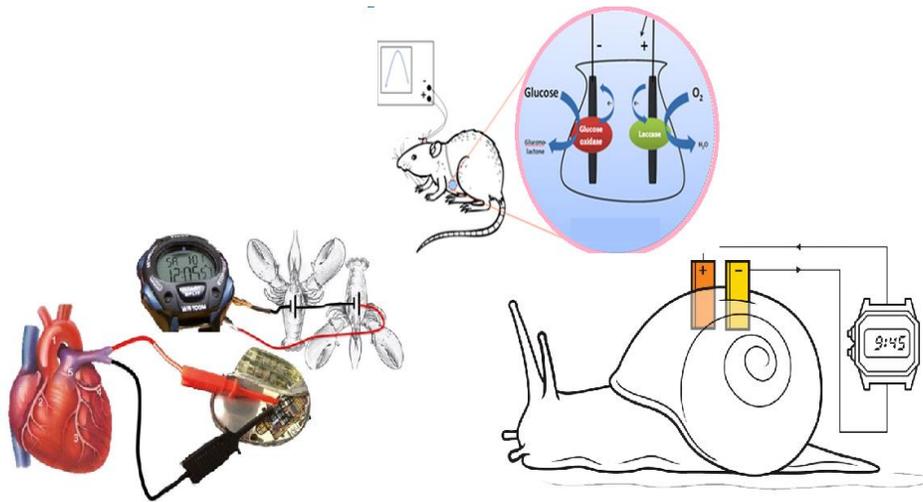


Figura 2.6.3.2. Diagramas de bioceldas de combustible implantadas en animales.

Las bioceldas de combustible enzimáticas tienen baja eficiencia, ya que en su mayoría se emplea solo un tipo de enzima, por lo cual se oxida parcialmente el combustible. Las enzimas tienen periodos cortos de actividad (8 h hasta 2 días) en solución buffer, y puede extenderse a 7-20 días por medio de la inmovilización en electrodos a través de atrapamiento, unión química y la reticulación. Recientemente, se ha prolongado la actividad más allá de 1 año a través de la encapsulación micelar en polímeros. Estos polímeros limitan físicamente la enzima y evitan que se desnaturalice al proporcionar un nido hidrófobo biocompatible (Minteer *et al.*, 2007).

El grupo de investigación de Minteer *et al.*, lograron crear un ánodo biocatalítico a través de la encapsulación de la enzima alcohol deshidrogenasa en una matriz de Nafion modificado, que demostró ser cinéticamente limitado por la difusión del cofactor NADH dentro de la estructura de la membrana, a pesar de esta limitación, la mejora de las densidades de potencias van desde 1.16 a 2.04 mWcm⁻² utilizando una celda electroquímica con un cátodo de Pt.

Las bioceldas de combustible se beneficiarán desde el desarrollo de las tecnologías de las celdas microfluidicas ya que se mejora la convección de transporte de masa, lo que permite una tasa de rotación enzimática para alcanzar su capacidad completa asociado con el transporte por difusión; hay un mayor aprovechamiento de la relación de superficie volumen de la celda de combustible, inherente a los dispositivos microestructurados para promover las reacciones electroquímicas catalizadas por enzimas inmovilizadas (**Soukharev et al.**, 2004).

3. METODOLOGÍA

3.1 Diseño del bioánodo y preparación.

Uno de los primeros pasos para la construcción del bioánodo basado en la enzima Alcohol deshidrogenasa es la selección del método de inmovilización enzimático. Después de una evaluación de los métodos existentes, la unión covalente es una buena alternativa para el incremento de la estabilidad del bioánodo y por consecuente de la celda de combustible microfluidica, aunque su proceso es más difícil, como lo es también lograr la orientación adecuada del sitio activo de la enzima con el sustrato, en este caso, etanol. Otro aspecto importante es que la enzima debe quedar unida al electrodo por mucho más tiempo cuando se les esté aplicando una fuerza, que sería el caso del flujo laminar. También la selección del material de soporte es vital, ya que es ahí donde la enzima quedara confinada.

Las técnicas de inmovilización, se presentan en los últimos tiempos como una herramienta muy poderosa para mejorar casi todas las propiedades de las enzimas, sí se diseñan correctamente: por ejemplo, la estabilidad, la actividad, especificidad, selectividad y la reducción de la inhibición. En la inmovilización se propone controlar la interacción entre el soporte y la enzima, para aumentar las posibilidades de éxito. El uso de un catalizador relativamente costoso como es el caso de una enzima requiere, en muchos casos, su recuperación y reutilización para hacer un proceso económicamente factible. Sin embargo, la idea de la reutilización de la enzima significa directamente que la estabilidad de la

enzimática debe ser lo suficientemente alta para permitir esta reutilización, por lo que encontrar el mejor método de inmovilización es muy importante.

3.1.1 Inmovilización covalente multipunto.

Una técnica muy interesante es el método de inmovilización covalente multipunto (**Pedroche** et al., 2007), ya que promueve el aumento de la rigidez de las uniones covalentes permitiendo que la enzima quede inmovilizada con la mayor conservación de la actividad catalítica, como se muestra en la figura 3.1.1.1. Este método permite conservar las uniones covalentes disminuyendo las alteraciones causada por agentes deformantes (calor, disolventes orgánicos, cambios bruscos de pH) por mucho más tiempo (**Ichikawa** et al., 2002). Esto reduce cualquier cambio conformacional que provoca la inactivación de enzimas y el aumento de gran medida de la estabilidad. Así, las condiciones de la inmovilización covalente multipunto debe ser cuidadosamente seleccionadas para ser capaz de involucrar el máximo número de grupos que formen uniones covalentes entre el soporte y la enzima inmovilizada.

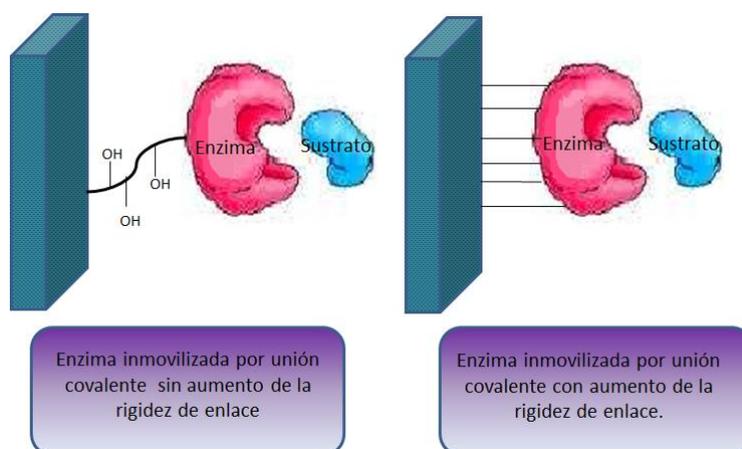


Figura 3.1.1.1. Diferencia entre la inmovilización covalente convencional y la unión covalente multipunto.

La técnica del utilizar glutaraldehído es muy versátil y puede usarse de diferentes formas. En términos de estabilización, el tratamiento de proteínas con glutaraldehído ofrece muy buenos resultados, ya que se crean uniones entre las moléculas del glutaraldehído con las de la

enzima y el glutaraldehído con el soporte, pero si no se utiliza en concentraciones adecuadas, puede modificar en su totalidad la estructura de la enzima (**Grazú** et al., 2006).

Para el método de unión covalente multipunto sea adecuado, la selección de las condiciones de inmovilización es crítica para maximizar las uniones covalentes. Algunas de estas variables críticas son:

- ◆ Tiempo de reacción. Aunque la inmovilización puede ser rápida, las interacciones entre la enzima y el sustrato puede ser un proceso lento y depende del tiempo del proceso, requiere una alineación correcta entre los grupos situados en la superficie del soporte y de la enzima (**Mateo** et al., 2007).
- ◆ pH. Aunque la inmovilización multipunto puede realizarse en pH neutro, la reactividad de los nucleófilos de la proteína, generalmente lisina, puede ser mejorado. Se debe tener en cuenta que mientras que algunos grupos aminos terminales pueden tener un pK entre 7 y 8, los grupos expuestos de lisina presentarán un pK sobre 10.5 (**Mateo** et al., 2007).
- ◆ Temperatura. Temperaturas moderadamente altas pueden favorecer la vibración entre la enzima y el soporte, aumentando las posibilidades de formar uniones covalentes (**Sakai** et al., 2003).
- ◆ Soluciones tampón. Se debe elegir soluciones tampón que no interferirán en la reacción enzimática. Por ejemplo, el borato puede interferir en las reacciones de aldehído-amina; compuestos amino (Tris, etanol amina) puede modificar los soportes epoxi (**Mateo** et al., 2006).

Por lo tanto, un diseño de inmovilización covalente multipunto adecuado para estabilizar una enzima debe considerar muchos hechos diferentes. No obstante, si se diseña adecuadamente, los resultados alcanzados a través de esta técnica de inmovilización puede ser realmente impresionante, perfectamente comparable a cualquier otra técnica de estabilización.

3.2 Selección de los materiales para la inmovilización covalente.

Es importante hacer mención de las propiedades de los materiales seleccionados, ya que proporcionan la información de cómo ayudan al incremento de la estabilidad del bioánodo desarrollado, así como de la potencia de la biocelda de combustible, utilizando etanol. Las propiedades de los materiales seleccionados en la construcción de este bioánodo se presentan a continuación.

3.3 Diseño del bioánodo y preparación.

Revisando los antecedentes de las bioceldas que utilizan la enzima Alcohol deshidrogenasa, uno de los trabajos de mayor interés, mostraba una inmovilización basada en la electropolimerización del verde de metilo para formar una capa de poli-verde de metilo; posteriormente se depositó la enzima con una mezcla de materiales que incrementan la estabilidad, formando la unión covalente, reportando un potencial de circuito abierto máximo de 0.62V, una potencia máxima de $1160 \mu\text{Wcm}^2$, trabajando en una biocelda híbrida descrita como reservorios, mostrando una pérdida de la potencia del 30% después de 30 días (Akers et al., 2005).

Este trabajo sirvió de referencia ya que es la potencia máxima de la biocelda reportada con esta enzima, utilizando una concentración de etanol 0.1M en solución amortiguadora de fosfatos. Por tal motivo se optó por el método de utilizar colorantes para la formación de grupos funcionales para la unión covalente con la enzima Alcohol deshidrogenasa, haciendo uso de varios materiales. La evaluación de la interacción entre cada uno de los materiales entre ellos así como con el electrolito es importante para garantizar el buen funcionamiento del bioánodo.

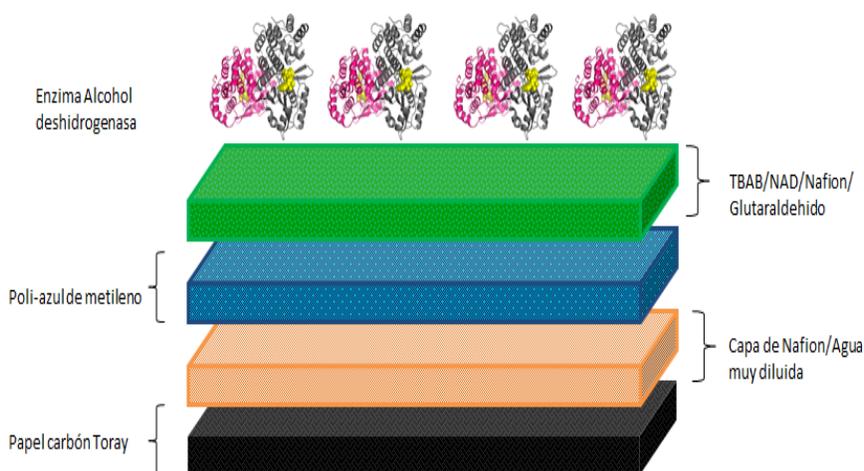


Figura 3.3.1. Arreglo del bioánodo basado en la enzima Alcohol deshidrogenasa.

El bioánodo debe ser conductor electrónico para que se produzca el transporte de los electrones a través de un circuito externo, desde el ánodo hacia el cátodo. Debe ser estable en los ambientes reductores del combustible, y además, debe ser poroso para permitir el paso del gas reactivo hasta la triple frontera de fase donde ocurre la reacción electrocatalítica. Al estar en contacto físico con el electrolito, debe ser compatible, desde el punto de vista químico, térmico y mecánico; además en la interfase la resistencia eléctrica debe ser muy baja para facilitar el transporte electrónico. En la figura 3.3.1 se muestra el esquema del arreglo del bioánodo desarrollado, así como los materiales de los cuales se construye.

3.3.1 Reactivos

Azul de metileno (contenido de tinta , $\geq 82\%$, Sigma Aldrich), enzima Alcohol deshidrogenasa (EC. 1.1.1.1 actividad inicial ≥ 300 unidades/mg de proteína proveniente de la *Saccharomyces cerevisiae*), β -nicotinamida adenina dinucleotido sal de sodio (NAD^+ , NAD^+ , $\geq 95\%$, Sigma), bromuro de tetrabutilamonio (TBAB, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich), glutaraldehído (Grado I, 50% en agua, Sigma-Aldrich), Nafion (5% diluido en agua).

3.3.2 Electrodo de papel carbón Toray y formación de capa de Nafion/agua.

El primer paso para la construcción del bioánodo es la selección de las dimensiones de éste. Debido a que el bioánodo será utilizado en una celda de combustible tipo air-breathing ya diseñada (**Ortiz-Ortega** et al., 2014), las dimensiones que requiere el electrodo de papel carbón Toray es de 25 X 3mm, cuidando que previo al cortar el papel con dichas dimensiones, se le debe de dar un tratamiento térmico, utilizando un pequeño soplete, para destruir la capa de Teflón que se encuentra en el papel, ya que esta capa hace resistivo al material. Cortado el electrodo, se le coloca 100µL de una solución 5:100 de Nafion/agua desionizada distribuyéndola por todo el papel carbón Toray y se deja secar para poder crear una capa que sirve para que el polímero creado en la siguiente etapa se pueda adherir con mayor facilidad en el electrodo.

3.3.3 Electro-polimerización del azul de metileno

La siguiente etapa es la formación en el electrodo de papel Toray de una capa del polímero de poli(azul de metileno), la cual se forma por medio de la técnica de electro-polimerización. Los polímeros electrónicamente conductores son estructuras conjugadas, en la cadena carbonada del polímero consiste de enlaces alternados sencillos y dobles o triples.

La síntesis de un polímero conductor mediante oxidación electroquímica se realiza usando una celda electroquímica como se presenta en la **figura 3.3.1**. En la celda se adiciona una disolución compuesta por un disolvente, acuoso o no, un electrolito y una cantidad determinada de monómero. En este caso se utilizó una solución 0.1M de azul de metileno, preparada en agua desionizada. Al pasar la corriente, haciendo de ánodo el electrodo de trabajo, el cual fue utilizado el electrodo de papel carbón Toray, éste se cubre con la formación del polímero, en este caso el poli(azul de metileno).

Para llevar a cabo esta electro-polimerización, se utilizó un potencióstato Biologic VSP/galvanostato, equipo que se encuentra en el Centro multidisciplinario, del campus aeropuerto de la Universidad Autónoma de Querétaro, utilizando la técnica de voltametría cíclica de -1 a 1 V vs SCE durante 15 ciclos a una velocidad de barrido de 0.005V Vs⁻¹.

El número de ciclos fue seleccionado después de una evaluación electroquímica, debido a que si se aumentaba el número de ciclos se aumentaba la resistencia, por lo que 15 ciclos fue el número adecuado. La voltametría de la electro-polimerización del azul de metileno se muestra en la figura 3.3.3.1 donde el incremento de la corriente en función del número de ciclos puede indicar la formación de la película conductora.

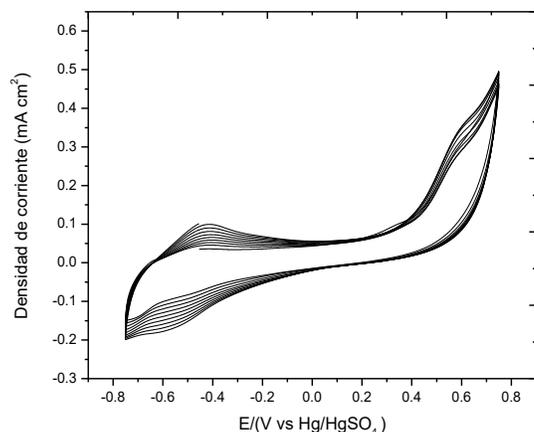


Figura 3.3.3.1. Voltametría de la electro-polimerización del azul de metileno sobre papel carbón Toray.

El objetivo de este proceso de electro-polimerización es la formación de un polímero conductor, como lo es el poli(azul de metileno) que tendrá varios grupos funcionales expuestos, que servirán para la formación de uniones covalentes para lograr la inmovilización de la enzima Alcohol deshidrogenasa y el cofactor con el soporte del electrodo, que en este caso es papel carbón Toray, por lo que esta etapa de la preparación es importante para el buen funcionamiento del bioánodo.

3.3.4 Preparación de la tinta catalítica.

La preparación de la tinta catalítica es muy importante ya que es la que contiene la enzima. Por cada miligramo de enzima se utiliza 5 μ L de Nafion, 10 μ L de glutaraldehído, 1000 μ L de agua desionizada, 10 mg de NAD⁺ Y 20 mg de TBAB. Lo primero es pesar la enzima y colocar el NAD⁺ y el TBAB, y se agrega el agua desionizada. Utilizando un vórtice, se agita 10 minutos,

para hacer la homogenización de la mezcla. Posterior a esto se agrega el glutaraldehído y se agita por otros 10 minutos. Terminado este tiempo se sónica la mezcla por 15 minutos y se agrega el Nafion, homogenizando y sonicando nuevamente por 5 y 10 minutos respectivamente.

Estos materiales fueron seleccionados, debido a que ayudan a obtener una inmovilización por unión covalente multipunto, ya que se aumenta la rigidez de las uniones covalentes que se hacen con el poli(azul de metileno), dejando a la enzima confinada con éxito, aumentando la estabilidad del electrodo.

3.3.5 Depósito de la tinta catalítica.

Ya preparada la tinta catalítica el siguiente paso es depositarla en el electrodo de papel carbón Toray ya polimerizado con el azul de metileno, realizando un enjuague previo con agua desionizada, para eliminar el exceso de poli(azul de metileno). De la tinta preparada se toman 100 μL y se depositan uniformemente por el electrodo y se deja secar. Lo más recomendable es agregar la tinta de 20 μL hasta completar 100 μL y dejando secar en cada periodo, así la tinta queda mejor distribuida.

Ya con el depósito de la tinta se completa la preparación del bioánodo así como la inmovilización de la enzima por unión covalente, como se muestra en el esquema de los componentes del bioánodo, en la figura 3.3.5.1.

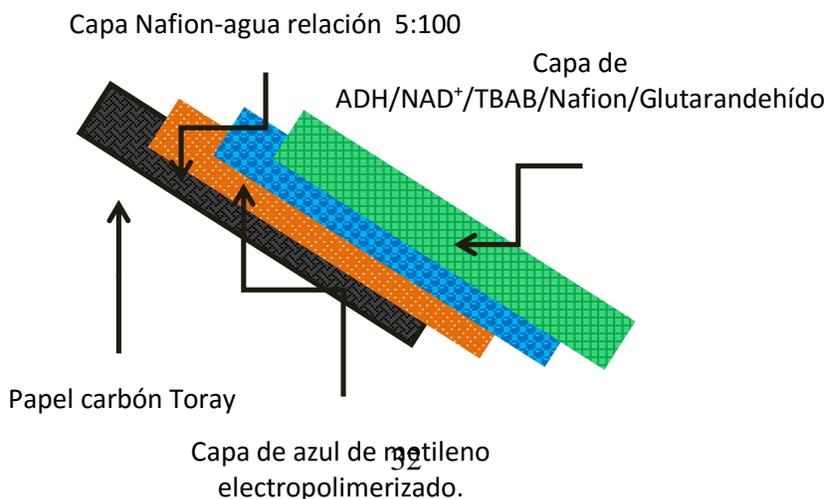


Figura 3.3.5.1 Esquema general de las capas que componen al bioánodo.

Si se realiza todas las etapas con cuidado se garantiza la formación de uniones covalentes más rígidas y una mejor distribución de la enzima Alcohol deshidrogenasa y el cofactor por toda la superficie del electrodo, aumentando la estabilidad y la potencia de energía generada por el bioánodo creado.

Por medio de técnicas por voltamperometria cíclica se pudo observar la importancia de la adición de la capa de Nafion, donde en la figura 3.3.5.2 se presenta la prueba electroquímica hecha al bioánodo sin la adición de la capa de Nafion-agua; en color negro muestra la oxidación y reducción del cofactor al inicio de la prueba y en color rojo al final de la prueba después de 10 ciclos. Se observó que la capa de azul de metileno, observándose únicamente la respuesta típica de un electrodo basado en carbón, por lo que la adición del Nafion-agua fue importante para mantener unido el poliazul de metileno con el papel toray.

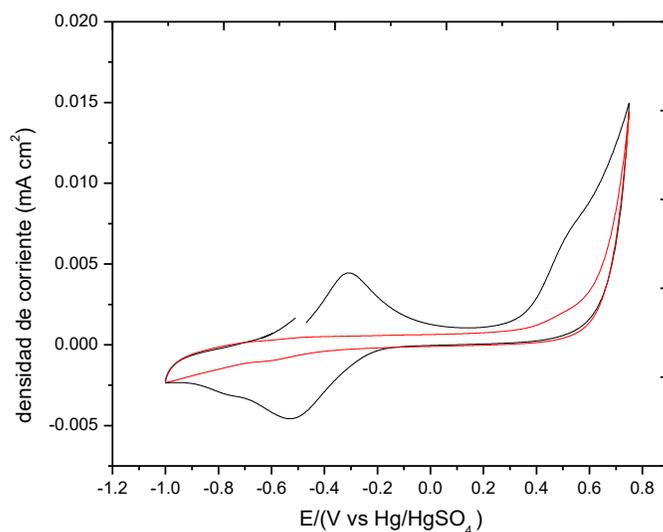


Figura 3.3.5.2. Voltamperometria cíclica de bioánodo desarrollado sin la capa de Nafion-agua.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Espectroscopia Raman

Para la evaluación Raman del bioánodo de la enzima Alcohol deshidrogenasa se analizaron las ocho muestras, utilizando el espectrofotómetro Raman de CIDETEQ (figura 4.1.1), con el propósito de confirmar la presencia de los grupos característicos de los materiales de construcción del electrodo, identificados en la técnica anterior, para corroborar principalmente que la enzima quedará inmovilizada.

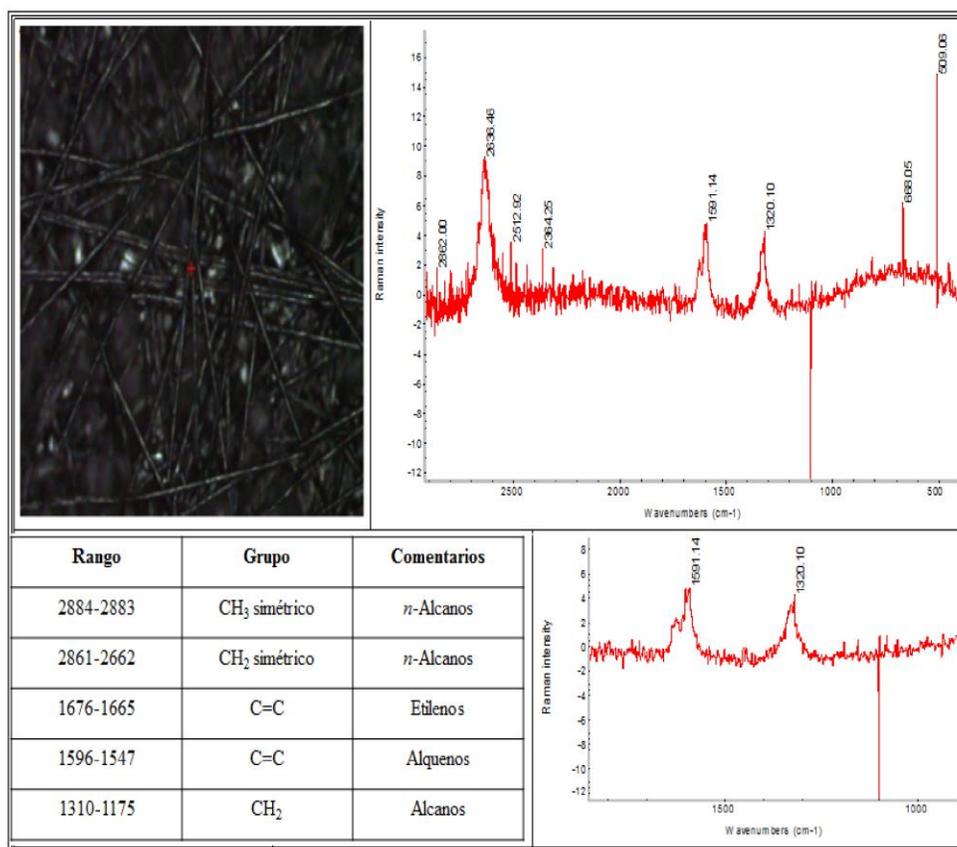


Figura 4.1.1. Espectroscopia Raman del papel carbón Toray.

La figura 4.1.1 muestra el análisis realizado al electrodo solo con papel carbón Toray. En la microscopia óptica (parte superior izquierda de la figura) se pueden observar las fibras del carbón que se presentan en este material. También se presentan los espectrogramas del

análisis, mostrando señales con mayor intensidad en el rango de los 1676-1665 cm^{-1} y 1596-1547 cm^{-1} correspondientes a las señales características para grupos C=C de etilenos y C=C de alquenos. Debido a que el material está compuesto en su mayoría por carbón, las señales presentes son características de alcanos, alquenos y grupos carbonilo.

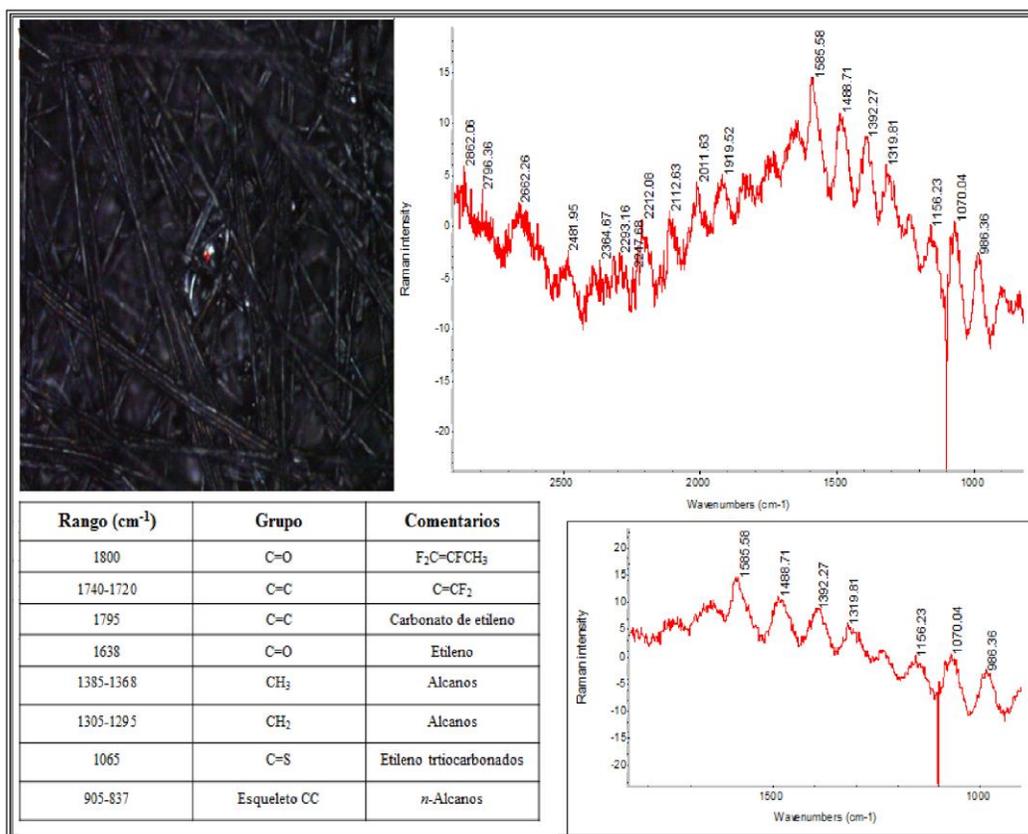


Figura 4.1.2. Espectroscopia Raman del papel carbón Toray con la capa 5:100 Nafion-agua.

Se realizó también el análisis Raman del papel carbón Toray con la capa de Nafion:agua, cuyo espectrograma se muestra en la figura 4.1.3; donde se muestra la presencia de los grupos funcionales correspondientes al carbón, y en el rango entre 1720-1740 se puede ver el grupo C=C correspondiente a los enlaces $\text{C}=\text{CF}_2$.

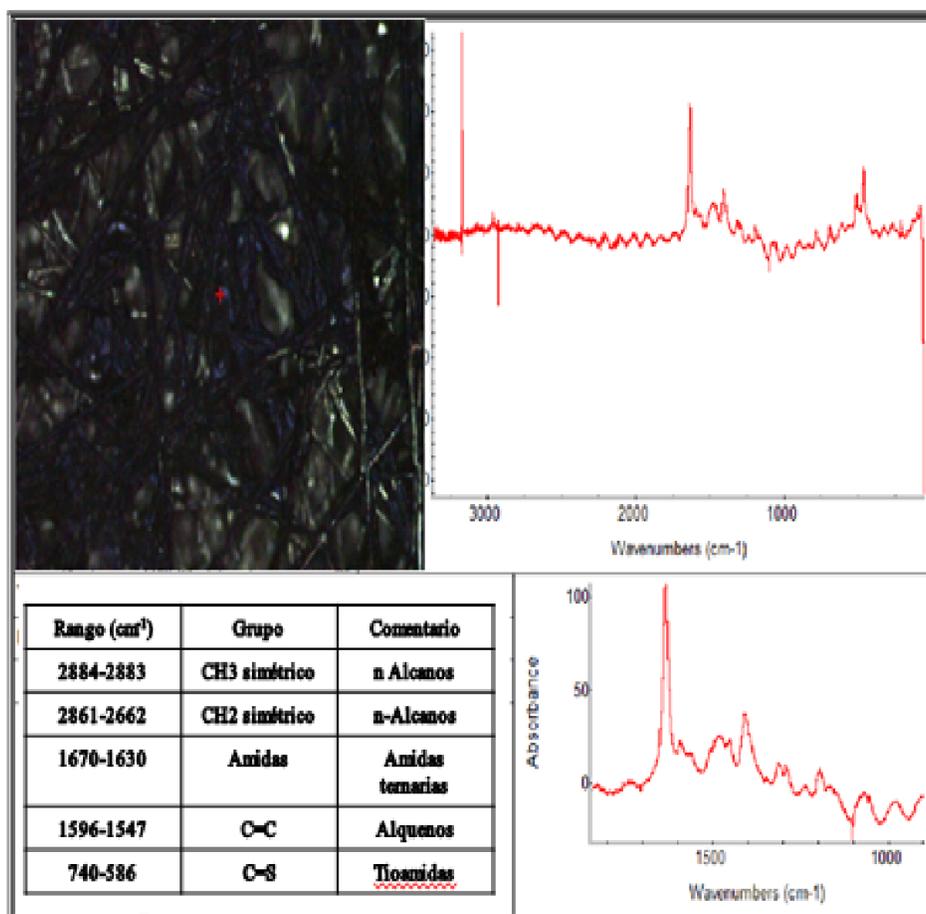


Figura 4.1.3. Espectroscopia Raman del papel carbón Toray con la capa 5:100 Nafion-agua y electropolimerizado con azul de metileno.

La Figura 4.2.3 muestra los resultados de la electropolimerización, donde se puede ver las bandas características de los enlaces C-S, C-N, C=C que pueden ser debido a la estructura del azul de metileno.

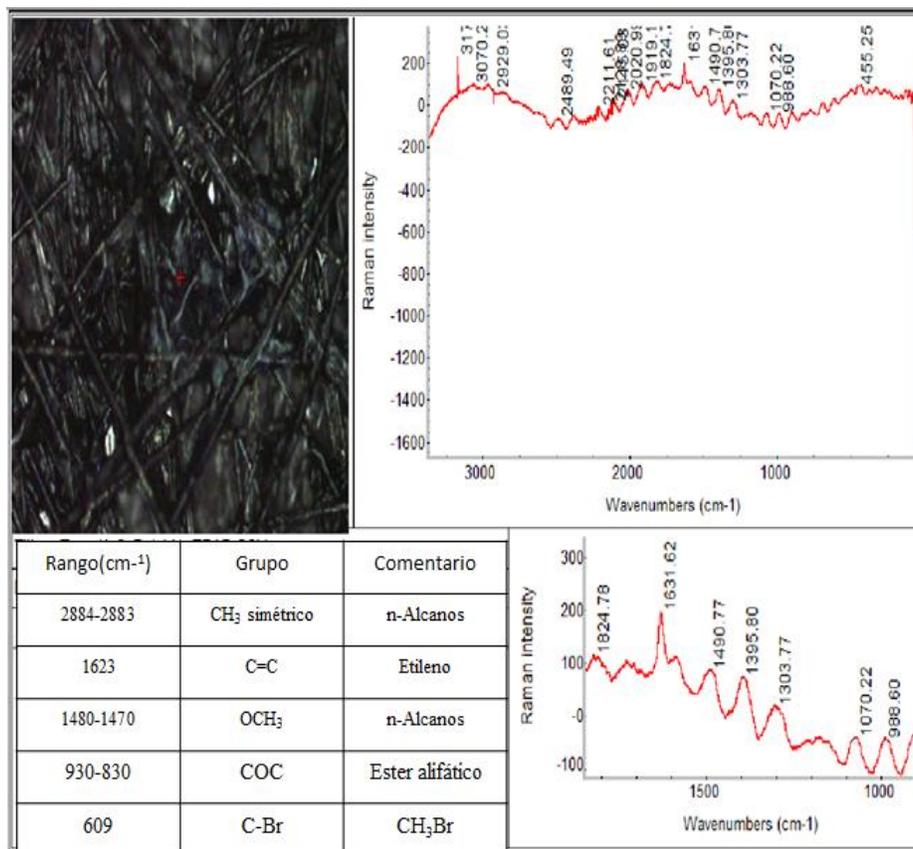


Figura 4.1.3. Espectroscopia Raman del papel carbón Toray con la capa 5:100 Nafion-agua y electropimerizado con azul de metileno, con capa de TBAB.

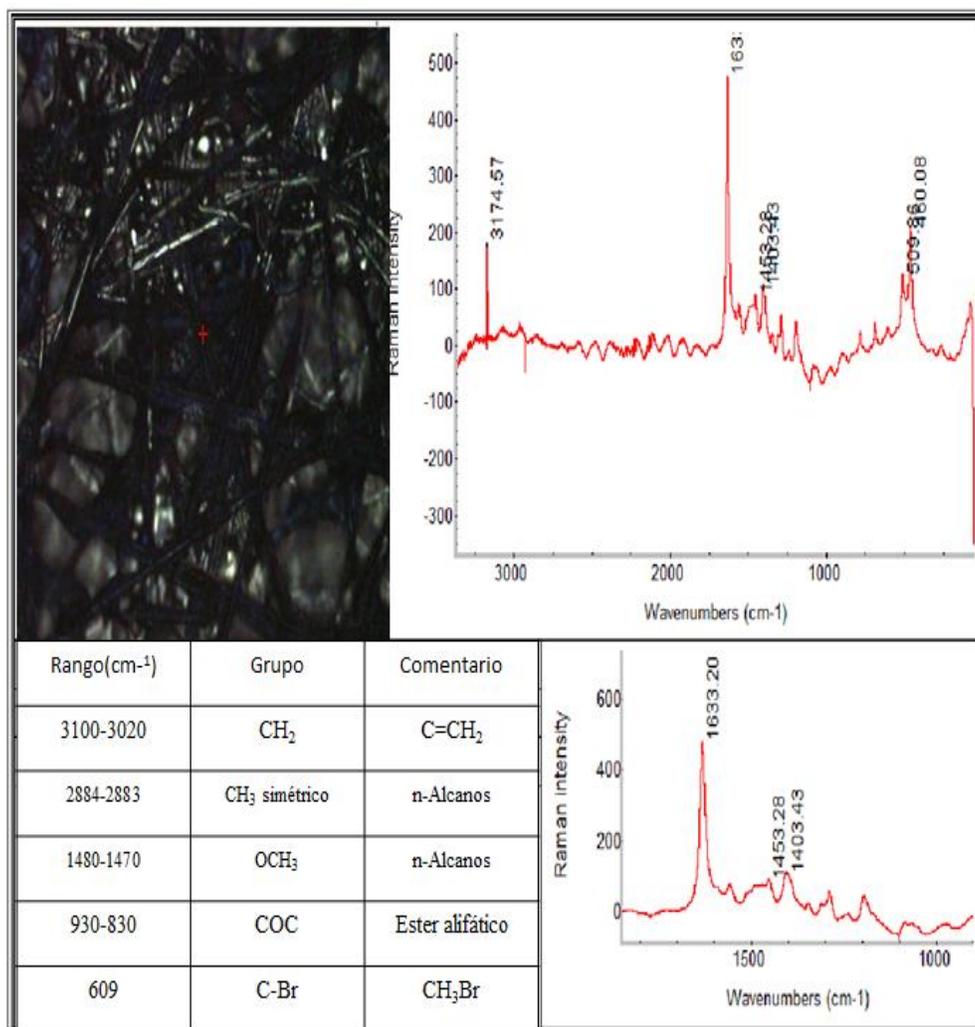


Figura 4.1.4 Espectroscopia Raman del papel carbón Toray con la capa 5:100 Nafion-agua y electropolimerizado con azul de metileno, con capa de glutaraldehído.

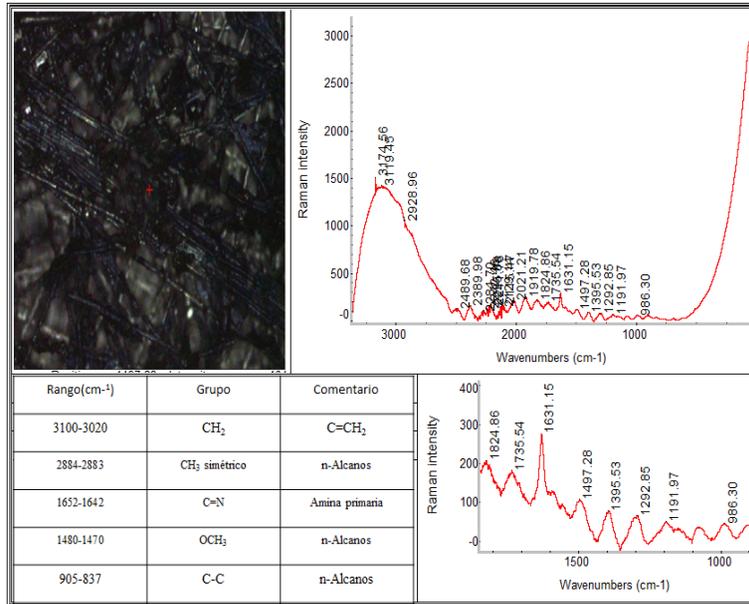


Figura 4.1.5. Espectroscopia Raman del papel carbón Toray con la capa 5:100 Nafion-agua y electropolimerizado con azul de metileno, con capa de NAD⁺.

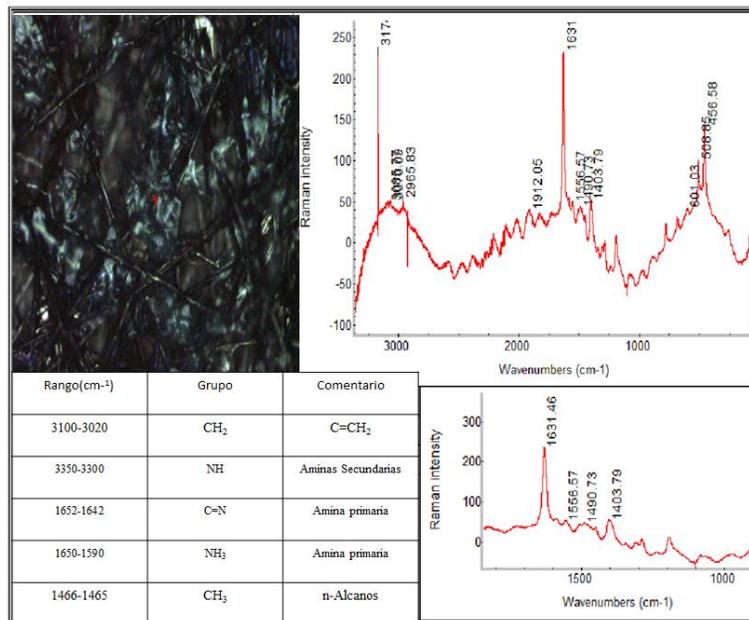


Figura 4.1.6. Espectroscopia Raman del papel carbón Toray con la capa 5:100 Nafion-agua y electropolimerizado con azul de metileno, con capa de ADH.

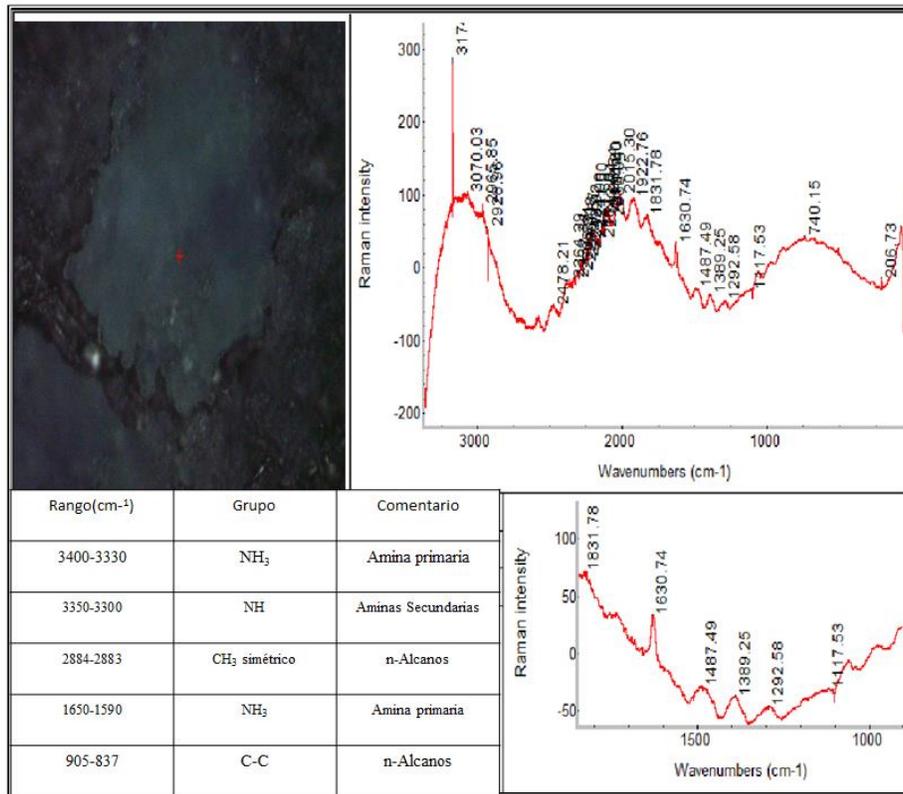


Figura 4.1.6. Espectroscopia Raman del papel carbón Toray con la capa 5:100 Nafion-agua y electropolimerizado con azul de metileno, con capa de ADH/NAD⁺/glutaraldehído/Nafion/TBAB.

4.2. Caracterización del bioánodo por microscopia de barrido SEM.

El microscopio electrónico de barrido, conocido por sus siglas inglesas SEM, utiliza electrones en lugar de luz para formar una imagen. Para lograrlo, el equipo cuenta con un dispositivo (filamento) que genera un haz de electrones para iluminar la muestra y con diferentes detectores se recogen después los electrones generados de la interacción con la superficie de la misma para crear una imagen que refleja las características superficiales de

la misma, pudiendo proporcionar información de las formas, texturas y composición química de sus constituyentes.

Los nuevos microscopios SEM trabajan utilizando como fuente de electrones un cañón de emisión de campo (Field Emission Gun, FEG) que proporcionan haces de electrones de alta y baja energía más focalizados, lo que permite mejorar la resolución espacial, minimizar cargas sobre el espécimen a observar, causando además menos daños en muestras sensibles.

Por lo anterior, esta técnica es utilizada para poder observar la superficie del electrodo, por lo que se optó por hacer el análisis de tres muestras.

- a) Electrodo de papel carbón Toray
- b) Electrodo de papel carbón Toray con una capa de Nafion y electropolimerizado con azul de metileno.
- c) Electrodo de papel carbón Toray con una capa de Nafion y electropolimerizado con azul de metileno, con una capa de ADH/Nafion/NAD⁺/glutaraldehído/TBAB.

La figura 4.3.1 nos muestra el diagrama de las muestras analizadas como sus respectivas imágenes SEM. La imagen a) muestra las fibras de carbón características del papel carbón Toray, en cambio la imagen b, se puede notar un cambio en la superficie del electrodo, ya que la capa de poli(azul de metileno) se formó adecuadamente y por último la capa que contiene la enzima se muestra en la imagen c, donde puede observar de nuevo un cambio superficial.

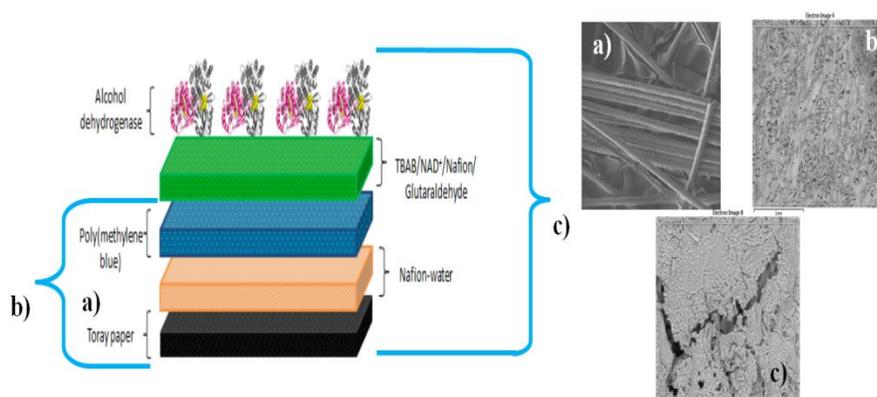


Figura 4.2.1 Imágenes por microscopía SEM de las capas del bioánodo de la enzima Alcohol deshidrogenasa.

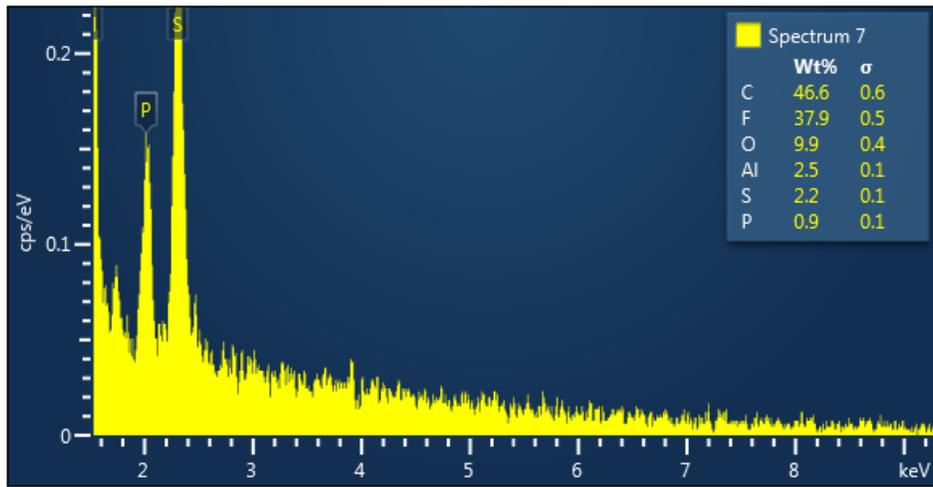
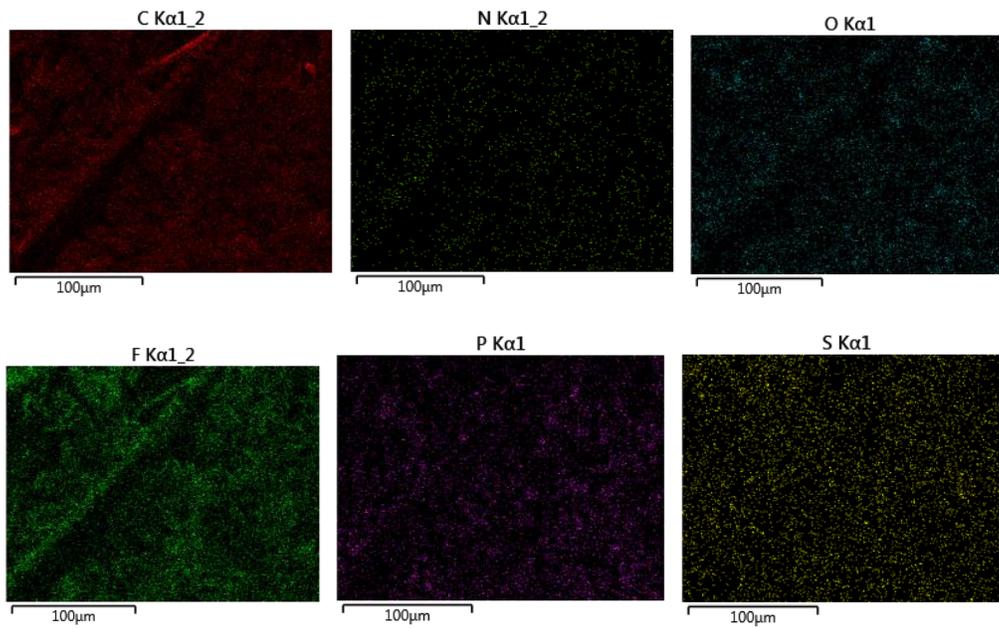


Figura 4.2. 2 Análisis por EDS del bioánodo Alcohol deshidrogenasa.



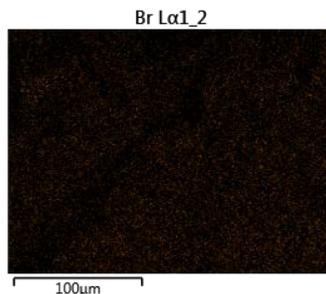


Figura 4.2.3 Mapeo del bioánodo de Alcohol deshidrogenasa.

Las figuras 4.2.2 y 4.2.3 muestran el escaneo que se le dio al electrodo completo de la enzima Alcohol deshidrogenasa, mostrando que se compone en su totalidad de carbon, con presencia de Fluor originario del Nafion, Azufre de los diferentes aminoácidos asufrados como la merionina, citina, cisteina. Como el cofactor NAD⁺. Se compone de Fosforo, se pudo evidenciar la existencia de este el bioánodo. Tambien es normal que se deterctara Bromo del bromuro de tetrabutilamonio. Los mapeos de la figura 4.2.3 muestran la distribucion de cada uno de los elementos presentes y por lo general se encuentran de forma homogenea en la superficie del electrodo, ya que al momento de sus contruccion al momento de hacer el deposito de la tinta catalitica, se cuida que estuviera bien mezclada para que la enzima se pudiera inmovilizar de forma uniforme en la superficie del bioánodo.

4.4. Caracterizacion del bioánodo por Potencial Z.

El potencial Zeta es el potencial eléctrico que existe en el plano de corte de la partícula, con una distancia corta de la superficie (**Hunter**, 1988) El potencial zeta es el parámetro clave que controla las interacciones electrostáticas en dispersiones de partículas. Las partículas coloidales dispersas en una solución están cargadas eléctricamente gracias a sus características iónicas y características de bipolaridad. El desarrollo de una red de carga eléctrica en la superficie de la partícula puede afectar la distribución de iones en una región interfacial vecina, y provocar un aumento de la concentración iones de carga contraria a las partículas cerca de la superficie. Cada partícula dispersa en una solución se rodea de iones

cargados con carga opuesta que se denomina capa fija. Fuera de esta capa fija, existen distintas composiciones de iones de polaridad opuesta, formando un área nebulosa. De esta manera se crea una capa doble eléctrica en la región de interfase partícula-líquido. La capa doble consiste en dos partes: una región interna que incluyen iones unidos fuertemente a la superficie y una externa, o región de difusión donde la distribución de iones se determina por un balance de fuerzas electrostáticas y movimiento termal aleatorio (**Kaszuba et al., 2010**).

La mayoría de dispersiones coloidales en medios acuosos llevan una carga eléctrica y el desarrollo de esta carga en la superficie de la partícula afecta a la distribución de los iones en la región interfacial que rodea. Un aumento en la concentración de iones cerca de los resultados de la superficie en la formación de una doble capa eléctrica. Existe la capa de líquido que rodea la partícula (la doble capa eléctrica) como dos partes-una región interior (capa de Stern), donde los iones están fuertemente unidos y una región (difusa) exterior donde están menos firmemente asociado. Dentro de la capa difusa hay un límite teórico dentro de la cual los iones y partículas forman una entidad estable. Cuando una partícula se mueve (por ejemplo, debido a la electroforesis), iones dentro del movimiento de límites con él. Esos iones más allá de la estancia límite con el dispersante mayor. El potencial en esta frontera (superficie de deslizamiento) es el potencial zeta (**Moorgat et al., 2003**).

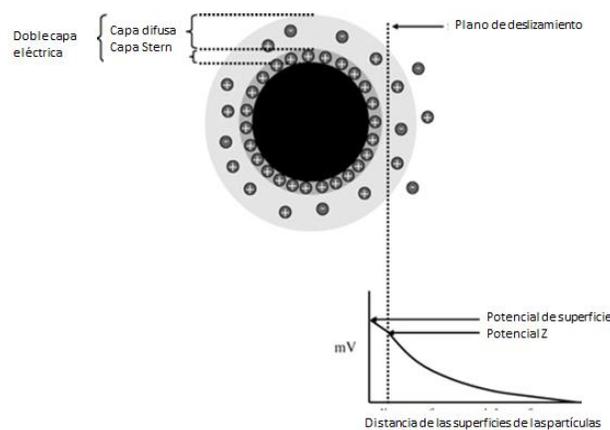


Figura 4.3.1 Esquema que muestra la doble capa eléctrica que rodea una partícula en un medio acuoso y la posición del plano de deslizamiento. El potencial zeta es el potencial eléctrico en el plano de deslizamiento.

El potencial zeta de las dispersiones coloidales se mide rutinariamente mediante la técnica de micro-electroforesis. En esta técnica, se aplica un voltaje a través de un par de electrodos en cada extremo de una célula que contiene la dispersión de partículas. Las partículas cargadas son atraídas hacia el electrodo de carga opuesta y su velocidad se mide y se expresa en unidad de intensidad de campo como su movilidad electroforética (Cornu, 2005).

Para la evaluación electrocinética se utilizaron los valores de potencial zeta para analizar la interacción electrostática entre los diferentes componentes de la matriz del bioánodo de Alcohol deshidrogenasa. Para este propósito, los valores de potencial zeta se obtuvieron a través de la transmisión de mediciones de potencial / corriente usando un SurPASS Electrokinetic (figura 4.4.2.2), aparato electrocinético para el análisis muestras sólidas y un "2gap" ajustable con una separación de las placas de 100 ± 2 micras. Placas de carbón vítreo (GC, 2×1 cm, instrumentos SPI) fueron utilizadas como superficies conductoras eléctricas para la electropolimerización del azul de metileno. La determinación de las interacciones electrostáticas consistió en obtener el potencial zeta de tres matrices: a) la película Nafion que cubría la superficie carbón vitreo, 2) la película azul de metileno (MB) creada por electropolimerización sobre una superficie de carbón vítreo y Nafion, y 3) de la capa de alcohol deshidrogenasa (ADH) sobre carbón vítreo electropolimerizado. La matriz de ADH se compone de dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD^+), glutaraldehído (GA), bromuro de tetra-n-butilamonio (TBAB) y Nafion. Finalmente, se utilizó agua como la solución de trabajo.

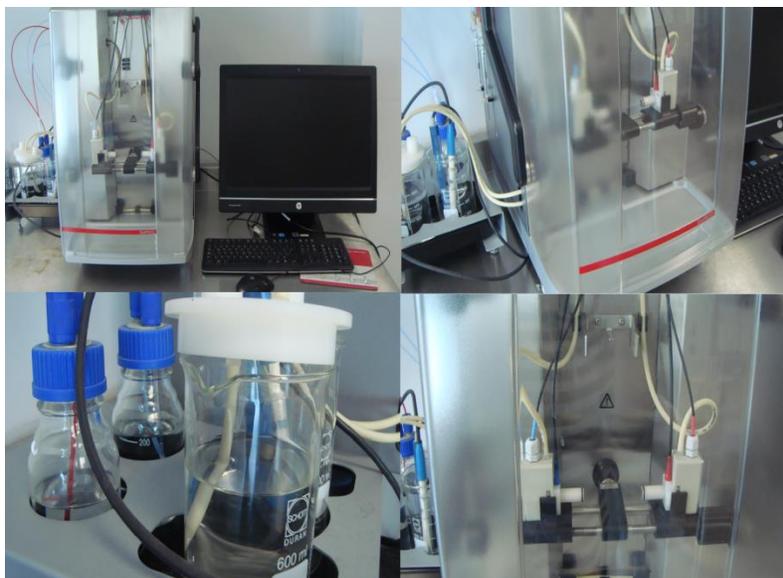


Figura 4.4.2.2 Equipo de caracterización de Potencial Z, SurPASS Electrokinetic.

Las interacciones electrostáticas de las tres capas del ánodo en el agua muestran en la figura 4.3.2. La película Nafion en placas de carbono vítreo exhibió un valor grande ZP negativo de -90,69 mV, que está relacionada con la presencia de la contracción SO_3^- de la estructura de Nafion.

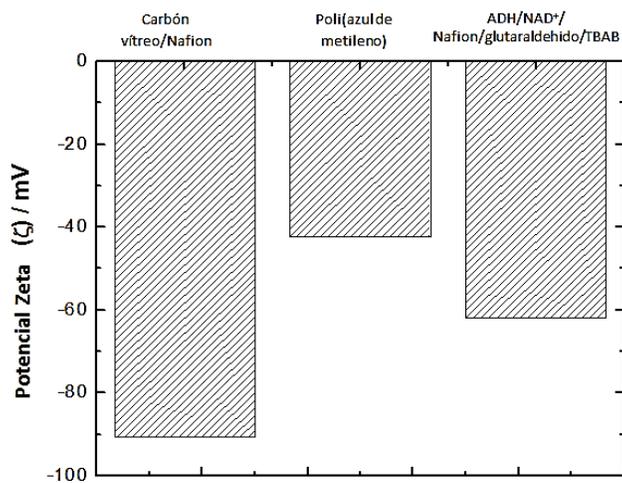


Figura 4.3.2 Medición del potencial Z de los componentes del bioánodo.

El potencial Z (ZP) disminuyó a -42,33 mV cuando azul polimetileno cubrió la película Nafion; Esta disminución puede atribuirse a una distribución/recubrimiento parcial de azul de metileno sobre la película de Nafion, donde el potencial negativo observado estaba relacionada con el contraión SO_3^- . Finalmente, cuando el NAD^+ /TBAB/Nafion tinta ADH se incorporó en el azul de metileno película, el ZP aumentó hasta alcanzar -61,99 mV. Este valor está relacionado con una mayor presencia de Nafion que en la matriz de electrodos de azul de metileno; Sin embargo, esta película nunca se recuperó el valor negativo grande inicial (-90,69 mV) a causa de la presencia de NAD^+ , TBAB (que exhibe cargas parciales positivas y negativas) y glutaraldehído.

4.4. Caracterización del bioánodo por Fluorescencia de Rayos X (XRF).

La espectroscopia de fluorescencia de rayos X (XRF) ha sido ampliamente empleada para la evaluación de la composición de la superficie de los materiales (Sándor et al., 2002). Aunque es en gran parte un análisis cualitativo, y una estimación de la concentración, teniendo desventajas, incluyendo irregularidades de la superficie y geometría de medición, así como diferencias elementales provocando ciertos errores (Milazzo, 2004).

La fluorescencia de rayos X es bien conocida como una herramienta poderosa para el análisis elemental no destructivo de pequeñas regiones de muestras en varios campos, incluyendo muestras biológicas (Buzanich et al., 2007).

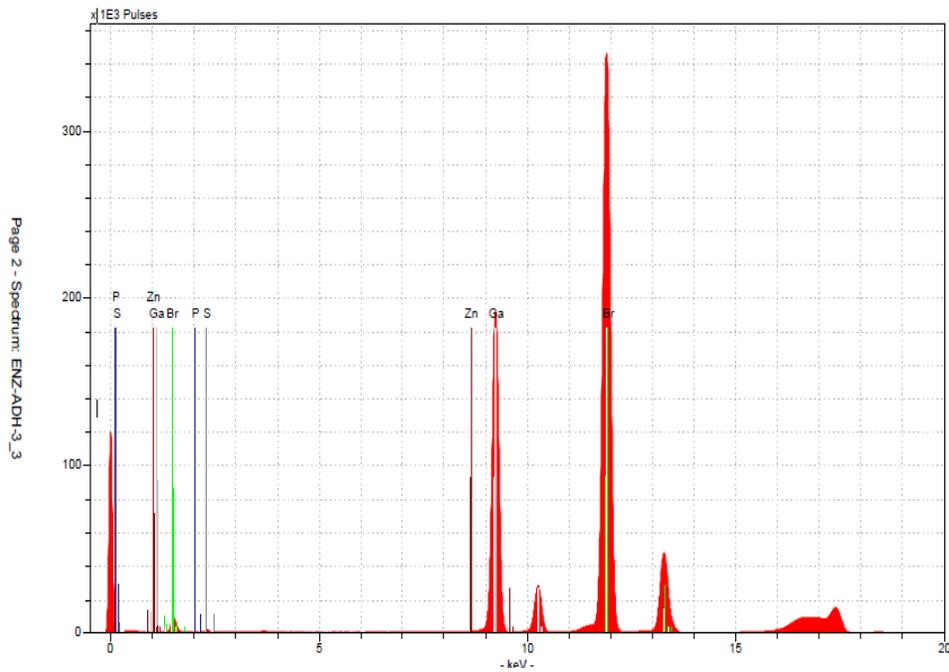
Por este motivo, se decidió analizar el bioánodo construido por esta técnica, para poder observar la presencia de ciertos elementos que pueden indicar la inmovilización de la enzima. Para el análisis se utilizó un espectrómetro de Fluorescencia de Rayos X con el que cuenta la Universidad Autónoma de Querétaro (Figura 4.5.1).



Figura 4.4.1 Equipo de Fluorescencia de Rayos X.

Tabla 4.4.1 Análisis del bioánodo por Fluorescencia de Rayos X.

Elemento	Concentración g/L	Sigma g/L	RSD / %	LLD g/L	Chi
P	1.428	0.033	2.3	0.064	2.18
S	2.884	0.022	0.8	0.034	1.66
Zn	0.025	0.001	2.1	0.001	3.17
Ga(1S)	10	0.005	0	0.002	25.88
Br	14.473	0.005	0	0.002	787.94



4.4.2 Espectro del bioánodo obtenido de la técnica de fluorescencia de rayos X.

La tabla 4.4.1 muestra los resultados del análisis de la muestra, en el cual se utilizó como estándar el Galio para una mejor determinación. El espectro de la muestra se puede observar en la figura 4.4.2, donde se puede ver la existencia de Br, proveniente del bromuro de tetrabutilamonio, que se encuentra en una concentración más alta que el resto de los elementos presentes. También se encontró Zn, que nos indica la presencia de la enzima Alcohol deshidrogenasa, ya que ninguno de los materiales que conforman el bioánodo lo contienen a excepción del sitio activo de enzima, que es un átomo de zinc, unido a varios aminoácidos, por lo que es normal que aparezca azufre en los resultados ya que muchos de estos aminoácidos son azufrados, como es el caso de la metionina, cisteína, cistina. La presencia de Fosforo, podría corresponder al cofactor nicotinamida adenina dinucleotido (NAD⁺), ya que su estructura contiene este elemento.

4.5 Evaluación electroquímica del bioánodo.

4.5.1. Evaluación del arreglo del bioánodo con etanol por voltamperometría cíclica.

Para verificar que la enzima Alcohol deshidrogenasa sea la que está realizando la oxidación del etanol se realizó la evaluación de diferentes electrodos por medio de voltamperometría cíclica. Se evaluaron 4 electrodos:

- a) Arreglo 1: Electrodo de papel carbón Toray con una capa de Nafion-agua y electropolimerizado con azul de metileno.
- b) Arreglo 2: Electrodo de papel carbón Toray con una capa de Nafion-agua y electropolimerizado con azul de metileno, bromuro de tetrabutilamonio, Nafion, glutaraldehído.

- c) Arreglo 3: Electrodo de papel carbón Toray con una capa de Nafion-agua y electropolimerizado con azul de metileno, bromuro de tetrabutilamonio, Nafion, glutaraldehído y NAD^+ .
- d) Arreglo 4: Electrodo de papel carbón Toray con una capa de Nafion-agua y electropolimerizado con azul de metileno, bromuro de tetrabutilamonio, Nafion, glutaraldehído, NAD^+ y la enzima Alcohol deshidrogenasa.

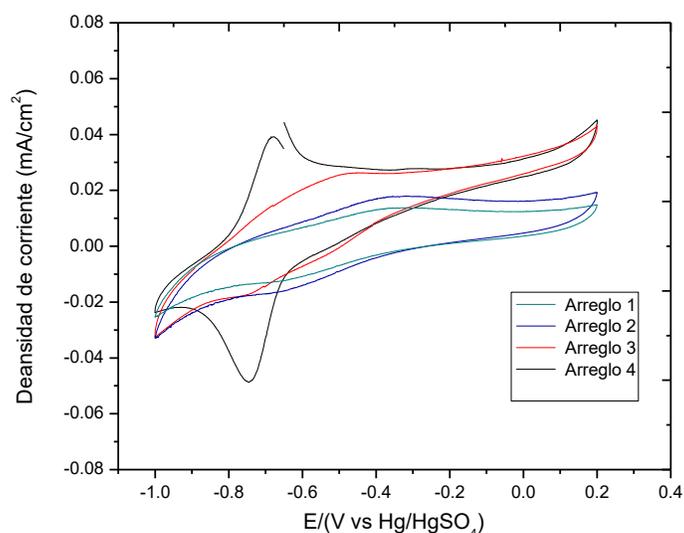


Figura 4.5.1.1. Evaluación de arreglo del bioánodo con una solución de etanol 10mM en buffer fosfatos pH 8.86.

Como se puede observar en el voltamperograma (figura 5.2.1.1), en los dos primeros electrodos no se observa la oxidación y reducción del cofactor NAD^+ en presencia de etanol ya que no se encuentra ni el cofactor ni la enzima inmovilizada, en cambio ya en el tercer electrodo ya se empieza a ver una pequeña oxidación y reducción del cofactor lo cual se puede atribuir a la inmovilización del NAD^+ en el electrodo. Una mayor oxidación y reducción del cofactor se puede apreciar en el electrodo que contiene ya a la enzima Alcohol deshidrogenasa inmovilizada, por lo que se puede verificar que la enzima está realizando la oxidación del etanol la cual se presenta indirectamente por las reacciones del cofactor, Con

estas pruebas se puede comprobar que la enzima esta inmovilizada en el bioánodo y es la que está efectuando la oxidación del etanol.

Como se puede observar en el voltamperograma (figura 4.5.1.1), en los dos primeros electrodos no se observa la oxidación y reducción del cofactor NAD^+ en presencia de etanol, en cambio ya en el tercer electrodo ya se empieza a ver una pequeña oxidación y reducción del cofactor lo cual se puede atribuir a la inmovilización del NAD^+ en el electrodo. Una mayor oxidación y reducción del cofactor se puede apreciar en el electrodo que contiene ya a la enzima Alcohol deshidrogenasa inmovilizada, por lo que se puede verificar que la enzima está realizando la oxidación del etanol la cual se presenta indirectamente por las reacciones del cofactor, Con estas pruebas se puede comprobar que la enzima esta inmovilizada en el bioánodo y es la que está efectuando la oxidación del etanol.

4.5.2. Evaluación del bioánodo a diferentes concentraciones de etanol en media celda por voltamperometría cíclica.

Por medio de la celda de tres electrodos y mediante la técnica electroquímica de voltamperometria cíclica se evaluó el bioánodo desarrollado utilizando diferentes concentraciones de etanol. La voltametría cíclica es la técnica más utilizada para la obtener información cualitativa sobre las reacciones electroquímicas, proporciona rápidamente información considerable sobre los procesos redox, la cinética de las reacciones heterogeneas de transferencia de electrones y en las reacciones químicas acopladas o procesos de adsorción. Voltametría cíclica es a menudo el primer experimento realizado en un estudio electroanalítico. En particular, se ofrece una rápida localización de potenciales redox de las especies electroactivas y evaluación conveniente del efecto de los medios de comunicación en el proceso redox. Por lo anterior por medio de esta técnica se pudo observar si se estaba efectuando la reducción y oxidación del cofactor de la enzima, que nos señala indirectamente si el etanol se está oxidando por medio de la enzima inmovilizada en el electrodo.

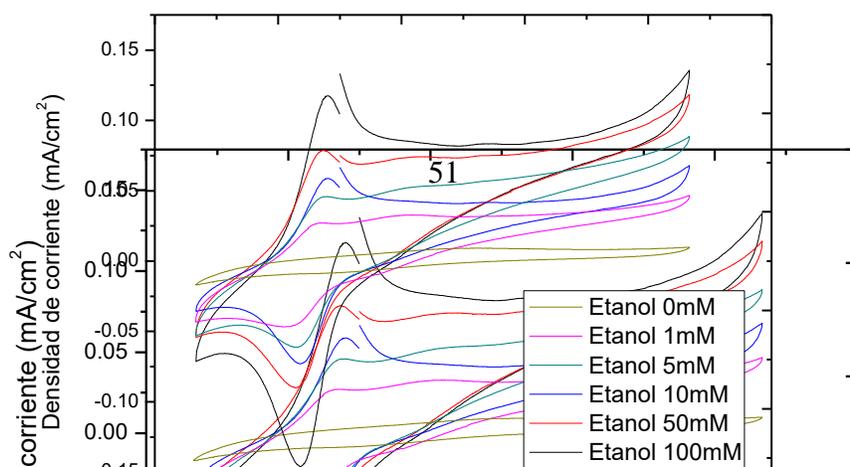


Figura 4.5.2.1. Oxidación y reducción del cofactor NAD⁺ a diferentes concentraciones de etanol en solución buffer fosfatos pH 8.86 utilizando el bioánodo de Alcohol deshidrogenasa desarrollado.

La respuesta electroquímica de bioánodo en ausencia y en presencia de etanol en solución buffer (pH = 8.86) se muestra en la Figura 4.5.2.1. Sin etanol, el voltamograma de control (línea verde) no mostró ninguna respuesta significativa del electrodo a la solución. Picos de una reacción redox surgieron en la presencia de 5 mM de etanol, que se encuentran en -0,7 y -0.74V vs. Hg / HgSO₄; estas señales corresponden a la pareja redox NAD⁺ / NADH. El aumento de la concentración de etanol resultó en un aumento de la densidad de corriente de las reacciones NAD⁺ / NADH debido a la oxidación del sustrato por la enzima, que se refleja en una mayor reducción de NAD⁺ a NADH. En etanol 100 mM, la enzima ADH exhibió la densidad de corriente más alta, como consecuencia de su buena actividad biocatalítica. Se utilizó la solución buffer con un pH=8.86 debido que se ha reportado que el óptimo para la enzima a temperaturas entre 25 a 26°C.

4.6 Evaluación del bioánodo en celda de combustible microfluídica.

Ya que por técnicas de voltamperometría ciclica y de pulso diferencial se pudo tener evidencia que la enzima se encontraba inmovilizada en el electrodo y que es capaz de lograr la oxidación y reducción del cofactor que nos indica la oxidación del etanol se realizó la evaluación del bioánodo en celdas de combustibles microfluidicas utilizando etanol. Las celdas de combustible microfluídicas son parte de una nueva clasificación de tecnología de celdas de combustible capaces de operar en el marco de los microfluidos (Morse et al., 2006). Las celdas de combustible de microfluídicas, a veces llamadas celdas de

combustible laminares basadas en el flujo o celdas de combustible sin membrana, describe un grupo de celdas de combustible capaces de funcionar en el marco de un chip de microfluidos (Nguyen et al., 2006). En las celdas de combustible microfluídicas todos sus componentes y funciones como el suministro de fluidos, sitios de reacción y electrodos, se encuentran confinados a canales microfluídicos. Este tipo de celdas trabajan con flujo co-laminar sin una barrera física o membrana, que separa los dos electrodos: al ánodo del cátodo. Un diagrama esquemático de una celda de combustible microfluídica (Kjeang et al., 2009).

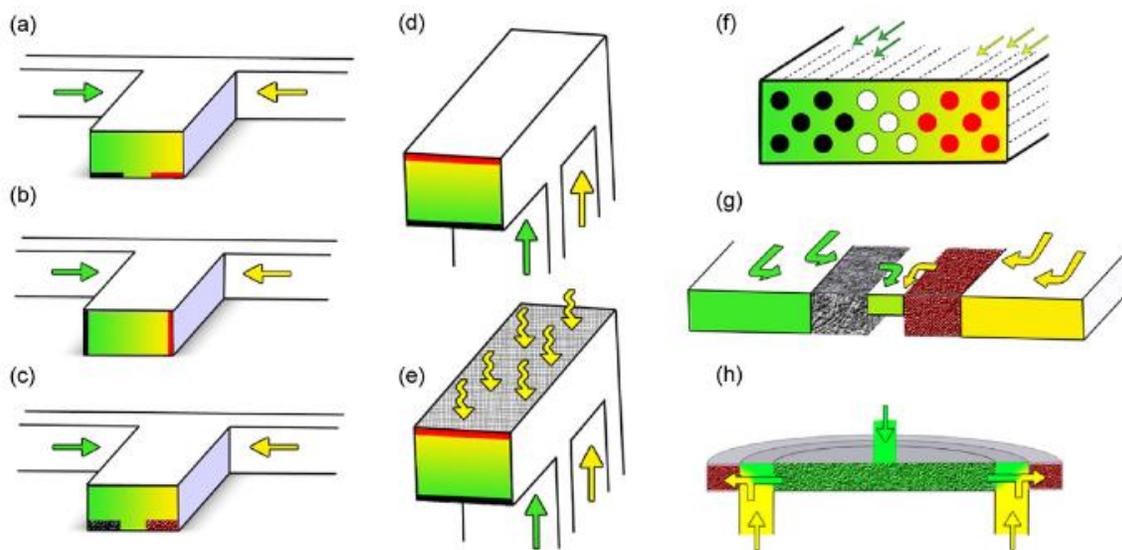


Figura 4.5.1. Esquemática de los diversos diseños en celdas de combustible microfluídicas(Kjeang et al., 2009)

En la figura 4.6.1 se muestra los diversos diseños de las celdas de combustible microfluídicas, la transmisión de Laminar, característica de los flujos de microfluidos, facilita la separación del combustible y el oxidante en ausencia de una membrana. Cada arquitectura se muestra con combustible en verde, oxidante en amarillo, cátodos, ánodos en rojo en negro. Dos corrientes se combinan horizontalmente en una T o Y-canal con electrodos en la parte inferior (a), los electrodos en los lados (b), y electrodos porosos en la parte inferior (c). Una configuración de canal F (d), y con la adición de un electrodo poroso para facilitar aire de

respiración (e). Una celda de combustible de microfluidos matriz de electrodos (f). Un flujo a través de electrodos porosos en la celda (g). Una arquitectura radial porosa de celda de combustible de electrodos (h) (**Kjeang**, et al., 2009).

En las configuraciones más comunes, las celdas de combustible microfluidicas utilizan un flujo laminar característico de los flujos microfluidicos para retrasar la mezcla convectiva de combustible y oxidante. Este régimen de flujo se caracteriza por bajos números de Reynolds, $Re = \rho U D_h / \mu$, donde ρ es la densidad de fluido, U es la velocidad promedio, D_h es el diámetro hidráulico y μ es la viscosidad dinámica (**Barton** et al., 2004).

A números de Reynolds bajos, dos corrientes acuosas, una que contiene el combustible (anolito) y uno que contiene el oxidante (catolito), fluirá de lado a lado por un solo canal de microfluidos. El anolito y el catolito también contienen electrólito de soporte que facilita el transporte iónico dentro de las corrientes, eliminando así la necesidad de un electrolito separado. La mezcla de las dos corrientes se produce por difusión solamente y está restringida a una anchura interfacial en el centro del canal (**Pennathur** et al., 2007).

Muchos diseños de celdas de combustible microfluidicas también están bien adaptados para su uso con catalizadores biológicos. Convencionalmente, los biocatalizadores se colocan en una celda electroquímica de dos compartimentos que contiene la solución buffer con el combustible y el oxidante concentrado en los compartimentos anódico y catódico, respectivamente (**Shukla** et al., 2005, **Qian** et al., 2006).

Cada compartimento también incluye un par redox que actúa como mediador difusional de electrones (cofactor), que es necesaria para la utilización eficiente del biocatalizador. La tasa de transferencia de electrones se limita generalmente por la velocidad de difusión de estas especies redox (**Bullen** et al., 2006).

Otro estudio realizado para la obtención de un mejor desempeño en las celdas de combustible microfluidicas, son la incorporación de una ventana de aire en el cátodo, para tener una mejor difusión en el transporte de masa de oxígeno, como lo presenta Déctor et al. quienes implementa una ventana de aire y distintas condiciones de oxidación. La problemática de

transporte de oxígeno en el cátodo, se trata de mejorar en este estudio por medio de una incorporación de líquidos con altas concentraciones de oxígeno como óxido de vanadio o peróxido de hidrógeno y una ventana de aire en la celda. En este trabajo se tratan con tres tipos de oxidantes; oxígeno disuelto en H_2SO_4 , aire disuelto en H_2SO_4 y peróxido de hidrógeno, y ácido fórmico como combustible.

La celda microfluídica utilizada para la evaluación del bioánodo fue de tipo air-breathing. Brevemente se hace la descripción del dispositivo, donde la primera sección consiste en dos placas de soporte hechas de poli- (metacrilato de metilo) (PMMA) y se modela utilizando un control numérico por computadora (CNC).

La segunda sección consiste en una película de elastómero de silicona hecha en casa (Silastic®, preparado usando un aplicador de película Elcometer® con un espesor final de 200 micras). Los electrodos consistieron en el bioánodo desarrollado y se probaron con diferentes cátodos (inorgánicos e orgánicos) nanoespuma disponible en el mercado de carbono (Marketech Inc), como se muestra en la figura 4.6.2.

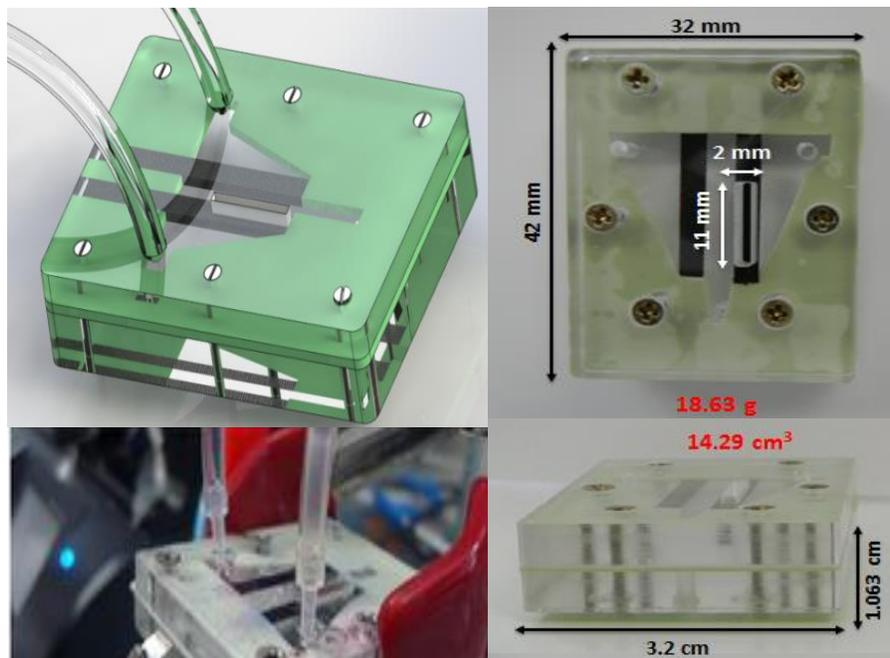


Figura 4.6.2. Celda de combustible microfluidica tipo air.breathing utilizada para la evaluación del bioánodo.

Las pruebas de celda de combustible de microfluídicas híbridas se realizaron mediante la inyección de 0,1 M de etanol N₂ saturado (4 UPD Praxair) como combustible en solución y el oxígeno del aire como oxidante, dentro de dos corrientes acuosas que contenían tampón de fosfato (pH 8,86) y 0,3 M de KOH, en el ánodo y cátodo respectivamente.

Las pruebas de celda de combustible de microfluídicas híbridas se realizaron mediante la inyección de 0,1 M de etanol N₂ saturado (4 UPD Praxair) como combustible en solución y el oxígeno del aire como oxidante, dentro de dos corrientes acuosas que contenían tampón de fosfato (pH 8,86) y 0,3 M de KOH, en el ánodo y cátodo respectivamente.

4.6.1 Celda de combustible híbrida Alcohol deshidrogenasa/Pt.

Se empleó el bioánodo creado con un cátodo inorgánico de platino para la evaluación de una celda de combustible microfluidica utilizando etanol (figura 4.6.1.1).

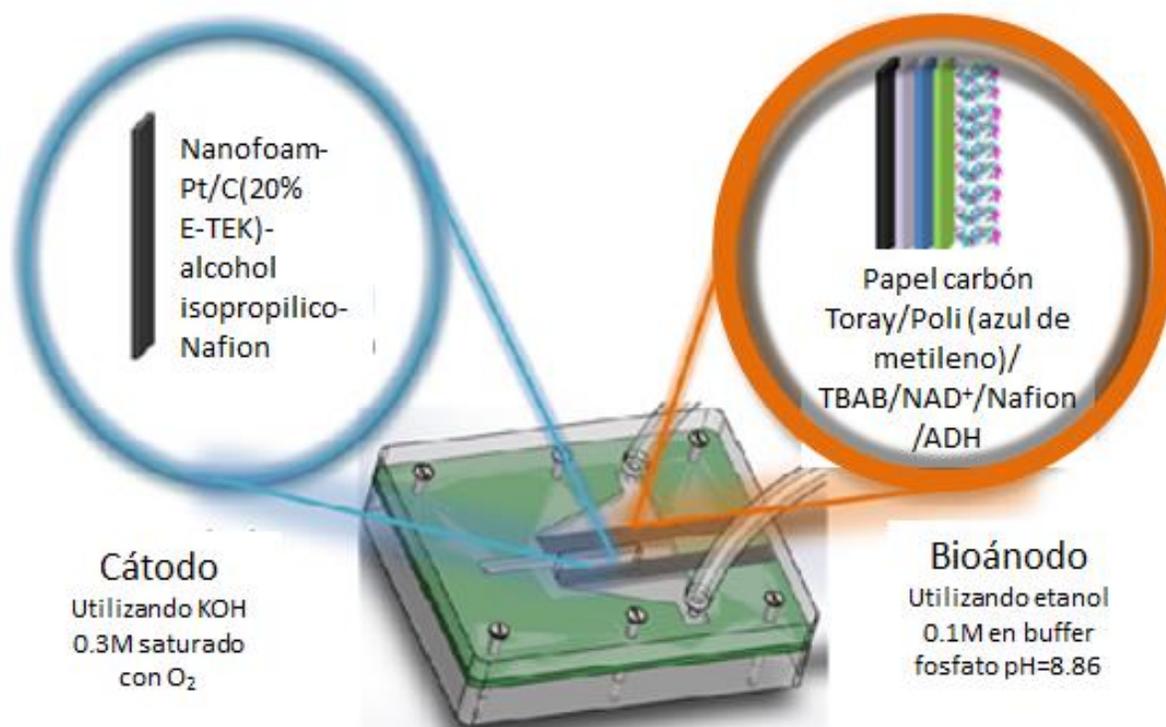


Figura 4.6.1.1. Diagrama de la celda híbrida Alcohol deshidrogenasa/Platino

El cátodo basado en Pt se preparó utilizando Platino comercial/C(20% E-TEK) soportado sobre un electrodo de nanoespuma de carbono (2 × 0,3 cm, Marketech®). Brevemente, 120 μL de alcohol isopropílico y 14 μL de Nafion se añadieron por mg de catalizador y se mezcló durante 30 minutos. La tinta catalítica se depositó sobre la superficie de nanoespuma de carbono utilizando la técnica de spray.

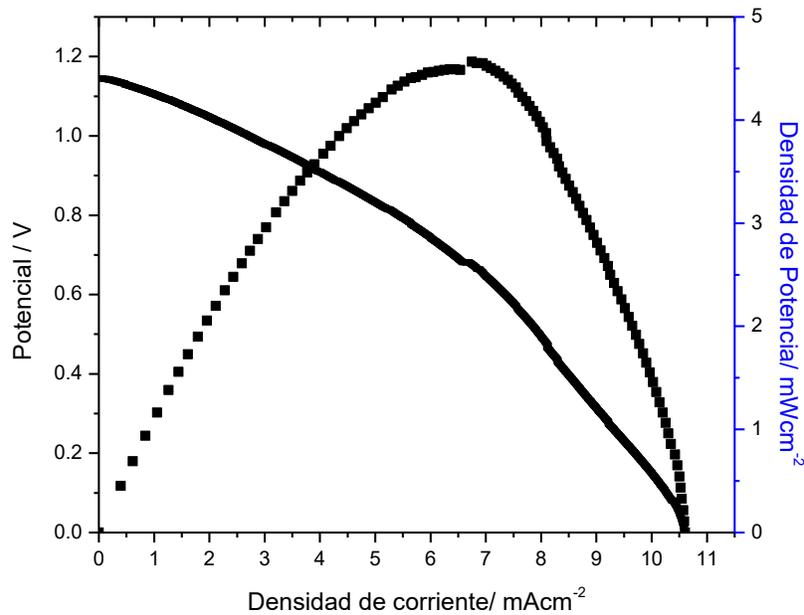


Figura 4.6.1.2. Curva de polarización y densidad de potencia de la celda de combustible híbrida Alcohol deshidrogenasa platino.

En la figura 4.6.1.2 se muestra la curva de polarización y potencia de la celda híbrida Alcohol deshidrogenasa/Pt, utilizando etanol 100mM en solución buffer fosfatos con un pH de 8.86 para en bioánodo y una solución KOH 0.3M saturada con nitrógeno por un tiempo de 20 minutos para el cátodo, operando a temperatura 25°C, obteniendo una potencia de 1.14V, 10.61mA/cm² de densidad de corriente y una densidad de potencia de 4.56mW/cm² utilizando un flujo de 50μL/min.

4.6.2 Evaluación de los flujos en microcelda de combustible Alcohol deshidrogenasa/Pt.

Por medio de una bomba microfluídica se realiza la inyección del combustible que en este caso es la solución de etanol en solución buffer fosfatos y de la solución saturada con nitrógeno de hidróxido de potasio, por lo que encontrar como afecta la velocidad de inyección

o el flujo, se realizó la siguiente evaluación utilizando 3 flujos diferentes propuestos: 50, 100, 200 μL por minuto, por medio de evaluaciones electroquímicas para la eficiencia de cada uno de los diferentes flujos.

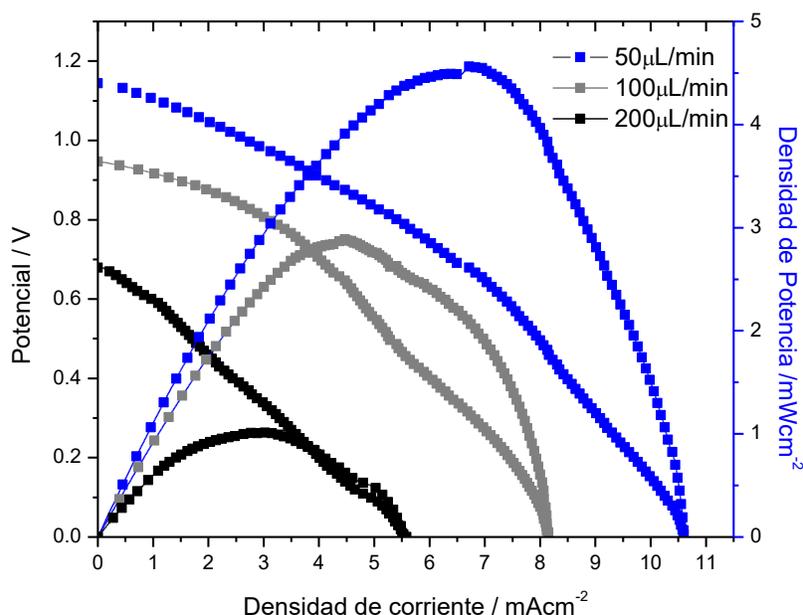


Figura 4.6.2.1. Curva de polarización y densidad de potencia de la celda de combustible híbrida Alcohol deshidrogenasa platino.

La figura 4.6.2.1 muestra las curvas de polarización y densidad de potencia para la celda de combustible microfluidica utilizando los tres flujos, obteniendo una mayor potencia la celda con el flujo más pequeño de 50 μL , atribuyendo que mientras más tiempo este el combustible con la enzima permite que la reacción catalítica sea más eficiente ya que se debe encontrar un tiempo óptimo. Para el resto de los flujos se obtuvo un menor rendimiento, ya que con un flujo de 200 μL se lograba desprender el material en el bioánodo, por lo que este flujo provocaba el desprendimiento de la capa de poli(azul de metileno) en el electrodo y por lo tanto de la enzima Alcohol deshidrogenasa.

Tabla 4.6.2.1. Tabla resultados de la celda microfluídica Alcohol deshidrogenasa/Pt a diferentes flujos

Flujo ($\mu\text{l}/\text{min}$)	Densidad de corriente (mA/cm^2)	Potencial (V)	Densidad de corriente (mW/cm^2)
50	10.611	1.14	4.56
100	8.162	0.946	2.887
200	5.073	0.679	1.01

4.6.3 Estabilidad de la celda de combustible híbrida Alcohol deshidrogenasa/Pt

Las pruebas de estabilidad / durabilidad de la célula de combustible de microfluidica híbrida por medio de la técnica de cronoamperometria. La cual es es una técnica electroanalítica basada en la medición de la corriente debidaa difusión en función del tiempo, después de aplicarse un escalón de potencial. Una aplicación importante de la Cronoamperometría es la evaluación de los coeficientes de difusión de especies electroactivas en solución.

La señal de respuesta depende del tipo de transferencia de carga "reversible o irreversible, del valor del potencial aplicado "altos o bajos sobrevoltajes y del tipo de difusión "hacia un electrodo plano, esférico, cilíndrico, etc. Difusión hacia un electrodo plano, con un salto de potencial muy negativo "lejos del equilibrio".

Consiste simplemente en la aplicación de un voltaje durante un cierto intervalo de tiempo y el registro de la corriente resultante en dicho lapso. De impulso sencillo y la variación de la corriente en función del tiempo contiene información sobre la difusión de las especies que se forman sobre el electrodo de trabajo como resultado del estímulo proporcionado por el voltaje.

Esta técnica puede usarse para evaluar la eficiencia de inhibidores de corrosión, denominados de control difusional, que forman una capa, obstaculizando el contacto de especies con el metal. Asimismo, se ha encontrado aplicación en la evaluación de aditivos que se agregan a las celdas de electrorrefinación de metales con el propósito de promover los mecanismos de transporte de las especies electroactivas.

Para determinar la capacidad de suministrar una densidad de corriente constante en el tiempo; los resultados indicaron que el sistema puede proporcionar una densidad de corriente de $4,5 \text{ mA cm}^{-2}$ durante el tiempo, como se puede observar en la figura XXX que se muestra a continuación.

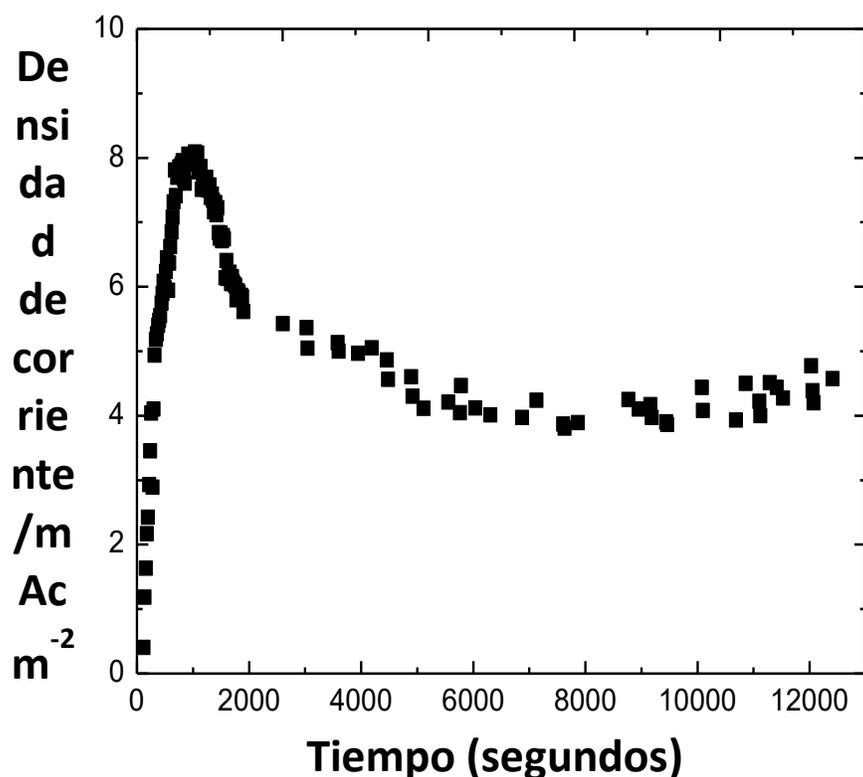


Figura 4.6.3.1. Cronoamperometría de la celda de combustible híbrida Alcohol deshidrogenasa/Pt

También para medir la eficiencia de la celda durante tiempos más prolongados como son días, se evaluó una celda híbrida durante un periodo de 35 día para poder medir el comportamiento de la celda mediante pruebas electroquímicas, las cuales consistían en dar una prueba de cronoamperometría durante un tiempo de 30 minutos, con una posterior prueba de polarización y densidad de potencia para cada día que se realizó el análisis, terminando cada experimento se almacenaba la celda microfluídica en un congelador a -20°C y cuando se iba a utilizar al se sacaba de nuevo y se esperaba a que llegara a la temperatura ambiente para que la enzima Alcohol deshidrogenasa se activara..

El propósito de este análisis fue el determinar la durabilidad del rendimiento de la microcelda a lo largo del tiempo, y más que nada comprobar que el bioánodo sigue funcionando durante largos periodos de tiempo, relacionándolo con la eficiencia del método de inmovilización por unión covalente utilizado, ya que la mayoría de las celdas de combustible microfluidicas no reportan periodos superiores a los tres días.

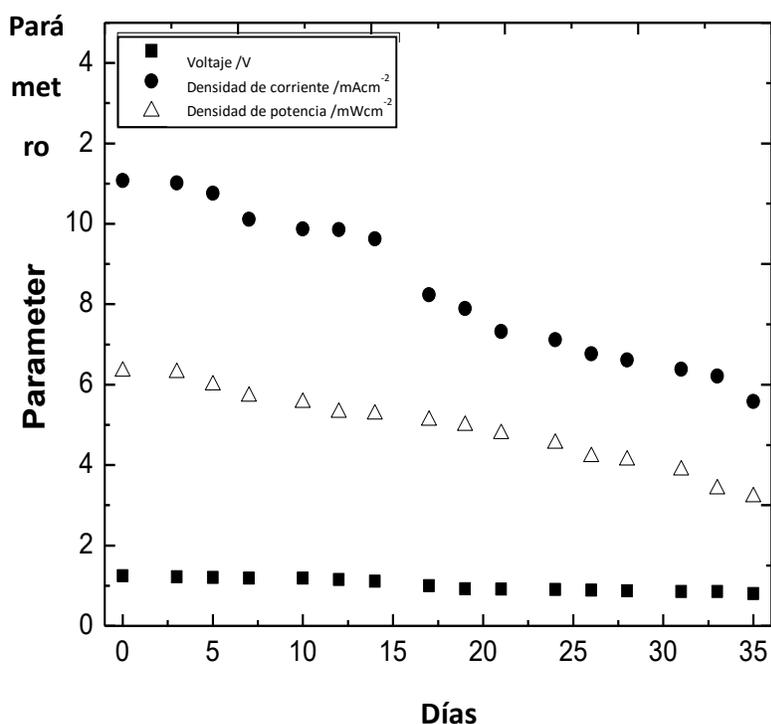


Figura 4.6.3.2. Evaluación de la durabilidad de la celda de combustible híbrida Alcohol deshidrogenasa/Pt.

Tabla 4.6.3.2. Durabilidad de la celda de combustible híbrida Alcohol deshidrogenasa/Pt.

Día	Potencial de circuito abierto (V)	Densidad de corriente (mA/cm ²)	Densidad de potencia (mW/cm ²)
0	1.11	11.078	6.327
35	.82	5.778	3.205
% Perdida	27.74	52.1579	50.65

Se puede observar que la durabilidad de la celda microfluídica híbrida fue buena ya que después del 35 días de operación se obtuvo una pérdida total del 50.65% de la densidad de potencia, lo cual es un buen resultado comparado con lo que está reportado en la actualidad.

4.6.4 Celda de combustible híbrida Alcohol deshidrogenasa/Pd.

Se evaluó el bioánodo desarrollado en celda de combustible microfluídica híbrida con un diferente cátodo, uno de Paladio. Platino soportado se utiliza comúnmente como cátodo electrocatalizador en pilas de combustible de baja temperatura alimentadas con hidrógeno o alcoholes de bajo peso molecular. El costo de Pt y la oferta mundial limitada son barreras importantes para el uso generalizado de este tipo de celdas de combustible. Por otra parte, el platino como material se envenena fácilmente por monóxido de carbono, presente en el gas reformado se utiliza como portador de H₂ en el caso de las pilas de combustible de electrolito polímero, y un subproducto de la oxidación de alcohol en el caso de celdas de combustible directas de alcohol. El Paladio y platino tienen propiedades muy similares porque pertenecen al mismo grupo de la tabla periódica. La actividad para la reacción de reducción de oxígeno de Pd es sólo ligeramente inferior a la de Pt, y mediante la adición de un metal adecuado, tal como Co o Fe.. Por el contrario, la actividad para la reacción de oxidación de hidrógeno de Pd es considerablemente menor que la de Pt y no presenta los problemas anteriores. Por eso se optó por probar el Paladio como catalizador inorgánico en el cátodo para evaluar el desempeño del bioánodo desarrollado.

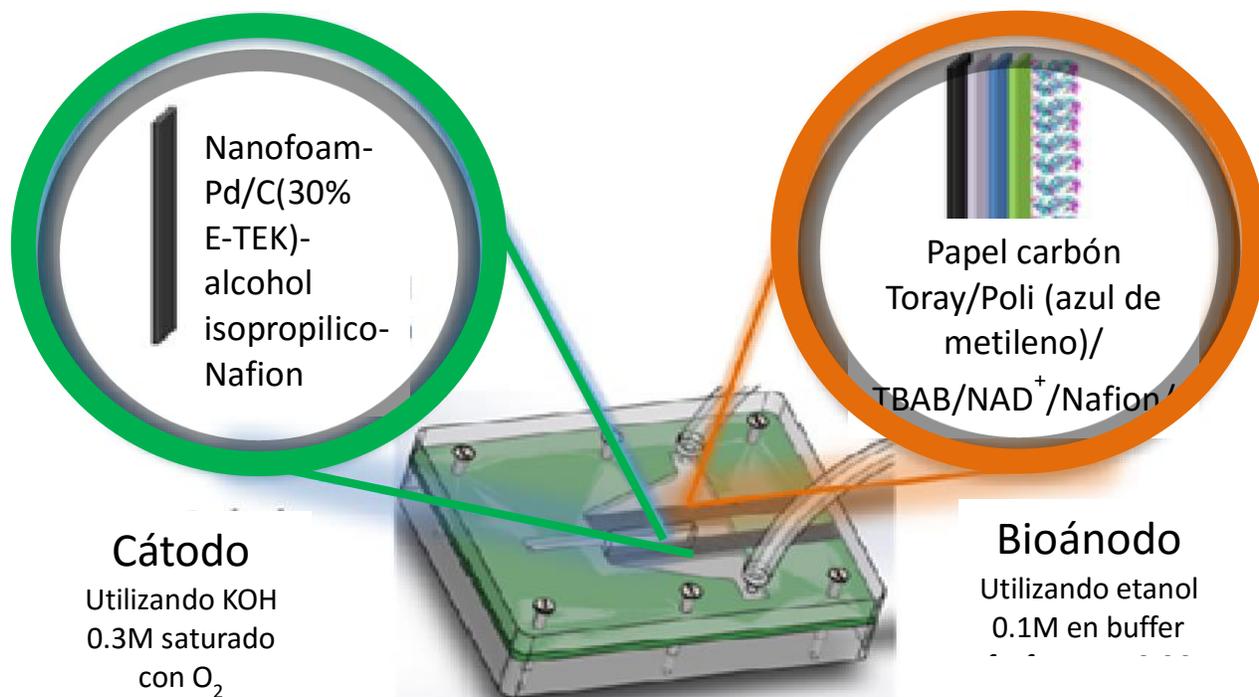


Figura 4.6.4.1. Diagrama de la celda híbrida Alcohol deshidrogenasa/Paladio

El cátodo basado en Pd se preparó utilizando Paladio comercial/C(30% E-TEK) soportado sobre un electrodo de nanoespuma de carbono (2 × 0,3cm,Marketech®). Brevemente, 120µL de alcohol isopropílico y 14µL de Nafion se añadieron por mg de catalizador y se mezcló durante 30 minutos. La tinta catalítica se depositó sobre la superficie nanoespuma de carbono utilizándola técnica de spray.

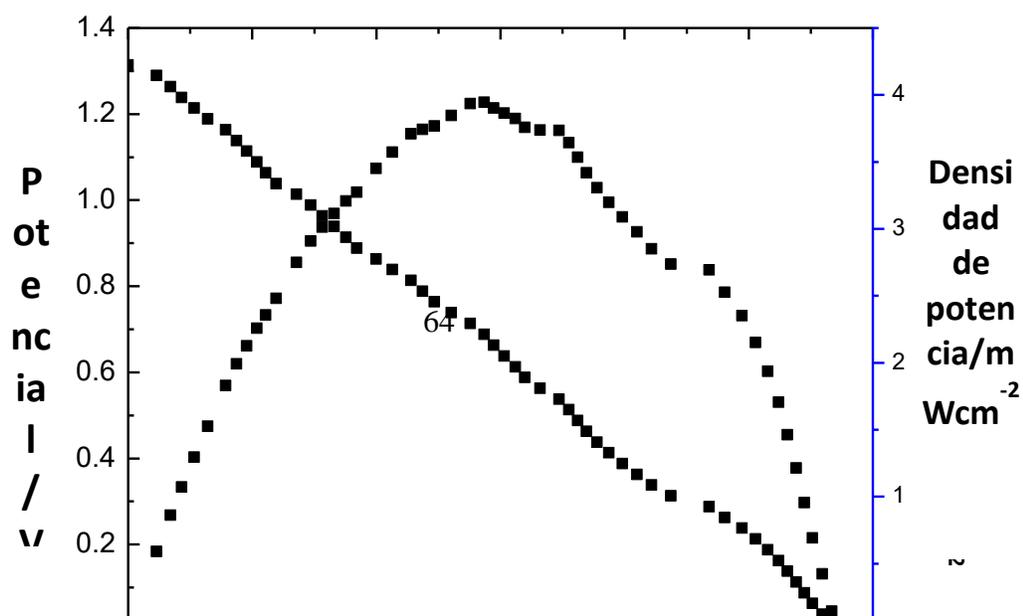


Figura 4.6.4.2. Curva de polarización y densidad de potencia de la celda de combustible híbrida Alcohol deshidrogenasa paladio.

En la figura 4.6.4.2 se muestra la curva de polarización y potencia de la celda híbrida Alcohol deshidrogenasa/Pd, utilizando etanol 100mM en solución buffer fosfatos con un pH de 8.86 para en bioánodo y una solución KOH 0.3M saturada con nitrógeno por un tiempo de 20 minutos para el cátodo, operando a temperatura 25°C. Se puede observar que esta celda tuvo una mayor potencia que la celda de platino alrededor de 4mWcm^{-2} , con un potencial de 1.3V y 11.34mAcm^{-2} de densidad de corriente.

4.6.5 Celda de combustible híbrida Alcohol deshidrogenasa/Lacasa.

El funcionamiento del bioánodo de Alcohol deshidrogenasa en celdas de combustible híbridas (Paladio y Platino) fue exitoso ya que las celdas presentaron altas densidades de potencia e incluso estabilidad durante días de operación, por lo que se decidió realizar la evaluación ya en una biocelda de combustible. Para ello se utilizó un biocátodo con la enzima Lacasa inmovilizada elaborada por otros miembros del grupo de investigación de Sistemas electroquímicos de energía (SEQUE).



Figura 4.6.5.2. Diagrama de la celda hibrida Alcohol deshidrogenasa/Lacasa

Este biocátodo se preparó usando una solución compuesta de enzima lacasa (5 mg ml⁻¹), 0,1 M de acetato de tampón de pH 5 y 1 v / v% de glutaraldehído. Luego, 2 mg ml⁻¹ de nanotubos de carbono de pared múltiple se dispersaron en la solución anterior (1: 1 v / v). Los electrodos de carbono nanoespuma se sumergieron durante 2 h en la tinta catalítica y se secaron a temperatura ambiente antes de ser utilizado. El método de inmovilización utilizado para este electrodo fue el de cross-linking. Para la evaluación se utilizó nuevamente una solución de 100mM de buffer de fosfatos con un pH de 8.86 para el bioánodo previamente nitrogenada por 20 minutos y una solución buffer acetatos pH = 5 previamente oxigenada durante un tiempo de 20 minutos como se muestra en la figura 4.6.5.1

La curva de polarización y densidad de potencia se puede observar en la figura XXX donde se puede apreciar que esta celda está generando un potencial de circuito abierto de 1.03V, una densidad de corriente de 3.15mAcm⁻² y una densidad de potencia casi un mWcm⁻².

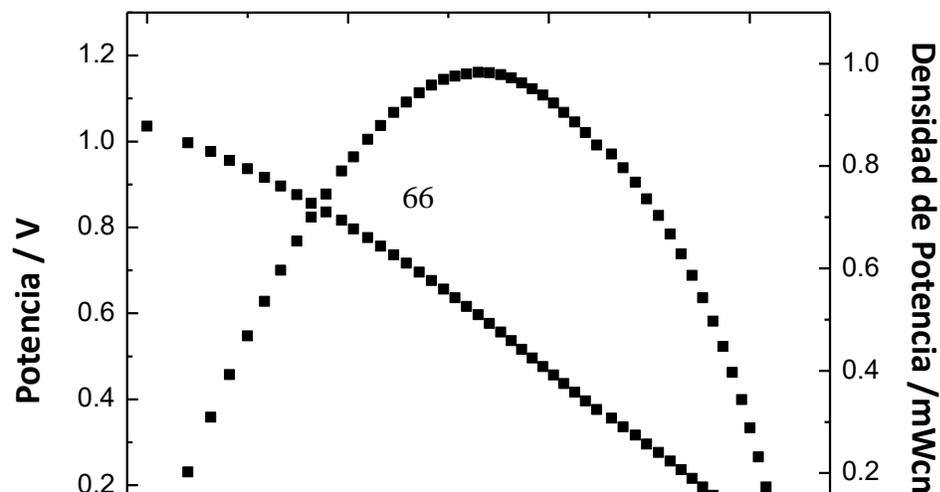


Figura 4.6.5.3. Curva de polarización y densidad de potencia de la biocelda de combustible Alcohol deshidrogenasa /Lacasa.

El rendimiento de la celda de biocombustible se atribuye principalmente a las limitaciones de transporte de masa y las pérdidas de activación, como se puede observar en las regiones de activación y la masa de transporte de la curva de polarización relacionado con el uso de un biocátodo basado en la enzima lacasa sin mediador. A nuestro entender, una celda de combustible microfluídica sin membrana con características similares a los reportados aquí no existe; Por lo tanto los resultados obtenidos se compararon con la única biocelda de combustible de etanol publicada en la actualidad, donde se empleó la enzima alcohol deshidrogenasa como un biocatalizador. La celda de combustible exhibió los voltajes de biocelda más altos reportados hasta la fecha. Incluso la biocelda de biocombustible microfluídico desarrollado en este trabajo, tuvo una mayor densidad de potencia ($1200\mu\text{W}$) que la primera biocelda microfluídica de etanol ($90\mu\text{W}$), que opera en un canal de microfluidos Y-forma y utilizando un bioánodo alcohol deshidrogenasa y un biocátodo de lacasa con velocidad de flujo de $15\mu\text{Lmin}^{-1}$ (Selloum et al., 2014).

En la Figura xxx se puede observar la capacidad del sistema o de la biocelda creada para recuperar el voltaje de la celda y densidad de corriente, demostrándolo por medio de varios experimentos por lotes en el que la microcelda se llena de combustible y oxidante, y se dejó

trabajar hasta que la densidad de corriente alcanza cero (condición estacionaria sin flujo, con un volumen de 11 μ L de bufferfosfato pH = 8,86 en el bioánodo y 11 μ L de buffer de acetato pH = 5 en el cátodo dentro de la celda de biocombustible durante 10 minutos). Después de veinte lotes, el voltaje de la celda no cambia y la densidad de corriente aumentó ligeramente (10.23 a 12.09 mA cm⁻²).

Figura 4.6.5.3. Curva de polarización y densidad de potencia de la biocelda de combustible Alcohol deshidrogenasa /Lacasa por mediciones por lote.

4.6.6 Comparación de los resultados obtenidos con los trabajos de investigación ya publicados

Tabla 4.6.1. Comparación de los trabajos actualmente publicados con los elaborados en esta investigación.

Bioánodo (anólito)	Cátodo (catolito)	OCV (V)	μWcm^{-2}	Tipo de celda de combustible	Referencia
PQQ-ADH + TBAB-modificado-Nafion (EtOH 0.1M en PBS pH=7.2)	20% Pt en Vulcan XC-72 (electrodo de difusión de gas)	0.597± 0.008	27.9	PEM	Aquino et al., 2011
PQQ-ADH + PAMAM (EtOH 0.1M en PBS pH=7.2)	20% Pt en Vulcan XC-72 (electrodo de difusión de gas)	0.584± 0.009	19.4	PEM	Aquino et al., 2011
C + poly-MG + PAMAM + MWCNTs + ADH + NAD ⁺ (EtOH 0.1M en PBS pH=7.4)	E-TEK Pt (electrodo de difusión de gas)	0.459±0.025	278± 38	PEM	Fenga et al., 2005
QH-ADH + glutaraldehído+ carbón vítreo (EtOH .025M en solución de acetatos pH= 6.0)	AOx-MP8 (EtOH .025M en peroxido)	0.24	1.5	PEM	Ramanavicius et al., 2008
C + ADH + poly-MG + TBAB+ NAD ⁺ (EtOH 0.1M en PBS pH=7.15)	Pt 20% en E-TEK Carbon (electrodo de difusión de gas)	0.62	1160	PEM	Akers et al., 2005
C + ADH+ AldDH + poly-MG + TBAB+ NAD ⁺ (EtOH 0.1M en PBS pH=7.15)	Pt 20% en E-TEK Carbon (electrodo de difusión de gas)	0.82	2040	PEM	Akers et al., 2005
C + poly-MG + CHIT + MWCNTs + ADH + NAD ⁺ (EtOH 0.475M en PBS pH=7.4)	Lacasa en carbon XC-72 (electrodo de difusión de gas)	0.618	20	PEM	Rincón et al., 2011
Electrodos de grafito + ADH + NAD ⁺ (EtOH 0.1M en Tris-fosfatos pH=7.6)	20% Pt en Vulcan XC-72 (electrodo de difusión de gas)	0.8	670	PEM	Tayhas et al., 1988
ADH+carbon KS6+NAD ⁺ +VK3+acetone+PEI (EtOH 160 μL in PBS pH 9)	Lacasa+ABTS+ Super P®+Nafion (PBS a pH 5 saturado con O ₂)	0.6	90	Microfluidica	Selloum et al., 2014.

Papel Toray + poly-MB + Nafion+glutaraldehído + ADH + NAD ⁺ (EtOH 01M en PBS pH=8.86)	Pt 20% E-Tek carbon (KOH 0.3M saturado con O ₂)	1.11	6327	Microfluidica	Ésta investigación
Papel Toray + poly-MB + Nafion+glutaraldehído + ADH + NAD ⁺ (EtOH 01M en PBS pH=8.86)	Pd 30% E-Tek carbon (KOH 0.3M saturado con O ₂)	1.314	3940	Microfluidica	Ésta investigación
Papel Toray + poly-MB + Nafion+glutaraldehído + ADH + NAD ⁺ (EtOH 01M en PBS pH=8.86)	Lacasa+MWCT _S + glutaraldehído (buffer acetatos saturado con O ₂)	0.94	1200	Microfluidica	Ésta investigación
PQQ: pírroloquinolina quinona; TBAB:bromuro de tetrabutilamonio; PAMAM: poliamida; poly-MG: poly-verde de metilo; MWCTs:nanotubos de carbon; QH:quino-hemoproteína; CHIT: quitosano; VK3: 2-metil-1,4- naftoquinona;PEI:polietilenimina; ABTS: sal de diammonio; poly-MB: poli(azul de metileno)					

La Tabla 4.6.6.1 muestra la comparación de los resultados de nuestra investigación con lo actualmente publicado con celdas de combustibles tipo PEM y la única biocelda de combustible microfluidica y se puede observar que las densidades de potencia de las 3 celdas (las hibridas de Pt, Pd y la biocelda) son mucho mayores. Esto se puede atribuir al tipo de celda que se utilizó, celdas tipo air-breathing, y a los materiales y métodos de inmovilización para la enzima Alcohol deshidrogenasa utilizados.

Conclusiones.

Por medio de caracterizaciones electroquímicas, bioquímicas y fisicoquímicas se pudo evidenciar la inmovilización de la enzima por medio de la unión covalente, así como la retención de gran parte de la actividad catalítica de esta. El bioánodo desarrollado pudo ser evaluado en dos celdas de combustibles microfluidicas hibridas y una biocelda. El método de inmovilización de unión covalente utilizando Nafion, poli-(azul de metileno), glutaraldehído, TBAB y NAD⁺ mejoro la durabilidad de la celda de combustible

microfluidica y resultando con potencial de celda más alta (1.3 V) y densidad de potencia (4 mW cm^{-2}) reportado hasta la fecha. El diseño de los métodos de la celda y de inmovilización de enzimas (unión covalente y entrecruzamiento) que se utiliza para cada enzima en el bioánodo y biocátodo fueron importantes que marcaron la diferencia entre el rendimiento de la celda de biocombustible microfluidos desarrollado en este trabajo y la primera celda de biocombustible microfluidica reportada hasta ahora utilizando etanol como combustible. Además, este dispositivo exhibe un rendimiento superior en términos de actividad y durabilidad, en ambos casos (pilas de combustible híbrido de microfluidos y celda de biocombustible microfluidos), que aumentan la posibilidad de su uso como un proveedor de energía para pequeños dispositivos electrónicos. Gracias a esta investigación se logró el incremento de la potencia de las celdas microfluidicas híbridas y aumentando la estabilidad.

Referencias.

- Abdullah S.**, Kamarudin S.K., Hasran U.A., Masdar M.S., Daud W.R.W, Modeling and simulation of a direct ethanol fuel cell: An overview (2014) *Journal of Power Sources* 262, 401-406.
- Akers N.L.**, Moore C.M., Minteer S.D., Development of alcohol/O₂ biofuel cells using salt-extracted tetrabutylammonium bromide/Nafion membranes to immobilize dehydrogenase enzymes (2005) *Electrochim. Acta* 50, 2521–2525.
- Ali I.**, Soomro B., Omanovic S., Electrochemical regeneration of NADH on a glassy carbon electrode surface: The influence of electrolysis potential (2011) *Electrochem. Commun.* 13, 562-565.
- An L**, Zhao TS. An alkaline direct ethanol fuel cell with a cation exchange membrane. (2011) *Energy Environ Sci* 4:2213-7.
- Antolini E**, Perez J., The use of rare earth-based materials in low-temperature fuel cells (2011) *Int J Hydrogen Energy* 36:15752–15765.
- Aquino Neto S.**, Forti J.C., Zucolotto V., Ciancaglini P., De Andrade A.R., Direct electron transfer-based bioanodes for ethanol biofuel cells using PQQ-dependent alcohol and aldehyde dehydrogenases (2011) *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011), 2922–2926.
- Arechederra R.L.**, Boehm, K., Minteer, S.D., Mitochondrial bioelectrocatalysis for biofuel cell applications (2009) *Electrochim. Acta* 54, 7268–7273.
- Ayato Yusuke**, Sakurai Kenichiro, Fukunaga Saori, Suganuma Takuya, Yamagiwa Kiyofumi, Shiroishi Hidenobu, Kuwano Jun. A Simple Biofuel Cell Cathode with Human Red Blood Cells as Electrocatalysts for Oxygen Reduction Reaction (2014). *Biosensors and Bioelectronics*, 55 14-18.
- Barton S.C.**, Gallaway J., Atanassov P., Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices (2004) *Chemical Reviews* 104 4867–4886.

- Bourgeois**, W., Burgess, J.E., Stuetz, R.M., On-line monitoring of wastewater quality: a review. (2001) *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76, 337-348.
- Bolivar** JM, Wilson L, Ferrarotti SA, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM, Mateo C. Stabilization of a formate dehydrogenase by covalent immobilization on highly activated glyoxyl-agarose supports (2006) *Biomacromolecules.* 7:669–73.
- Bozbag S.E**, ErkeyC. (2012) Supercritical fluids in fuel cell research and development.*J. of Supercritical Fluids* 62 (2012) 1– 31.
- Brena** Beatriz M., Batista-Viera Francisco, Immobilization of enzymes. Methods of biotechnology. (2006) *Human press Inc.*
- Bullen** R.A., Arnot T.C., Lakeman J.B., Walsh F.C., Biofuel cells and their development (2006) *Biosensors & Bioelectronics* 21 2015–2045.
- Buzanich** G., Wobrauschek P., Strelci C., Markowicz A., Wegrzynek D., Chinea-Cano E., Bamford, S. A portable micro-X-ray fluorescence spectrometer with polycapillary optics and vacuum chamber for archaeometric and other applications (2007) *Spectrochim. Acta Part B* 62,1252–1256.
- Calabrese** Barton Scott, Gallaway Josh, Atanassov Plamen, Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices (2004) *Chem. Rev.*104, 4867–4886.
- Carrera-Cerritos** R., Fuentes-Ramírez R., Cuevas-Muñiz F.M., Ledesma-García J., Arriaga L.G., Performance and stability of Pd nanostructures in an alkaline direct ethanol fuel cell (2014). *Journal of Power Sources* 269, 370-378.
- Charmantray** F., Touisni N., Hecquet L., Mousty C., Amperometric Biosensor Based on Galactose Oxidase Immobilized in Clay Matrix (2013) *Electroanalysis.* 25, 630–635.
- Chetty Raghuram**, Scott Keith, Direct ethanol fuel cells with catalysed metal mesh anodes (2007). *Electrochimica Acta* 52, 4073-4081.
- Choban** E., Markoski L., Wieckowski A., Kenis P., Microfluidic fuel cell of laminar flow (2004) *Journal Of Power Sources*, 128, 54 – 60.

- Choban E.**, Spendelow J., Gancs L., Wieckowski A., Kenis P., Membraneless laminar flow-based micro fuel cells operating in alkaline, acidic, and acidic/alkaline media (2005) *Electrochimica Acta*, 50, 5390 - 5398.
- Cornu F.**, Pramana, Classical charge fluids at equilibrium near an interface: Exact analytical density profiles and surface tension (2005) *J. Phys.* 64 ,785.
- Crutzen P.**, Mosier AR, Smith KA, Winiwarter W., 2O release from agro-biofuel production negates global warming reduction by replacing fossil fuels (2007) *Atmos Chem Phys Discuss* 7:11191–11205.
- Davis F.**, Higson S.P.J. Biofuel cells –Recent advances and applications (2007) *Biosensors & Bioelectronics* 22 1224-1235.
- dos Santos A.P.**, Levin Y., Surface tensions and surface potentials of acid solutions. (2010) *J. Chem. Phys.* 133, 154107.
- Déctor A.**, Esquivel J., González M., Guerra M., Ledesma J., Sabaté N., Arriaga L., Direct formic acid microfluidic fuel cell design and performance evolution (2013) *Electrochimica Acta*, 92, 31 – 35.
- Dyer C.K.**, Fuel cells for portable applications (2002) *Journal of Power Sources* 106, 31-34.
- Ehrburger P.** (1990). En: *Mathematical and Physical Sciences*, Ed. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1990, Vol. 177.
- Elmer Theo.**, Worall Mark, Wu Shenyi, Riffat Saffa B., Fuel cell technology for domestic built environment applications State of-the-art review (2005) *Renewable and Sustainable energy reviews*, 42, 913- 931.
- Farrow G. J.**, Atkinson K. E., Fluck N., Jones C., Effect of low-power air plasma treatment on the mechanical properties of carbon fibres and the interfacial shear strength of carbon fibre—epoxy composites (1995) *Surf. Interf. Anal.* 23 313.
- Fenga P.G.**, Cardoso F.P., Aquino Neto S., De Andrade A.R., Multiwalled carbon nanotubes to improve ethanol/air biofuel cells (2013) *Electrochim. Acta*106, 109– 113.

- Floris** Tomas, Kluson Petr, Bartek Lukas, Pelantova Helena, Quaternary ammonium salts ionic liquids for immobilization of chiral Ru-BINAP complexes in asymmetric hydrogenation of β -ketoesters (2009) *Applied Catalysis A: General*. 366, 160-165.
- Friedl** J, Stimming U., Model catalyst studies on hydrogen and ethanol oxidation for fuel cells (2013) *Electrochim Acta* 101:41–58.
- Gorte** R.J., Vohs J.M., Nanostructured anodes for solid oxide fuel cells (2009) *Science* 14 (2009) 236–244.
- Grazú** V., Betancor L, Montes T, López-Gallego F, Guisan J. M, Fernández-Lafuente R., Glyoxyl agarose: a fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme Microb Technol* (2006) *Enzyme Microb Technol*. 38:960–6.
- Grove** W.R., Alternating H₂ and O₂ electrodes in a gas battery.(1839). *Philos. Mag. Ser. 3* (14), 127.
- Harnisch, F.**, Schröder, U., From MFC to MXC: chemical and biological cathodes and their potential for microbial bioelectrochemical systems (2010). *Chem. Soc. Rev.* 39, 4433–4448.
- Heller** A., Miniature biofuel cell (2004) *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6, 209-216.
- Hoogers** G. (2003) *Fuel Cell Handbook*, CRC Press, USA, 2003.
- Hunter, R.J.** (1988) *Zeta Potential in Colloid Science: Principles And Applications*, Academic Press, UK.
- Ichikawa** S, Takano K, Kuroiwa T, Hiruta O, Sato S, Mukataka S., Formation of Biocompatible Nanoparticles by Self-Assembly of Enzymatic Hydrolysates of Chitosan and Carboxymethyl Cellulose (2002) *J. Biosci. Bioeng.* 93:201 6.
- Iwasita** T., Pastor E., CO and ethanol electro-oxidation on Pt-Rh/C (1994) *Electrochim. Acta* 39, 531.
- Izake** E.L. (2010) Forensic and homeland security applications of modern portable **Jiang** L., Sun G., Sun S., Liu J., Tang S., Li H., Zhou B., Xin Q.(2005). *Electrochim. Acta* 50 5389.

- Jungwirth** P., Tobias D.J, Specific ion effects at the air/water interface (2006) *Chem. Rev.* 106, 1259
- Kamaruddin** M.Z.F, Kamarudin S.K., Daud W.R.W, Masdar M.S. Direct ethanol fuel cell (2013) *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 24 (2013) 557–565.
- Kaszuba** Michael, Corbett Jason, Watson Mcneil Fraser, Jones Andrew(2010). High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Phil. Trans.Raman spectroscopy, Forensic Sci. Int.* 202, 1–8.
- Katz** E., Shipway A.N., Willner I.(2003) Biochemical Fuel Cells. In W. Vielstich, H.A. Gasteiger,A. Lamm, eds. *Handbook of Fuel Cells - Fundamentals, Technology and Applications* (John Wiley & Sons, Ltd., New York).
- Kee** S., Fichtl G., and Kenis P., Ceramic microreactors for on-site hydrogen production from high temperature steam reforming of propane (2006) *The Royal Society of Chemistry, Lab on Chip*, 6, 1516-1524.
- Kemmegne** Mbouguen J., Tonlé I.K., Walcarius A., Ngameni E., Tetrabutylammonium-modified clay film electrodes: Characterization and application to the detection of metal ions (2011) *Talanta.* 85, 754–762.
- Kjeang**, E., Djilali, N., & Sintona, D., Microfluidic fuel cells: A review. (2009). *Journal of Power Sources*, 353–369.
- Kim** C, Kim YJ, Yanagisawa T, Park KC, Endo M., Direct Alcohol Fuel Cells: Materials, Performance (2004) *J. Appl. Phys.* 96:5903–5905.
- Lamy** C, Coutanceau C, Leger J-M (2009) The direct ethanol fuel cell: a challenge to convert bioethanol cleanly into electric energy. In: Barbaro P, Bianchini C (eds) *Catalysis for sustainable energy production.* Wiley, New York.
- Larminie** J., Dicks A. (2003) *Fuel Cell Systems Explained*, 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.
- Larminie**, J., Dicks, A. (2000). *Microbial fuel cells: performances and perspectives.* *Fuel Cell Systems Explained*, 1st ed. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.

- Liu** Wenfang, Zhang Songping, WangPing, Nanoparticle-supported multi-enzyme biocatalysis with in situ cofactor regeneration (2009)*Journal of Biotechnology* 139, 102–107.
- Lombardi** J.R., Birke R.L (2008), A unified approach to surface-enhanced Raman spectroscopy, *J. Phys. Chem. C* 112, 5605.
- Maghear** Adela, Tertis Mihaela, Fritea Luminta, Marian Iuliu O., Indre Emil, Walcarius Alain, Sandulescu Robert. (2014) *Talanta*. 125, 36-44.
- Mano** N., Mao F., Shin W., Chen T., Heller A., A miniature biofuel cell operating in a physiological buffer (2003) *Chem. Commun.* 518.
- Mateo** C, Palomo J. M, Fuentes M, Betancor L, Grazu V, López-Gallego F., Improvement of Enzyme Activity, Stability and Selectivity Via Immobilisation Techniques (2006) *Enzyme Microb Technol.* 39:274–80.
- McCreery** R.L.(200) Raman Spectroscopy for Chemical Analysis, John Wiley & Sons, New York, USA, p. 4.
- McLean** GF, Niet T, Prince-Richard S, Djilali N. (2002) An assessment of alkaline fuel cell technology. *Int. J Hydrogen Energy* 27:507-26.
- Merida** W.R., McLean G., Djilali N., Water management in PEM fuel cells (2001) *Journal of Power Sources* 102, 178-185.
- Milazzo** M.(2004) Radiation applications in art and archaeometry X-ray fluorescence applications to archaeometry. Possibility of obtaining non-destructive quantitative analyses, *Nucl.Instr. Meth. Phys. Res. B* 213, 683–692
- Mukhopadhyay** Abhijit, Wei Baoxian, Weiner Henry, Selective Alteration of the Rate-Limiting Step in Cytosolic Aldehyde Dehydrogenase through Random Mutagenesis (2013). *Biochimica et Biophysica Acta* 1830, 3391–3398.
- Molina**, Á., Laborda, E., Rogers, E. I., Martínez -Ortiz, F., Serna, C., Limon-Petersen, J. G., Compton, R. G. (2009). Theoretical and experimental study of Differential

- Pulse Voltammetry at spherical electrodes: Measuring diffusion coefficients and formal potentials. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 73-81.
- Moore** C.M., Akers N.L., Hill A.D., Johnson Z.C., Minter S.D., Improving the environment for immobilized dehydrogenase enzymes by modifying nafion with tetraalkylammonium bromides,(2004) *Biomacromolecules* 5, 1241-1247.
- Moorgat** G, Vancaster N., Vandeneede V., Cambier F. (2003). La caracterización de barbotinas arcillosas utilizando medidas de resistencia a la polarización. *Belgian Ceramic Research Centre*.
- Morse** J.D, Micro-fuel cell power sources (2007) *International Journal of Energy Research* 31 576–602.
- Mousavi** S., Nguyen N., Chan S. A review on membranless laminar flow-based fuel cells(2011) *International Journal Of Hydrogen Energy*, 36, 5675 - 5694.
- Murray** JN, Grimes PG (1963) Fuel cells. *American Institute of Chemical Engineers*, New York, pp 57.
- Pal** Ajay, Khanum Farhath, Covalent immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated alginate beads using response surface methodology: Characterization of immobilized enzyme (2011) *Process Biochemistry* 46, 1315–1322.
- Nguyen** N.T., Chan S.H., Micromachined polymer electrolyte membrane and direct methanol fuel cells (2006) *Journal of Micromechanics and Micro engineering* 16 R1–R12.
- Ortiz-Ortega** E., Goulet Marc-Antoni, Wook Lee Jin, Guerra-Balcázar M., Arjona N., Kjeang Erik, Ledesma-García J. and Arriaga L. G., A nanofluidic direct formic acid fuel cell with a combined flow-through and air-breathing electrode for high performance (2014) *The Royal Society of Chemistry, Lab Chip*, 14,4596–4598.
- Palmore** G.T.R., Bertschy H., Bergens S.H., Whitesides G.M., A methanol/dioxygen biofuel cell that uses NAD⁺ dependent dehydrogenases as catalyst: application of an electro-

- enzymatic method to regenerate nicotinamide adenine dinucleotide at low overpotentials (1998). *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 443 155-161.
- Park D.H.**, Zeikus J.G., In silico characterization of microbial electrosynthesis for metabolic engineering of biochemicals (2000) *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1292 -1297.
- Pedroche J**, Yust M, Mateo C, Fernández-Lafuente R, Girón-Calle J, Alaiz M. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques (2007) *Enzyme Microb. Technol.* 40:1161–7.
- Pennathur S**, Eijkel J.C.T., A. van den Berg, High efficiency energy conversion from liquid jet flow (2007) *Lab on a Chip*, 1234–1237.
- Piccolino Marco**. (2006). Luigi Galvani's path to animal electricity. *C. R. Biologies* 329 303–318.
- Pick André**, Ott Wolfgang, Howe Thomas, Schmid Jochen, SieberVolker, Improving the NADH-cofactor specificity of the highly active AdhZ3 and AdhZ2 from *Escherichia coli* K-12 (2014). *Journal of Biotechnology*, 189, 157–165.
- Qi**, Liang. et al. (2012) Adsorbate interactions on surface lead to a flattened Sabatier volcano plot in reduction of oxygen. *Journal of Catalysis* 295. 59–69.
- Qian W.M.**, Wilkinson D.P., Shen J., Wang H.J., Zhang J.J. A Novel Structure of a Direct Methanol Fuel Cell: Design, Research and Assembly (2006), *Journal of Power Sources* 154 (2006) 202–213.
- Ramanavicius A.**, Kausaite A., Ramanaviciene A., Enzymatic biofuel cell based on anode and cathode powered by ethanol (2008)*Biosens. Bioelectron.* 24, 761–766.
- Rousseau S.**, Coutanceau C., Lamy C., L'éger J.M., J., Direct ethanol fuel cell (DEFC): electrical performances and reaction products distribution under operating conditions with different platinum-based anodes(2006) *Power Sources*, 158 18.

- Rincón** Rosalba A., Lau C., Luckarift H. R., Garcia K.E., Adkins, Johnson G.R, Atanassov P., Enzymatic fuel cells: Integrating flow-through anode and air-breathing cathode into a membrane-less biofuel cell design (2011) *Biosens. Bioelectron.*27, 132– 136.
- Sándor** Zs., Tölgyesi S., Gresits I., Kasztovszky Zs.(2002) Determination of the alloying elements in ancient silver coins by X-ray fluorescence, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 254, 283–288.
- Sakai** T., Hayashi K., Yano F., Takami M., Ino M., Korenaga T. , Enhancement of the efficiency of the low temperature method for kinetic resolution of primary alcohols by optimizing the organic bridges in porous ceramic-immobilized lipase (2003). *Bull Chem Soc Jpn* 76:1441–6.
- Sauve** A. A., Pharmacol J., NAD⁺ and vitamin B3: from metabolism to therapies (2008) *Exp. Ther.* 324, 833- 893.
- Schrenk** M., Villigram R., Torrence N., Brancato V., Minteer S.D., Effects of Mixture Casting Nafion with Quaternary Ammonium Bromide Salts on the Ion Exchange Capacity and Mass Transport in the Films (2002) *J. Membr. Sci.* 205, 3.
- Selloum** D., Tingry S., Techer V., Renaud L., Innocent C., Zouaoui M., Optimized electrode arrangement and activation of bioelectrodes activity by carbon nanoparticles for efficient ethanol microfluidic biofuel cells (2014) *J. Power Sources*, 269, 834-840.
- Sharma** S, Poleet B.G., Support Materials for PEMFC and DMFC Electrocatalysts - A Review (2012) *J. Power Sources*, 208:96–119.
- Shaw** D. J.(1992) Introduction to colloid and surface chemistry (Butterworth Heinemann, London, UK).
- Shukla** A.K., Raman R.K., Scott K., An alkaline direct borohydride fuel cell with hydrogen peroxide as oxidant (2005) *Fuel Cells*, 436–447.
- Smith** E., Dent G. (2005) Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach, John Wiley & Sons, Chichester, England.

- Soukharev V.**, Mano N., Heller A., A Four-Electron O₂-Electroreduction Biocatalyst Superior to Platinum and a Biofuel Cell Operating at 0.88 V (2004) *Journal of the American Chemical Society*, 126, 8368-8369.
- Tahtat Djamel**, Mahlous Mohamed, Benamer Samah, Khodja Assia Nacer, Oussedik-Oumehdi Habiba, Laraba-Djebari Fatima, Oral delivery of insulin from alginate/chitosan crosslinked by glutaraldehyde (2013). *International Journal of Biological Macromolecules* 58, 160– 168.
- Tavano Olga Luisa**, Fernández-Lafuente Roberto, Goulart Antonio José, Monti Rubens, Stabilization of an Amylase from *Neurospora crassa* by Immobilization on Highly Activated Supports (2013). *Process Biochemistry* 48, 1054–1058.
- Tayhas R.**, Palmore G., Bertschy H., Bergens S.H., Whitesides G.M, A methanol/dioxygen biofuel cell that uses NAD⁺-dependent dehydrogenases as catalysts: application of an electro-enzymatic method to regenerate nicotinamide adenine dinucleotide at low over potentials (1988) *J. Electroanal. Chem.*443, 155–161.
- Tonlé I.K.**, Letaief S., Ngameni E., Detellier C. , Recent advances in material science for developing enzyme electrodes (2011) *Electroanalysis*. 23, 245–252.
- Verma A.**, Basu S., Direct use of alcohols and sodium borohydride as fuel in an alkaline fuel cell (2005) *J. Power Sources* 145 (2005) 282.
- Vigier F**, Coutanceau C, Hahn F, Belgsir EM, Lamy C., On the mechanism of ethanol electro-oxidation on Pt and PtSn catalysts: Electrochemical and in situ IR reflectance spectroscopy studies (2004) *J. Electroanal. Chem.* 563:81–89.
- White P.C.**(2003) In situ Surface Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS) spectroscopy of biro inks – long term stability of colloid treated samples, *Sci. Justice* 43, 149–152.
- Willner I.**, Katz E., DNazymes for sensing, nanobiotechnology and logic gate applications (2000) *Angewandte Chemie-International Edition* 39, 1180-1218.
- Willsau J.**, Heitbaum J., Elementary steps of ethanol oxidation on Pt in sulfuric-acid as evidenced by isotope labeling (1985) *Electroanal. J. Chem.* 194, 27.

- Wei** Guo-Lin, Melnik Juri, Luo Jing-Li, Sanger Alan R., Chuang Karl T., Cathodes for fuel cells using proton-conducting $\text{Li}_2\text{SO}_4\text{-Al}_2\text{O}_3$ electrolyte (2005) *Journal of Electroanalytical Chemistry* 575 (2005) 183–193.
- Wu**, B.-Y., Hou, S.-H., Yin, F., Zhao, Z.-X., Wang, Y.-Y., Wang, X.-S., & Chen, Q. (2007). Amperometric glucose biosensor based on multilayer films via layer-by-layer self-assembly of multi-wall carbon nanotubes, gold nanoparticles and glucose oxidase on the Pt electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 2854–2860.
- Yang**, X. -Y., Tian, G., Jiang, N., & Su, B.-L. (2012). Immobilization technology: a sustainable solution for biofuel cell design. *Energy & Environmental Science*, 5540–5563.
- Zamel** Nada, Li Xianguo, Shen Jun, Becker Jürgen, Wiegmann Andreas, Add to e-Shelf Estimating the thermal conductivity and diffusion coefficient of the microporous layer of polymer electrolyte membrane fuel cells (2010) *Chemical Engineering Science*. 65, 3994-4006.
- Zhou**, M., Deng, L., DanWen, Shang, L., Jin, L., & Dong, S. (2009). Highly ordered mesoporouscarbons-based glucose/O₂ biofuel cell. *Biosensors and Bioelectronics*, 2904–2908.