



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERIA CELULAR Y BIOCATÁLISIS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UNA  
CELDA DE COMBUSTIBLE ENZIMÁTICA  
HÍBRIDA Zn-LACASA**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS**

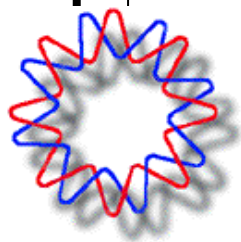
**P R E S E N T A :**

**BIOL. JAVIER MARTÍNEZ ORTIZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. RAFAEL VÁZQUEZ DUHALT**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**2010**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Índice

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>1</b>
<b>I. Introducción.....</b>	<b>2</b>
1.1 Celdas de combustible químicas.....	2
1.1.1 Mecanismo de funcionamiento.....	3
1.1.2 Tipos de celdas de combustible químicas.....	5
1.2 Celdas de combustible biológicas.....	6
1.2.1 Tipos de celdas de combustible biológicas.....	8
1.2.2 Aplicaciones de las celdas de combustible biológicas.....	12
1.3 Celdas de combustible enzimáticas.....	13
1.3.1 Electrodo enzimático: Transferencia electrónica.....	17
1.4 Lacasas.....	19
1.4.1 Sitio activo y mecanismo catalítico.....	21
1.4.2 Aplicaciones de las lacasas.....	25
<b>II. Justificación.....</b>	<b>28</b>
<b>III. Hipótesis y Objetivos.....</b>	<b>29</b>
<b>IV. Estrategia experimental.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1 Materiales.....</b>	<b>30</b>
4.1.1 Material biológico.....	30
4.1.2 Material químico.....	30

<b>4.2 Métodos</b> .....	<b>31</b>
4.2.1 Condiciones de cultivo y producción de la enzima.....	31
4.2.2 Extracción y purificación enzimática.....	32
4.2.3 Inmovilización no-covalente.....	33
4.2.4 Inmovilización covalente.....	34
4.2.5 Evaluación de actividad enzimática y concentración de proteína.....	37
4.2.6 Caracterización eléctrica y electroquímica del cátodo.....	37
4.2.7 Construcción y evaluación de celda de combustible Zn-lacasa.....	39
<b>V. Resultados y Discusión</b> .....	<b>40</b>
5.1 Producción y purificación de lacasa de <i>Corioloopsis gallica</i> UAMH 8260.....	40
5.2 Evaluación de actividad catalítica en inmovilizaciones no-covalentes de lacasa.....	41
5.3 Evaluación de actividad catalítica en inmovilizaciones covalentes de lacasa.....	49
5.4 Interacción covalente de la lacasa de <i>C. gallica</i> UAMH 8260 con AEBA.....	56
5.5 Caracterización eléctrica y electroquímica de cátodos de lacasa.....	58
5.6 Construcción y caracterización electroquímica de la celda de combustible enzimática híbrida.....	66
<b>VI. Conclusiones y Perspectivas</b> .....	<b>77</b>

**Literatura citada**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Rafael Vázquez Duhalt por su dirección y apoyo en el desarrollo y la culminación de este proyecto de investigación.

Al Comité Tutoral, integrado por el Dr. Rafael Vázquez Duhalt, el Dr. José Roberto Flores Hernández y el Dr. Agustín López Munguía Canales.

Al Jurado de Evaluación conformado por la Dra. Katy Juárez López, el Dr. Rafael Vázquez Duhalt, el Dr. Ulises Cano Castillo, el Dr. Alfredo Martínez Jiménez y el Dr. Edmundo Castillo Rosales.

A la Dra. Marcela Ayala Aceves, a la Dra. Lucía Pérezgasga Ciscomani, al Dr. Félix Loyola Morales y al Dr. Sergio Andrés Águila Puentes por prestarme ayuda y resolverme satisfactoriamente las dudas que se me presentaron.

A Rosita por apoyarme, orientarme y aconsejarme en todo momento.

A mis compañeros de laboratorio: Julio, Bere, Cris Torres, Cris Uribe, Lore Hernández, Lore Sánchez, Abraham y demás que desfilaron por el laboratorio (como Adriana y Pedro).

A Lorena Albarran Sánchez y demás personal del IIE que me prestaron apoyo durante mi estancia en su laboratorio.

### **Referencia de la tesis:**

Martínez-Ortiz, J. (2010). *Diseño y construcción de una celda de combustible enzimática híbrida Zn-lacasa*. Tesis de maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca (Morelos).

## DEDICATORIA

Dedico especialmente a mis señores padres: el Sr. Javier Martínez Resendiz y la Sra. Demetria Ortiz Padilla, les agradezco su eterno e incondicional apoyo en todo momento; siempre han sido mi impulso por seguir adelante, les brindo este segundo fruto.

A mis honorables abuelitos: la Sra. María Paula Padilla Arenas, la Sra. Guadalupe Resendiz Trejo (†), el Sr. Calixto Ortiz Olvera y el Sr. José Martínez Robles (†).

A mis adorables Lupita y Sergio les agradezco su apoyo y estimación, les brindo esto con mucho cariño; esperando que algún día hagan lo posible por superarse.

A mi Chavita (†), te lo dedico de corazón...desde aquí hasta el cielo.

A mi muy amada Bere, gracias chaparrita por estar ahí en todo momento, y darme ese impulso que inyectas en mi; siempre aquí en mi corazón...ya sabes. Asimismo a la Sra. Gabriela Reyes Cruz, a Jessica e Ingrid Romero Reyes.

A mis compadres (Pepe y Anita), les agradezco su apoyo y estimación.

A mi dulce princesita (Marianita), te brindo este gran esfuerzo, esperando que hagas lo mismo en tu hermosa vida.

A mis padrinos: la Sra. Antonia Ortiz Soto (†) y el Sr. Antonio López Sánchez.

A mis tíos paternos y maternos.

A mis primos.

A mi entrañable: la Dra. S. Eréndira Avendaño Vázquez.

A mis amigos: Fabis, Elia, Miriam, Azu, Elida, Mary, David, Alejandra, Jesús, René, Ramces, Zuemy, A. Nabor, Hugo, Katy, Herme, Yola, Moni, Herve, Martín, Sergio y demás "banda" por citar.

....y pues no puede faltar a "Bombón" y su inseparable "Trapo".

## Resumen

En este trabajo, se construyó una celda de combustible enzimática híbrida conformada por un ánodo de zinc y un cátodo a base de lacasa. Se evaluaron tres métodos de inmovilización usando lacasa de *Corioloopsis gallica* UAMH 8260, sobre superficies de carbono: a) adsorción con una tinta de carbono, b) unión covalente directa, y c) unión covalente mediada por el ácido 4-[2-aminoetil] benzoico (AEBA). Los cátodos con lacasa elaborados por inmovilización covalente mediada por AEBA presentaron una mejoría en la orientación del sitio T1 de la lacasa a la superficie de carbono. Este acoplamiento permite una transferencia electrónica directa entre la superficie de carbono y el sitio T1. El ácido benzoico interactúa con el sitio T1 como un ligando, con una constante de asociación ( $K_A$ ) de 6.6  $\mu\text{M}$ . Se desarrollaron dos celdas de combustible enzimática híbridas, dependiendo del tipo de inmovilización enzimática en el cátodo de lacasa: Zn-lacasa<sup>MED</sup> y Zn-lacasa<sup>DIR</sup>. Las densidades de potencia máxima ( $S_{\text{MAX}}$ ) de las celdas Zn-lacasa<sup>MED</sup> y Zn-lacasa<sup>DIR</sup> fueron de 1191  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  y 866  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  a 0.4 V, respectivamente. Estas densidades de potencia son mayores a las reportadas en otras celdas de combustible enzimáticas. La medición cronoamperométrica de la celda Zn-lacasa<sup>MED</sup> mostró un decremento en la densidad de corriente eléctrica, después de 6 horas de operación continua.

## Abstract

In this work, hybrid enzyme-based fuel cell constituted of a zinc anode and laccase-based cathode has been constructed. We evaluated three immobilization methods using laccase from *Corioloopsis gallica* UAMH 8260, into surfaces carbon: a) adsorption with a carbon ink, b) direct covalent binding, and c) mediated covalent binding by 4-[2-aminoethyl] benzoic acid (AEBA). The laccase-cathodes elaborated by AEBA-mediated covalent immobilization, showed an improvement in the orientation of T1 site of laccase to carbon surface. This coupling allows direct electron transfer between surface carbon and T1 site. The benzoic acid interacts with T1 site as a ligand, with an association constant ( $K_A$ ) of 6.6  $\mu\text{M}$ . We thus developed two hybrid enzyme-based fuel cells, depending on the type of enzymatic immobilization of laccase-cathode: Zn-laccase<sup>MED</sup> and Zn-laccase<sup>DIR</sup>. The maximum power density ( $S_{\text{MAX}}$ ) of Zn-laccase<sup>MED</sup> and Zn-laccase<sup>DIR</sup> cells was 1191  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  and 866  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  at 0.4 V, respectively. These power densities are higher than those reported for other enzyme-based fuel cell. Chronoamperometric measurement of the Zn-laccase<sup>MED</sup> cell shows an electric current density decreased, after of operation continual a 6 hours.

## I. Introducción.

### 1.1 Celdas de combustible químicas.

El panorama mundial en el que actualmente nos encontramos inmersos, está caracterizado por el incremento en la demanda energética global propiciada tanto por el crecimiento demográfico, como por el agotamiento de las reservas petroleras. Adicionando a esto, la problemática ambiental producida por las actividades antropogénicas, ha impulsado la búsqueda, el desarrollo y la implementación de fuentes de energía alternativas, que además sean sustentables. Una de esas opciones prometedoras son las celdas de combustible.

Históricamente, la primera celda de combustible fue construida por Sir William Grove (1839), demostrando que mediante la combinación de hidrógeno y oxígeno, se generaba energía eléctrica. No fue hasta principios de los años setenta del siglo pasado, que surgió el interés por las celdas de combustible químicas, al ser empleadas en algunos sistemas de las naves espaciales *Geminis* y *Apollo* (proporcionando no solo energía eléctrica, sino además agua). En la actualidad, las celdas de combustible químicas han ido abarcando un mayor campo de aplicación, debido a que ofrecen ciertas ventajas respecto a otras fuentes de energía. La investigación que se ha venido realizando en torno a las celdas de combustible, permitirá el desarrollo y mejoramiento de estos sistemas, y por lo tanto explotar al máximo esta tecnología [Larminie y Dicks, 2003].

La celda de combustible es un dispositivo electroquímico mediante el cual la energía libre de una reacción química se convierte en energía eléctrica (y parte en energía calorífica). La conversión de energía química a energía eléctrica en estos dispositivos es un proceso irreversible (*i.e.* la energía química no puede ser restaurada mediante el suministro de corriente eléctrica); por lo que la celda de combustible es considerada, dentro de los dispositivos electroquímicos, como una pila galvánica primaria. Además de generar energía eléctrica, las celdas de combustible originan como producto agua (si los reactivos son el hidrógeno y oxígeno) ó incluso dióxido de carbono y otras especies de hidrocarburos menos complejas, dependiendo del combustible que se aprovecha [Larminie y Dicks, 2003; Bagotsky, 2006].



### 1.1.1 Mecanismo de funcionamiento.

Una celda de combustible consiste de un polo negativo conformado por un ánodo y una capa catalítica anódica (en la que se oxida el combustible); y un polo positivo constituido por un cátodo y una capa catalítica catódica (en la que se reduce un oxidante). El ánodo y el cátodo consisten de capas de un material poroso que permite la difusión de los gases, y poseen propiedades altamente electro-conductivas y una conductividad protónica teórica de cero (e.g. el grafito poroso). Los dos polos ó electrodos de la celda de combustible se encuentran separados por un electrolito iónico conductor. El electrolito es fabricado de un material que proporciona una gran conductividad protónica y una electro-conductividad teórica de cero (el material comúnmente empleado es el Nafion<sup>®</sup>). Unas placas bipolares colectan los electrones generados en el ánodo, además de permitir la distribución y separación de los gases reactivos entre el ánodo y el cátodo. Algunas veces, existen sellos que auxilian en la prevención de la salida de los gases. La agrupación de estos componentes se denomina como una monocelda. La figura 1 muestra una monocelda de combustible convencional. La conexión de varias monoceldas de combustible en serie ó en paralelo, permite producir el voltaje y la corriente que se requiere [Larminie y Dicks, 2003; Spiegel, 2007].

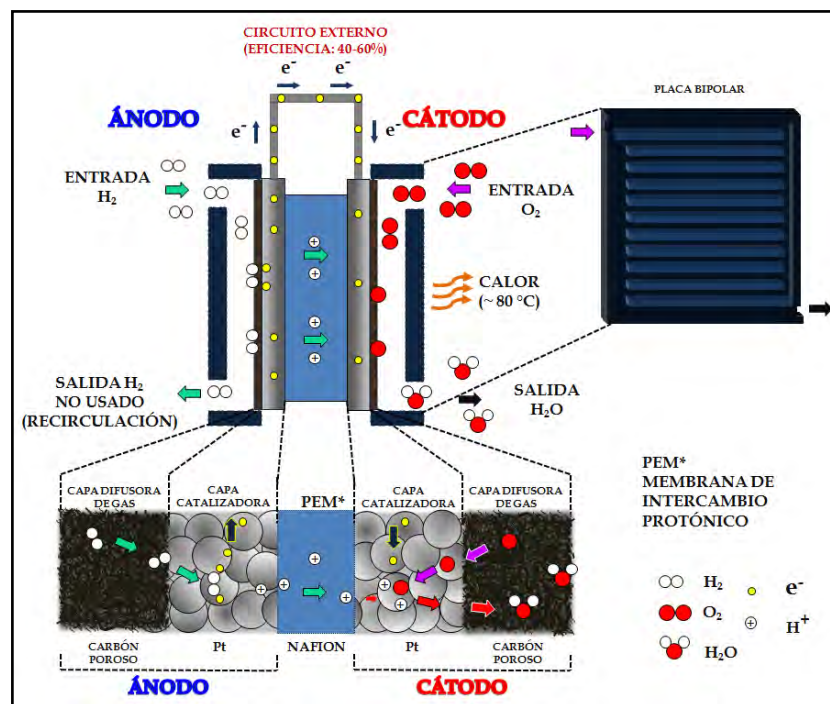
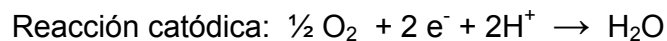
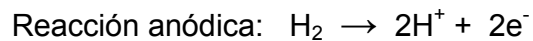


Figura 1. Esquema de una monocelda de combustible de membrana de intercambio protónico (PEMFC) [tomado y modificado de Spiegel, 2007].

El mecanismo de funcionamiento de una celda de combustible convencional, consiste en la entrada y oxidación de un combustible: hidrógeno, metanol (mediante una oxidación directa) ó ciertos hidrocarburos (a través de una oxidación indirecta, vía reformación; un proceso que consiste en la extracción de hidrógeno contenido en los hidrocarburos); acompañada por la reducción de un oxidante: oxígeno. Las reacciones electroquímicas involucradas son comúnmente catalizadas por el platino (en celdas de combustible de baja temperatura) ó por el níquel (en celdas de combustible de alta temperatura) [Spiegel, 2007]. Para el caso de las celdas de combustible de membrana de intercambio protónico (PEMFC, por sus siglas en inglés), las reacciones electroquímicas están dadas por las siguientes ecuaciones:



En la reacción anódica: el hidrógeno molecular es oxidado, liberando dos protones y dos electrones, que son transferidos al cátodo (a través del electrolito y placas bipolares, respectivamente). En la reacción catódica: el oxígeno es reducido, formando agua a partir de dos protones y dos electrones. Ambas reacciones son catalizadas por el platino. La reacción global de la celda de combustible puede ser resumida a la producción de una molécula de agua a partir de dos átomos de hidrógeno y un átomo de oxígeno ( $\Delta H = -286$  kJ/mol), y la generación de energía libre disponible para desempeñar un trabajo ( $\Delta G = -237$  kJ/mol) en términos de electricidad y calor [Larminie y Dicks, 2003; Spiegel, 2007].

El potencial eléctrico ( $E^0$ ) teórico para una celda de combustible de membrana de intercambio protónico —ideal—, bajo condiciones estándar (25 °C y presión de 1 atmósfera) es de 1.23 V. Aunque el potencial eléctrico de operación característico es de 0.6-0.7 V para las celdas de combustible de gran rendimiento; lo que representa una eficiencia de conversión eléctrica del 40-60%. La disminución del potencial eléctrico es debida a —pérdidas— asociadas con la operación, el diseño y los materiales usados en la celda de combustible; tales como pérdidas óhmicas, pérdidas de transporte de masa, pérdidas por activación, y corrientes internas ó cruzamiento de combustible [Larminie y Dicks, 2003; Spiegel, 2007].

### 1.1.2 Tipos de celdas de combustible químicas.

Las celdas de combustible químicas se han clasificado por sus características en: celdas de combustible de membrana de intercambio protónico (PEMFC), celdas de combustible de metanol directo (DMFC), celdas de combustible de óxido sólido (SOFC), celdas de combustible alcalinas (AFC), celdas de combustible de ácido fosfórico (PAFC) y celdas de combustible de carbonato fundido (MCFC). Las principales características de cada una de celdas de combustible químicas son presentadas en la tabla 1. En general, las celdas de combustible químicas operan con  $H_2$  (ó algún tipo de hidrocarburo) como combustible; y  $O_2$  (puro ó procedente del aire) como oxidante. El tipo de electrolito que manejan, depende del ion que transporta la carga entre el ánodo y el cátodo (*e.g.* el Nafion<sup>®</sup> permite la difusión selectiva de protones). Las condiciones de operación de las celdas de combustible químicas varían ampliamente, desde una temperatura ambiente y presión de 1 ó 3 atmósferas (como en algunas PEMFC y DMFC), hasta temperaturas de 600 ó 1000 °C y presiones de hasta 10 atmósferas (como en las SOFC, PAFC y MCFC). Las altas temperaturas en la mayoría de las celdas de combustible químicas se deben a que parte de la energía química es liberada como energía calorífica [Bagotsky, 2006; Spiegel, 2007]. La eficiencia máxima de conversión de energía química a eléctrica es del 40 al 65%, un porcentaje que puede considerarse aceptable. A diferencia de la maquinas de combustión cuya eficiencia es determinada por la temperatura (especificado por el límite de Carnot), la eficiencia de las celdas de combustible está regida por las leyes de Faraday (que relacionan directamente la corriente eléctrica generada en una reacción electroquímica con la cantidad de combustible suministrado) [Larminie y Dicks, 2003]. Los valores de densidad de potencia eléctrica que presentan las celdas de combustible químicas, han permitido su aplicación como fuentes de poder estacionario (*e.g.* edificios e industrias) y portátil (*e.g.* desde dispositivos electrónicos, hasta automóviles eléctricos) [Larminie y Dicks, 2003; Spiegel, 2007]. No obstante, las celdas de combustible químicas que aprovechan algunos hidrocarburos como combustibles, generan contaminantes (*e.g.* CO a una concentración menor de 100 ppm) [Spiegel, 2007]. Las celdas de combustible químicas presentan otro inconveniente, el gran costo económico: por la adquisición de los catalizadores químicos (Pt, Ni y Ru), por la obtención de un combustible de alta pureza (en este sentido, se habla específicamente del  $H_2$ ), y por la producción y mantenimiento que requieren este tipo de celdas [Barton *et al.*, 2004; Shukla *et al.*, 2004; Bullen *et al.*, 2006].

	PEMFC	DMFC	SOFC	AFC	PAFC	MCFC	BFC
Combustible	H <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> OH + H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> , CO, CH <sub>4</sub> y otros hidrocarburos	H <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> , CO, CH <sub>4</sub> y otros hidrocarburos	Desechos orgánicos, carbohidratos, CH <sub>3</sub> OH ó C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH
Oxidante	O <sub>2</sub> , aire	O <sub>2</sub> , aire	O <sub>2</sub> , aire	O <sub>2</sub> , aire	O <sub>2</sub> , aire	CO <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , aire	O <sub>2</sub> , aire
Electrolito	Membrana de Nafion®	Membrana de Nafion®	Zirkondióxido estabilizado con Itrio (YSZ)	Hidróxido de potasio	Ácido fosfórico concentrado (100%)	Carbonato de potasio y/o sodio fundido en una matriz cerámica de LiAlO <sub>2</sub>	Solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.0) u otras soluciones amortiguadora (pH 8-9)
Catalizador	Pt	Pt/Ru	Ni/YSZ	Pt ó Ni	Pt	Ni	Microorganismo ó enzima
Portador de Carga	H <sup>+</sup>	H <sup>+</sup>	O <sup>2-</sup>	OH <sup>-</sup>	H <sup>+</sup>	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	H <sup>+</sup>
Condiciones de Operación	Temperatura ambiente, hasta 100°C; presión de 1-3 atm.	Temperatura ambiente, hasta 100°C; presión de 1-3 atm.	Temperatura 600-1000°C; presión 1 atm.	Temperatura ambiente, hasta 250°C; presión de 1-4 atm.	Temperatura 150- 220°C; presión de 3-10 atm.	Temperatura 620-660°C; presión de 1-10 atm.	Temperatura ambiente; presión de 1 atm
Contaminantes	CO < 100 ppm	CO < 100 ppm	S < 100 ppm	CO <sub>2</sub>	CO < 100 ppm, NH <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> S, HCl, H <sub>2</sub> Se, NH <sub>3</sub> , AsH <sub>3</sub>	Ninguno
Eficiencia máxima (conversión eléctrica)	~58%	~40%	~65%	~64%	~42%	~50%	~40%
Aplicaciones	Fuente de poder estacionario y portátil	Fuente de poder portátil	Fuente de poder estacionario y portátil	Fuente de poder estacionario y portátil (programas espaciales)	Fuente de poder estacionario	Fuente de poder estacionario	Fuente de poder (portátil) Biorremediación
Densidad de potencia (W/m <sup>2</sup> )	3800- 6500	~ 600	100 - 1500	~ 1000	800 -1900	1500 - 2600	Microbianas: >1 Enzimáticas : >10 <sup>-4</sup>
Costos de Producción y/o mantenimiento	Altos costos	Altos costos	Altos costos	Altos costos	Altos costos	Altos costos	Bajos costos

Tabla 1. Principales tipos de celdas de combustible químicas y biológicas (BFC) [tomado y modificado de Spiegel, 2007].

## 1.2 Celdas de combustible biológicas.

Los experimentos de Galvani a finales del siglo XVIII dieron apertura al descubrimiento de la bio-electricidad. Luigi Galvani demostró que tras la aplicación de una corriente eléctrica en la pata de una rana, se producían contracciones musculares de la misma [Galvani, 1791 en Bullen *et al.*, 2006]. De esta manera, se entendió que una acción eléctrica podía inducir una reacción biológica; y lo contrario también ocurre en la naturaleza, los sistemas biológicos pueden generar energía eléctrica (bio-electricidad). El aprovechamiento de esta cualidad biológica para su implementación, desarrollo y aplicación tecnológica, despertó el interés en la comunidad científica. En 1910, Michael Cresse Potter demostró que cultivos de levadura ó de bacterias de *Escherichia coli*, colocados en un electrodo de platino, podían generar energía eléctrica. En 1931, Cohen retomó la idea de Potter al desarrollar

celdas de combustible microbianas conectadas en serie, generando un potencial eléctrico de 35 V. Recientemente, las celdas de combustible biológicas adquirieron mayor importancia debido a la problemática del suministro y contaminación implicadas en el uso de combustible fósil [Shukla *et al.*, 2004, Bullen *et al.*, 2006; Neto *et al.*, 2010].

Las celdas de combustible biológicas (referidas en la literatura científica como “biofuel cells” ó “bio-celdas”) se pueden definir como dispositivos capaces de transformar directamente la energía química (contenida en moléculas orgánicas e inorgánicas) en energía eléctrica; a través de reacciones bioquímicas implicadas en vías metabólicas o específicamente de una macromolécula aislada. Por lo tanto, debe considerarse como celdas de combustible biológicas, a aquellos sistemas que emplean enzimas y/o microorganismos, para cumplir con el propósito de generar energía eléctrica [Bullen *et al.*, 2006; Neto *et al.*, 2010]. Las celdas de combustible biológicas consisten en dos electrodos colocados en una solución, y que pueden estar separados por una membrana semi-permeable. Los catalizadores biológicos (enzimas ó microorganismos; aunque en sentido estricto, estos últimos no pueden definirse como auténticos catalizadores) deben estar en solución de forma libre ó inmovilizada dentro del compartimento anódico ó catódico (dependiendo de las características bioquímicas del catalizador biológico). El sustrato (combustible) suministrado en el compartimento anódico, es oxidado total ó parcialmente, liberando electrones. En el compartimento catódico se suministra un aceptor de electrones (comúnmente el oxígeno, aunque pueden emplearse otros compuestos como el dióxido de carbono y el acetato) el cual es reducido. De esta manera se completa la reacción electroquímica global de las celdas de combustible biológicas [Bullen *et al.*, 2006, Davis y Higson, 2007].

Como se observa en la tabla 1, las celdas de combustible biológicas (BFC por sus siglas en inglés) presentan algunas ventajas con respecto a las celdas de combustible químicas. El empleo de microorganismos ó enzimas permite: a) minimizar el costo económico relacionado con la obtención del catalizador (*e.g.* resulta más barato la producción y purificación de una enzima, que la adquisición de un catalizador químico como el platino y el níquel); b) operar a condiciones de temperatura y presión moderadas (20-30°C y una presión atmosférica), además de no manejar electrolitos corrosivos; y c) aprovechar una variedad de combustibles (como algunos carbohidratos y/o desechos orgánicos derivados de procesos industriales) [Barton *et al.*, 2004; Shukla *et al.*, 2004;

Bullen *et al.*, 2006]. Desde el punto de vista ecológico, las BFC representan una opción viable, no solo porque no se producen contaminantes (e.g. el monóxido de carbono generado por las celdas de combustible químicas que operan con hidrocarburos) [Bullen *et al.*, 2006; Spiegel, 2007], sino que además el aprovechamiento de los desechos orgánicos derivados de procesos industriales (e.g. lignocelulosa) ó de aguas residuales, permite su aplicación en el campo de la biorremediación [Catal *et al.*, 2008; Mohan *et al.*, 2010]. Por otra parte, las BFC exhiben ciertas desventajas con relación a las celdas de combustible químicas: presentan bajas densidades de potencia eléctrica (que se encuentran en el orden de  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  a  $\text{W}/\text{m}^2$ , con respecto al orden de  $\text{W}/\text{m}^2$  a  $\text{kW}/\text{m}^2$  de las celdas de combustible químicas) y una baja estabilidad operacional (e.g. algunas celdas de combustible microbianas, en continuo suministro de combustible, son mantenidas por varios meses; en cambio, las celdas de combustible enzimáticas solo persisten por algunos días ó semanas). Aunque faltan varios aspectos por resolver, para el mejoramiento de la funcionalidad y potencialidad de las celdas de combustible biológicas, estas se visualizan como una fuente de energía alternativa, que además es económica y ambientalmente sustentable [Shukla *et al.*, 2004; Davis y Higson, 2007; Neto *et al.*, 2010].

### **1.2.1 Tipos de celdas de combustible biológicas.**

Las celdas de combustible biológicas se pueden agrupar en dos grandes grupos: celdas de combustible microbianas y celdas de combustible enzimáticas. Debe señalarse que existen celdas de combustible mixtas, integradas tanto por microorganismos como por enzimas, que en conjunción posibilitan el funcionamiento del sistema (por ejemplo, una celda de combustible biológica mixta integrada por un ánodo conformado por *Desulfovibrio vulgaris* y un cátodo a base de bilirubina oxidasa) [Tsujimura *et al.*, 2001]. Las celdas de combustible biológicas se constituyen por biocatalizadores en ambos compartimentos (catódico y anódico), cada uno de los cuales realiza las reacciones bioquímicas correspondientes del electrodo (estas se denominan como —celdas íntegramente biológicas”); aunque existen celdas de combustible biológicas conformadas por un biocatalizador en un compartimento, y un catalizador químico en el otro (estas se denominan como —celdas biológicas híbridas”) [Bullen *et al.*, 2006; Neto *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011]. A continuación se presentaran las características de cada uno de estos grupos de celdas de combustible biológicas.

### *Celdas de combustible microbianas.*

Las celdas de combustible microbianas son sistemas que aprovechan las vías metabólicas de los microorganismos, para oxidar total ó parcialmente el combustible (a través de un proceso de fermentación), obteniendo energía eléctrica de la misma forma que las celdas de combustible químicas. La selección adecuada de los microorganismos (puro ó consorcio) y de las condiciones de mantenimiento del electrolito (e.g. la concentración y recirculación de oxígeno) son importantes para el diseño y construcción de una celda de combustible microbiana [Kim y Lee, 2010; Catal, *et al.*, 2008; Guerrero-Rangel, *et al.*, 2010]. La operación de las celdas de combustible microbianas, en presencia de diversos combustibles (como los desechos orgánicos derivados de procesos industriales), y su resistencia a cierto rango de temperatura, pH, y a otras moléculas soluto, hacen que estos sistemas no solamente sean ideales para la producción de energía eléctrica, sino también puedan ser empleados para el tratamiento de aguas residuales (biorremediación) [Davis y Higson, 2007; Osman *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2011].

Se han acoplado celdas de combustible químicas a un compartimento externo que contiene microorganismos fermentadores (e.g. *Clostridium butyricum*, *Proteus vulgaris*, *E. coli*). En este sistema, el compartimento adicional (denominado como “~~ib~~-reactor”) utiliza un combustible primario (e.g. desechos orgánicos como hojas del maíz, suero de leche ó desechos animales y humanos) para transformarlo, y generar un combustible secundario (tales como hidrógeno ó metanol) que será conducido y aprovechado por una celda de combustible [Shukla *et al.*, 2004; Davis y Higson, 2007; Sund *et al.*, 2007]. Por otra parte, se han reportado celdas de combustible integradas por el bio-reactor y el ánodo en el mismo compartimento. Una celda de combustible microbiana de este tipo fue reportada en 2003, en la cual su compartimento anódico se conformaba por un electrodo de grafito platinizado cubierto con un polímero de tetrafluoroanilina, y acoplado con *C. butyricum*. Este polímero bio-compatible y electro-catalíticamente activo prevenía que el platino fuese dañado por compuestos de origen biológico. Los electrodos de esta celda de combustible microbiana híbrida se encontraban separados por una membrana semipermeable. Este sistema funcionaba con almidón (como combustible), obteniéndose una densidad de corriente de  $1\text{mA}/\text{cm}^2$ ; aunque la estabilidad del sistema y la eficiencia de la conversión de energía no fue determinada [Schroder *et al.*, 2003; Shukla *et al.*, 2004].

Las celdas de combustible microbianas se pueden categorizar en dos tipos de sistemas, dependiendo de la forma en que los microorganismos transfieren los electrones:

- a) *Sistemas microbianos MET (Transferencia electrónica mediada)*. En estos sistemas, se acoplan moléculas mediadoras exógenas que participan en la transferencia de electrones del microorganismo a la superficie del electrodo. Los mediadores aceptan los electrones de un sustrato oxidado por el microorganismo y los transfieren a la superficie del electrodo (dentro del compartimento anódico). Estos mediadores deben tener la facilidad de atravesar la pared y membrana bacteriana, poseer un potencial redox similar al potencial redox del sustrato reducido y tener una rápida cinética electroquímica del proceso redox. De entre los compuestos que poseen estas características y que son empleados en la transferencia electrónica mediada se encuentran la ferricianina, la tionina, la 2-hidroxi-1-4-naftoquinona (HNQ), la 9, 10-antraquinona-2,6-ácido disulfónico disodio (AQDS), la safranina O, el azul de metileno, entre otros [Shukla *et al.*, 2004]. Debe mencionarse que algunos mediadores redox pueden tener efectos negativos en los procesos metabólicos del microorganismo (por ejemplo, la safranina y el azul de metileno afectan el proceso de fermentación de *C. cellulolytic*) [Sund *et al.*, 2007]. Una celda de combustible microbiana representativa de este tipo fue reportada en el 2010, empleando *Shewanella oneidensis* y riboflavina ó FMN (como mediadores redox) para obtener una densidad de potencia eléctrica de 150 mW/m<sup>2</sup>. Las flavinas permitieron que las bacterias aprovecharan un sustrato (lactato) que no es tan accesible para su oxidación [Velasques-Orta *et al.*, 2010].
- b) *Sistemas microbianos DET (Transferencia electrónica directa)*. En estos sistemas ocurre una transferencia directa de los electrones a la superficie del electrodo dentro del compartimento anódico. La DET puede involucrar dos mecanismos: a) DET vía contacto físico entre la superficie del electrodo y la membrana externa de la bacteria (mediante las proteínas de la cadena de transporte electrónico del microorganismo) ó con apéndices de la membrana interna ó externa (*e.g.* a través de los pilis electroconductores de algunas cepas de *Geobacter*); ó b) DET vía mediadores redox endógenos excretados



por el microorganismos (e.g. ciertas hidroquinonas liberadas por *E. coli* permiten la transferencia electrónica al electrodo, en una celda microbiana que produce una densidad de potencia eléctrica de 1300 a 340 mW/m<sup>2</sup>) [Qiao *et al.*, 2008]. Se ha demostrado que los microorganismos que reducen el Fe<sup>III</sup> (e.g. *Geobacter sulfurreducens*, *Rhodospirillum rubrum* y *S. putrefaciens*), pueden ser usados en la transferencia directa de electrones en este tipo de sistemas [Kim y Lee, 2010]. Cabe mencionar que las celdas de combustible microbianas pueden constituirse por un determinado tipo de microorganismos (e.g. *G. sulfurreducens* adheridas a la superficie del ánodo, han sido aprovechadas para la oxidación del acetato, obteniendo una densidad de potencia máxima de 13.1 mW/m<sup>2</sup>) [Bond y Lovley, 2003; Kim y Lee, 2010] ó por un consorcio (e.g. celdas de combustible microbiana de este tipo son reportadas con densidades de potencia eléctrica de 7.29 hasta 2650 mW/m<sup>2</sup>, empleando como combustibles desechos vegetales ó aguas residuales) [Catal, *et al.*, 2008; Guerrero-Rangel *et al.*, 2010].

#### *Celdas de combustible enzimáticas.*

Las celdas de combustible enzimáticas son sistemas dispositivos electroquímicos que producen energía eléctrica, aprovechando las características de las enzimas. Las enzimas son catalizadores biológicos con altos valores de número de recambio (que se refleja en una alta actividad catalítica); y una gran especificidad de sustrato, estereoselectividad y regioespecificidad (aunque algunas enzimas, como las lacasas, exhiben una plétora de sustratos) [Barton *et al.*, 2004; Neto *et al.*, 2010]. Es importante recalcar, que las enzimas presentan ciertas ventajas con respecto a los catalizadores químicos empleados en las celdas de combustible convencionales. Contrario a las enzimas, el platino es un catalizador que tiene una baja afinidad por el hidrógeno comparado con el oxígeno y otras moléculas, haciéndolo susceptible a ciertas impurezas presentes en el combustible; esto hace necesario el uso de hidrógeno de alta pureza, y por ende un mayor costo económico [Larminie y Dicks, 2003]. A esto cabe añadir el bajo costo económico relacionado con la producción y purificación de las enzimas, y de la fabricación de las celdas de combustible enzimáticas. Como las celdas de combustible microbianas, las celdas de combustible enzimáticas operan bajo condiciones moderadas (temperatura, presión y pH) sin generar contaminantes. No obstante a diferencia de los microorganismos, las enzimas son

catalizadores que no producen metabolitos secundarios que puedan limitar ó afectar la eficiencia del sistema. Las celdas de combustible enzimáticas han mostrado funcionalidad, pero aún quedan aspectos pendientes para mejorar los sistemas (e.g. la correcta orientación de la enzima hacia el electrodo para una eficiente transferencia electrónica; y la estabilidad operacional) [Barton *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006; Neto *et al.*, 2010].

### **1.2.2 Aplicaciones de las celdas de combustible biológicas..**

Como se mencionó anteriormente, las celdas de combustible biológicas presentan varias ventajas sobre las celdas de combustible químicas, proyectándose como una opción económica y ambientalmente sustentable. Las celdas de combustible biológicas representan fuentes de energía portátiles ó estacionarias (suministrando energía eléctrica desde equipos electrónicos, hasta automóviles eléctricos), seguras (debido a que no operan con electrolitos corrosivos; ni emplean combustibles volátiles, excepto aquellas que emplean hidrógeno) y no contaminantes. Específicamente, las celdas de combustible enzimáticas (que en asociación con el uso de nanomateriales bio-compatibles), pueden presentar una aplicación potencial como fuentes de poder miniaturizadas acopladas a micro-dispositivos médicos implantables (tales como sistemas liberadores de fármacos ó biosensores de niveles de glucosa sanguínea) [Barton *et al.*, 2004; Shukla *et al.*, 2004; Neto *et al.*, 2010]. En este caso, las celdas de combustible enzimáticas pueden operar con una reserva de combustible almacenado en un compartimento (que una vez agotado sea recargado ó reemplazado), ó con un combustible proveniente del suero humano (e.g. glucosa sanguínea). Se ha reportado el funcionamiento de una celda de combustible enzimática (integrada por un ánodo de glucosa oxidasa, y un cátodo de lacasa) con suero humano, obteniéndose una densidad de poder de  $1.6 \mu\text{W}/\text{mm}^2$  a 0.21 V [Amman y Fransaer, 2010]. Las celdas de combustible microbianas pueden también ser desarrolladas con esta finalidad; aunque su aplicación está orientada para el tratamiento de aguas residuales (aprovechando y oxidando compuestos contaminantes, acompañada de una producción de energía eléctrica). Se han reportado celdas de combustible microbianas con una densidad de potencia eléctrica de hasta  $57.38 \text{ mW}/\text{m}^2$  [Shukla *et al.*, 2004; Mohan *et al.*, 2010; Neto *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011]. Como se mencionó anteriormente, las celdas de combustible biológicas representan una fuente de energía alternativa; no obstante por el propósito del proyecto de investigación, este trabajo se enfocará en las celdas de combustible enzimáticas.

### 1.3 Celdas de combustible enzimáticas.

Históricamente, la primera celda de combustible enzimática fue reportada en 1964, con una densidad de corriente de  $30 \text{ nA/cm}^2$  a  $0.33 \text{ V}$ ; este sistema híbrido se conformaba por un ánodo a base de glucosa oxidasa (que empleaba glucosa como combustible) y un cátodo de platino [Yahiro *et al.*, 1964 en Neto *et al.*, 2010]. El desarrollo de celdas de combustible enzimáticas resurgió en la década de los ochentas, con el reporte de un sistema que empleaba una metanol-deshidrogenasa como catalizador anódico, y que producía una densidad de corriente de  $30 \text{ }\mu\text{A/cm}^2$  [Plotkin *et al.*, 1981 en Neto *et al.*, 2010]. No obstante, durante la década de los noventas se hicieron pocas publicaciones de celdas de combustible enzimáticas. En recientes años, con el avance de la tecnología (en especial en el mejoramiento de materiales nano-estructurados), se ha impulsado el desarrollo de celdas de combustible enzimáticas más eficientes [Kim *et al.*, 2006; Neto *et al.*, 2010].

En la tabla 2 se presenta un cuadro que muestra algunas de las celdas de combustible enzimáticas que han sido reportadas en los últimos años. Como se observa, las celdas de combustible enzimáticas están conformadas por electrodos a base de enzimas oxidoreductasas. El empleo de un determinado tipo de enzima en el ánodo ó en el cátodo de una celda de combustible enzimática, dependerá de la reacción que catalice, así como del potencial redox con respecto a un sustrato (el cuál es específico de cada enzima). Para la reacción de oxidación del combustible (ánodo), se ha recurrido predominantemente de la glucosa oxidasa (suministrando glucosa como combustible) [Mano y Heller, 2003; Soukharev *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2009]; aunque el interés por explotar otro tipo de sustratos (tales como el metanol, el etanol y el glicerol) como combustibles, ha permitido la aplicación de enzimas como la metanol deshidrogenasa, la aldehído deshidrogenasa y oxalato oxidasa. Se pueden combinar varios tipos de enzimas, para oxidar completamente el sustrato (y así obtener más electrones, lo que representaría una mayor producción de energía eléctrica); aunque la organización de las enzimas en una secuencia gradual de reacciones, resulta ser muy complejo y problemático [Palmore *et al.*, 1998; Topcagic y Minteer, 2006]. Por otra parte, para el cátodo se han aprovechado enzimas como la lacasa, la ascorbato oxidasa, el citocromo c oxidasa, la bilirrubina oxidasa y algunas peroxidases [Barton *et al.*, 2004; Neto *et al.*, 2010]. Algunas celdas de de combustible enzimáticas emplean Nafion para mejorar la conductividad protónica (como las celdas de combustible químicas PEMFC y DMFC), ó

como una protección química del electrodo que recubre [Palmore *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2009; Topcagic y Minteer, 2006]. No obstante, existen reportes sobre el efecto negativo del Nafion sobre la actividad de las enzimas [Moore *et al.*, 2004; Neto *et al.*, 2010].

Ánodo	Cátodo	Membrana	Combustible/Oxidante	Densidad de Potencia	Referencia
Pt	Lacasa en carbono (y ABTS) ó platino	Nafion	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	42μW/cm <sup>2</sup> a 0.61 V	Palmore y Kim, 1999
Formato-, aldehído-y alcohol deshidrogenasas en grafito	Platino	Nafion	Metanol/O <sub>2</sub>	670μW/cm <sup>2</sup> a 0.49 V	Palmore <i>et al.</i> , 1998
Glucosa oxidasa inmovilizada en carbono cristalino y un polímero redox basado en osmio	Bilirubina oxidasa en carbono cristalino, y polímero redox basado en osmio	Ninguno	Glucosa/O <sub>2</sub>	58μW cm <sup>-2</sup>	Tsujimura <i>et al.</i> , 2002 en Davis y Higson, 2007
Glucosa oxidasa inmovilizada en fibra de carbono (7 μM) y polímero redox basado en osmio	Bilirubina oxidasa en fibra de carbono (7 μM) y polímero redox basado en osmio	Ninguno	Glucosa/O <sub>2</sub>	244μW/cm <sup>2</sup> a 0.36 V	Mano y Heller, 2003
Glucosa oxidasa inmovilizada en fibra de carbono (7 μM) y polímero redox basado en osmio	Lacasa en fibra de carbono (7 μM) y polímero redox basado en Osmio	Ninguno	Glucosa/O <sub>2</sub>	350μW /cm <sup>2</sup> a 0.88 V	Soukharev <i>et al.</i> , 2004
Glucosa oxidasa en Carbono poroso y nanotubos de Carbono	Lacasa en carbono poroso y nanotubos de carbono	Nafion	Glucosa/O <sub>2</sub>	99.8μW/cm <sup>2</sup>	Liu <i>et al.</i> , 2005
Aldehído – y alcohol deshidrogenasa en polimetileno, y NADH	Bilirubina oxidasa inmovilizada en Carbon (Nafion modificado), y con Ru(pby) y Bilirubina	Ninguno	Etanol/O <sub>2</sub>	460 μW/cm <sup>2</sup>	Topcagic y Minteer, 2006
Zinc y carbono (en tinta)	Lacasa en carbono (tinta, nanotubos de carbono), y ABTS	Nafion	Zn/O <sub>2</sub>	10μW/cm <sup>2</sup>	Smolander <i>et al.</i> , 2008
Zinc (cubierto por Nafion)	Lacasa en TMOS y nanotubos de carbono	Ninguno	Zn/O <sub>2</sub>	17.6μW/cm <sup>2</sup> a 0.7 V	Szot <i>et al.</i> , 2009
Glucosa oxidasa en carbono, nanotubos de carbono e hidroxiapatita	Lacasa en carbono, nanotubos de carbono e hidroxiapatita	Nafion	Glucosa/O <sub>2</sub>	15.8μW/cm <sup>2</sup> a 0.28 V	Zhao <i>et al.</i> , 2009
Glucosa oxidasa en carbono cristalino, nanotubos de carbono, quitosano y FCMA	Lacasa en carbono cristalino, nanotubos de carbono, quitosano y ABTS	Nafion	Glucosa/O <sub>2</sub>	9.6μW/cm <sup>2</sup>	Tan <i>et al.</i> , 2009
Zinc (cubierto por Nafion)	Peroxidasa de rábano en carbono	Ninguno	Zn/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	98μW/cm <sup>2</sup> a 0.6 V	Gomez <i>et al.</i> , 2010

**Tabla 2.** Algunas de las celdas de combustible enzimáticas reportadas más recientemente.

El mecanismo de funcionamiento de las celdas de combustible enzimáticas, es similar a las celdas de combustible microbianas y químicas, incluyendo las limitaciones

operacionales. Uno de los mayores problemas en el desarrollo de las celdas de combustible enzimáticas es la densidad de potencia, la cual está relacionada con los procesos de transferencia de masa involucrados dentro del sistema: 1) la difusión del sustrato (combustible u oxidante) a los sitios activos de la enzimas, 2) la transferencia protónica, y 3) la transferencia electrónica entre los sitios activos de las enzimas a los electrodos, ó viceversa. La densidad de potencia es una medición de la generación de potencia eléctrica por área superficial del electrodo, por peso ó volumen de la celda. Como se observa en la tabla 2, las celdas de combustible enzimáticas que se han reportado, exhiben densidades de potencia que se encuentran en el rango de  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  (un valor que es inferior a los obtenidos en las celdas de combustible microbianas y químicas). Existen varios aspectos que influyen en la eficiencia y estabilidad operacional de la celda de combustible enzimática: a) el combustible aprovechado, b) las características (específicamente de la eficiencia catalítica y el potencial redox) y la pureza de la enzima empleada, c) la fabricación del electrodo (considerando los materiales utilizados y el protocolo/método de inmovilización de la enzima), d) las característica del electrolito (contemplando su conductividad protónica, su pH y la presencia de algunos iones en la solución, estos últimos dos factores repercuten en la actividad catalítica de la enzima), entre otros. El uso de nanotubos de carbono no solo permite incrementar la electroconductividad, sino además aumentar el área superficial que es importante para inmovilizar una mayor concentración de enzima. En general, las celdas de combustible enzimáticas operan a un potencial eléctrico no mayor de 1 voltio; y teóricamente, la densidad de corriente puede proporcionar una densidad de potencia de aproximadamente  $0.2 \text{ mW}/\text{cm}^2$  [Barton *et al.*, 2004; Smolander *et al.*, 2008; Neto *et al.*, 2010].

Es importante mencionar, que algunas de las celdas de combustible enzimáticas, al igual que las celdas de combustible químicas (específicamente las PEMFC y DMFC), se pueden constituir de una membrana de Nafion (Nafion<sup>®</sup> Dupont) que permite la conducción selectiva de los protones liberados en el compartimento anódico hacia el compartimento catódico. El Nafion es un co-polímero conformado por una estructura variable de tetrafluoretileno (teflón) y un ácido perfluor-3,6-dioxi-4-metilo-7-octeno sulfónico. Este compuesto no solamente es empleado como membranas de intercambio protónico; sino además es aplicado como catalizador ácido en algunas reacciones (tales como la acilación, la isomerización, la oxidación, la esterificación e hidrólisis de azúcares), y es por ello que se utiliza en la síntesis de cloro alcalinos ( $\text{KOH}/\text{NaOH Cl}_2$ ). La estructura y espesor de la

membrana de Nafion<sup>®</sup> repercute en la densidad de potencia de la celda de combustible, debido a las propiedades proto-conductivas [Larminie y Dicks, 2003; Bagotsky, 2006]. Es importante resaltar que el uso de una membrana de intercambio protónico, depende de las características bioquímicas que integran la celda de combustible enzimática. Existen reportes de celdas de combustible enzimáticas que emplean ánodos de zinc cubiertos de Nafion, sumergidos en una solución de fosfatos [Szot *et al.*, 2009; Gomez *et al.*, 2010]; esto permite la formación de una capa de  $Zn_3(PO_4)_2 \cdot H_2O$  que conduce los cationes  $Zn^{2+}$  formados por la oxidación del zinc, y previene la difusión de oxígeno a la superficie del zinc [Heller, 2006].

Como se mencionó anteriormente, varios aspectos son relevantes en la eficiencia y estabilidad operacional de las celdas de combustible enzimáticas; no obstante, la mejora de los sistemas se ha centrado en el proceso de inmovilización de la enzima. La inmovilización de enzimas es una estrategia que ha mostrado ciertas ventajas respecto al uso de enzimas libres, debido a que se mejora la estabilidad de la enzima (abatiendo los agentes desnaturalizantes) y se puede reciclar/reutilizar las enzimas (disminuyendo los costos para su aplicación) [Barton *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006; Neto *et al.*, 2010]. No obstante quedan aspectos por resolver, ya que la inmovilización presenta ciertas desventajas, tales como: la pérdida de enzima (debido a que se exhibe una pérdida de cierta cantidad de enzima en algunos protocolos de inmovilización), y cierta disminución de actividad (esto se debe a que se altera la estructura tridimensional de la enzima, y a efectos difusionales, electrostáticos, estéricos y del micro-entorno) [Taylor, 1991; Duran *et al.*, 2002]. Existen innumerables protocolos de inmovilización de enzimas que pueden ser clasificados en tres grupos: 1) inmovilización no-covalente, e 2) inmovilización covalente directa ó 3) mediada. La inmovilización no-covalente comprende procesos de: adsorción física ó iónica (sobre soportes no-funcionalizados como sílica, alúmina, DEAE-Sefadex, poliestireno, colágeno, carbón activado y concavalina A), atrapamiento (en matrices de poliacrilamida, alginato, celulosa y almidón) y/o micro-encapsulación (dentro de liposomas, nylon, colodión y poliestireno). La inmovilización covalente directa consiste en la unión química específica entre grupos funcionales de residuos aminoácidos con la superficie de soportes funcionalizados (es decir, soportes con grupos funcionales activos). La inmovilización covalente mediada consiste en el uso de moléculas bi-funcionales que median permanentemente la unión química específica de la enzima con la superficie del soporte. Este tipo de moléculas que median la unión química es denominado como

espaciador ó entrecruzante (e.g. el ácido 4-[2-aminoetil] benzoico hidrociorado ó AEBA) [Taylor, 1991; Duran *et al.*, 2002].

### 1.3.1 Electrodo enzimático: Transferencia electrónica.

Para seleccionar el adecuado método de inmovilización enzimática, debe considerarse la apropiada orientación de la enzima con respecto al electrodo, para alcanzar una eficiente transferencia de electrones (que consecuentemente se manifiesta por el incremento de densidad de potencia). La enzima inmovilizada sobre la superficie del electrodo usualmente no alcanza una transferencia de electrones significativa entre el centro redox (centro catalítico) de la enzima y el soporte conductor, debido a un aislamiento del centro redox por las regiones de la proteína que circundan este sitio. En general, la transferencia de los electrones se clasifica en dos diferentes mecanismos: transferencia electrónica directa (DET) ó transferencia electrónica mediada (MET) [Barton *et al.*, 2004; Cracknell *et al.*, 2008]. Anteriormente, los conceptos de DET y MET fueron descritos como criterio para categorizar las celdas de combustible microbianas.

En la DET, ocurre una transferencia directa de los electrones de la enzima a la superficie del electrodo, o viceversa. La adecuada orientación de la enzima con el electrodo, disminuye la distancia de transferencia electrónica entre el sitio activo de la enzima y la superficie conductiva del electrodo [Szot *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2009; Gomez *et al.*, 2010]. Existen reportes de varias proteínas redox (e.g. la lacasa, la bilirrubina oxidasa, la glucosa oxidasa, el citocromo c peroxidasa, azurina y plastocianina) que han sido capaces de llevar a cabo una DET con la superficie de electrodo. Inicialmente la DET estaba implicada en electrodos de sistemas biosensores; pero recientemente se han realizado celdas de combustible enzimáticas con electrodos basados en la DET [Szot *et al.*, 2009]. La aplicación de las enzimas oxidoreductadas está basado en su capacidad de interactuar con la superficie del electrodo, formando un tipo “transductor molecular” que convierte la señal química en eléctrica [Yan *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2006; Barton *et al.*, 2004]. Los dispositivos que emplean la DET entre la lacasa y el electrodo han sido favorecidos por la simplicidad y la inexistencia de pérdidas termodinámicas (debidas a un equivoco acoplamiento entre la enzima y los mediadores redox empleados) [Szot *et al.*, 2009]. Existen reportes de celdas de combustible enzimáticas elaboradas por los tres tipos de inmovilización; no obstante, la inmovilización covalente directa ó mediada ofrece una

mayor ventaja, debido a que contempla la óptima orientación de la enzima con respecto a la superficie del electrodo. Como un ejemplo de una eficiente DET, se reportó una lacasa de *Coriolus hirsutus* inmovilizada en electrodos de oro modificados con 4-aminotiofenol. Debe mencionarse que la reducción electrocatalítica del oxígeno es dependiente de la orientación de la enzima y del método de inmovilización empleado [Gupta *et al.*, 2004 en Barton *et al.*, 2004].

Por otra parte, la MET utiliza moléculas de bajo peso molecular y redox-activas (mediador redox) para acoplar la transferencia de electrones entre la enzima y el electrodo. El mediador redox debe actuar como sustrato para la reacción enzimática, y tener una cinética redox rápida y reversible. Los mediadores redox pueden encontrarse libres en solución ó estar inmovilizados en la superficie del electrodo. A diferencia del mediador redox, el espaciador empleado en el proceso de inmovilización covalente mediada, es una molécula que no se agota durante el proceso de transferencia electrónica, ni presenta una cinética redox. La MET puede exceder por órdenes de magnitud a la DET (dependiendo de la enzima, del mediador y de las condiciones de reacción). La resistencia a la transferencia de masa de los mediadores redox puede ser significativa, cuando se emplean mediadores poliméricos. Los coeficientes de difusión aparentes de los polímeros redox son de entre  $10^{-9}$ - $10^{-8}$   $\text{cm}^2/\text{s}$ , que es menor a los valores de los pequeños mediadores difusionales ( $10^{-6}$ - $10^{-5}$   $\text{cm}^2/\text{s}$ ). Debe remarcarse que la diferencia de potencial redox entre el mediador y el reactivo consumido, es la fuerza que promueve la transferencia electrónica (y por lo tanto no debe ser de cero) [Barton *et al.*, 2004; Cracknell *et al.*, 2008]. La selección del correcto mediador redox, no solo depende de su potencial redox, sino también de su estabilidad, toxicidad y bio-compatibilidad. De entre los mediadores empleados en la MET del ánodo, podemos encontrar a la  $\text{NADP}^+$  (nicotinamida difosfato) y ciertos mediadores redox poliméricos basados en osmio (como el poli[*N*-vinilimidazol ( $\text{Os}(4,4'$ -diamino-2,2-bipiridina) $_2\text{Cl}]^{+/2+}$ )). Por su parte, los mediadores empleados en la MET del cátodo se encuentran el metilsiringato, el ferroceno-carboxialdehído, el ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolia-6-sulfonato)); y también algunos mediadores redox poliméricos basados en osmio (como el poli[*N*-vinilimidazol ( $\text{Os}(4,4'$ -diaclo-ro-2,2-bipiridina) $_2\text{Cl}]^{+/2+}$ -co-acrilamida)). Existen reportes de celdas de combustible enzimáticas construidas con cátodos que utilizan ABTS acoplado a la lacasa (*e.g.* *Pyricularia oryzae*, *Trametes hirsuta*, *T. versicolor*), observándose potenciales eléctricos de 0.53 V y 0.8 V (vs SCE) por algunos días [Palmore y Kim, 1999; Smolander *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2009].



Los mediadores redox han permitido que las enzimas amplíen su rango de sustratos; debido a que facilitan la transferencia electrónica entre la enzima y una molécula que no puede oxidar la enzima por sí misma. Esto ha sido aprovechado para su aplicación industrial y biotecnológica (específicamente en el área de la biorremediación). Por ejemplo, en la industria textil y papelera se han empleado lacasas en conjunto con mediadores redox como el ABTS, el *N*-hidroxibenzotriazol (HBT) y el ácido siríngico (ácido 4-hidroxí-3,5-dimetoxi-benzoico ester metílico) en la decoloración de tintes y en la deslignificación de la madera [Bourbonnais y Paice, 1990; 1997; Bajpai, 1999]. No obstante, los mediadores redox pueden presentar algunas desventajas, como su costo económico, la toxicidad, la inestabilidad y la aparición de reacciones químicas laterales [Barton *et al.*, 2004; Cracknell *et al.*, 2008; Neto *et al.*, 2010]. Algunos autores reportan una inestabilidad y rápida inactivación de las enzimas por el ABTS [Quan *et al.*, 2004; Ivnitski *et al.*, 2008]. Los dispositivos electroquímicos (*e.g.* biosensores y celdas de combustible enzimáticas) que emplean mediadores redox, incrementan la tasa de transferencia electrónica (con respecto a DET) [Palmore y Kim, 1999; Smolander *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2009]; aunque su uso puede provocar pérdidas termodinámicas (debidas a un incorrecto acoplamiento entre la enzima y el mediador redox) [Szot *et al.*, 2009]. En este sentido, la DET ha sido favorecida en muchos sistemas electroquímicos, debido a su simplicidad [Szot *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2009; Gomez *et al.*, 2010].

#### **1.4 Lacasas.**

Las lacasas son un grupo de enzimas pertenecientes a la familia de las oxidoreductasas (EC 1.10.3.2, oxidoreductasas *p*-difenoil:oxígeno), de amplia distribución y reportadas en plantas —superiores” [Yoshida, 1883 en Baldrian, 2006; y Caparrós-Ruiz *et al.*, 2006], en hongos —superiores” (como los ascomicetos basidiomicetos) [Baldrian, 2006], y en algunos insectos y bacterias [Kramer *et al.*, 2001; Claus, 2003]. La denominación de —lacasas” se debió a que fueron descritas, por primera vez en los conductos de resina del árbol productor de laca (*Rhus vernicifera*) [Yoshida, 1883 en Baldrian, 2006]. Se han realizado varios estudios de genética molecular, expresión, transcripción y clonación de lacasas [Baldrian, 2006; Morozova *et al.*, 2007].

La función biológica de las lacasas es específica en cada uno de los organismos. En plantas, las lacasas participan en el proceso de lignificación (un proceso donde también participan las peroxidadas), catalizando la polimerización de unidades estructurales de la lignina: alcoholes *p*-coumarílico, coniferílico, y sinapilos. Mientras en los hongos, las lacasas están involucradas en la des-lignificación, patogénesis y destoxificación (protección en contra las fitoalexinas y taninas liberadas por las plantas), además de estar implicadas en el desarrollo y morfogénesis [Thurston, 1994]. En insectos, las lacasas colaboran en la esclerotización de la cutícula [Kramer *et al.*, 2001]. Y en algunas especies de *Bacillus*, juegan un papel importante en la formación de esporas resistentes a la luz ultravioleta y al peróxido de hidrógeno [Martins *et al.*, 2002; Claus, 2003]. La mayoría de las lacasas reportadas son proteínas extracelulares, pero se han descrito lacasas intracelulares en hongos de "podrición blanca" (e.g. *Trametes versicolor*, *Podospora anserina*, *T. hirsuta* (*C. hirsutus*), *T. ochracea*, *T. villosa*, *T. gallica*, *Cerrena maxima*, *Coriolopsis polyzona*, *Lentinus tigrinus* y *Pleurotus eryngii*) [Morozova *et al.*, 2007]. Esta localización intracelular parece asociarse con funciones fisiológicas, relacionadas con la transformación de fenoles de bajo peso molecular producidos por la célula. Las lacasas ubicadas en las esporas y en las paredes celulares, pueden estar implicadas en la síntesis de melanina y otros compuestos protectores de las paredes celulares [Claus, 2003].

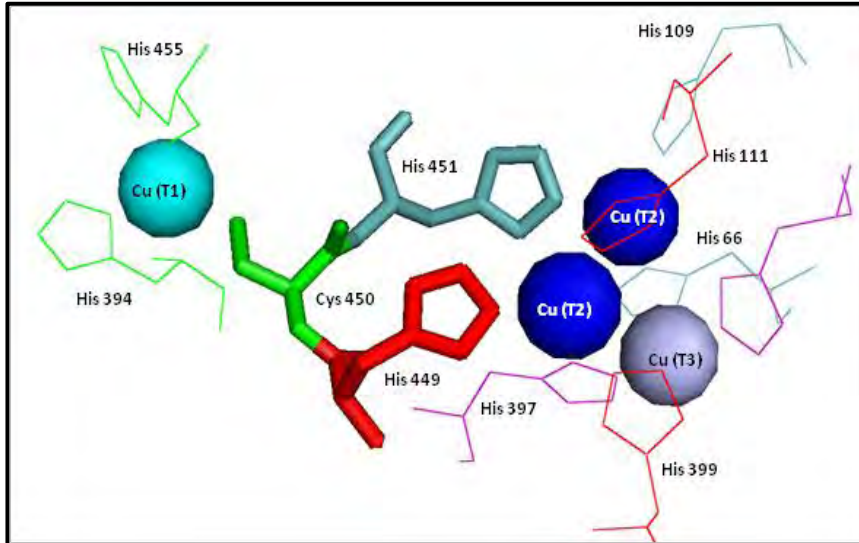
Las lacasas son proteínas glicosiladas con un peso molecular que oscila entre 50 y 130 kDa. La glicosilación (conformada por unidades de manosa, *N*-acetilglucosamina y galactosa) constituye el 22-45% del peso total de la lacasa en plantas, mientras en hongos el contenido es menor (6.5-32%, excepto en *Botrytis cinérea* que posee el 49% del peso total de la proteína). Se ha propuesto que la glicosilación provee estabilidad, y previene la proteólisis e inactivación por los radicales libres. Entre las lacasas fúngicas, se ha observado una gran variabilidad en grado de polimorfismo y de propiedades cinéticas y físico-químicas (peso molecular, punto isoeléctrico, grado de glicosilación, por mencionar algunas). Aunque la mayoría de las lacasas son monoméricas, se han reportado lacasas diméricas (en *Trametes villosa*), triméricas (en *Gaeumannomyces graminis*) y tetraméricas (en *Podospora anserina*). Debe recalcarse que existen muchos hongos que producen varias isoformas de lacasas, que parecen asociarse a diferentes procesos (por ejemplo *Pleurotus ostreatus* secreta ocho distintas isoformas, de las cuáles POXC es la isoforma predominante; mientras POXA3a y POXA3b son las únicas isoformas heterodiméricas). El número de isoformas depende de las condiciones de cultivo, en particular de la presencia

de algún tipo de molécula —inductora” en el medio de cultivo [Baldrian, 2006; Morozova *et al.*, 2007]. Desde el punto de vista electroquímico, las lacasas pueden ser clasificadas en tres grupos, dependiendo del valor del potencial redox ( $E^{\circ}$ ) del sitio T1. La lacasa de *Rhus vernicifera* pertenece a la categoría de bajo potencial redox ( $E^{\circ}$ = 430 mV vs SHE). Las lacasas de *Myceliophthora thermophila*, *Scytalidium thermophilum*, *Coprinus Cinereus* y *Rhizoctonia solani* corresponden a la categoría de potencial redox medio ( $E^{\circ}$ = 510-710 mV vs SHE). Las lacasas de *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* POXC, *Cerrena máxima*, *T. hirsute*, *T. ochracea* y *T. togii* corresponden a la categoría de alto potencial redox ( $E^{\circ}$ = 730-790 mV vs SHE) [Morozova *et al.*, 2007].

#### 1.4.1 Sitio activo y mecanismo catalítico.

El sitio activo de las lacasas se conforma por cuatro átomos de cobre distribuidos en un sitio T1 mononuclear (un átomo de cobre) y un sitio T2/T3 trinuclear (consistiendo en dos átomos de cobre en T2 y un átomo de cobre en T3). La figura 2 presenta la estructura tridimensional del sitio activo de la lacasa de *Coriolopsis gallica* UAMH 8260. El átomo de cobre del sitio T1 se encuentra a una distancia aproximada de 12 Å del sitio T2/T3; y los átomos de cobres del sitio T2 se encuentran a una distancia aproximada de 4 Å del cobre del sitio T3. El átomo de cobre del sitio T1 tiene una coordinación trigonal con dos histidinas y una cisteína (H455, H394 y C450 en el caso del sitio activo de la lacasa de *C. gallica*) que le confiere la característica absorción electrónica azul, de ahí que se les conozca como —lacasas azules”. La coloración azul es debida a la fuerte absorción (a 600 nm) causada por el enlace covalente entre la cisteína y el cobre T1. Por otra parte, los dos átomos de cobre T2 son coordinados por seis histidinas (H451, H66, H109, H449, H399 y H111 en el caso del sitio activo de la lacasa de *C. gallica*) y el cobre T3 por dos histidinas (H64 y H397 en el caso del sitio activo de la lacasa de *C. gallica*). Las dos histidinas y la cisteína que intercomunican a los átomos de cobre T1 y T2, conforman un motivo tri-peptídico altamente conservado entre las lacasas. Este motivo tri-peptídico His-Cys-His (H449-C450-H451 en *C. gallica*) es la región donde se lleva a cabo la transferencia de electrones del sitio T1 al sitio T2 [Garavaglia *et al.*, 2004]. Por su parte, el átomo de cobre T3 muestra una absorción débil en la región visible y revela propiedades paramagnéticas en estudios de resonancia paramagnética electrónica (EPR). Mientras los átomos de cobre T2 (sitio apareado de forma antiferromagnética, a través de un —puente hidroxilo”) carece de una señal EPR. El sitio T3 puede caracterizarse por una absorción electrónica de 330

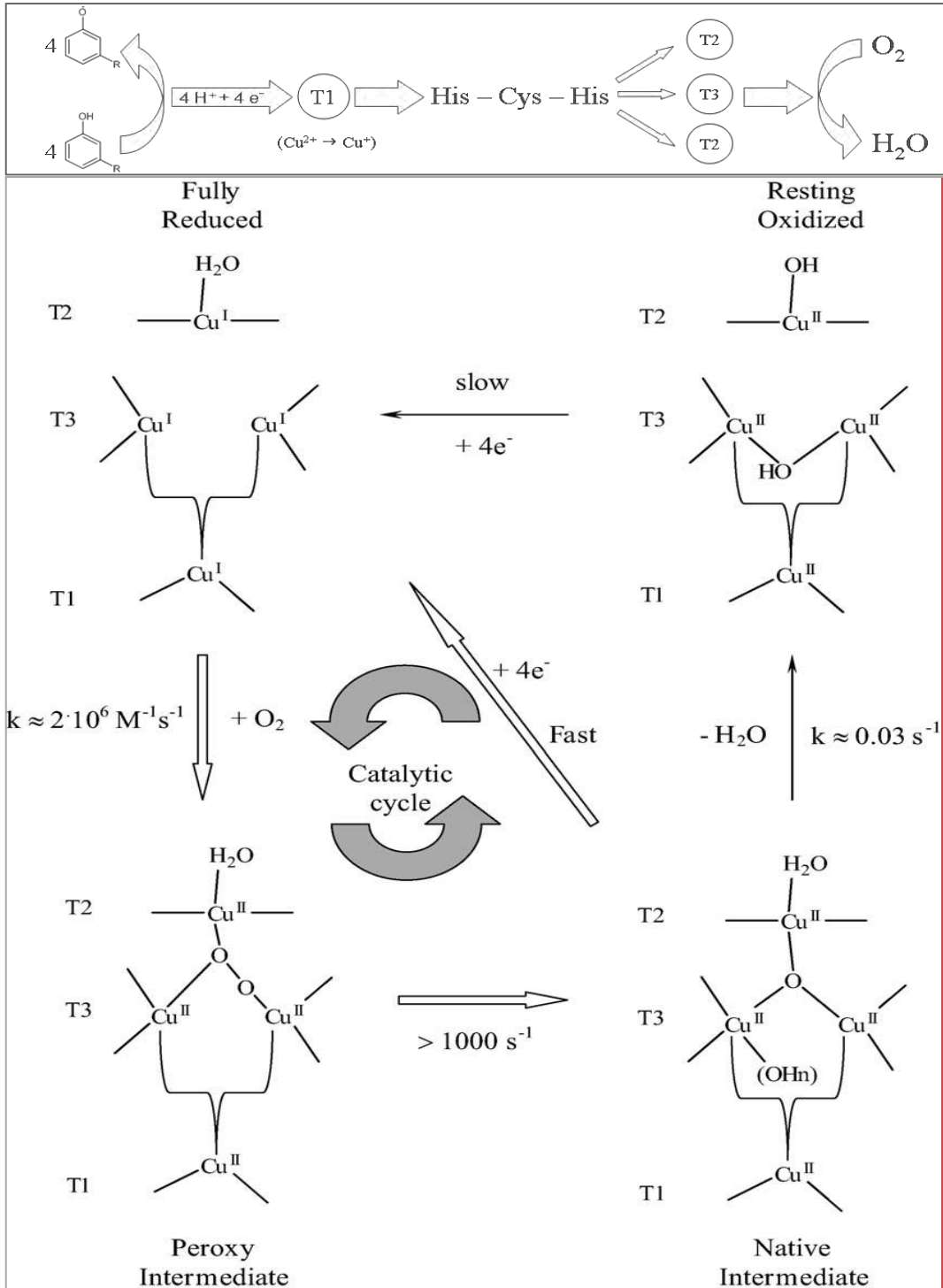
nm (en su forma oxidada). Se ha elucidado a detalle las estructuras tridimensionales de varias lacasas (tanto de origen fúngico como vegetal y bacteriano) por estudios de cristalografía por rayos X y espectroscopia [Piontek *et al.*, 2002; y Morozova *et al.*, 2007].



**Figura 2.** Estructura tridimensional del sitio catalítico de *Corioloopsis gallica* UAMH 8260, constituido por cuatro átomos de cobre distribuidos en un sitio T1 uninuclear (1Cu) y un sitio T2/T3 trinuclear (2Cu y 1Cu, respectivamente). Imagen realizada con el software de grafico molecular PyMOL (versión 1.10), a partir de los datos del PDB (Protein Data Bank).

Las reacciones catalizadas por las lacasas proceden por la oxidación monoelectrónica del sustrato a su correspondiente especie radical reactiva. Estos radicales reactivos pueden producir dímeros, oligómeros y polímeros. El proceso de oxido-reducción se realiza con la asistencia del conjunto de los cuatro átomos de cobre que conforman parte del sitio catalítico. El ciclo catalítico completo de las lacasas, comienza con la unión y subsecuente oxidación de las cuatro moléculas de sustrato (generando cuatro radicales) en el sitio T1; los electrones son transferidos por medio del motivo tripeptídico His-Cys-His al sitio T2/T3; para finalmente, promover reducción de una molécula de oxígeno en dos moléculas de agua. Debe señalarse que el átomo de cobre T1, es el sitio donde se produce la oxidación del sustrato, debido a su alto potencial redox. Existen evidencias de que el átomo de cobre T3 es requerido para la reducción del oxígeno y está implicado en la estabilización del intermediario peróxido que se genera transitoriamente durante el proceso catalítico (obsérvese la figura 3) [Cole *et al.*, 1990; Solomon *et al.*, 1996].

El ciclo de la lacasa y los mecanismos de reducción y re-oxidación de los sitios de cobre se ilustra en la figura 3. El oxígeno molecular interactúa con el sitio trinuclear T2/T3 (completamente reducido) vía transferencia de  $2e^-$  ( $k \approx 2 \times 10^6 \text{ m}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), produciendo un intermediario peróxido transitorio que contiene el anión dioxígeno [Yoon *et al.*, 2005]. Un átomo de oxígeno del anión se une a uno de los cobres T2 y al cobre T3; mientras el otro átomo de oxígeno se une al otro cobre T2. Entonces el intermediario peróxido experimenta la segunda transferencia de  $2e^-$  ( $k > 305 \text{ m}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), provocando la ruptura del enlace O-O del peróxido; esto da lugar al intermediario nativo transitorio (el cual se encuentra en un estado totalmente oxidado). Este intermediario nativo tiene los tres cobres del sitio T2/T3 enlazados por uno de los átomos oxígeno, dicha configuración molecular se conoce como  $\mu_3$ -oxo, y puede estar unida o disociada del segundo átomo de oxígeno. La configuración de  $\mu_3$ -oxo, proporciona una estructura relativamente estable que favorece termodinámicamente el proceso de transferencia de los  $4e^-$  y la subsecuente reducción del oxígeno molecular. La transferencia electrónica, conduce a la rápida reducción del conjunto de cobres del sitio T2/T3, permitiendo la regeneración del sitio activo; y así incorporarse a otro ciclo catalítico. El intermediario nativo puede convertirse lentamente a un estado totalmente oxidado (denominado como lacasa —resting”), caracterizado por el átomo de cobre T3 separado del sitio T2. La transición del intermediario nativo al estado de —resting” es asistido por protones. El primer protón se une al centro del  $\mu_3$ -oxo; y entonces un segundo protón se une al —puente hidroxilo” (como se menciona anteriormente, este aparea los átomos de cobre T2). Finalmente, se pierde la configuración del  $\mu_3$ -oxo, dando origen al estado —resting” de la lacasa. El átomo de cobre T1 del estado —resting” puede ser reducido por un sustrato. Sin embargo, le velocidad de transferencia electrónica del sitio trinuclear T2/T3 es tan lenta, para ser significativa en la cinética enzimática. La lenta conversión del intermediario nativo al estado —resting”, es debido al re-arreglo de la configuración  $\mu_3$ -oxo y a la velocidad del paso limitante [Yoon *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2007]. Las lacasas fúngicas exhiben un gran potencial redox (varia dentro de los 700 mV a pH 4.0), cercano al equilibrio de potencial de reducción del oxígeno. El gran potencial redox de las lacasas fúngicas es atribuido al ligando metionina no-axial (cercano al sitio activo), un ligando que estabiliza el estado reducido. Otros factores como la accesibilidad del solvente, orientación dipolar y puentes de hidrógeno desempeñan un papel importante dentro del potencial redox. Los distintos ambientes químicos que circundan al cobre T1 resultan en diferentes potenciales redox [Baldrian, 2006; Morozova *et al.*, 2007].



**Figura 3.** Mecanismo catalítico de las lacasas [Shleev *et al.*, 2006]

Las lacasas pueden oxidar a un extenso grupo de compuestos incluyendo *orto* y *para*-difenoles, polifenoles, aminofenoles, poliaminas, ligninas, arildiaminas y un número de compuestos inorgánicos (incluyendo sustratos de otras enzimas, como la tirosina monooxigenasa monofenol, correspondiente al grupo EC 1.14.18.1). Frecuentemente los sustratos de interés no pueden ser oxidados directamente por las lacasas, debido a que su tamaño no permite la entrada al sitio activo de las lacasas. Para resolver este problema, se emplean “mediadores”, los cuales actúan como sustratos intermediarios de la lacasa, que al ser oxidados forman radicales que son capaces de interactuar con los sustratos “blanco” voluminosos o de alto potencial redox [Bourbonnais y Paice, 1990; Call y Muke, 1997; Bajpai, 1999; Claus *et al.*, 2002].

La pobre solubilidad en agua de muchos sustratos potenciales de lacasas, ha provocado el interés en el comportamiento de estas oxidasas en medios de reacción no convencionales con un contenido restringido de agua. De hecho, el primer sistema bifásico de solventes orgánicos describe la oxidación del  $\beta$ -estradiol disuelto en acetato, catalizado por una lacasa de *Polyporus versicolor* disuelta en solución amortiguadora de acetato de etilo [Lugaro *et al.*, 1973 en D'Acunzo *et al.*, 2004]. Varias de las aplicaciones descritas han sido usadas en presencia de cantidades significativas (en alguna ocasiones, superiores al 50% v/v) de co-solventes orgánicos miscibles en agua. La estabilidad de la lacasa es afectada por el co-solvente. Por ejemplo, la actividad residual de la lacasa de *Poliporus pinsutus* disminuyó efectivamente, cuando la enzima fue disuelta en una solución amortiguadora con dioxano, isopropanol ó acetonitrilo en proporción 1:1 (el etilenglicol en la misma concentración no afecta la actividad de la enzima) [D'Acunzo *et al.*, 2004]. Las lacasas han sido empleadas exitosamente en solventes apolares con un bajo contenido de agua, una vez que forman complejos con polímeros alquilados anfílicos o inmovilizados en soportes sólidos [Ruiz *et al.*, 2000].

#### **1.4.2 Aplicaciones de las lacasas**

La capacidad de las lacasas de oxidar una amplia variedad de compuestos, ha sido aprovechada para su aplicación en ámbitos: analíticos (e.g. biosensores para ciertos compuestos aromáticos) [Ruiz *et al.*, 2000; Freire *et al.*, 2001 en Duran *et al.*, 2002; Abdullah *et al.*, 2007; Sezginürk *et al.*, 2010], médicos (incluyendo las aplicaciones inmunoquímicas) [Xu, 1996; Ghindilis *et al.*, 2000 en Duran *et al.*, 2002; Wang y Ng, 2004],

industriales (específicamente en el área textil y papelera, pero también la industria alimenticia) [Bajpai, 1999; Reyes *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 1999; Claus *et al.*, 2002; Minussi *et al.*, 2002], y de biorremediación (para el tratamiento de residuos contaminantes) [Pickard *et al.*, 1999a; Torres *et al.*, 2003; Minussi *et al.*, 2007]. A pesar de que se ha avanzado en materia de celdas de combustible enzimáticas, resulta ser una aplicación potencial; debido a que existen varios aspectos para resolver su rendimiento y estabilidad operacional [Duran *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2006]. Las lacasas han sido empleadas en la elaboración de celdas de combustible enzimáticas, constituyendo parte del cátodo [Palmore y Kim, 1999; Soukharev *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005; Khani *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2006; Smolander *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2009; Szot *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2009].

Como se mencionó anteriormente, las lacasas pueden ser empleadas en la industria textil, de colorantes ó de impresión (participando en los procesos relacionados con la decoloración de tintes), papelera (participando en la deslignificación de las fibras madereras, particularmente durante el proceso de “blanqueo”). La aplicación más importante de la lacasa a nivel industrial, es la decoloración de la ropa de mezclilla para producir el efecto de “deslavado”. En muchas de estas aplicaciones, las lacasas son empleadas junto con mediadores redox, que son propiamente sustratos de estas [Bajpai, 1999; Claus *et al.*, 2002]. El primer mediador artificial introducido en el sistema mediador-lacasa para la deslignificación de la pulpa fue el ABTS [2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)] [Bourbonnais y Paice, 1990]. Los mediadores más efectivos para la degradación de la lignina son el *N*-hidroxibenzotriazol (HBT), el ácido siríngico (ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzoico ester metílico), el ácido violúrico (VLA), la *N*-hidroxiptaimida (HPI), y la *N*-hidroxiacetanilida (NHA). El proceso ha sido patentado bajo el nombre comercial de “Ignozom®-process” [Call y Mucke, 1997].

La ventaja adicional de las lacasas (y otras enzimas como las tirosinasas) sobre otras enzimas, radica en el hecho de que catalizan la transformación de una variedad de compuestos aromáticos fenólicos y no-fenólicos [Duran *et al.*, 2002; Minussi *et al.*, 2007]. Específicamente, la oxidación directa de sustrato de derivados fenólicos ha sido investigada en biorremediación, para descontaminar los desechos industriales. Los derivados polifenólicos poliméricos resultan del acoplamiento oxidativo catalizada por lacasas, son usualmente insolubles y pueden ser separados, fácilmente, por filtración o sedimentación [Torres *et al.*, 2003]. La eliminación selectiva de los derivados fenólicos es



también requerida para la estabilización de bebidas, tales como jugos de fruta, vino y cerveza [Minussi *et al.*, 2002], aunque las enzimas deben ser inmovilizadas debido a que no han sido aprobadas como aditivo alimenticio. Las lacasas han sido comercializadas, recientemente, para preparar tapones de corcho para las botellas de vino, para disminuir la astringencia característica del corcho que se da frecuentemente en las botellas de vino añejadas [Conrad *et al.*, 2000 y Xu, 2005 en Morozova *et al.*, 2007].

Las lacasas pueden ser aplicadas en la síntesis de productos de importancia farmacéutica [Duran *et al.*, 2002]. Por ejemplo, se ha reportado que las lacasas pueden oxidar el yoduro para producir yodo (un reactivo ampliamente usado como desinfectante) [Xu, 1996]. Por otra parte, Wang y Ng (2004) lograron inhibir la transcriptasa reversa del VIH-1, mediante una lacasa de *Tricholoma giganteum*. Cabe mencionar que se han desarrollado algunos biosensores de lacasa que permiten la detección de catecoles y fenoles [Ruiz *et al.*, 2000; Freire *et al.*, 2001 en Duran *et al.*, 2002; Abdullah *et al.*, 2007], y de antígenos libres [Ghindilis *et al.*, 2001 en Duran *et al.*, 2002]. Las lacasas pueden ser conjugadas con un determinado anticuerpo ó antígeno para ser aprovechadas como marcadores en ensayos inmunoquímicos. En estos ensayos, la enzima de interés cataliza la producción de un compuesto que será oxidado por la lacasa. Esta estrategia ha sido aplicada en ensayos para varias enzimas (e.g. amilasas, amino-peptidasas, quimotripsina, glucosidasa, arilamidasa, plasmina y trombina) [Duran *et al.*, 2002].

## II. Justificación

Es importante la búsqueda, el desarrollo e implementación de fuentes de energía alternativas que sean económica y ambientalmente sustentables. Los avances realizados en la investigación de las celdas de combustible biológicas, nos han permitido comprender sus ventajas (con respecto a otras fuentes de energía) y aplicaciones potenciales (las cuales no solo se concentran en la generación de energía eléctrica; sino además en el campo de la biorremediación). Es por ello que este trabajo está enfocado en el diseño y la construcción de una celda de combustible enzimática. El mejoramiento de las celdas de combustible enzimáticas, permitirá su aplicación en pequeños dispositivos electrónicos (e.g. fuentes de poder miniaturizadas acopladas a micro-dispositivos médicos implantables), entre otras finalidades.

Las celdas de combustible enzimáticas han demostrado funcionalidad, pero aún quedan aspectos para mejorar el sistema. Uno de los elementos críticos en la eficiencia de las celdas de combustible enzimáticas, se relaciona con el método de inmovilización de enzimas empleado. Parte de la importancia de este trabajo radica en la búsqueda y el desarrollo de un adecuado método de inmovilización enzimática que nos permita:

- a) incrementar la densidad de enzima activa inmovilizada por área del electrodo, y
- b) orientar apropiadamente la enzima hacia la superficie del electrodo, para una eficiente transferencia electrónica.

De esta manera, la concentración de enzima activa y correctamente orientada (además de la gran eficiencia catalítica de la enzima) nos permitirá obtener una mayor densidad de potencia eléctrica y una excelente estabilidad operacional.

### III. Hipótesis y Objetivos

#### Hipótesis

La inmovilización de la lacasa de forma directa y orientada en el cátodo de una celda de combustible enzimática híbrida mejorará su desempeño en términos de densidad de potencia, debido a una óptima transferencia de electrones.

#### Objetivo General

El propósito de este proyecto es diseñar y construir una celda de combustible enzimática híbrida (integrada por un ánodo de zinc, y un cátodo cubierto de lacasa) con la que se pueda obtener un buen rendimiento (expresado en términos de densidad de potencia eléctrica) y estabilidad operacional.

#### Objetivos particulares

Los objetivos particulares, derivados del anterior, son los siguientes:

- A. Producir y purificar una lacasa fúngica extracelular de *Corioloopsis gallica*.
- B. Desarrollar un método de inmovilización de la enzima sobre una superficie de carbono por:
  - a) Inmovilización no-covalente por adsorción de la lacasa con una tinta de carbono.
  - b) Inmovilización covalente directa entre los grupos carboxilos de la superficie de carbono y los residuos aminos externos de la lacasa.
  - c) Inmovilización covalente mediada por el ácido 4-[2-aminoetil] benzoico (AEBA).
- C. Evaluar la capacidad del cátodo en términos de actividad enzimática y electroquímica.
- D. Construir la celda de combustible enzimática híbrida, integrada por un ánodo de zinc y un cátodo de lacasa.
- E. Evaluar la funcionalidad y la estabilidad operacional de la celda de combustible enzimática híbrida construida.

## **IV. Estrategia experimental.**

### **4.1 Materiales.**

#### **4.1.1 Material biológico.**

El microorganismo fúngico *Corioloopsis gallica* UAMH 8260 antiguamente *Populus tremuloides*, de donde se obtuvo de la Colección de Microhongos y Herbario de la Universidad de Alberta (Edmonton, Alberta, Canadá). De esta cepa se produjo y se purificó la lacasa como se describe posteriormente [Tinoco *et al.*, 2001].

#### **4.1.2 Material químico.**

El material que se ocupó en los procesos de cultivo del microorganismo fúngico y de producción/purificación enzimática: el agar, el extracto de levadura y el extracto de malta fueron comprados a BD Difco Laboratories (Sparks, MD, E.U.A.); la glucosa, el fosfato de potasio monobásico, el sulfato de magnesio, el sulfato de cobre, el sulfato de manganeso, el sulfato de zinc, el cloruro de cobalto y el sulfato de amonio se consiguieron con J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, E.U.A.). Las dos columnas cromatográficas de intercambio aniónico, una equipada con una matriz Whatman DE-52 y la otra con High-Q, se compraron a Whatman International Ltd (Kent, Reino Unido) y a Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA, E.U.A.), respectivamente. La membrana de ultrafiltración de 10 kDa se adquirió de Milipore Corporation (Billerica, MA, E.U.A.). El kit empleado para la cuantificación de proteína se compró a Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, E.U.A.). El fosfato de sodio monobásico y dibásico, y el ácido succínico que se emplearon en la preparación de las soluciones amortiguadoras de fosfatos y succinato respectivamente, se adquirieron de J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, E.U.A.).

El material que se empleó en los procesos de inmovilización: las superficies de carbono que se emplearon como los electrodos para la inmovilización enzimática son láminas GDL 30 BC obtenidas de <sup>®</sup>SIGRACET, SGL Carbon Group (Wiesbaden, Alemania). El carbón vulcan XC-72R se adquirió de Cabot Corporation (Billerica, MA, E.U.A.). La solución de Nafion al 5% se compró a Fuel Cell Scientific, LLC, (Stoneham, MA, E.U.A.). El *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida hidroclicado (EDC), el ácido 2-(*N*-morfolino) etanosulfónico (MES), el ácido 4-[2-aminoetil] benzoico hidroclicado (AEBA),

y el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico (ABTS) se compraron a Sigma-Aldrich Chemical Corporation (St. Louis, MI, E.U.A.). El hidróxido de sodio, el ácido nítrico, el isopropanol, el metanol, la acetona, se consiguieron de J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, E.U.A.); el tolueno se adquirió de Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, E.U.A.); y el tetrahidrofurano (THF) se compró a Burdick & Jackson (Muskegon, MI, E.U.A.).

Los materiales empleados en la fabricación y mantenimiento de la celda de combustible: la membrana de intercambio protónico Nafion<sup>®</sup> 117 de 180 µm de espesor se adquirió a Dupont (St. Louis, MI, E.U.A.); y el material elastomérico Silastic<sup>®</sup> J RTV se compró a Dow Corning Corporation (Midland, MI, E.U.A.). El armazón de acrílico, los tornillos de acero inoxidable rosca estándar (6 mm de diámetro), el papel-lijas WC-1500 Fandeli<sup>®</sup> fueron proporcionados por el Dr. Roberto Flores Hernández, investigador de la Gerencia de Energías No Convencionales del Instituto de Investigaciones Eléctricas (Cuernavaca, Mor. México).

## **4.2 Métodos.**

### **4.2.1 Condiciones de cultivo y producción de la enzima.**

La cepa fúngica *C. gallica* UAMH 8260 fue propagada en placas en cajas Petri conteniendo medio PDA (papa-dextrosa) agarizado. Después de su crecimiento, se obtuvo 1 cm<sup>2</sup> de micelio de una caja de Petri que fue homogenizado con 50 mL de medio GYM mediante un Omnimixer Sorvall (Norwalk, CT, E.U.A) por 2 segundos a velocidad máxima. El hongo homogenizado se inoculó en un matraz de 250 mL que contenía 100 mL del medio GYM. El medio GYM (glucosa- extracto de levadura- extracto de malta, por sus siglas en inglés), contenía por un litro de solución: 10 g de glucosa, 2 g de extracto de levadura, 3.5 g de extracto de malta, 2 g de fosfato de potasio monobásico, 0.5 g de sulfato de magnesio pentahidratado y 1 mL de una solución fórmula de metales traza. La solución fórmula de metales traza contenía, por un mililitro de solución:  $5 \times 10^{-3}$  mg de sulfato de cobre pentahidratado,  $1.6 \times 10^{-3}$  mg de sulfato de manganeso monohidratado,  $1.4 \times 10^{-3}$  mg de sulfato de cobalto pentahidratado y  $2.9 \times 10^{-3}$  mg de cloruro de cobalto hexahidratado. Los cultivos se mantuvieron en agitación (200 rpm) a 28°C [Pickard *et al.*, 1999a; y Rodríguez *et al.*, 1999].

Después de 3 días, el cultivo fue transferido a un medio de producción, el cual consistió de 3% (p/v) del cereal All-bran flakes de Kellogg's (Kellogg Company; Battle Creek, MI, E.U.A.) en solución amortiguadora de fosfatos 60 mM (pH 6.0) [Pickard *et al.*, 1999b]. Este medio de producción permitió un incremento en los niveles de producción de lacasa extracelular. El hongo se mantuvo en condiciones de agitación (200 rpm) a 28 °C, en un matraz Fernbach de 2500mL que contenía 1000 mL del medio de producción. Se realizó un monitoreo diario de la producción de la lacasa, por la medición de su actividad enzimática mediante espectrofotometría (descrito posteriormente). El máximo nivel de producción de lacasa se alcanzó en el noveno día de cultivo.

#### **4.2.2 Extracción y purificación enzimática.**

Una vez alcanzado el máximo nivel de producción de lacasa en los cultivos, la biomasa fue removida por centrifugación del medio de producción a 10 000 rpm por 10 minutos. Los siguientes pasos de la purificación fueron llevados a cabo a 4 °C. El sobrenadante obtenido es precipitado en dos etapas con sulfato de amonio. En la primera etapa, se añadieron 291 g. de sulfato de amonio por litro (para llegar al 50% de saturación) y se mantuvo en agitación por una hora. Posteriormente de una centrifugación a 10 000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante es precipitado (en una segunda etapa) con la adición de 391 g de sulfato de amonio por litro (para alcanzar el 100% de saturación) y agitado por una hora. Después de una centrifugación a 10 000 rpm por 10 minutos, el pellet es recuperado con 10 mL de solución amortiguadora de fosfatos 10 mM (pH 6.0). La solución fue dializada con una membrana de 10 kD en 4 litros de solución amortiguadora de fosfatos 10 mM (pH 6.0) durante toda la noche.

Al día siguiente, se renovó la solución amortiguadora de fosfatos 10 mM (pH 6.0) y se dejó en agitación por 4 horas más. El dializado fue centrifugado a 12 000 rpm por 10 minutos, para remover precipitados. Este concentrado enzimático centrifugado fue aplicado en una columna de intercambio aniónico (preparada con una matriz Whatman DE-52, y previamente pre-equilibrada con solución amortiguadora de fosfatos 10 mM de pH 6.0), se realizó un lavado con solución amortiguadora de fosfatos 10 mM (pH 6.0) y finalmente la enzima fue eluida con un gradiente de cloruro de sodio 1 M. Las fracciones que tenían la actividad de la lacasa fueron colectadas y concentradas a través de un sistema de ultrafiltración Amicon (con una membrana de una abertura de 10 kDa). Posteriormente la

solución de lacasa se sometió a una segunda columna de cromatografía de intercambio aniónico de mayor fuerza (High-Q), se lavó con solución amortiguadora de fosfatos 10 mM (pH 6.0) y finalmente la enzima pura fue eluida con un gradiente de cloruro de sodio 1 M. La solución enzimática fue concentrada en solución amortiguadora de fosfatos 60 mM (pH 6.0) por medio del sistema de ultrafiltración Amicon (con una membrana de una abertura de 10 kDa). Se determinó la cantidad de la proteína presente en esta solución enzimática, por el método de Bradford utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. La actividad enzimática fue determinada mediante ensayos espectrofotométricos (ver sección 4.2.5). El grado de pureza de la solución enzimática, fue analizado por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), y su tinción con azul de Coomassie R250. Para asegurar la conservación de la solución enzimática, se empleó glicerol como criopreservador [Pickard *et al.*, 1999a].

#### **4.2.3 Inmovilización no-covalente**

Se preparó una tinta conteniendo 1600  $\mu$ l de isopropanol, 520  $\mu$ l de solución amortiguadora de fosfatos 10 mM (pH 6.0), 52  $\mu$ l de solución de Nafion al 5%, y carbón vulcan en diferentes cantidades (26 mg, 13 mg ó 6.5 mg). Esta tinta de carbono fue homogenizada al ser mantenida en un baño de sonicación, Branson Ultrasonic 1510 (Danbury, CT, E.U.A), por una hora a una temperatura de 40 °C. La preparación de la tinta de carbono se completó con la adición de 5 ó 50  $\mu$ l de una solución de lacasa (75.85 mg/ml), y su posterior homogenización en el baño de sonicación por 10 minutos. La tinta de carbono fue depositada sobre láminas de carbono de 6.25 cm<sup>2</sup>, por medio de un sistema manual de aspersion con desplazamientos x-y-z, con una presión de aire de 50 lb/pulg<sup>2</sup> (fig. 4). Durante el proceso de aspersion de la tinta de carbono, las láminas de carbono se mantuvieron a una temperatura de 25 ó 40 °C. Después de este proceso de inmovilización no-covalente, se realizaron tres lavados con una solución amortiguadora de fosfatos 10 mM (pH 6.0), antes de realizar las pertinentes evaluaciones. Estas láminas de carbono cubiertas con lacasa fueron sumergidas en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM (pH 6.0) y almacenadas en condiciones de refrigeración.



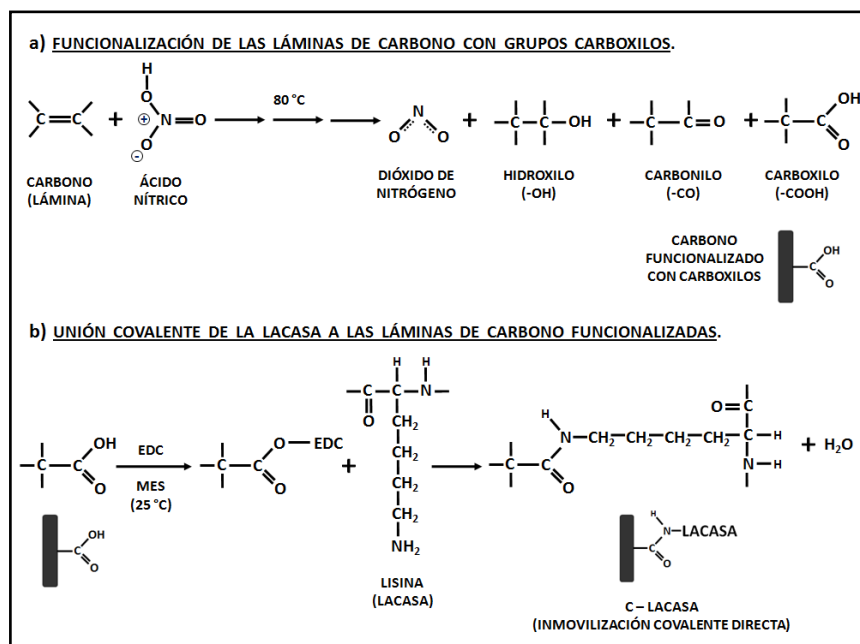
**Figura 4** Sistema manual de aspersión de tinta conductora con desplazamientos x-y-z. Este sistema fue desarrollado por el grupo de investigadores de la Gerencia de Energías No Convencionales del Instituto de Investigaciones Eléctricas (Cuernavaca, Morelos).

#### 4.2.4 Inmovilización covalente

##### A) Unión química directa

Las láminas de carbono de  $1 \text{ cm}^2$  fueron oxidadas al ser tratadas a reflujo con  $\text{HNO}_3$  a  $80^\circ\text{C}$  por 2 horas dentro de un termo-block Equatherm (Melrose Park, IL. E.U.A.). La finalidad de este tratamiento es el de producir grupos carboxilo en la superficie de la lamina de carbono [Lee *et al.*, 2006]. La reacción de formación de grupos carboxilos en las láminas de carbono es ilustrada en la figura 5a. Después, las laminas de carbono, se lavaron exhaustivamente con agua destilada y secadas. Las láminas de carbono carboxiladas fueron incubadas en una solución de reacción de solución amortiguadora MES 50 mM pH 5.0 (1mL) y de EDC (2 mg/mL), adicionado con 5 ó 50  $\mu\text{l}$  de una solución de lacasa (75.85 mg/ml). La reacción de unión química (entre los residuos carboxilos de las superficies de carbono y los residuos aminos externos de la lacasa) se desarrollo a temperatura ambiente ( $20^\circ\text{C}$ ) y en condiciones de agitación (80 rpm) por 4 horas. Esta reacción se muestra en la figura 5b [Gao y Kyratzis, 2008]. Finalmente, se realizaron tres lavados con una solución amortiguadora de fosfatos 10 mM (pH 6.0), antes de realizar las pertinentes evaluaciones. Estas láminas de carbono cubiertas con lacasa fueron sumergidas en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM (pH 6.0) y almacenadas en condiciones de refrigeración.



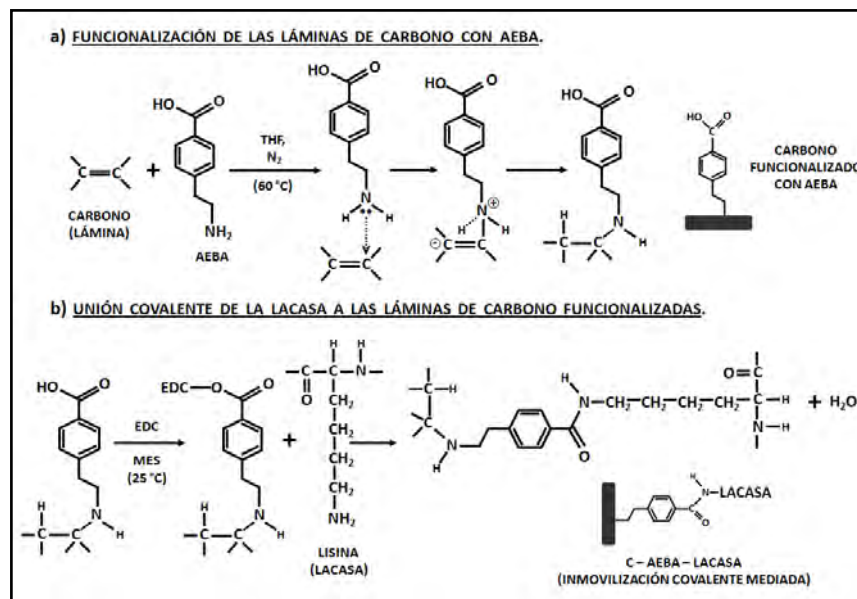


**Figura 5.** Inmovilización covalente directa. Al aumentar la temperatura del ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), cercano a su punto de ebullición ( $83^\circ\text{C}$ ), se descompone en varias especies químicas intermediarias. Finalmente algunas de las especies químicas reaccionan con los carbonos (mediante un proceso de quimisorción), derivando en la formación de grupos carboxilos, carbonilos e hidroxilos (en una proporción 4:2:1); además de producirse dióxido de nitrógeno (inciso a). Las superficies de carbono se funcionalizan con grupos carboxilos, carbonilos e hidroxilos en una proporción 4:2:1 [estas reacciones fueron desarrolladas en base a Rakov, 2001; Naseh *et al.*, 2009; Kanai *et al.*, 2010]. El EDC (agente activador) promueve la formación de enlaces amida entre los grupos carboxilos (de la lámina de carbono) y los residuos amino externos de la lacasa (específicamente residuos de lisina). Primero, el EDC se acopla al grupo carboxilo formando un intermediario (*O*-acilurea); y posteriormente el intermediario es atacado por el grupo amino, para formar la amida. De esta manera se une covalentemente la lacasa a la superficie de carbono, de forma directa (inciso b) [Gao y Kyratzis, 2008].

## B) Unión química mediada

Se mezclaron homogéneamente 180 mg de ácido 4-[2-aminoetil] benzoico hidrocloreto en 10 mL de hidróxido de sodio 0.2 M para desproteger el amino y formar ácido 4-[2-aminoetil] benzoico (AEBA), posteriormente se añadieron 3 mL de tolueno para extraer el AEBA puro. El AEBA fue disuelto en 3 mL de THF destilado e inmediatamente se sumergieron las láminas de carbono de  $1\text{ cm}^2$ , para realizar un reflujo a  $60^\circ\text{C}$  por 15 horas dentro del termo-block Equatherm. La reacción química de funcionalización de las láminas de carbono con AEBA es presentada en la figura 6a. Después, las laminas de carbono, se lavaron rápidamente en orden secuencial con 10 mL de metanol, acetona, THF destilado, agua destilada, y finalmente fueron secadas. Todos los reactivos empleados en este proceso fueron previamente des-oxygenados (mediante un burbujeo con  $\text{N}_2$ ); asimismo el interior del tubo donde se realizó el reflujo se lleno con  $\text{N}_2$ , debido a que el AEBA es un compuesto muy inestable [Gallardo *et al.*, 2006].

Las láminas de carbono funcionalizadas fueron incubadas en una solución de amortiguadora MES 50 mM pH 5.0 (1mL) y de EDC (2 mg/mL), adicionado con 5 ó 50  $\mu$ l de una solución de lacasa (75.85 mg/ml), en las mismas condiciones en que se realizó la unión química directa. La reacción de unión química se llevó a cabo entre los grupos carboxilos de las moléculas de AEBA (que se acoplaron a las superficies de carbono) y los residuos aminos externos de la lacasa. Esta reacción es mostrada en la figura 6b [Gao y Kyratzis, 2008]. Finalmente, se realizaron tres lavados con una solución amortiguadora de fosfatos 10 mM (pH 6.0), antes de realizar las pertinentes evaluaciones. Estas láminas de carbono cubiertas con lacasa fueron sumergidas en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM (pH 6.0) y almacenadas en condiciones de refrigeración.



**Figura 6** Inmovilización covalente mediada. El aumento de temperatura del tetrahidrofurano (THF), cercano a su punto de ebullición ( $66^{\circ}C$ ), permitirá que AEBA se acople a la superficie de carbono. Este proceso consiste en una reacción de ataque nucleofílico del nitrógeno del grupo amino del AEBA, al carbono de la lámina. De esta manera las laminas de carbono se funcionalizaron con grupos AEBA (inciso a) [esta reacción fue desarrollada en base a Gallardo *et al.*, 2006]. El EDC (agente activador) promueve la formación de enlaces amida entre los grupos carboxilos (de AEBA) y los residuos amino externos de la lacasa (específicamente residuos de lisina). Primero, el EDC se acopla al grupo carboxilo formando un intermediario (O-ácilurea); y posteriormente el intermediario es atacado por el grupo amino, para formar la amida. De esta manera se une covalentemente la lacasa a la superficie de carbono, de forma indirecta (inciso b) [Gao y Kyratzis, 2008].

#### 4.2.5 Evaluación de actividad enzimática y concentración de proteína.

La actividad enzimática fue evaluada espectrofotométricamente con el cambio de absorbancia a una longitud de onda de 436 nm, utilizando como sustrato 50  $\mu\text{M}$  de ABTS ( $\epsilon = 29,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) [Wolfenden y Wilson, 1982]. En el caso de las láminas de carbono cubiertas con lacasa, se sumergieron en 10 ml de una solución de reacción de ABTS 50  $\mu\text{M}$  disuelto en solución amortiguadora de succinato 100 mM (pH 4.5); y cada determinado tiempo se fue tomando una muestra (1 mL), para medir el incremento en la absorbancia por medio de un espectrofotómetro Beckman DU<sup>®</sup>530 (Brea, CA. E.U.A). Asimismo se evaluó la actividad enzimática en la solución amortiguadora de fosfatos de 10 mM (pH 6.0) empleada en los lavados de las láminas de carbono cubiertas con lacasa. Los cálculos de actividad enzimática se realizaron mediante la ley de Lambert-Beer. La ley de Lambert-Beer (representada por la ecuación  $A = \epsilon lc$ ) establece una relación de la absorbancia (**A**) con la concentración (**c**) y coeficiente de extinción molar de la sustancia adsorbente ( $\epsilon$ ), y la distancia que la luz la atraviesa (**l**) [Chang, 1983].

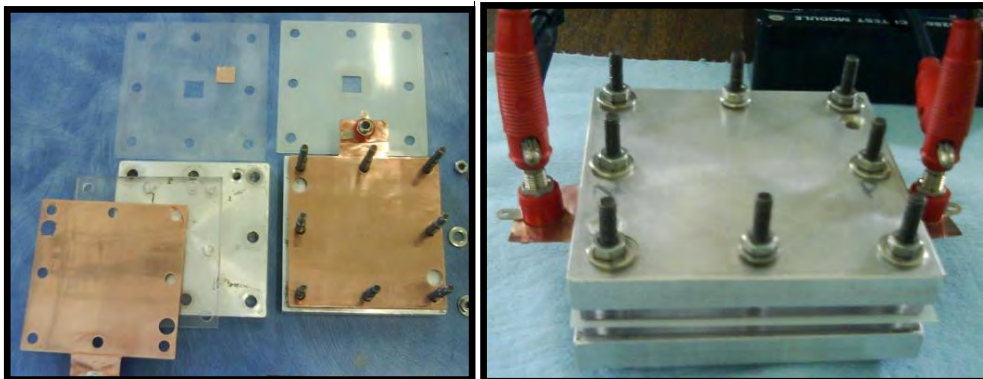
La determinación de concentración de proteína por unidad de área ( $1\text{cm}^2$ ) en las láminas de carbono, se realizó de la siguiente forma: a partir de una curva estándar de reactivo de Bradford (Bio-Rad Laboratories<sup>®</sup>) con 50  $\mu\text{L}$  de una solución de albúmina sérica bovina (4 mg/mL), se determinó la proporción del reactivo de Bradford requerida para obtener una absorbancia de 0.5. Posteriormente, las láminas de carbono cubiertas con lacasa fueron incubadas en la solución de reacción de Bradford establecida: 890  $\mu\text{L}$  de agua destilada, 50  $\mu\text{L}$  de una solución de albúmina sérica bovina (20 mg/mL) y 60  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford. Después de 5 minutos se midió la absorbancia de la solución de reacción, y se calculó la concentración de proteína inmovilizada por la diferencia de absorbancia. Asimismo se realizó la medición de láminas de carbono sin lacasa como control.

#### 4.2.6 Caracterización eléctrica y electroquímica del cátodo.

Es importante mencionar, que las láminas de carbono cubiertas con lacasa (independientemente del método de inmovilización por el que se hayan elaborado) se denominaron como “~~electrodos~~ electrodos de lacasa” como referencia, debido a que integrarán el electrodo positivo de la celda de combustible enzimática híbrida, y además permite evitar

confusiones con los electrodos comúnmente empleados en electroquímica (como electrodo de referencia y electrodo contador ó contraelectrodo, de los cuales se mencionara más adelante). Antes de realizar las mediciones correspondientes, se realizaron tres lavados previos con solución amortiguadora de fosfatos 10 mM (pH 6.0), como se mencionó anteriormente.

Las mediciones de resistencia eléctrica de contacto de los cátodos de lacasa se realizaron mediante la técnica de impedancia utilizando un potenciostato Solartron-1287 y un analizador de frecuencia/impedancia Solartron-SI1260. La resistencia eléctrica fue evaluada mediante el software Zplot y Zview 2-2.zv2. Se aplicó un potencial eléctrico AC de 10 mV, y se midió la resistencia en función de la presión ejercida por dos placas de cobre sobre el cátodo de lacasa. Las placas de cobre se encontraban aisladas entre sí por una lámina aislante (mylar), existiendo solo el contacto eléctrico en la región central ( $1 \text{ cm}^2$ ) donde se ubicaba el cátodo de lacasa. La presión efectuada por las placas de cobre sobre el cátodo de lacasa, fue causada por la torsión de los tornillos (a través de un torquímetro graduado) que sujetaban a las placas metálicas. Es por ello, que esta técnica se denomina como —resistencia eléctrica de contacto—. La figura 7 muestra la constitución del sistema de placas que ejerce presión sobre los cátodos de lacasa.



**Figura 7.** Sistema montado para la medición de resistencia eléctrica por contacto. En la imagen del lado izquierdo aparece los constituyentes del sistema (placas de acero, placas de acrílico, laminas de cobre y laminas mylar) que permite realizar las mediciones de resistencia eléctrica. Los cátodos de lacasa se mantienen prensados entre las placas de cobre en la región central. En la imagen del lado derecho, se muestra el sistema montado y conectado al potenciostato y el analizador de impedancia.

Las mediciones electroquímicas de potencial en circuito abierto (OCP, por sus siglas en ingles) de los cátodos de lacasa ( $1 \text{ cm}^2$ ) y de una placa de zinc ( $22.5 \text{ cm}^2$ ) fueron realizadas con apoyo del potenciostato Solartron-1287 y el software CorrWare y CorrView

versión 3.1c. El sistema de medición de dos-electrodos se integró por un electrodo de trabajo (WE, por sus siglas en inglés) a base de un cátodo de lacasa ó una placa de zinc sumergidos en solución amortiguadora de succinato 50 mM pH 4.5; y un electrodo de referencia (RE por sus siglas en inglés) de calomel Hg/HgCl<sub>2</sub>, KCl saturado (SCE por sus siglas en inglés), el cual tiene un potencial eléctrico de +0.2412 V (vs electrodo de hidrógeno estándar, SHE por sus siglas en inglés). Como WE control, se evaluó el potencial en circuito abierto de láminas de carbono GDL 30 BC sin enzima y de una barra de platino (inmersos en solución amortiguadora de succinato 50mM pH 4.5) con respecto al SCE.

Las mediciones de voltamperometría cíclica de los cátodos de lacasa (1 cm<sup>2</sup>) se llevaron a cabo mediante el potenciostato Solartron-1287 y el software CorrWare y CorrView versión 3.1c. Se realizaron voltamperometrías cíclicas entre un rango de -0.1 V a +1.2 V y una velocidad de barrido de 10 mV/s (6 ciclos). En este caso, se estableció un sistema de medición de tres-electrodos: el cátodo de lacasa ó una lámina de carbono GDL 30 BC sin enzima (como electrodo de trabajo), un electrodo de calomel saturado (como electrodo de referencia), y una malla de platino (como electrodo contador, CE por sus siglas en inglés). El sistema electroquímico de tres-electrodos fue sumergido en una solución amortiguadora de succinato 50 mM pH 4.5, dentro del mismo contenedor. Durante la medición, se saturó con O<sub>2</sub> y monitoreo el pH de la solución amortiguadora de succinato.

#### **4.2.7 Construcción y evaluación de celda de combustible enzimática híbrida.**

La celda de combustible enzimática híbrida fue construida con un ánodo de zinc de 22.5 cm<sup>2</sup> y un cátodo de lacasa elaborado por inmovilización covalente directa ó mediada de 1 cm<sup>2</sup>. Ambos electrodos fueron sumergidos con una solución amortiguadora de succinato 50 mM pH 4.5; y separados por una membrana de intercambio protónico de Nafion<sup>®</sup> de un espesor de 180 μm. Los electrodos fueron sujetos a la pared del armazón mediante una película adhesiva o por una diminuta capa de Silastic<sup>®</sup> (material elastomérico eléctricamente aislante y químicamente inerte), y conectados a tornillos de acero inoxidable de 6 mm de diámetro. Para evitar la fuga de la solución amortiguadora de succinato, la celda fue ensamblada junto con sellos elaborados a base de Silastic<sup>®</sup>. El armazón de la celda de combustible enzimática híbrida se conformó de dos compartimentos fabricados en acrílico que fueron sujetos por tornillos de acero inoxidable de 6 mm de diámetro (los

cuales no mantenían contacto con la solución amortiguadora de succinato, ni con los electrodos de la celda).

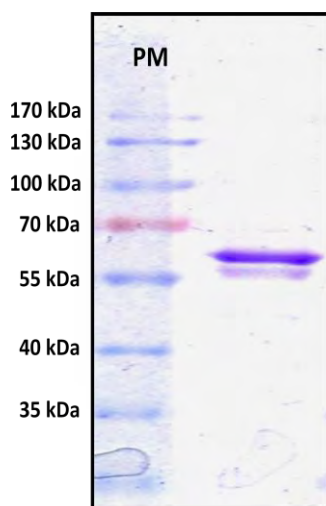
Una vez fabricada la celda combustible enzimática híbrida, se realizaron las mediciones electroquímicas pertinentes con apoyo de un potenciostato 1287-Solartron y el software CorrWare y CorrView versión 3.1c. Para cada medición, la superficie del ánodo de zinc fue pulida (con un papel WC-1500 Fandeli®) y limpiada con etanol y agua destilada previamente; además se utilizó un cátodo de lacasa recién preparado. Antes de cada medición, se determinó el OCP de la celda electroquímica. Se realizaron mediciones potenciodinámicas, estableciendo un potencial eléctrico inicial de 0 V (con respecto al potencial en circuito abierto), un potencial eléctrico final de 0.1V (con respecto al potencial del SCE) y una velocidad de barrido de 5 mV/s. Las mediciones potenciodinámicas de la celda electroquímica, se efectuaron con suministro continuo y directo de O<sub>2</sub> ó N<sub>2</sub> en el compartimento catódico (con un flujo de entre 100-140 mL/min). Asimismo, se realizaron mediciones potenciodinámicas de celdas control (integradas por el ánodo de zinc y un cátodo a base de una lámina de carbono GDL 30 BC sin enzima) en las mismas condiciones (constante suministro de O<sub>2</sub> ó N<sub>2</sub>). Por otra parte, se realizaron mediciones cronoamperométricas, fijando un determinado valor de voltaje. Durante las mediciones cronoamperométricas, se suministro O<sub>2</sub> con un flujo de entre 100-140 mL/min) al compartimento catódico de la celda electroquímica.

## **V. Resultados y Discusión.**

### **5.1 Producción y purificación de lacasa de *Corioloopsis gallica* UAMH 8260.**

Se produjo lacasa de *C. gallica* mediante los procedimientos descritos en la sección de Materiales y Métodos. Los extractos extracelulares fueron purificados por precipitación con sulfato de amonio y dos cromatografías de intercambio iónico. Para conocer el grado de pureza de la solución enzimática obtenida, se realizó un análisis por SDS-PAGE. Como se muestra en la figura 8, se encontró la presencia de dos bandas. La banda más abundante pertenece a la lacasa de *C. gallica* UAMH 8260, con un peso molecular de 64.6 kDa determinado mediante su movilidad electroforética relativa (Rf). Un análisis densitométrico del gel de electroforesis emitió un grado de pureza mayor del 80%. La lacasa de *C. gallica* fue reportada con un peso molecular de 66 kDa [Vandertol-Vanier *et al.*, 2002]. La segunda

banda (ubicada en la parte inferior), puede corresponder a una proporción de lacasa de *C. gallica* UAMH 8260 con menor grado de glicosilación; aunque esta conjetura no fue comprobada. El grado de pureza de lacasa, es un factor que puede ser relevante en el proceso de inmovilización enzimática; debido a que la presencia de otra proteína reduce las probabilidades de inmovilizar lacasa. No obstante, en este caso ese aspecto no parece ser un obstáculo. La actividad catalítica de la solución enzimática determinada en términos de la oxidación del sustrato ABTS fue de 762.5 U/mL; mientras que la concentración de proteína fue de 75.85 mg/mL. A partir de estos datos, se estableció que la actividad específica de la solución de lacasa es 10.05 U/mg. La unidad enzimática (U) se define como la cantidad de lacasa que oxida 1  $\mu$ mol de ABTS por minuto.

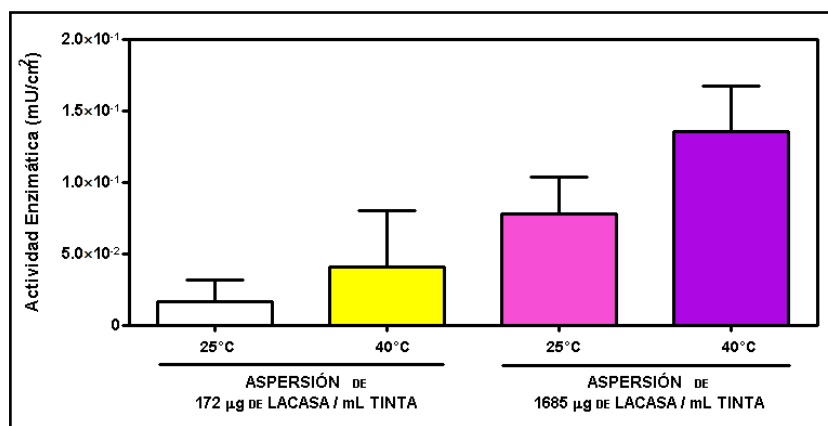


**Figura 8.** Lacasa de *C. gallica* UAMH 8260 purificada. Gel de poliacrilamida-SDS (12%) teñido con azul de Coomassie R-250. Peso molecular estándar (PM).

## 5.2 Evaluación de actividad catalítica en inmovilizaciones no-covalentes de lacasa.

Primero se evaluó la actividad enzimática de la lacasa inmovilizada de forma no-covalente (adsorción de lacasa en una tinta de carbono), a través de la medición espectrofotométrica de la reacción de oxidación de ABTS. Como se describió en la sección de Métodos, se aplicó la ley de Lambert-Beer para obtener los valores de actividad catalítica. La tinta que se depositó sobre las láminas de carbono de 6.25 cm<sup>2</sup>, fue preparada con 5 ó 50  $\mu$ L de una solución de lacasa (75.85 mg/ml), teniendo una concentración final de 172  $\mu$ g/ml tinta y 1685  $\mu$ g/ml tinta, respectivamente. La concentración de lacasa en la tinta y la temperatura de las láminas de carbono (25 ó 40°C), fueron dos aspectos que se consideraron en la medición de actividad catalítica (gráfica 1 y tabla 3). Como se esperaba, existe una mayor actividad enzimática en las aspersiones de 1685  $\mu$ g lacasa/ml tinta, en relación con las aspersiones de 172  $\mu$ g lacasa/ml tinta; siendo 3.30 y 4.66 veces mayor a temperaturas de

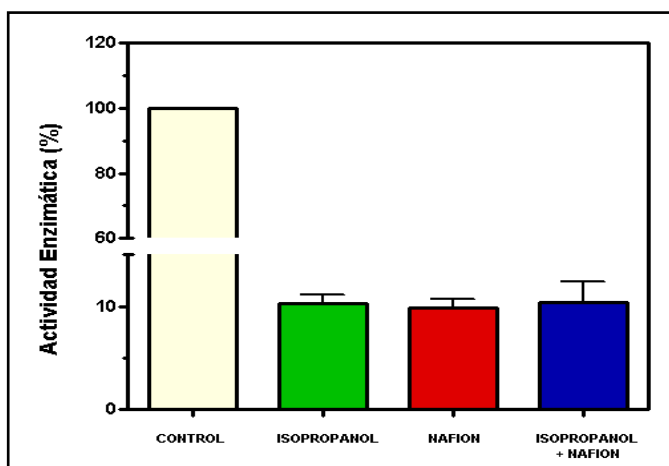
deposición de 25 y 40 °C, respectivamente. Por otra parte, se muestra cierta diferencia entre las aspersiones de una misma concentración de lacasa a diferentes temperaturas. Las aspersiones de 1685 µg lacasa/ml tinta a 40°C muestran mayor actividad enzimática que a 25°C (siendo 1.73 veces mayor). Este efecto puede ser debido a la presencia del isopropanol (componente de la tinta). Cabe mencionar que el aumento de temperatura (40°C) acelera la evaporación del isopropanol, incrementando la porosidad en la matriz de la tinta depositada en las láminas de carbono. De esta manera, un alto grado porosidad de la matriz de la tinta, facilitará el acceso de las moléculas de ABTS a un determinado número de lacasas depositadas.



Temperatura Proceso (°C)	Concentración Enzima en Tinta (µg/ml tinta)	Concentración Enzima Depositada* (µg/cm <sup>2</sup> )	Actividad Catalítica (mU/cm <sup>2</sup> )
25 <sup>2a</sup>	172	23.40	0.016 (±0.01)
40 <sup>2a</sup>	172	23.40	0.041 (±0.03)
25	1685	229.23	0.078 (±0.02)
40	1685	229.23	0.135 (±0.03)

**Grafica 1 y Tabla 3.** Actividad enzimática y concentración de lacasa de *C. gallica* UAMH 8260 inmovilizada de forma no-covalente sobre láminas de carbono de 6.25 cm<sup>2</sup>. Aspersión de una tinta preparada con 26 mg de carbón vulcan y 5 ó 50 µl de una solución de lacasa (75.85 mg/ml); sobre láminas de carbono a dos diferentes temperaturas (25 ó 40°C). La concentración final de lacasa en la tinta fue de 172 y 1685 µg lacasa/ml de tinta, respetivamente. La concentración de enzima depositada en las laminas de carbono (\*), fue calculada a partir de la concentración inicial de lacasa en la tinta, restando las pérdidas por el proceso de aspersión (aprox. 150µl de tinta), y por la ineficiente inmovilización (enzima presente en los lavados con 30 ml de solución amortiguadora de fosfatos). La actividad catalítica determinada por la oxidación de ABTS 50 µM, fue expresada en términos mU/cm<sup>2</sup>. Las actividades enzimáticas de las aspersiones de 172 µg lacasa/ml de tinta pertenecen a una segunda medición (<sup>2a</sup>). Los datos son mostradas como promedios (n= 3-5). Las desviaciones estándar se indican entre paréntesis.



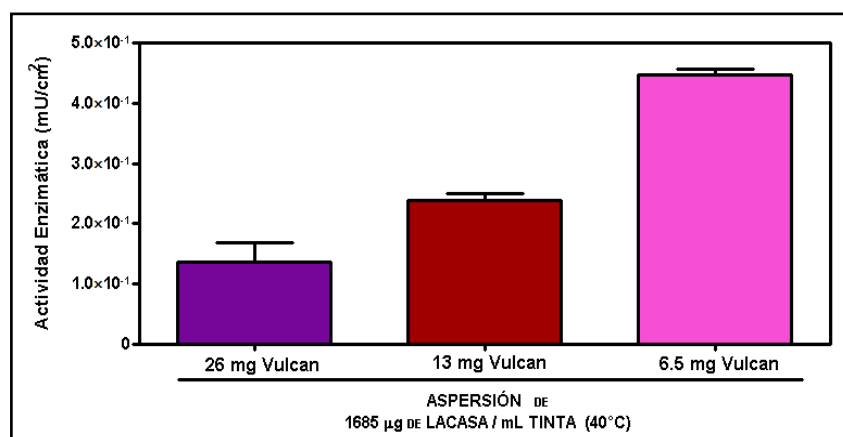


**Gráfica 2.** Efecto del isopropanol y el Nafion en la actividad catalítica de lacasa de *C. gallica*. Medición de la actividad catalítica de la lacasa, después de su incubación (agitación por una hora) en isopropanol (barra verde), en solución Nafion al 5% (barra roja), ó en isopropanol y Nafion (barra azul) (n=6).

La baja actividad enzimática de las aspersiones de 172  $\mu\text{g}$  lacasa/ml tinta (gráfica 1 y la tabla 3) puede deberse a la presencia de isopropanol. Para verificar el efecto del isopropanol, se realizaron ensayos de actividad enzimática de la lacasa en presencia de isopropanol y/o solución de Nafion 5% (a las mismas concentraciones usadas en la elaboración de la tinta). Resulta conveniente recalcar que la solución de Nafion 5% <sup>®</sup>Fuel Cell Scientific (empleada en la preparación de la tinta como aglutinante) se encuentra diluida en isopropanol. La presencia del isopropanol inhibe la actividad catalítica de la lacasa (barra verde, gráfica 2). Este efecto negativo del isopropanol en la actividad de las enzimas ha sido reportado en algunos estudios [D'Acunzo *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2009]. Asimismo, la presencia de solución de Nafion 5% también abate la actividad enzimática (barra roja, gráfica 2); por otra parte, la incubación de la lacasa en isopropanol y Nafion 5% (barra azul, gráfica 2), exhibe el mismo nivel de actividad enzimática (sin existir algún efecto sinérgico). En los recientes años, se ha publicado el uso de Nafion en la construcción de biosensores (basados en lacasas, hemoglobinas ó glucosa oxidasas) [Osina *et al.*, 2003; Abdullah *et al.*, 2007; Shie *et al.*, 2009] y celdas de combustible enzimáticas [Szot *et al.*, 2009; Gomez *et al.*, 2010], aunque no se reporta un efecto negativo del Nafion en la actividad de las proteínas. Por otra parte, algunos autores afirman que la propiedad ácida del Nafion, disminuye la actividad de las enzimas; sin embargo, la neutralización de los grupos sulfónicos del Nafion por tetra-alcilamónio, permite la estabilidad e incremento de la actividad enzimática (aunque esto representaría que el Nafion pierda la capacidad de transportar protones) [Moore *et al.*, 2004; Neto *et al.*, 2010]. Es importante mencionar que en un principio, el protocolo de preparación de la tinta consistía en la homogenización de la tinta (adicionada con lacasa) por una hora. Las aspersiones con 172  $\mu\text{g}$  lacasa/ml tinta

(gráfica 1 y tabla 3) fueron realizadas mediante este protocolo; lo que sugiere que durante la homogenización de la tinta, la poca concentración de lacasa fue afectada por la presencia del isopropanol. Para evitar este problema en las subsecuentes aspersiones, se optó por modificar el protocolo, adicionando la lacasa después de la hora de homogenización de la tinta.

Con el objetivo de evaluar la influencia de la cantidad de carbón (principal componente de la tinta) en la actividad enzimática, se realizaron aspersiones con diferentes cantidades de carbón vulcan en la tinta (gráfica 3 y tabla 4). Dado que se obtuvo una mayor actividad enzimática en las aspersiones con 1685 µg lacasa/ml tinta a una temperatura de 40 °C (tabla 3), se consideraron dichas condiciones como estándar para estas aspersiones. En la gráfica 3 y la tabla 4, se nota una mayor actividad enzimática cuando se fijo la menor cantidad de carbón vulcan (6.5 mg), en relación con la deposición de 26 mg y 13 mg de carbón vulcan (siendo 3.29 y 1.87 veces más que ellos, respectivamente). Como se mencionó anteriormente, la rápida evaporación del isopropanol, incrementa la porosidad en la matriz de la tinta depositada en las láminas de carbono, facilitando el acceso de las moléculas de ABTS a un determinado número de lacasas depositadas. De la misma forma, la cantidad de carbón vulcan en la tinta también afecta la porosidad en la matriz de la tinta. A medida que se disminuye la cantidad de carbón vulcan (el cual tiene un tamaño de partícula promedio de 7 nm) en la tinta, se incrementa la porosidad de la matriz, permitiendo que un mayor número de lacasas sean accesibles al ABTS. Por otra parte, se realizó una aspersión de tinta, sustituyendo el carbón vulcan por nanotubos de carbono de múltiple pared (MWCN de 8 nm de diámetro externo y una longitud de 50 µm); esto no resultó una buena opción, debido a que no se muestra una mayor actividad enzimática, en las deposiciones de 6.5 mg de MWCN (dato no mostrado). Esta información se derivó de un dato experimental, debido a que se presentaron problemas de solubilidad de los MWCN durante el proceso de homogenización de la tinta. Los MWCN empleados parecen presentar un mayor grado de insolubilidad que el carbón vulcan; por lo que se pudo optar por modificar la proporción de los solventes que conforman la tinta conductora (el isopropanol y/o la solución amortiguadora de fosfatos), hasta alcanzar su completa homogenización.

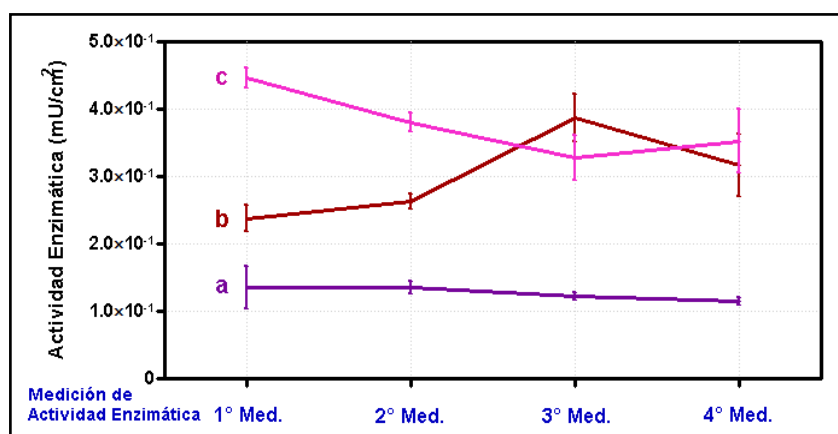


Temperatura Proceso (°C)	Vulcan (mg)	Concentración Enzima en Tinta (µg/ml tinta)	Concentración Enzima Depositada* (µg/cm²)	Actividad Catalítica (mU/cm²)
40	26	1685	229.23	0.135 (±0.03)
40	13	1685	229.14	0.238 (±0.02)
40	6.5	1685	229.19	0.447 (±0.02)

**Gráfica 3 y Tabla 4.** Actividad enzimática y concentración de lacasa de *C. gallica* UAMH 8260 inmovilizada de forma no-covalente sobre láminas de carbono de 6.25 cm<sup>2</sup>. Aspersión de una tinta preparada con 26, 13, ó 6.5 mg de carbón vulcan y 50 µl de una solución de lacasa (75.85 mg/ml) sobre láminas de carbono a 40 °C. La concentración final de lacasa en la tinta fue de 1685 µg lacasa/ml de tinta. La concentración de enzima depositada en las laminas de carbono (\*), fue calculada como se señalo anteriormente (considerando las pérdidas de lacasa). La actividad enzimática determinada por la oxidación de ABTS 50 µM, fue expresada en términos mU/cm<sup>2</sup>. Los datos son mostrados como promedios (n=3-4). Las desviaciones estándar se indican entre paréntesis.

Con el objetivo de estimar la estabilidad de las inmovilizaciones no-covalentes, se realizaron cuatro mediciones sucesivas de la actividad enzimática de las aspersiones de 1685 µg lacasa/ml tinta con diferente composición de carbón vulcan (gráfica 4 y tabla 5). Existe una disminución en la actividad enzimática de cada medición (realizada cada tercer día) en las deposiciones de lacasa con 26 ó 6.5 mg de carbón vulcan; tal fenómeno no fue observado en las deposiciones de lacasa con 13 mg de carbón vulcan. En el caso de las aspersiones de lacasa con 26 mg de carbón vulcan, la actividad enzimática se mantiene en la segunda medición, pero posteriormente se presenta un decremento del 9.77% en la tercera medición (con respecto a la segunda medición) y del 6.01 % en la cuarta medición (con respecto a la tercera medición). En el caso de las aspersiones de lacasa con 6.5 mg de carbón vulcan se exhibe una disminución de actividad enzimática del 14.95 % (con respecto a la primera medición), del 13.54 % (con respecto a la segunda medición), y un leve incremento del 7.27 % (con respecto a la tercera medición). La aspersión de lacasa

con 6.5 mg de MWCN, muestran un patrón similar (datos no mostrados): un decremento del 6.59%, 15.13 % y 9.07% cada una con respecto a su anterior medición; aunque como se menciono anteriormente, esta información procede de un solo dato experimental, y no se repitió debido a problemas de solubilidad de MWCN. La tendencia de este decremento en la actividad enzimática de las inmobilizaciones no-covalentes, puede deberse a las condiciones de almacenamiento y a la posible inactivación de las lacasas propiciada por el efecto destructivo de los radicales libres reactivos del ABTS formados durante su oxidación. Por su parte, en la aspersion de lacasa con 13 mg de carbón vulcan, se observa un incremento del 10.40% (con respecto a la primera medición) y del 46.89 % (con respecto a la segunda medición), y una disminución del 18.24 % (con respecto a la tercera medición). En los otros casos se observa una tendencia al decremento de la actividad enzimática; por lo que en este caso, el incremento puede deberse a errores durante las mediciones.



Proceso de Inmovilización	Actividad Catalítica (mU/cm <sup>2</sup> )			
	1°Medición	2°Medición	3°Medición	4°Medición
No-Covalente <sup>a</sup>	0.135	0.135	0.122	0.115
No-Covalente <sup>b</sup>	0.238	0.263	0.386	0.316
No-Covalente <sup>c</sup>	0.447	0.380	0.328	0.352

**Gráfica 4 y Tabla 5.** Monitoreo de la actividad enzimática de *C. gallica* UAMH 8260 inmobilizada de forma no-covalente sobre láminas de carbono. Se realizaron mediciones de actividad enzimática (cada tercer día) para evaluar la estabilidad de la enzima inmobilizada. Inmovilización No-Covalente.- Aspersion de láminas de carbono de 6.25 cm<sup>2</sup> con una tinta preparada con 50 µl de una solución de lacasa (75.85 mg/ml) y con 26 (<sup>a</sup>), 13 (<sup>b</sup>) ó 6.5 mg de carbón vulcan (<sup>c</sup>). La concentración final de lacasa en la tinta fue de 1685 µg lacasa/ml de tinta. Los datos son mostrados como promedios (n=3-5).

La inmovilización enzimática no-covalente resultó ser un proceso que implica una poca pérdida de lacasa. Durante la aspersion, se perdieron aproximadamente 150  $\mu\text{l}$  de tinta (que representa el 6.8 % del total de tinta que se preparo) en los componentes del sistema manual de aspersion (tales como el frasco contenedor de la tinta conductora, los conductos plásticos y la boquilla de dispersion). En otras palabras, en el proceso de aspersion se pierde 15% del total de lacasa mezclada en la tinta. Considerando esta merma, se calculó que la concentración de lacasa inmovilizada en las láminas de carbono es de 23.4  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  y 229.2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  en aspersiones de 172  $\mu\text{g}$  lacasa/ml tinta y 1685  $\mu\text{g}$  lacasa/ml tinta, respectivamente. Como se menciona en la sección de métodos, se realizaron lavados con solución amortiguadora de fosfatos para eliminar la lacasa que no permaneció atrapada en la tinta depositada en las láminas de carbono. La actividad enzimática en la solución amortiguadora de lavados (de las aspersiones de 172  $\mu\text{g}$  lacasa/ml tinta y 1685  $\mu\text{g}$  lacasa/ml tinta) es casi nula; es decir esta segunda merma es insignificante (representando entre el  $2.4 \times 10^{-3}$  y el  $3.8 \times 10^{-2}$  % del total de lacasa mezclada en la tinta). La concentración de lacasa total que hipotéticamente se depositó en las láminas de carbono se muestra en la tabla 6. Las aspersiones que se hicieron con 172  $\mu\text{g}$  lacasa/ml tinta presentan una concentración de lacasa inmovilizada de 23.4  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; mientras las aspersiones que se hicieron con 1685  $\mu\text{g}$  lacasa/ml tinta presentan una concentración de lacasa inmovilizada de 229.2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , depositando 26, 13 ó 6.5 mg de carbón vulcan.

A partir de los valores de actividad catalítica (tabla 3 y tabla 4), se determinó la concentración de lacasa activa inmovilizada; los resultados se muestran en la tabla 6. Como se mencionó anteriormente, el aumento de temperatura (40°C) y la disminución de carbón vulcan en la composición de la tinta, incrementa la porosidad de la matriz y con ello el acceso del ABTS a un cierto número de lacasas. Es por ello, que la concentración de lacasa calculada a partir de las actividades catalíticas, representan a aquella porción de lacasas que mantienen expuestos los sitios T1 de sus centros activos, para la unión y subsecuente oxidación del ABTS. La concentración de lacasa activa inmovilizada en las aspersiones de 172  $\mu\text{g}$  lacasa/ml tinta y 26 mg de carbón vulcan es de  $2 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (para deposiciones a 25°C) y  $4 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (para deposiciones a 40°C); conformando el  $7 \times 10^{-3}$  y  $2 \times 10^{-2}$  % del total de enzima depositada, respectivamente. Por otra parte, la concentración de lacasa activa inmovilizada en las aspersiones de 1685  $\mu\text{g}$  lacasa/ml tinta y 26 mg de carbón vulcan, es de  $8 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (para deposiciones a 25°C) y

$1 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (para deposiciones a  $40^\circ\text{C}$ ); representando el  $3 \times 10^{-3}$  y  $6 \times 10^{-3}$  % del total de enzima depositada, respectivamente. La concentración de lacasa activa inmovilizada en las deposiciones de 1685  $\mu\text{g}$  lacasa/ml tinta y 13 mg de carbón vulcan a  $40^\circ\text{C}$  es de  $2 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (que constituye el  $1 \times 10^{-2}$  % del total de enzima depositada); en tanto que las deposiciones de 1685  $\mu\text{g}$  lacasa/ml tinta y 6.5 mg de carbón vulcan a  $40^\circ\text{C}$  es de  $4 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (que constituye el  $2 \times 10^{-2}$  % del total de enzima depositada). En todos los casos, la concentración de lacasa activa inmovilizada, representa un porcentaje insignificante del total de lacasa depositada. Este porcentaje corresponde a aquella proporción de lacasas activas inmersas en la densa matriz de la tinta, favorecidas por la accesibilidad de sus sitios T1. El resto de lacasas depositadas (enzima no accesible para el ABTS), posiblemente mantienen una distribución y orientación aleatoria (con respecto a las partículas de carbón vulcan). Dada la relevancia de la orientación de las lacasas, en el proceso de transferencia de electrones (en el sistema de una celda de combustible enzimática), este proceso de inmovilización enzimática resulta ineficiente para el propósito de este proyecto.

Temperatura Proceso ( $^\circ\text{C}$ )	Concentración Enzima en Tinta ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ tinta)	Concentración Enzima Depositada*	Concentración Enzima Activa ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Enzima Activa Inmovilizada (%)
25 <sup>a</sup>	172	23.40	0.002 ( $\pm 0.001$ )	0.007
40 <sup>a</sup>	172	23.40	0.004 ( $\pm 0.003$ )	0.02
25 <sup>a</sup>	1685	229.23	0.008 ( $\pm 0.002$ )	0.003
40 <sup>a</sup>	1685	229.23	0.01 ( $\pm 0.003$ )	0.006
40 <sup>b</sup>	1685	229.20	0.02 ( $\pm 0.002$ )	0.01
40 <sup>c</sup>	1685	229.20	0.04 ( $\pm 0.002$ )	0.02

**Tabla 6.** Concentración de lacasa de *C. gallica* UAMH 8260 inmovilizada de forma no-covalente sobre láminas de carbono de  $6.25 \text{ cm}^2$ . Aspersión de una tinta preparada con 5 ó 50  $\mu\text{l}$  de una solución de lacasa (75.85 mg/ml) y 26 (<sup>a</sup>), 13 (<sup>b</sup>) ó 6.5 mg de carbón vulcan(<sup>c</sup>); a diferentes temperaturas (25 ó  $40^\circ\text{C}$ ). La concentración final de lacasa en la tinta fue de 172 y 1685  $\mu\text{g}$  lacasa/ml de tinta, respetivamente. La concentración de enzima depositada en las laminas de carbono (\*), fue calculada como se indicó anteriormente (considerando las pérdidas de lacasa). La concentración de lacasa activa inmovilizada, se determino a partir de los valores de la actividad enzimática y considerando la actividad específica (10.05 U/mg) y el peso molecular de la lacasa de *C. gallica* UAMH 8260 (66 kDa). La relación entre la concentración de enzima activa y el total de enzima calculada es expresada en términos de porcentaje (última columna). Los datos son mostradas como promedios (n= 3-5). Las desviaciones estándar se indican entre paréntesis.

### 5.3 Evaluación de actividad catalítica en inmobilizaciones covalentes de lacasa.

Se midió la actividad enzimática y se estimó la concentración de lacasa activa inmobilizada covalentemente de forma directa ó mediada sobre láminas de carbono de  $1 \text{ cm}^2$  (como se realizó anteriormente). La inmobilización covalente directa consistió en la unión química entre los grupos carboxilos formados en las láminas de carbono y los residuos aminos externos de la lacasa; mientras que la inmobilización covalente mediada radicó en la integración de una molécula (el ácido 4-[2-aminoetil] benzoico ó AEBA, por sus siglas en inglés) en las superficies de carbono, participando en la unión lacasa (a través de sus grupos carboxilos y los residuos aminos de la lacasa). Como se mencionó en la sección de métodos, las inmobilizaciones covalentes se realizaron mediante una incubación en una solución de reacción constituida por 1 mL de solución amortiguadora MES 50 mM pH 5.0, 2 mg de EDC y 5 ó 50  $\mu\text{L}$  de una solución de lacasa (75.85 mg/ml). La concentración final de lacasa donde se incubaron las laminas de carbono funcionalizadas fue de 380 y 3792  $\mu\text{g}$  lacasa/ml, respectivamente. La gráfica 5 y la tabla 7, muestra una comparación de la inmobilización covalente directa ó mediada (incubadas en 380 ó 3792  $\mu\text{g}$  lacasa/ml) y la inmobilización no-covalente, en términos de actividad enzimática y concentración de lacasa activa. Las inmobilizaciones covalentes exhiben una mayor actividad enzimática (y concentración de lacasa activa) que las inmobilizaciones no-covalentes. La aspersion de 172  $\mu\text{g}$  lacasa/ml tinta con 26 mg de carbón vulcan a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  (barra amarilla en gráfica 5 y tabla 7) es 241 y 401 veces menor que la inmobilización covalente directa ó mediada (incubando las láminas de carbono en 380  $\mu\text{g}$  lacasa/ml), respectivamente. Por otro lado, la aspersion de 1685  $\mu\text{g}$  lacasa/ml tinta con 6.5 mg de carbón vulcan a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  (barra rosa en gráfica 5 y tabla 7) es 30 y 45 veces menor que la inmobilización covalente directa ó mediada (incubando las láminas de carbono en 3792  $\mu\text{g}$  lacasa/ml), respectivamente. De esta manera, se puede establecer que el método de inmobilización covalente es mucho más efectivo que la inmobilización no-covalente (adsorción de la lacasa a una tinta a base de carbono), desde el punto de vista de actividad enzimática y concentración de lacasa activa inmobilizada.

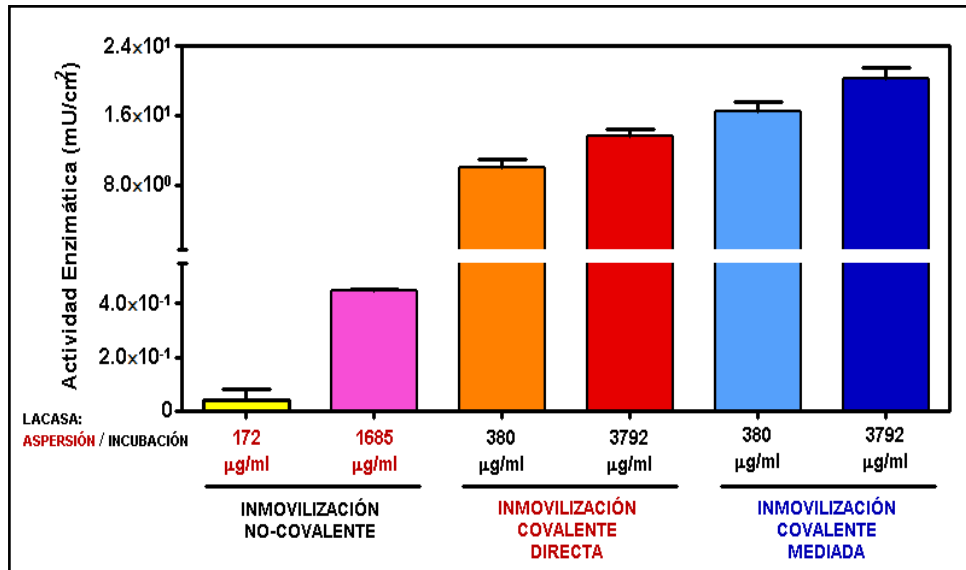
En la inmobilización covalente directa, se observa que la incubación de láminas de carbono en 380  $\mu\text{g}$  lacasa/ml (barra naranja en gráfica 5 y tabla 7), presenta una actividad catalítica de  $9.92 \text{ mU/cm}^2$  que resulta en una concentración de lacasa activa inmobilizada de  $0.98 \mu\text{g/cm}^2$ . En tanto, la incubación de láminas de carbono en 3792  $\mu\text{g}$  lacasa/ml (barra

roja en gráfica 5 y tabla 7), muestran una actividad catalítica de  $13.60 \text{ mU/cm}^2$  (resultando en una concentración de lacasa activa inmovilizada de  $1.35 \text{ }\mu\text{g/cm}^2$ ). La actividad enzimática (y concentración de lacasa activa) de láminas de carbono incubadas en  $3792 \text{ }\mu\text{g lacasa/ml}$ , es 1.36 veces mayor que las láminas de carbono incubadas en  $380 \text{ }\mu\text{g lacasa/ml}$ . Por otra parte, en la inmovilización covalente mediada, se observa que las láminas de carbono incubadas en  $380 \text{ }\mu\text{g lacasa/ml}$  (barra azul claro en gráfica 5 y tabla 7), muestra una actividad enzimática de  $16.51 \text{ mU/cm}^2$  que resulta en una concentración de lacasa activa inmovilizada de  $1.64 \text{ }\mu\text{g/cm}^2$ . Mientras, las láminas de carbono incubadas en  $3792 \text{ }\mu\text{g lacasa/ml}$  (barra azul oscuro en gráfica 5 y tabla 7), presentan una actividad enzimática de  $20.19 \text{ mU/cm}^2$  que resulta en una concentración de lacasa activa inmovilizada de  $2.00 \text{ }\mu\text{g/cm}^2$ . La actividad enzimática (y concentración de lacasa activa) de láminas de carbono incubadas en  $3792 \text{ }\mu\text{g lacasa/ml}$ , es 1.22 veces mayor que las láminas de carbono incubadas en  $379 \text{ }\mu\text{g lacasa/ml}$  MES. Como se observa, la inmovilización covalente mediada es 1.48 y 1.66 veces mayor que la inmovilización covalente directa, en incubaciones de láminas de carbono con  $380$  y  $3792 \text{ }\mu\text{g lacasa/ml}$  MES, respectivamente. En este sentido, la inmovilización covalente mediada presenta una cierta ventaja con respecto a la inmovilización covalente directa.

Como en las inmovilizaciones no-covalentes, también se realizó un monitoreo de la estabilidad catalítica en las inmovilizaciones covalentes (gráfica 6 y tabla 8). Ambos procesos de inmovilización covalente (directa y mediada) exhiben un decremento de la actividad enzimática conforme se realiza cada medición. En el caso de la inmovilización covalente directa, se exhibe un decremento significativo del 61.02% en la segunda medición (con respecto a la primera medición), del 52.71% en la tercera medición (con respecto a la segunda medición) y del 60.79% en la cuarta medición (con respecto a la tercera medición). Por otra parte, en la inmovilización covalente mediada, se nota la misma disminución de la actividad enzimática del 63.23% en la segunda medición (con respecto a la primera medición), del 36.32% en la tercera medición (con respecto a la segunda medición) y del 48.13% en la cuarta medición (con respecto a la tercera medición). Es notable la gran pérdida de actividad enzimática que existe en las inmovilizaciones covalentes, en relación con las inmovilizaciones no-covalentes (gráfica 4 y tabla 6). Esta diferencia puede radicar en el hecho de que en las inmovilizaciones covalentes, las lacasas están expuestas en su totalidad a los radicales libres reactivos formados por la oxidación

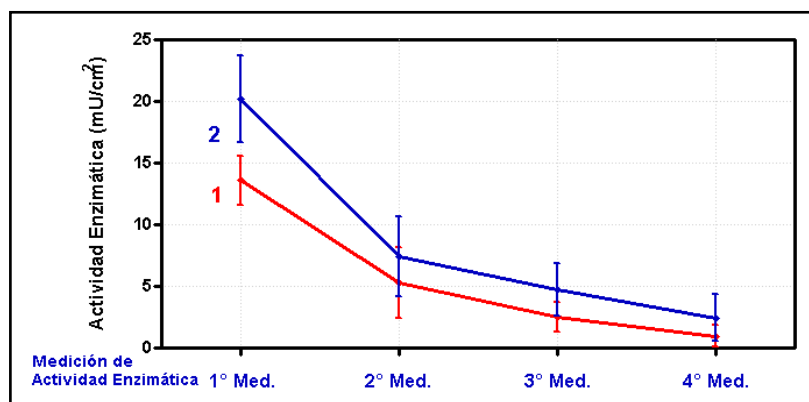


del ABTS. Como en las inmobilizaciones no-covalentes las lacasas se encuentran protegidas de alguna forma por las partículas del carbono, puede ser que se vean menormente afectadas por la acción destructiva de los radicales libres de ABTS.



Proceso de Inmovilización	Aspersión/ Incubación Lacasa (µg/ml)	Actividad Catalítica (mU/cm <sup>2</sup> )	Concentración Enzima Activa (µg/cm <sup>2</sup> )
No-Covalente <sup>a</sup>	172	0.041 (±0.004)	0.004 (±0.003)
No-Covalente <sup>b</sup>	1685	0.44 (±0.01)	0.04 (±0.002)
Covalente Directa	380	9.92 (±1.8)	0.98 (±0.2)
Covalente Directa	3792	13.60 (±1.9)	1.35 (±0.2)
Covalente Mediada	380	16.51 (±2.2)	1.64 (±0.2)
Covalente Mediada	3792	20.19 (±3.5)	2.00 (±0.3)

**Gráfica 5 y Tabla 7.** Actividad enzimática y concentración de lacasa de *C. gallica* UAMH 8260 activa inmobilizada sobre láminas de carbono. Inmovilización No-Covalente.- <sup>a</sup> Láminas de carbono de 6.25 cm<sup>2</sup> en las que se depositó una tinta preparada con 172 µg lacasa/ml tinta y 26 mg de carbón vulcan (barra amarilla, gráfica) (n=5). <sup>b</sup> Láminas de carbono de 6.25 cm<sup>2</sup> en las que se depositó una tinta preparada con 1685 µg lacasa/ml tinta y 6.5 mg de carbón vulcan (barra rosa, gráfica) (n=3). Inmovilización Covalente Directa.- Láminas de carbono de 1 cm<sup>2</sup> (previamente carboxiladas) incubadas en 380 (barra naranja, gráfica) ó 3792 µg lacasa/ml (barra roja, gráfica) (n=3-5). Inmovilización Covalente Mediada.- Láminas de carbono de 1 cm<sup>2</sup> (previamente funcionalizadas con AEBA) incubadas en 380 (barra azul claro, gráfica) ó 3792 µg lacasa/ml (barra azul oscuro, gráfica) (n=3-7). La concentración enzimática fue determinada a partir de la actividad enzimática (como en los casos anteriores). Las desviaciones estándar se indican entre paréntesis.



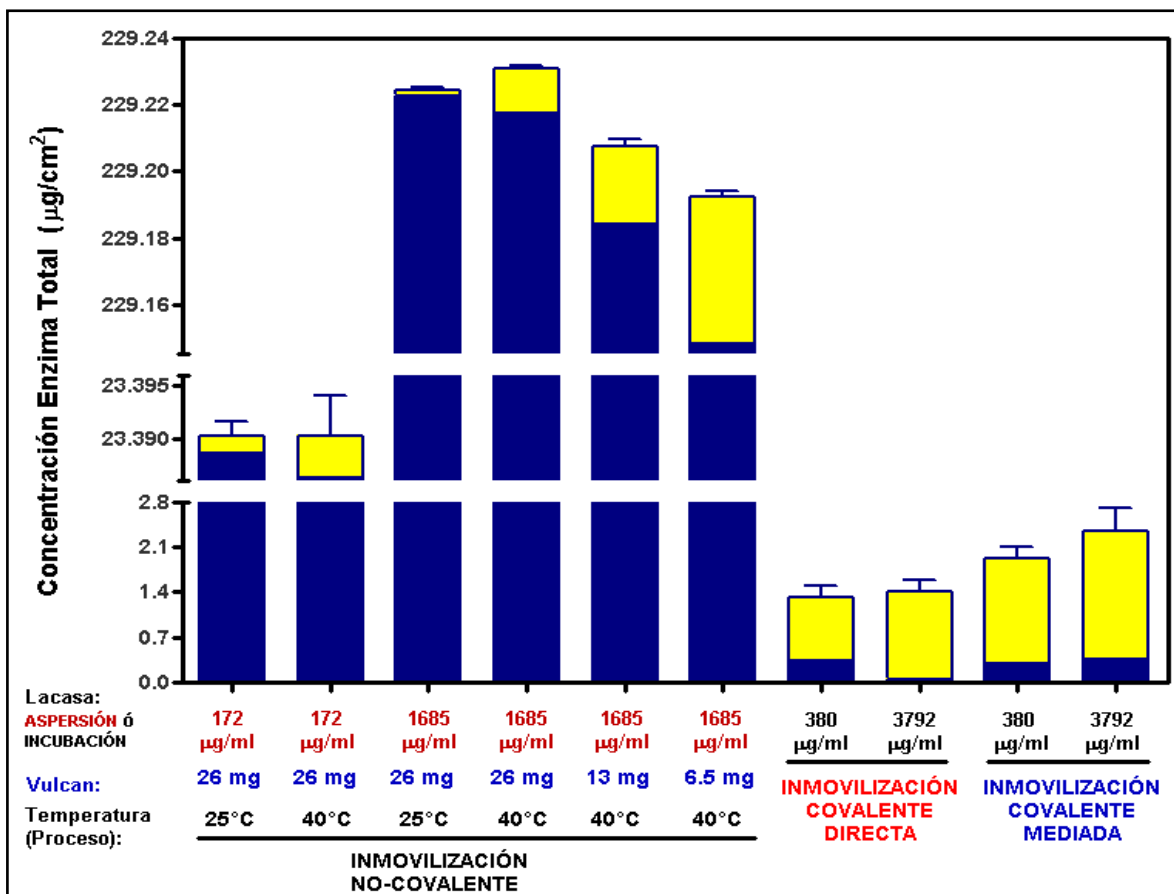
Proceso de Inmovilización	Actividad Catalítica (mU/cm <sup>2</sup> )			
	1°Medición	2°Medición	3°Medición	4°Medición
Covalente Directa	13.6	5.3	2.5	1.0
Covalente Mediada	20.2	7.4	4.7	2.4

**Gráfica 6 y Tabla 8.** Monitoreo de la actividad enzimática de *C. gallica* UAMH 8260 inmovilizada de manera covalente sobre láminas de carbono. Se realizaron mediciones de actividad enzimática (cada tercer día) para evaluar la estabilidad de la enzima inmovilizada. Inmovilización Covalente Directa (1).- Incubación de láminas de carbono de 1 cm<sup>2</sup> (previamente carboxiladas) en 3792 µg lacasa/ml (n=5). Inmovilización Covalente Mediada (2).- Incubación de láminas de carbono de 1 cm<sup>2</sup> (previamente funcionalizadas con AEBA) en 3792 µg lacasa/ml (n=7).

En la gráfica 7 (y cuarta columna en la tabla 9), se muestra una comparación de los tres métodos de inmovilización enzimática, en términos de la concentración total de lacasa por unidad de área (µg/cm<sup>2</sup>). Pero además se indica aquella concentración de lacasa inmovilizada que presenta actividad para oxidar el ABTS (región amarilla, gráfica 7; y tercera columna, tabla 9). La concentración total de enzima fue determinada por el método de Bradford, excepto las inmovilizaciones no-covalentes (donde se calculó la concentración total considerando la deposición inicial en la tinta, ver tabla 7). Como se observa en la tabla 6 y gráfica 7, en todas las inmovilizaciones no-covalentes, el 99% de enzima depositada no es detectada por actividad de oxidación del ABTS. Este porcentaje de lacasa representa aquella enzima que está embebida en la densa matriz de la tinta depositada en las láminas de carbono sin acceso al ABTS. Por otra parte, en las inmovilizaciones covalentes se exhibe que más del 60% de lacasa inmovilizada es detectada por actividad de oxidación del ABTS (indicada como la región amarilla, en la gráfica 7). Debe resaltarse que existe una cierta similitud en el total de lacasa inmovilizada entre las incubaciones hechas por inmovilización covalente directa ó mediada. Esto puede

explicarse por el número definido de posibles sitios de unión: grupos carboxilos (formados durante la funcionalización de las láminas de carbono ó provenientes de las moléculas de AEBA) a los que se enlazan químicamente los residuos aminos expuestos en la superficie de la lacasa.

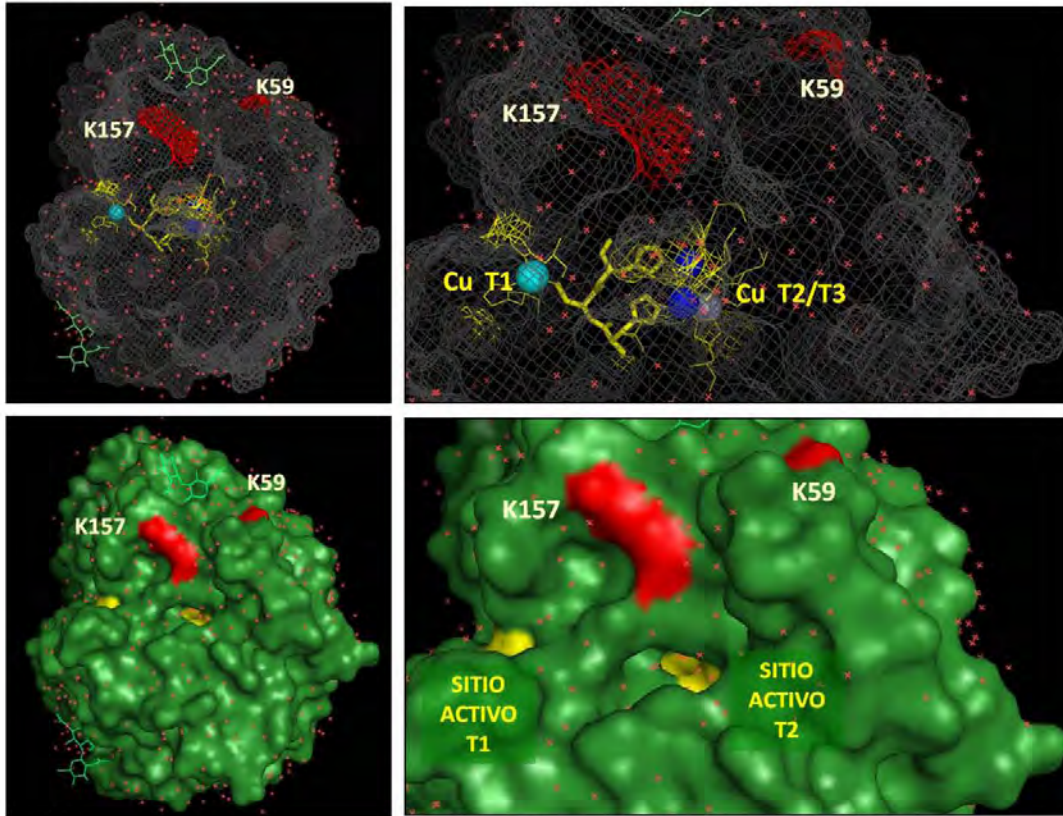
Asumiendo que el porcentaje de enzima detectada por oxidación del ABTS, representa aquella enzima que mantiene accesible su sitio T1 para la unión y oxidación de este sustrato, lo que significaría que este sitio no está orientado hacia la superficie de carbono. Bajo esta suposición, se puede hacer una estimación del porcentaje de lacasa que mantiene una orientación directa entre el T1 y la superficie de carbón en la inmovilización covalente directa ó mediada (quinta columna, tabla 9). Como se comentó en la sección de Introducción, la orientación de la lacasa inmovilizada en la superficie de carbono es fundamental en el proceso de transferencia de electrones. En este sentido, se observa que la incubación de las láminas de carbono funcionalizadas con carboxilos en 380 ó 3792  $\mu\text{g}$  lacasa/ml, la enzima orientada con sus sitios T1 orientados hacia la superficie de carbono, representan el 35.6 y 16.9 % del total de enzima inmovilizada (1.5 y 1.6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectivamente). Mientras en la inmovilización covalente mediada, las láminas derivatizadas con AEBA que se incubaron en 380 ó 3792  $\mu\text{g}$  lacasa/ml, el porcentaje de enzima con sus sitios orientados a la superficie de carbono representa el 26 % del total de enzima inmovilizada (2.24 y 2.74  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectivamente). Es importante señalar que el porcentaje de lacasa orientada con sus sitios T1 hacia la superficie de carbono es una determinación aproximada y que debe considerarse con cierta precaución; pues cabe la posibilidad de que cierta proporción de lacasa que oxide al ABTS (enzima activa) pueda estar orientada en cierta medida a la superficie de carbono, colaborando en el proceso de transferencia electrónica directa. Es bien conocido que en las proteínas redox los electrones pueden viajar a una distancia de 14 Å entre sus centros redox a través de la proteína (e.g. T1 y superficie de la proteína) [Moser *et al.*, 1992; Page *et al.*, 1999]. Esta proximidad es suficiente para permitir el paso de los electrones, descrito en la literatura como “tunnelling”, incluso a velocidades mayores que en el proceso de las reacciones enzimáticas. Por ende, puede darse la oxidación de ABTS, aun cuando el sitio T1 este ocupado.



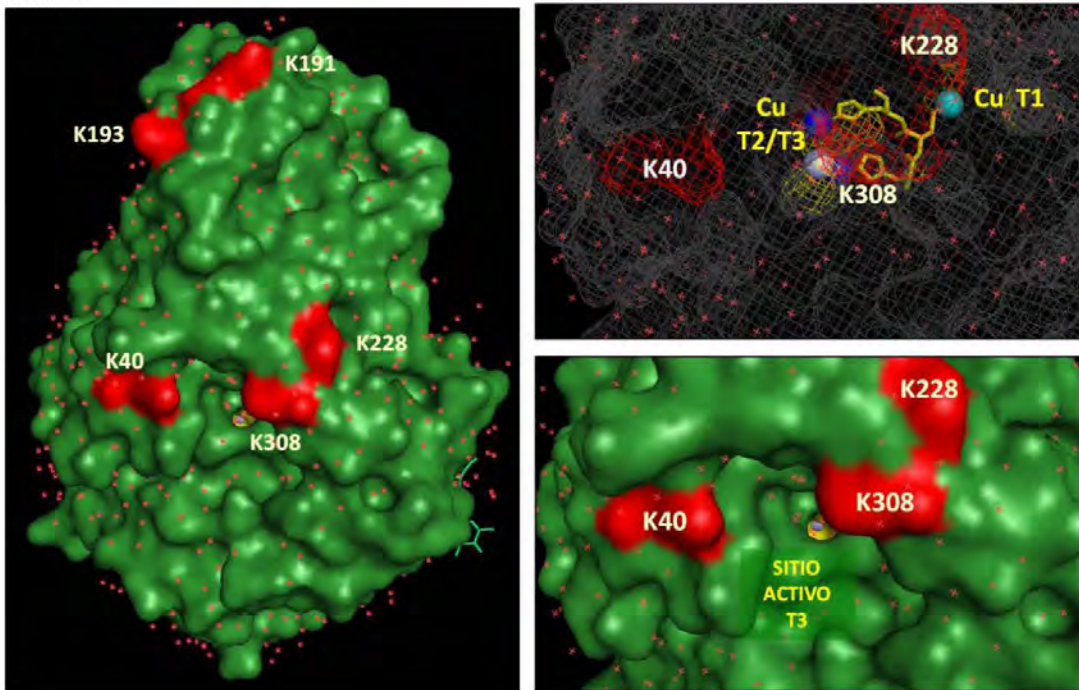
Proceso de Inmovilización	Incubación Lacasa (µg/ml)	Concentración Enzimática		Enzima T1 Orientada (%)
		por Actividad Catalítica (µg/cm <sup>2</sup> )	por Bradford (µg/cm <sup>2</sup> )	
Covalente Directa	380	0.98 (±0.2)	1.53 (±0.2)	35.6
Covalente Directa	3792	1.35 (±0.2)	1.63 (±0.7)	16.9
Covalente Mediada	380	1.64 (±0.2)	2.24 (±0.5)	26.8
Covalente Mediada	3792	2.00 (±0.3)	2.74 (±0.7)	26.6

**Gráfica 7 y Tabla 9.** Concentración de lacasa de *C. gallica* UAMH 8260 inmovilizada sobre láminas de carbono. Inmovilización No-Covalente.- láminas de carbono de 6.25 cm<sup>2</sup> en las que se depositó 172 µg lacasa/ml tinta y 26 mg de carbón vulcan a 25°C ó 40°C (n=4-5); láminas de carbono de 6.25 cm<sup>2</sup> en las que se depositaron 1685 µg lacasa/ml tinta a 25°C y a 40°C con 26, 13 ó 6.5 mg de carbón vulcan (n = 3-4). Inmovilización Covalente Directa.- láminas de carbono (previamente carboxiladas) incubadas en 380 ó 3792 µg lacasa/ml (n=3-5). Inmovilización Covalente Mediada.- láminas de carbono (previamente funcionalizadas con AEBA) incubadas en 380 ó 3792 µg lacasa /ml (n=3-7). La concentración de enzima (por actividad catalítica) fue calculada como se describió anteriormente; y es indicada en la grafica en amarillo. La concentración total de enzima fue determinada por el método de Bradford, excepto en las inmovilizaciones no-covalentes. Las desviaciones estándar se indican entre paréntesis. Enzima T1 Orientada (%).- Estimación de lacasa con el sitio T1 orientado hacia la lámina de carbono (%), fue calculado a partir de la concentración total de enzima inmovilizada y la concentración de enzima activa (es decir que reacciona al ABTS), asumiendo que aquella concentración de lacasa que no reacciona con ABTS, es debido a que tiene su sitio T1 orientado hacia la superficie de carbono.

Panel A



Panel B



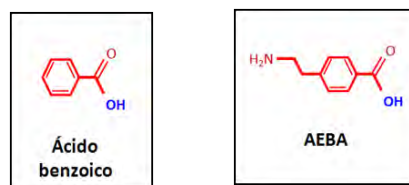
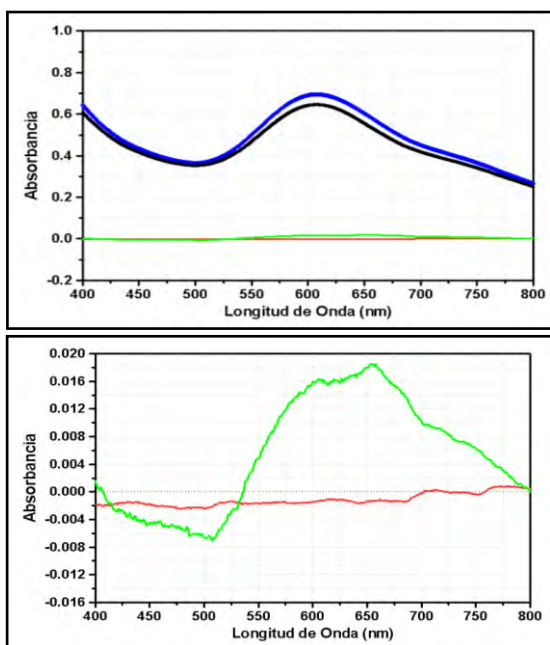
**Figura 9.** Distribución de residuos de lisina en la superficie de la lacasa de *C. gallica* UAMH 8260. Panel A y B: Residuos de lisina (K) que pueden participar en la unión covalente directa ó mediada, son mostrados en rojo. El sitio activo de la enzima (amarillo) se constituye por cuatro átomos de cobre distribuidos en un sitio T1 uninuclear (1Cu) y un sitio T2/T3 trinuclear (2Cu y 1Cu, respectivamente) que son coordinados por histidinas. Imágenes realizadas con el software de grafico molecular PyMOL (versión 1.10), a partir de los datos del PDB (Protein Data Bank).

#### **5.4 Interacción covalente de la lacasa de *C. gallica* UAMH 8260 con AEBA.**

Como se mencionó previamente, la orientación de la lacasa inmovilizada en la superficie de carbono es fundamental en el proceso de transferencia de electrones. Aunque no se realizaron experimentos que evaluaran este aspecto, es inevitable especular una posible orientación azarosa de la enzima en las inmovilizaciones no-covalentes, debido a que se trata de una técnica de aspersión. La misma conjetura puede considerarse para las inmovilizaciones covalentes directas; excepto que en este caso la orientación de la enzima será establecida por la distribución y densidad de sitios probables de unión química (grupos carboxilos y residuos amino externos de la lacasa). Por otra parte, las inmovilizaciones covalentes mediadas pueden mostrar una orientación de la lacasa sitio-específica, debido a que AEBA es un compuesto que por su naturaleza aromática puede acoplarse directamente al sitio T1 de la lacasa. Es importante considerar, en la inmovilización covalente directa ó mediada, la densidad y distribución de los residuos amino externos de la lacasa (específicamente los residuos de lisina). La lacasa de *C. gallica* UAMH 8260 presenta un total de 7 residuos de lisina, todos distribuidos en su superficie (figura 9). Es importante recalcar la presencia de tres residuos de lisina que son relevantes en la orientación de la enzima inmovilizada: lisinas 157, 40 y 308. La lisina 157 es un aminoácido cercano al sitio del cobre T1 y a uno de los cobres del sitio T2 (panel A, figura 9), que puede favorecer la óptima orientación de sitio T1 hacia la superficie de carbono. Por otra parte, las lisinas 40 y 308 están próximos al cobre del sitio T3 (panel B, figura 9). Algunos estudios de voltametría cíclica, plantean la posibilidad de una transferencia electrónica alternativo que involucra el sitio T2/T3 [Ivnitski y Atanassov, 2007]; por lo cual la orientación de la lacasa de *C. gallica* UAMH 8260 en este sitio (con respecto a la superficie de carbono), puede tener alguna relevancia en el proceso de transferencia electrónica. En este sentido, el objetivo de usar AEBA es el de inducir que esta molécula interactúe como ligando con el sitio T1 de la lacasa y después se uniera covalentemente de manera orientada. Por el otro lado, la inmovilización directa los carboxilos de la superficie del carbón pueden unirse covalentemente con cualquiera de los aminos libres de las lisinas localizadas en la superficie de la proteína.



Dado lo anterior, se realizó una medición de la interacción del ácido benzoico que es similar a la parte del AEBA (figura 10) que interactuaría con la región de la lacasa donde se encuentra el sitio T1. Para llevar a cabo este ensayo, se determinó el cambio de espectro de absorbancia en la región del cobre T1. La absorbancia del cobre T1 de la lacasa de *C. gallica* detectada a los 609 nm (línea azul, panel superior de la gráfica 8), es modificada con la presencia del ácido benzoico (línea negra, panel superior de la gráfica 8); esto indica una alteración del sitio T1 por la presencia del ácido benzoico, que se interpreta como una interacción del ácido benzoico como ligando de la lacasa. El ácido benzoico interactúa con el sitio T1 de la lacasa con una constante de asociación ( $K_A$ ) de  $6.6 \mu\text{M}$  ( $\pm 0.11$ ). La diferencia (normalizada) entre los valores de absorbancia del ácido benzoico y de la lacasa (línea verde, panel superior e inferior de la gráfica 8) en comparación con la absorbancia del ácido benzoico (línea roja, panel superior e inferior de la gráfica 8) exhibe una notable interacción. Estos resultados sugieren una interacción del AEBA (unido por su extremo amino a la superficie de carbono) con la región donde se encuentra el cobre T1 de la lacasa de *C. gallica*, en los cátodos de lacasa. En adición a estos resultados, debe mencionarse que existe nula actividad en láminas de carbono (derivatizadas con AEBA) incubadas en  $3792 \mu\text{g}$  lacasa/ml MES sin la presencia de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC) (demostrando que existe un enlace covalente cuando EDC está presente). El EDC es un agente activador de la reacción de condensación entre los grupos amino y carboxilo. Esto representa que existe una unión química entre el residuo amino de la lisina y el grupo carboxilo del AEBA; aunque no se descarta la posible interacción del anillo aromático del AEBA con el sitio T1.



**Figura 10.** Estructura química del ácido benzoico y del ácido 4-[2-aminoetil] benzoico (AEBA).

**Gráfica 8.** Interacción del ácido benzoico con la región del sitio cobre T1 de la lacasa de *C. gallica* UAMH 8260. El panel superior muestra la medición espectrofotométrica de la absorbancia en un rango de longitud de onda (nm) del ácido benzoico (línea roja), y de la lacasa en ausencia (línea azul) ó en presencia de ácido benzoico (línea negra). La diferencia (normalizada) entre los valores de absorbancia del ácido benzoico y la lacasa son mostrados (línea verde). El panel inferior muestra la absorbancia del ácido benzoico (línea roja) y la diferencia de absorbancia (normalizada) entre el ácido benzoico y la lacasa (línea verde).

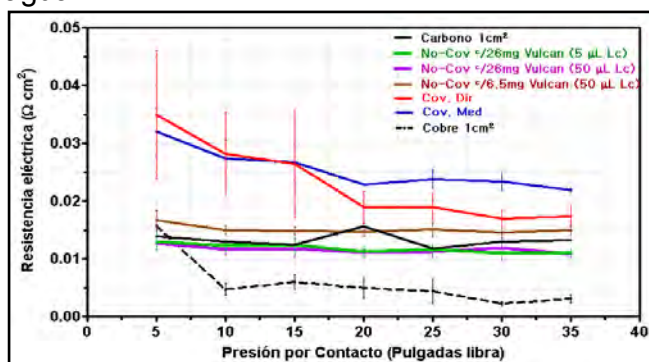
## 5.5 Caracterización eléctrica y electroquímica de cátodos de lacasa.

Como se explicó en la sección de Métodos, se empleara el término de “cátodo de lacasa” (en lugar de “electrodo de lacasa”) para referirse a cualquier tipo de inmovilización enzimática. Este término será utilizado, aunque no sea integrado (como es el caso de las inmovilizaciones no-covalentes) en el electrodo positivo de la celda de combustible enzimática que se pretende. De esta forma, se evitara la confusión con otro tipo de electrodos que comúnmente se emplean en electroquímica. Dicho lo anterior, la caracterización de los cátodos de lacasa se inició con la evaluación de la resistencia eléctrica de contacto. La resistencia eléctrica de contacto fue monitoreada conforme se incrementaba la presión de las placas de cobre sobre el cátodo de lacasa, tras la aplicación del método de impedancia (gráfica 9). Los valores de resistencia eléctrica superficial (tabla 10) fueron obtenidos a una presión de 35 pulgadas libra, debido que es el valor donde existe mejor contacto superficial entre el cátodo de lacasa y las placas de cobre. Como se muestra en la tabla 10, existe una mayor resistencia (y por ende una menor conductividad) en los cátodos de lacasa elaborados por inmovilización covalente directa ( $14.52 \text{ m}\Omega\cdot\text{cm}^2$ ) y mediada ( $19.35 \text{ m}\Omega\cdot\text{cm}^2$ ), que en aquellos fabricados por inmovilización no-covalente. En los cátodos de lacasa elaborados por aspersion de  $1685 \mu\text{g}$  lacasa/ml tinta con  $6.5 \text{ mg}$  de carbón vulcan exhiben una mayor resistencia ( $12.07 \text{ m}\Omega\cdot\text{cm}^2$ ), que aquellos elaborados por aspersion de  $172 \mu\text{g}$  lacasa/ml tinta ó  $1685 \mu\text{g}$  lacasa/ml tinta con  $26 \text{ mg}$  de carbón vulcan ( $7.83 \text{ m}\Omega\cdot\text{cm}^2$  y  $8.21 \text{ m}\Omega\cdot\text{cm}^2$ , respectivamente).

A partir de los resultados anteriores se puede establecer que: la concentración de lacasa inmovilizada influye en la resistencia eléctrica, para el caso de los cátodos elaborados por inmovilización covalente; no obstante, la concentración de lacasa inmovilizada no parece ser significativa en la resistencia eléctrica en los cátodos hechos por inmovilización no-covalente. La resistencia eléctrica de los cátodos de inmovilización no-covalente se encuentra mayormente relacionada con la cantidad de carbón vulcan depositada. Con respecto a este último, debe señalarse que el aumento de carbón vulcan en la composición de la tinta, se manifiesta en un decremento de la resistencia eléctrica. Este efecto se puede explicar por las propiedades electro-conductoras de las partículas de carbón (componente básico de la tinta); por ello, al depositarse mayor cantidad de carbón vulcan se incrementa la conductividad de los cátodos de lacasa. En este sentido, los



cátodos de lacasa elaborados por inmovilización no-covalente (principalmente aquellos en donde se deposita mayor cantidad de carbón vulcan) presentan una ventaja con respecto a los cátodos de lacasa producidos de forma covalente. Sin embargo, por el problema de la orientación de la lacasa que se señaló anteriormente, estos cátodos de lacasa no parecen ser la opción adecuada. Por otra parte debe resaltarse que la presencia de tetrafluoretileno (teflón) en las láminas de carbón puede explicar la mayor resistencia superficial de las láminas de carbono que no contienen enzima inmovilizada (gráfica 9 y tabla 10). Las láminas de carbono (GDL 30 BC de <sup>®</sup>SIGRACET) usadas en todos los procesos de inmovilización, son un material que se emplea comúnmente como difusor de gases en celdas de combustible químicas. Estas láminas de carbono son adquiridas del fabricante, con una capa microporosa y un recubrimiento de tetrafluoretileno (teflón) para evitar el paso de moléculas de agua.



Electrodo	Proceso de Inmovilización	Concentración Enzima ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Resistencia Superficial ( $\text{m}\Omega \cdot \text{cm}^2$ )	Resistividad ( $\text{m}\Omega \cdot \text{cm}^2/\text{cm}$ )	Conductividad (Siemens/cm)
Carbono	Ninguno	0	8.70 ( $\pm 2.1$ )	28.02	$3.60 \times 10^{-6}$
Carbono/Lacasa	No-Covalente <sup>a</sup>	23.40	7.83 ( $\pm 0.6$ )	25.26	$3.95 \times 10^{-6}$
Carbono/Lacasa	No-Covalente <sup>b</sup>	229.23	8.21 ( $\pm 0.5$ )	26.50	$3.80 \times 10^{-6}$
Carbono/Lacasa	No-Covalente <sup>c</sup>	229.20	12.07 ( $\pm 1.6$ )	38.95	$2.60 \times 10^{-6}$
Carbono/Lacasa	Covalente Directa	1.63	14.52 ( $\pm 3.1$ )	46.85	$2.13 \times 10^{-6}$
Carbono/Lacasa	Covalente Mediada	2.74	19.35 ( $\pm 0.6$ )	62.44	$1.60 \times 10^{-6}$

**Gráfica 9 y Tabla 10.** Resistencia eléctrica de cátodos de lacasa de *C. gallica* UAMH 8260 ( $1 \text{ cm}^2$ ). Las mediciones se realizaron mediante la aplicación de un potencial eléctrico AC de 10 mV, entre cada 5 pulgadas libra de presión ejercida por las placas de cobre. La resistencia eléctrica superficial obtenida a 35 pulgadas libra de presión se le resta la resistencia de las placas de cobre de  $2.88 \text{ m}\Omega \cdot \text{cm}^2$  (línea negra discontinua). La resistividad ( $\rho$ ) fue calculada a partir del área y grosor de las láminas de carbono ( $1 \text{ cm}^2$  y  $0.31 \text{ mm}$ , respectivamente). La conductividad fue calculada como el inverso de la resistividad ( $\sigma = 1/\rho$ ). Inmovilización No-Covalente.- Aspersión de 26 mg de carbón vulcan y 5 <sup>a</sup> (línea verde) ó 50  $\mu\text{l}$  de una solución de lacasa ( $75.85 \text{ mg/ml}$ ) <sup>b</sup> (línea morada). Aspersión de 6.5 mg de carbón vulcan y 50  $\mu\text{l}$  de una solución de lacasa ( $75.85 \text{ mg/ml}$ ) <sup>c</sup> (línea café). La concentración final de lacasa en la tinta fue de 172 y 1685  $\mu\text{g}$  lacasa/ml de tinta, respectivamente. Inmovilización Covalente Directa.- Incubación láminas de carbono (previamente carboxiladas) en 3792  $\mu\text{g}$  lacasa/ml (línea roja). Inmovilización Covalente Mediada.- Incubación láminas de carbono (previamente derivatizadas con AEBA) en 3792  $\mu\text{g}$  lacasa/ml (línea azul). Control: Lámina de carbono sin lacasa (línea negra continua). Los valores son mostrados como promedio ( $n=3-4$ ). Las desviaciones estándar se indican entre paréntesis.

El potencial en circuito abierto (OCP por sus siglas en inglés) es un parámetro electroquímico que se obtiene al medir una diferencia de potencial eléctrico entre dos pares redox ó electrodos, sin permitir el paso de corriente eléctrica (de ahí la denominación de circuito abierto). El OCP entre dos pares redox es un indicador de la fuerza electromotriz, que puede generarse en un flujo de electrones (dentro de un circuito eléctrico cerrado). Es por ello que es importante evaluar este parámetro para establecer los pares redox que proporcionen una mayor fuerza electromotriz en la celda de combustible que se pretende [Larminie y Dicks, 2003; Bagotsky, 2006]. Primero se determinó el OCP de cada uno de los cátodos de lacasa, con respecto a un electrodo de referencia de calomel  $\text{Hg}/\text{HgCl}_2$ ,  $\text{KCl}$  saturado (SCE por sus siglas en ingles). En un sistema electroquímico, el electrodo de trabajo (WE) se define como el electrodo en el cual ocurre la reacción de interés; en este caso, cada uno de los cátodos de lacasa. El electrodo de referencia (RE) es aquel electrodo que mantiene un potencial eléctrico definido, que alcanza por el uso de un sistema redox interno de concentración constante (en el caso del SCE, el sistema redox es  $\text{Hg}/\text{HgCl}_2$  en una solución de  $\text{KCl}$  saturada). Entre los RE más empleados se encuentran el electrodo de hidrógeno estándar (SHE) ó normal (NHE), el electrodo de calomel saturado (SCE) ó normal (NCE), el electrodo de  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ , electrodo de  $\text{Hg}/\text{HgO}$ , el electrodo de  $\text{Ag}/\text{Ag}_2\text{SO}_4$ , y el electrodo de  $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{SO}_4$  [Larminie y Dicks, 2003; Spiegel, 2007].

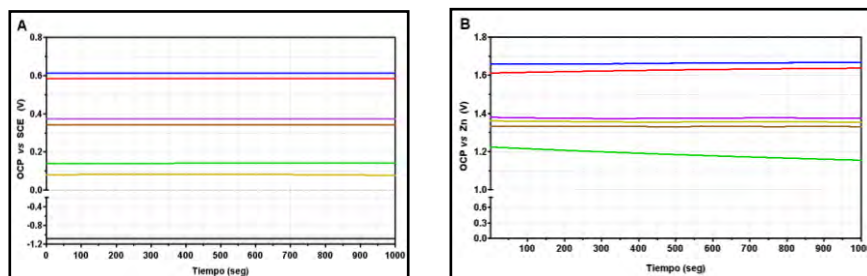
Las mediciones de OCP se realizaron en función del tiempo, con el objetivo de determinar la estabilidad del OCP (grafica 10A; y tabla 11). Los datos graficados en las gráficas 10A y 10B corresponden a una estabilización del OCP, después de 30 minutos de sumergirse en la solución electrolito (solución de succinato). En el caso de los cátodos de lacasa, se observó un incremento gradual del OCP que se estabilizó después de los primeros 10 ó 20 minutos de haberse sumergido en la solución electrolito-amortiguadora de succinato (datos no mostrados). Este comportamiento se relaciona con la activación electroquímica del WE; es decir se produce un desplazamiento de partículas cargadas eléctricamente hacia la interface de la superficie del WE-electrolito (es decir, la interface del cátodo de lacasa y la solución amortiguadora de succinato) hasta alcanzarse un equilibrio eléctrico y de concentración [Spiegel, 2007]. Específicamente este equilibrio electroquímico se origina en la superficie de la lacasa, la cual se encuentra cargada eléctricamente (por efecto de sus residuos aminoácidos cargados). La estabilización del OCP indica que este equilibrio electroquímico se ha alcanzado. En el caso de las mediciones de OCP del platino

y el zinc, no se presentó este fenómeno electroquímico; ya que se presenta la formación de un par redox de manera inmediata [Larminie y Dicks, 2003; Spiegel, 2007].

El OCP de cada uno de los WE (con respecto al SCE) es presentado en la grafica 10A y tabla 11 (cuarta columna). Se aprecia que existe ligera diferencia entre los cátodos de lacasa elaborados por inmovilización covalente directa ó mediada (0.58 V y 0.61 V vs SCE, respectivamente), y aquellos fabricados por inmovilización no-covalente (0.37 y 0.34 V vs SCE para aspersiones de tintas con 26 mg y 6.5 mg de carbón vulcan, respectivamente). El valor de OCP de los cátodos de lacasa hechos por inmovilización covalente directa ó mediada es similar a los reportados en otros cátodos de lacasa (0.53 V vs SCE en Paltmore y Kim, 1999). El OCP de un WE es un indicador de su energía potencial, que se encuentra almacenada como una diferencia de potencial electroquímico [Larminie y Dicks, 2003; Spiegel, 2007]. En este sentido, los cátodos de lacasa hechos por inmovilización covalente presentan una mejor energía potencial que aquellos elaborados por inmovilización no-covalente. Por otra parte, se exhibe una mayor diferencia de los cátodos de lacasa con respecto a las láminas de carbono sin lacasa inmovilizada (que presentan un OCP de 0.14 V vs SCE) (línea verde, grafica 10A; y tabla 11). Nótese que la concentración de lacasa inmovilizada, no parece tener relación con el OCP. Más que la concentración de lacasa inmovilizada, la densidad de grupos cargados eléctricamente (es decir, residuos aminoácidos de la lacasa), puede ser relevante para mantener un potencial electroquímico. En los cátodos de lacasa elaborados por inmovilización no-covalente, las partículas de carbón depositadas pueden mantener ciertas interacciones electrostáticas con los residuos aminoácidos; de esta manera se reduce el número de cargas eléctricas que participan en la formación del potencial electroquímico.

El platino es un metal que se utiliza en las celdas de combustible convencionales, como catalizador químico de la reducción del  $O_2$  [Larminie y Dicks, 2003]. Se realizaron mediciones de OCP del platino (línea amarilla, grafica 10A; y tabla 11) para tener un punto de comparación de los cátodos de lacasa, en términos de energía potencial. Se observa una diferencia significativa entre los cátodos de lacasa, en general, con relación al platino (que presenta un OCP de 0.08 V vs SCE). Cabe mencionar que el platino evaluado en esta prueba, posee diferentes características que el platino empleado como catalizador en las celdas de combustible químicas. El platino que se emplea en las celdas de combustible químicas, es reconocido como platino grado "fuel cell" nanométrico, y es soportado en

carbono mediante enlaces. El platino evaluado en esta medición de OCP, es usualmente empleado como contraelectrodo (CE por sus siglas en ingles, también denominado como electrodo contador) en algunas técnicas de electroquímica [Bagotsky, 2006; Spiegel, 2007]. Dado lo anterior, no se puede hacer una comparación entre los cátodos de lacasa y el platino. Por otra parte, se realizaron mediciones de OCP del zinc (línea negra, grafica 10A; y tabla 11) para conocer su energía potencial. A diferencia del resto de WE evaluados, el zinc presenta un OCP negativo (-1.08 V vs SCE). Este OCP es similar al potencial redox del zinc en solución amortiguadora de acetatos pH 4.5 [Palmore y Kim, 1999]. El signo negativo no representa más que una diferencia significativa del OCP del zinc con respecto a los cátodos de lacasa. Como en el caso del platino, el OCP del zinc se mantiene estable inmediatamente de haberse sumergido en la solución amortiguadora de succinato. Es decir, no se observa un incremento del OCP inicial como en los cátodos de lacasa, formándose rápidamente el par redox [Larminie y Dicks, 2003; Spiegel, 2007].



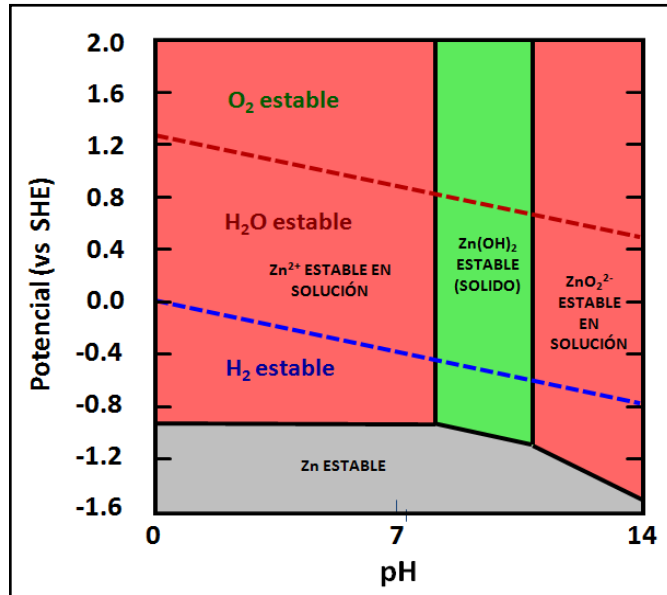
Electrodo	Proceso de Inmovilización	Concentración Enzimática ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	OCP vs SCE (V)	OCP vs Zn (V)
Carbono	Ninguno	0	0.14	1.16
Carbono/Lacasa	No-Covalente <sup>a</sup>	229.23	0.34	1.33
Carbono/Lacasa	No-Covalente <sup>b</sup>	229.20	0.37	1.35
Carbono/Lacasa	Covalente Directa <sup>c</sup>	1.35	0.58	1.64
Carbono/Lacasa	Covalente Mediada <sup>d</sup>	2.00	0.61	1.68
Platino	Ninguno	0	0.08	1.35
Zinc	Ninguno	0	-1.08	ND

**Gráfica 10 y Tabla 11.** Potencial en circuito abierto (OCP) de cátodos de lacasa de *C. gallica* UAMH 8260 (1 cm<sup>2</sup>) elaborados por aspersión de 50  $\mu\text{l}$  de una solución de lacasa (75.85 mg/ml) con 26 (<sup>a</sup> línea café) ó 6.5 mg de carbón vulcan (<sup>b</sup> línea morada), por inmovilización covalente directa (<sup>c</sup> línea roja), y por inmovilización covalente mediada (<sup>d</sup> línea azul). Controles: láminas de carbono sin lacasa (1 cm<sup>2</sup>) (línea verde), lámina de zinc de 22.5 cm<sup>2</sup> (línea negra), y barra de platino (línea amarilla). Los valores son mostrados como promedio (n=3). Inmovilizaciones covalentes.- Incubación láminas de carbono funcionalizadas en 3792  $\mu\text{g}$  lacasa/ml. La diferencia de potencial en circuito abierto con respecto al zinc, se presenta en la última columna. **Gráfica 10A.** Evaluación del OCP en función del tiempo, de cada uno de los electrodos de trabajo (WE) con respecto al electrodo de calomel Hg/HgCl<sub>2</sub>, KCl saturado (SCE). Cada uno de los WE y el SCE fueron inmersos en amortiguadora de succinato 50 mM pH 4.5 **Gráfica 10B.** Evaluación de la diferencia de OCP en función del tiempo, entre el zinc y los WE (sumergidos en solución amortiguadora de succinato 50 mM pH 4.5).

Una vez evaluado el OCP de los cátodos de lacasa y del zinc, de forma independiente, el siguiente paso consistió en determinar la diferencia de potencial en circuito abierto entre cada uno de los cátodos de lacasa con respecto al zinc. Como se muestra en la gráfica 10B y en la tabla 11 (quinta columna), el OCP del acoplamiento redox del zinc con alguno de los cátodos de lacasa elaborados por inmovilización covalente directa ó mediada exhibe una ligera diferencia que en los acoplamientos redox del zinc con alguno de los cátodos fabricados por inmovilización no-covalente. El OCP en los acoplamientos del zinc con los cátodos de lacasa hechos por inmovilización covalente directa (línea roja, grafica 10B; y tabla 11) ó mediada (línea azul, grafica 10B; y tabla 11), es de 1.63 y 1.66 V, respectivamente; en tanto que el OCP es de 1.33 y 1.37 V en los acoplamientos del zinc con los cátodos de lacasa hechos por inmovilización no-covalente por aspersión de 1685 µg lacasa/ml tinta con 26 (línea café, grafica 10B; y tabla 11) ó 6.5 mg de carbón vulcan (línea morada, grafica 10B; y tabla 11), respectivamente. Debe resaltarse que el valor del OCP en cada acoplamiento redox es aproximado a la suma de los OCP del zinc y del correspondiente cátodo de lacasa, determinados de manera independiente (obsérvese la grafica 10A; y la cuarta columna de la tabla 11).

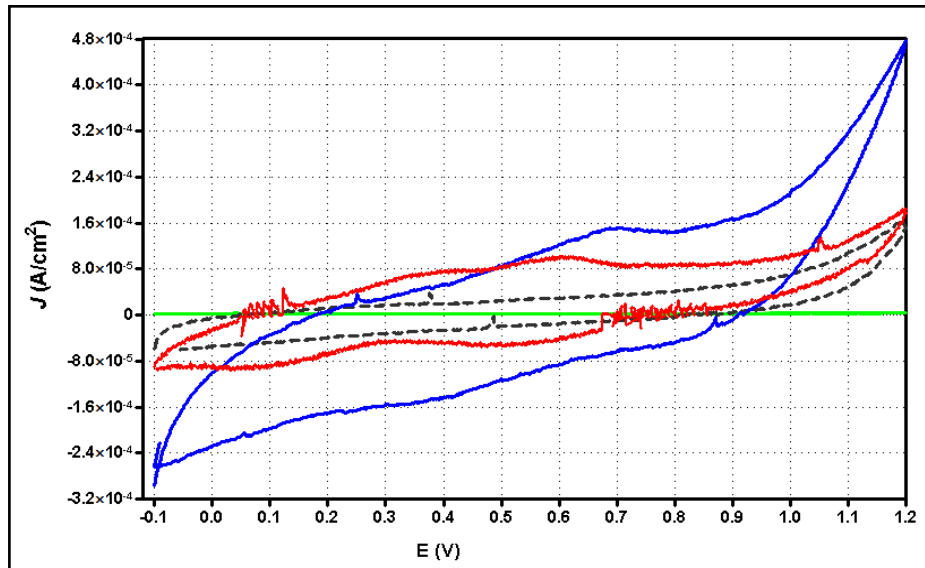
Por otra parte, el acoplamiento redox zinc-platino (línea amarilla, grafica 10B; y tabla 11) presenta un valor de OCP (1.35 V) menor que el acoplamiento electroquímico del zinc con los cátodos de lacasa de inmovilización covalente; pero semejante al acoplamiento electroquímico del zinc con los cátodos de lacasa de inmovilización no-covalente. No obstante, como se había comentado el platino que se evaluó, posee diferentes propiedades al platino catalítico; por ello que no resulta conveniente la comparación. Finalmente, debe mencionarse que el acoplamiento redox zinc-carbono (sin enzima), exhibe una diferencia de OCP de 1.15 V (línea verde, grafica 10B; y tabla 11). Esto significa que existe una separación de cargas eléctricas en la interface de la superficie de la lámina de carbono-solución electrolito. El OCP del par electroquímico Zn-C, no indica que el carbono completa el proceso de oxido-reducción en circuito eléctrico cerrado (donde se permite el paso de electrones generados por el Zn), debido a que el carbono no cataliza la reducción del O<sub>2</sub>.

**Figura 11.** Diagrama de Pourbaix del zinc. Este esquema describe la zona de estabilidad química (inmunidad), la zona de reactividad química (corrosividad), y la zona de no-reactividad (pasividad), en función del pH de la solución donde se encuentre inmerso y del potencial eléctrico establecido (el cual se pondera con respecto al electrodo de hidrógeno saturado (SHE, por sus siglas en inglés). [Tomado y modificado de Bagotsky, 2006].



La solución amortiguadora de succinato a pH 4.5, es importante para la óptima actividad de la lacasa [Tinoco *et al.*, 2001]; además de ser el pH adecuado para la oxidación del zinc, según su diagrama de Pourbaix (figura 11). Los diagramas de Pourbaix son representaciones que proporcionan información acerca del comportamiento electroquímico de un metal en función del pH y del potencial eléctrico. Los diagramas de Pourbaix predicen las tres zonas electroquímicas de un metal: una zona de inmunidad, una zona de pasivación y una zona de corrosión. Para el zinc, la zona de inmunidad (área color gris, figura 11) es aquella donde el metal mantiene una estabilidad química (la oxidación es termodinámicamente imposible). La zona de pasivación (área color verde, figura 11) es aquella que se caracteriza por la no-reactividad química del metal (la oxidación es posible, pero es gradualmente abatida por la acumulación del producto sólido de la corrosión, sobre la superficie metálica). La zona de corrosión es aquella donde se favorece termodinámicamente la oxidación del zinc, acompañada por la reducción del  $H^+$  (área color rojo, debajo de la línea discontinua azul, figura 11) ó del  $O_2$  (área color rojo, debajo de la línea discontinua roja, figura 11); ó bien, la oxidación requiere de un agente oxidante como el  $O_2$  (área color rojo, arriba de la línea discontinua roja, figura 11) [Bagotsky, 2006; Spiegel, 2007]. La oxidación del zinc es un aspecto que debe considerarse para el diseño y construcción de la celda de combustible híbrida. Por lo que, el zinc debe de encontrarse en la zona de corrosión, para permitir su oxidación y la subsecuente liberación de electrones (además de cationes de zinc). Cabe mencionar que inmediatamente de sumergir una parte de la lámina de zinc, en solución amortiguadora de succinato pH 4.5, se hace evidente su

oxidación. La parte de la lámina de zinc inmersa en la solución amortiguadora de succinato, se visualiza como una superficie opaca a diferencia del resto de la lámina no sumergida.



**Gráfica 11.** Voltamperometría cíclica de cátodos de lacasa de *C. gallica* UAMH 8260 ( $1 \text{ cm}^2$ ). Las mediciones se realizaron con ayuda de un potenciostato 1287-Solartron y el software CorrWare, a  $10 \text{ mV/s}$ . Cada uno de los cátodos fue inmerso en solución amortiguadora de succinato  $50 \text{ mM}$   $\text{pH}$   $4.5$ . Inmovilización Covalente Directa en presencia de  $\text{O}_2$  (línea roja). Inmovilización covalente mediada en presencia de  $\text{O}_2$  (línea azul) ó  $\text{N}_2$  (línea negra discontinua). Control: Lámina de carbono sin enzima (línea verde). Un electrodo de platino y un SCE fueron empleados como CE y RE, respectivamente. El SCE tiene un potencial eléctrico de  $+0.2412 \text{ V}$  vs al electrodo de hidrógeno estándar (SHE). Los datos corresponden al cuarto ciclo.

Por otra parte, se realizaron voltamperometrías cíclicas de los electrodos de lacasa, las cuales se realizaron a  $10 \text{ mV/s}$  (gráfica 11). Tanto en los cátodos de lacasa de inmovilización covalente mediada, como en la directa se muestra un ciclo electroquímico cuasireversible. Los cátodos de lacasa elaborados por inmovilización covalente mediada, presentan un pico anódico de  $1.5 \times 10^{-4} \text{ A}/\text{cm}^2$  (a  $0.7 \text{ V}$  vs SCE) y un pico catódico poco perceptible de  $-1.4 \times 10^{-4} \text{ A}/\text{cm}^2$  (a  $0.4 \text{ V}$  vs SCE) (línea azul, gráfica 11); mientras aquellos cátodos producidos por inmovilización covalente directa exhiben un pico anódico de  $1.0 \times 10^{-5} \text{ A}/\text{cm}^2$  (a  $0.62 \text{ V}$  vs SCE) y un poco perceptible pico catódico de  $-5.4 \times 10^{-5} \text{ A}/\text{cm}^2$  (a  $0.5 \text{ V}$  vs SCE) (línea roja, gráfica 11). Estos picos farádicos de oxidación (anódico) y de reducción (catódico) son abatidos por la presencia de  $\text{N}_2$  (línea negra discontinua, gráfica 11). Asimismo, se realizaron mediciones voltamperométricas de láminas de carbono sin lacasa (control negativo) que se encuentran en rangos de densidad de corriente eléctrica de  $10^{-6} \text{ A}/\text{cm}^2$ , sin mostrar picos farádicos (línea verde, gráfica 11). Obsérvese que en ambas voltamperometrías de los cátodos de lacasa, el punto medio

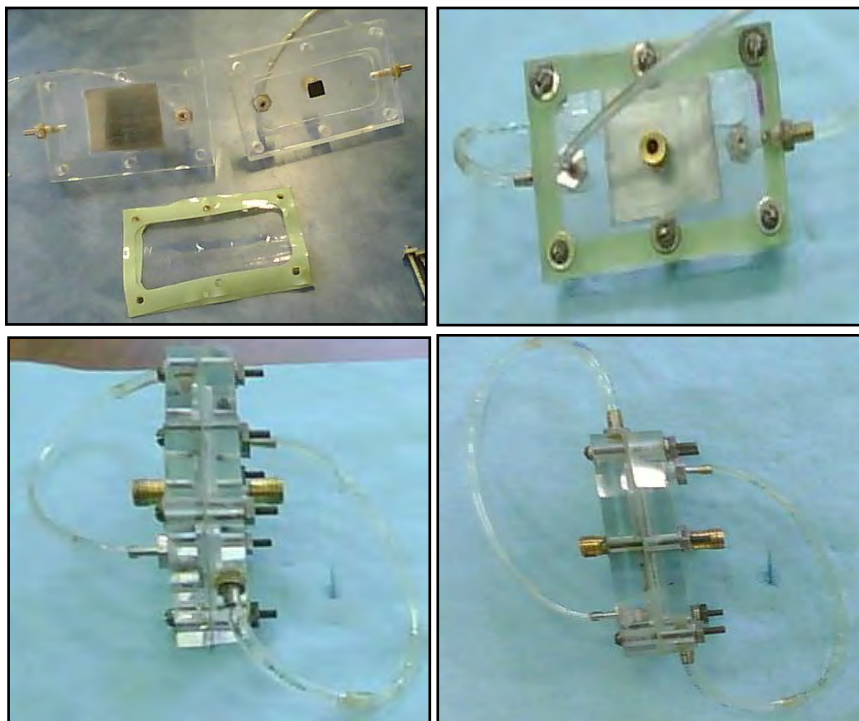
entre el pico farádico anódico y catódico (550 mV vs SCE) es aproximado al potencial redox ( $E^\circ$ ) del sitio T1 de lacasa de *T. hirsute* [Vaz-Dominguez *et al.*, 2008], y de otras lacasas provenientes de organismos fúngicos como *Cerreña maxima*, *T. versicolor* y *T. ochracea*, *T. trogii* (780 mV vs SHE) [Morozova *et al.*, 2007]. Esto significa que la lacasa de *C. gallica* corresponde a la categoría de lacasas con alto potencial redox ( $E^\circ$ ) en el sitio T1 (730-790 mV vs SHE). Cabe adicionar que la lacasa de *C. gallica* al igual que este grupo de lacasas presentan un aminoácido-ligando axial (fenilalanina) en la secuencia de aminoácidos que constituyen el “pocket” del sitio T1. Este aminoácido-ligando axial puede ser fundamental en el proceso de unión y oxidación de sustratos de lacasa, en otras palabras puede ser trascendente en la eficiencia catalítica de la enzima [Morozova *et al.*, 2007].

## **5.6 Construcción y caracterización electroquímica de la celda de combustible enzimática híbrida.**

La celda de combustible integrada por una lámina de zinc (22.5 cm<sup>2</sup>) y un cátodo de carbono (1 cm<sup>2</sup>), fue conformada por un ánodo de mayor dimensión que el cátodo, con la finalidad de evitar que el proceso de oxidación fuera la reacción limitante en la celda electroquímica. El cátodo de lacasa utilizado en la celda electroquímica, fue elaborado por inmovilización covalente directa ó mediada; debido a que presentan mejores características en términos de concentración de enzima activa inmovilizada (aspecto íntimamente relacionado con la orientación del sitio T1 hacia la superficie de carbono) y electroquímica (como se demostró anteriormente). Ambos electrodos fueron separados por una membrana de intercambio protónico de Nafion<sup>®</sup> (un tipo de membrana que es ampliamente usada en la construcción de celdas de combustible químicas), permitiendo de esta manera la difusión selectiva de H<sup>+</sup> hacia el cátodo y previniendo el paso de oxígeno a la superficie de zinc [Smolander *et al.*, 2008; Szot *et al.*, 2009]. La solución amortiguadora de succinato 50 mM pH 4.5 fue el electrolito empleado en ambos compartimentos de la celda. Los electrodos de la celda electroquímica fueron acoplados con tornillos de acero inoxidable, los cuales establecieron el punto de conexión del circuito externo (que es por donde fluyen los electrones) (figura 12). Para evitar confusiones entre las diferentes celdas de combustible enzimáticas híbridas, aquellas celdas conformadas por el ánodo de zinc y un cátodo de lacasa elaborado por inmovilización covalente directa, serán denominadas como Zn-lacasa<sup>DIR</sup>; en cambio, las celdas que se constituyan por el ánodo de zinc y un cátodo de



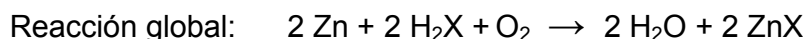
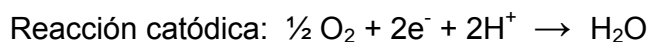
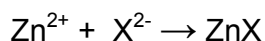
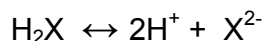
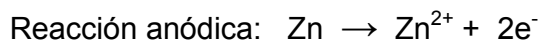
lacasa producido por inmovilización covalente mediada por AEBA, serán designadas como Zn-lacasa<sup>MED</sup>. Es importante recalcar, que a diferencia de otras celdas constituidas por un ánodo de Zn y un cátodo de lacasa que emplean ABTS como un mediador redox efímero [Palmore y Kim, 1999; Smolander *et al.*, 2008], las celdas Zn-lacasa<sup>MED</sup> utilizan AEBA como un espaciador que media la unión química entre la enzima y la superficie de carbono.



**Figura 12.** Celda de combustible Zn-lacasa. El panel superior izquierdo muestra la celda desarmada; la cual se constituye por la placa de zinc de 22 cm<sup>2</sup> (ánodo) y el cátodo de lacasa (1 cm<sup>2</sup>) sujetos en el armazón de acrílico, y una membrana de Nafion (180 μm de espesor) entre dos sellos a base de Silastic®. El armazón de acrílico se conformaba de dos compartimentos (sujetados por tornillos), cada uno con su respectivo punto de contacto eléctrico (tornillo de acero inoxidable) y una manguera de plástico. A través de la manguera de plástico del compartimento catódico se suministró el O<sub>2</sub>. Los paneles superior derecho e inferior exponen a la celda armada (conteniendo solución amortiguadora de succinato 50 mM pH4.5 como electrolito) desde diferentes vistas.

El mecanismo de funcionamiento de la celda de combustible enzimática híbrida Zn-lacasa, consiste en la oxidación del zinc (reacción anódica); acompañada por la reducción de oxígeno (reacción catódica) [Smolander *et al.*, 2008]. La oxidación del zinc es una reacción favorecida por el pH 4.5 de la solución electrolito-amortiguadora de succinato, y por el potencial eléctrico de la celda (como se indica en el diagrama de Pourbaix del zinc, ver figura 11). La reducción del oxígeno es una reacción catalizada por la lacasa

inmovilizada [Baldrian *et al.*, 2006; Morozova *et al.*, 2007]. Las reacciones electroquímicas que se proponen están dadas por las siguientes ecuaciones:



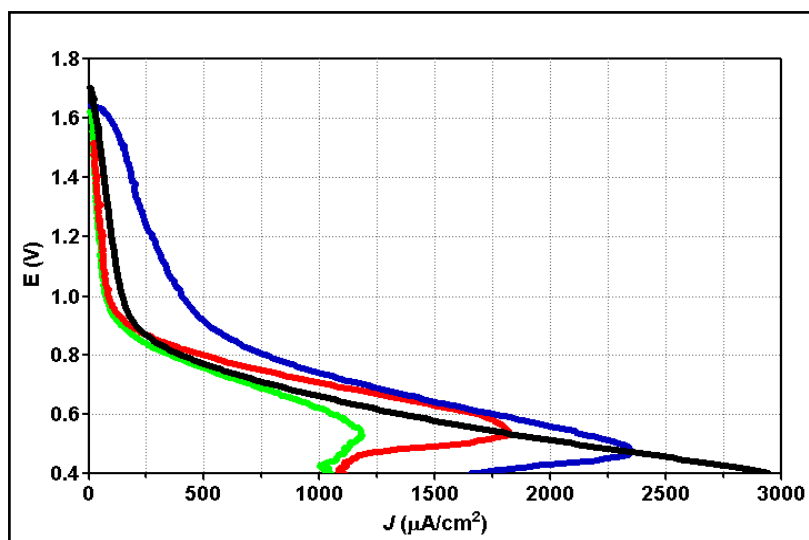
En la reacción anódica: el zinc se oxida, liberando un catión ( $\text{Zn}^{2+}$ ) y dos electrones; asimismo ocurre una disociación de una molécula "X", produciendo un anión ( $\text{X}^{2-}$ ) y dos protones. Los electrones y protones que se liberan pueden provenir de la disociación de una molécula de agua ó del ácido succínico ( $\text{HOOCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ). Los electrones y protones son transferidos al cátodo, a través del circuito externo y de la membrana de intercambio protónico de Nafion, respectivamente. Los cationes de zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) y los aniones ( $\text{O}^{-2}$  ó  $\text{OOCH}_2\text{CH}_2\text{COO}^{-}$ ) forman un complejo de zinc: óxido de zinc ó succinato de zinc, dependiendo de la molécula que se disoció (agua ó ácido succínico). El complejo de zinc (óxido de zinc ó succinato de zinc) se acumula gradualmente en el compartimento anódico, debido a que la membrana de Nafion es selectiva para la transferencia de protones. En la reacción catódica: el oxígeno es reducido, formando agua a partir de dos protones y dos electrones. La reacción global de la celda de combustible puede ser resumida en una producción neta de dos moléculas de agua, dos moléculas de complejo de zinc y la generación de energía libre disponible para desempeñar un trabajo en términos de electricidad y calor [Smolander *et al.*, 2008; Orlova *et al.*, 2010].

Una vez construida la celda de combustible enzimática híbrida, se comenzó su caracterización con una potenciodinámica. La potenciodinámica es una medición electroquímica que monitorea la densidad de corriente eléctrica producida en un determinado rango de potencial eléctrico (E). La densidad de corriente eléctrica (J) se define como una magnitud vectorial de la intensidad de corriente eléctrica (I) por unidad de área (y se expresa como Amperes/cm<sup>2</sup>). A diferencia de la medición de OCP, en la potenciodinámica el circuito eléctrico se encuentra cerrado, permitiendo el flujo de

electrones del ánodo al cátodo. Como se mencionó en la sección de Métodos, las mediciones potenciodinámicas fueron realizadas con un potencial eléctrico inicial en circuito abierto (OCP), hasta un potencial eléctrico final (en circuito cerrado) cercano a cero. Debe mencionarse que las celdas Zn-lacasa construidas, fueron evaluadas en términos de OCP (previo a cada medición), presentando un valor promedio de 1.61 V (n=9) y 1.67 V (n=11), en celdas electroquímicas Zn-lacasa<sup>DIR</sup> y Zn-lacasa<sup>MED</sup>, respectivamente (datos no mostrados). Las celdas Zn-lacasa<sup>DIR</sup> y Zn-lacasa<sup>MED</sup>, muestran un valor OCP muy similar (línea roja y azul, respectivamente en gráfica 13) al de otras celdas de combustible enzimáticas híbridas. Smolander *et al.* (2008) y Szot *et al.* (2009) elaboraron celdas Zn-lacasa con un OCP de entre 1.5 y 1.6 V, respectivamente. Por otra parte, existen reportes de celdas de combustible enzimáticas, integradas por enzimas tanto en el ánodo, como en el cátodo, con OCP menores de 1.0 V [Liu *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2006; Kamitaka *et al.*, 2007; Servat *et al.*, 2007; Coman *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2009]. Es importante resaltar que la presencia de un catalizador químico (e.g. platino) ó uno biológico (tales como, la. glucosa oxidasa, la glucosa deshidrogenasa, la D-fructosa deshidrogenasa, y la celobiosa deshidrogenasa) hacen la diferencia del OCP de la celda de combustible. Por otra parte, queda mencionar que el OCP de las celdas Zn-lacasa<sup>DIR</sup> y Zn-lacasa<sup>MED</sup> es mayor comparado con las celdas de combustible convencionales que operan con hidrógeno como combustible (OCP de 1.2 V) [Larminie y Dicks, 2003; Bagotsky, 2006].

Las condiciones y el mecanismo del suministro del combustible ó del oxidante son importantes para un buen rendimiento de las celdas de combustible químicas. Específicamente, el flujo y la presión del oxígeno en el compartimento catódico es importante para la eficiencia y densidad de poder eléctrico [Larminie y Dicks, 2003; Bagotsky, 2006; Spiegel, 2007]. Es por ello que se probaron diferentes flujos de oxígeno en el compartimento catódico de la celda de combustible enzimática híbrida. Al incrementar el suministro de O<sub>2</sub> se alcanza una mayor densidad de corriente (obsérvese los diferentes flujos de O<sub>2</sub> en la gráfica 12). En la gráfica 12, se observan que las curvas potenciodinámicas presentan tres fases: una fase inicial de activación, una fase óhmica, y una fase final de decaimiento. Estas fases se asocian con “pérdidas” de energía y son específicas en cada una de ellas. La fase de activación se caracteriza por una nula o baja densidad de corriente eléctrica, debido a las “pérdidas por activación”. Las “pérdidas de activación” se originan por el consumo de energía para establecer una diferencia de cargas eléctricas y de concentración de moléculas en la interface de la superficie de los

electrodos-electrolito. La fase óhmica se distingue por el incremento de la densidad de corriente eléctrica, conforme disminuye el potencial eléctrico; esto se asocia con “pérdidas óhmicas”. Las “pérdidas óhmicas” se derivan de la resistencia al flujo de electrones del ánodo de zinc, y de la resistencia a la circulación de iones a través del electrolito. La fase de decaimiento se caracteriza por la atenuación de la densidad de corriente eléctrica por efecto de “pérdidas por transporte de masa”. Las “pérdidas por transporte de masa” pueden originarse por la reducción en la concentración del combustible y/o del oxidante en la superficie de los electrodos. En este caso, la fase de decaimiento está dada por el agotamiento del oxígeno molecular en el cátodo de lacasa. [Larminie y Dicks, 2003; Spiegel, 2007]. La fase de decaimiento puede ser aplazada con el aumento en el suministro de  $O_2$  en el compartimento catódico (observar los diferentes flujos de  $O_2$  en la gráfica 12); abatiendo los problemas de transferencia de masa en la celda Zn-lacasa<sup>MED</sup>, a un flujo de  $O_2$  de 100-110 mL/min.

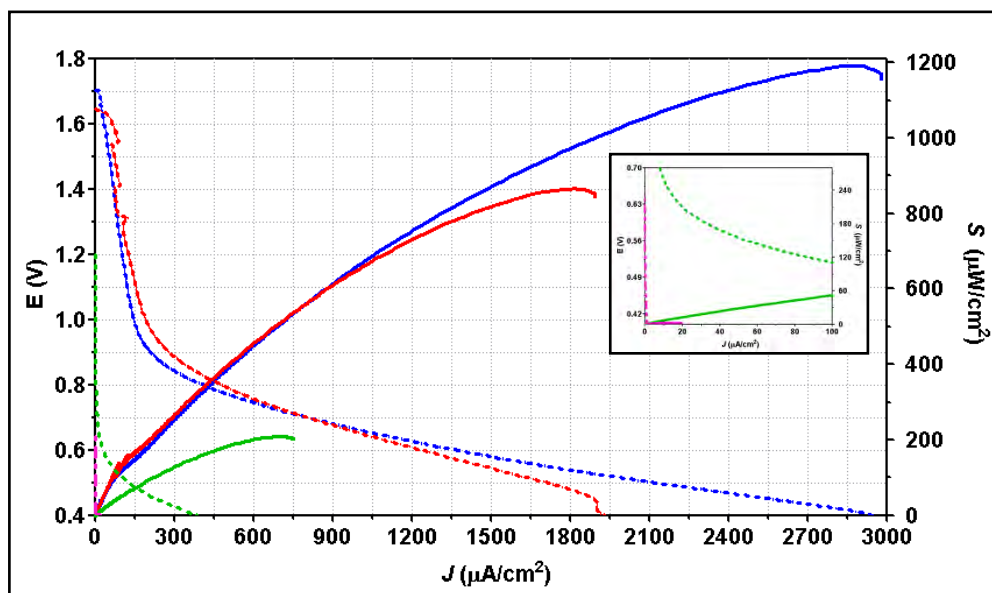


**Gráfica 12.** Curvas potenciodinámicas de celda Zn-lacasa<sup>MED</sup> con diferentes flujos de  $O_2$ . Las mediciones fueron realizadas con ayuda de un potenciostato 1287-Solartron (y el software CorrWare). Se suministro en el compartimento catódico de la celda Zn-lacasa un flujo continuo de  $O_2$ : 10-30 mL/min (línea verde), 30-50 mL/min (línea roja), 50-100 mL/min (línea azul) y 100-110 mL/min (línea negra) (n=3).

Al establecer el adecuado flujo de  $O_2$  (100-110 mL/min) en el compartimento catódico, para abatir los problemas de transferencia de masa, se determinó la densidad de corriente máxima ( $J_{MAX}$ ) de las celdas de combustible enzimáticas híbridas. Las celdas Zn-lacasa<sup>MED</sup> presentan una densidad de corriente eléctrica máxima de  $2977 \mu A/cm^2$  (línea azul, gráfica 13), mientras las celdas Zn-lacasa<sup>DIR</sup> exhiben una densidad de corriente

eléctrica máxima de  $2085 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (línea roja, gráfica 13); ambas densidades de corriente son obtenidas con el mismo suministro de  $\text{O}_2$  (flujo de 100-110mL/min). La densidad de corriente eléctrica en las celdas Zn-lacasa<sup>MED</sup> es 1.42 veces mayor que las celdas Zn-lacasa<sup>DIR</sup>; esto puede deberse a la posible orientación sitio-específica de la lacasa a la superficie de carbono (a través de AEBA), facilitando el proceso de transferencia electrónica. La intensidad de corriente eléctrica obtenida en las celdas Zn-lacasa<sup>MED</sup> y Zn-lacasa<sup>DIR</sup>, es abatida por la aplicación de  $\text{N}_2$  (línea café, gráfica 13); esto es debido a que no se lleva cabo completamente la reacción global de la celda Zn-lacasa, por la ausencia de oxígeno en el compartimento catódico. Es importante reiterar, que la lacasa es una enzima que cataliza la reducción del oxígeno molecular (formando agua) [Solomon *et al.*, 1996; Yoon *et al.*, 2005]; de esta manera, en ausencia de oxígeno no se lleva a cabo la reacción catódica (reducción del oxígeno). No obstante, en una celda control integrada por el ánodo de zinc y una lámina de carbono sin lacasa como cátodo (Zn-C), se muestra una densidad de corriente eléctrica máxima de  $764 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  en presencia de  $\text{O}_2$  (línea verde, gráfica 13). Esta densidad de corriente eléctrica es disminuida por el suministro de  $\text{N}_2$  (línea café, gráfica 13). Sin embargo, una celda control conformada por el ánodo de zinc y una lámina de carbono sin lacasa como cátodo (Zn-C), con agua destilada como solución electrolito en el compartimento catódico (suministrando  $\text{O}_2$ ), no presenta una densidad de corriente eléctrica (línea rosa, gráfica 13). Este fenómeno puede ser explicado por la presencia del Nafion que forma parte de la membrana de intercambio protónico de la celda electrolítica. En líneas anteriores, se señaló que el Nafion es un co-polímero de una estructura química compleja que es empleado como catalizador químico en ciertas reacciones (tales como la isomerización, la oxidación y la esterificación). Existen reportes de la esterificación del ácido succínico con etanol por polímeros análogos al Nafion (e.g. Amberlyst XN-1010 y Amberlyst-15) [Benedict *et al.*, 2006; Kolah *et al.*, 2008]; lo que permite plantear la posibilidad de una oxidación del succinato por parte del Nafion que compone la membrana de intercambio protónico, y de esa manera originar la densidad de corriente eléctrica en celdas control Zn-C en presencia de oxígeno (línea verde, gráfica 13).





**Gráfica 14.** Densidad de potencia ( $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) de la Celda Zn-Lacasa. A partir de las mediciones potenciodinámicas (gráfica 13), se determinaron las densidades de potencia ( $S$ ). Se muestran las densidades de poder (líneas continuas) con sus respectivas potenciodinámicas (líneas discontinuas) en el mismo color. Celda Zn-lacasa<sup>DIR</sup>, en presencia de  $\text{O}_2$  (línea roja) ( $n=7$ ). Celda Zn-lacasa<sup>MED</sup>, en presencia de  $\text{O}_2$  (línea azul) ( $n=3$ ). Controles: Celda Zn-C (sin enzima), en presencia de  $\text{O}_2$  (línea verde) ( $n=3$ ); Celda Zn-C con agua como electrolito, en presencia de  $\text{O}_2$  (línea rosa) ( $n=3$ ). En todos los casos, se realizó el mismo suministro de  $\text{O}_2$  (100-110 mL/min).

En la tabla 12 se muestra un cuadro comparativo entre algunas de las celdas de combustible enzimáticas reportadas en los últimos años, con respecto a las elaboradas en este proyecto. En este cuadro se realiza una comparación entre celdas fabricadas con un electrodo de naturaleza química (ánodo de Zn ó Pt) y otro de características enzimáticas (cátodo de lacasa) [Palmore y Kim, 1999; Smolander *et al.*, 2008; Szot *et al.*, 2009; y Gomez *et al.*, 2010], y celdas conformadas por ambos electrodos de características enzimáticas (ánodo de glucosa oxidasa y cátodo de lacasa) [Deng *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2009]. Debe resaltarse que los cátodos de las celdas son elaborados con diferentes lacasas (incluso se emplearon distintos métodos de inmovilización enzimática), y con un mecanismo de transferencia electrónica directa (DET) ó mediada (MET). Obsérvese que las celdas enzimáticas híbridas constituidas por un ánodo de Zn ó Pt exhiben un OCP similar a las celdas Zn-lacasa<sup>MED</sup> y Zn-lacasa<sup>DIR</sup>; por otra parte, las celdas de conformadas por enzimas en sus dos electrodos poseen valores de OCP menores que las celdas Zn-lacasa<sup>MED</sup> y Zn-lacasa<sup>DIR</sup>. Como se observa, las densidades de potencia máximas de las celdas Zn-lacasa<sup>MED</sup> y Zn-lacasa<sup>DIR</sup> (1191 y 866  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  a 0.4 V, respectivamente) son mayores a las otras celdas de combustible enzimáticas. Como se menciono anteriormente, diversos aspectos influyen en la eficiencia de una celda de

combustible enzimática: la constitución del electrodo (considerando el tipo de enzima, la superficie electroconductiva y el método de inmovilización), la eficiencia catalítica de la enzima, el tipo de combustible aprovechado, las características del electrolito (tales como la conductividad protónica, el pH y la presencia de ciertos iones), entre otros [Barton *et al.*, 2004; Davis y Higson, 2007; Smolander *et al.*, 2008]. En este caso, los altos valores de las densidades de potencia máxima en Zn-lacasa<sup>MED</sup> y Zn-lacasa<sup>DIR</sup> pueden deberse a la eficiente transferencia electrónica directa (aspecto relacionado con la orientación de la lacasa hacia la superficie del electrodo), a las características de la lacasa de *C. gallica* (específicamente su potencial redox del sitio T1 de 790 mV vs SHE, según lo observado en la gráfica 11) y una posible aportación energética del ácido succínico (como se indicó anteriormente, se plantea la posibilidad de una oxidación del ácido succínico por parte de la membrana de Nafion).

Es importante recalcar que las densidades de potencia fueron determinadas a partir de las mediciones potenciodinámicas que se llevaron a cabo bajo un constante suministro de O<sub>2</sub> (flujo de entre 100-110 mL/min) en el compartimento catódico. El suministro de O<sub>2</sub> en el compartimento catódico durante las mediciones, presentó ciertos problemas técnicos para ajustar un flujo constante de O<sub>2</sub>, es por ello que se manejaron flujos en un determinado rango. No obstante, a partir del valor de densidad de potencia eléctrica (P), del potencial eléctrico (E), de la constante de Faraday (F, que equivale a 96485.34 C mol<sup>-1</sup>) y considerando que en la reacción catódica se lleva a cabo la reducción del oxígeno (cediéndose cuatro electrones por cada molécula de O<sub>2</sub>), para formar agua (aceptándose dos electrones por cada molécula de H<sub>2</sub>O generada), se puede determinar la concentración de oxígeno que es consumido y la cantidad de agua que es producida en cada una de las celdas, aplicando las siguientes ecuaciones derivadas en Larminie y Dicks, 2003:

$$\text{Consumo de O}_2 = P / E \cdot F \cdot 4$$

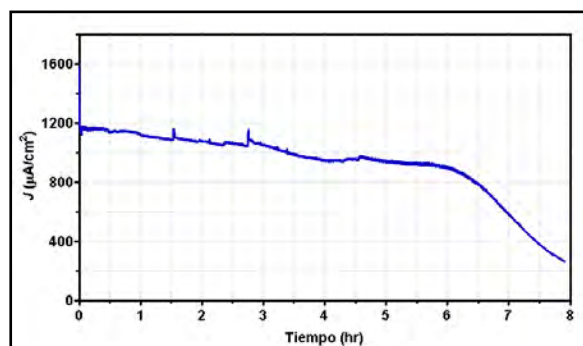
$$\text{Producción de H}_2\text{O} = P / E \cdot F \cdot 2$$

Aplicando las anteriores ecuaciones, nos permitió determinar que las celdas electroquímicas Zn-lacasa<sup>MED</sup>, consumen  $7.52 \times 10^{-9}$  moles de O<sub>2</sub> por segundo, y producen  $1.50 \times 10^{-8}$  moles de H<sub>2</sub>O por segundo (a una potencia eléctrica de 1191 μW/cm<sup>2</sup>); en cambio las celdas Zn-lacasa<sup>DIR</sup>, consumen  $1.91 \times 10^{-8}$  moles de O<sub>2</sub> por segundo, y producen  $9.56 \times 10^{-9}$  moles de H<sub>2</sub>O por segundo (a una potencia eléctrica de 866 μW/cm<sup>2</sup>).



Celda de Combustible Enzimática			OCP	$J_{MAX}$	$S_{MAX}$	Cita
Ánodo	Cátodo	Transferencia electrónica	CELDA (V)	( $\mu A/cm^2$ )	( $\mu W/cm^2$ )	
Zinc	Lacasa <sup>COV. MED.</sup> ( <i>Corioloopsis gallica</i> )	DET	1.67	2977	1191 a 0.41 V	*
Zinc	Lacasa <sup>COV. DIR.</sup> ( <i>Corioloopsis gallica</i> )	DET	1.61	2085	866 a 0.47 V	*
Zinc	Lacasa ( <i>Cerrena unicolor</i> )	DET	1.48	95	17.6 a 0.7 V	Szot <i>et al.</i> , 2009
Zinc	Lacasa ( <i>Trametes hirsuta</i> )	MET	1.4 - 1.5	1	10 a 0.8 V	Smolander <i>et al.</i> , 2008
Zinc	Peroxidasa de rábano	DET	1.68	800	98 a 0.6 V	Gomez <i>et al.</i> , 2010
Platino	Lacasa ( <i>Pyricularia oryzae</i> )	MET	ND	100	42 a 0.61 V	Palmore y Kim, 1999
Glucosa deshidrogenasa (recombinante <i>E. coli</i> )	Lacasa ( <i>Trametes versicolor</i> )	DET	0.3	751.7	178 a 0.23 V	Deng <i>et al.</i> , 2008
Glucosa oxidasa ( <i>Aspergillus niger</i> )	Lacasa ( <i>Trametes versicolor</i> )	DET	0.58	ND	15.8 a 0.28	Zhao <i>et al.</i> , 2009
Glucosa oxidasa (ND)	Lacasa ( <i>Trametes versicolor</i> )	MET	0.19	114	9.6	Tan <i>et al.</i> , 2009

**Tabla 12.** Comparación de parámetros de celdas de combustible enzimáticas. Potencial en circuito abierto de la celda (OCP<sub>CELDA</sub>) Densidad de corriente eléctrica máxima ( $J_{MAX}$ ) de la celda expresada en términos de  $\mu$ Amperes/cm<sup>2</sup>. Densidad de potencia eléctrica ( $S_{MAX}$ ) de la celda expresada en términos de  $\mu$ Watts/cm<sup>2</sup>. Proceso de transferencia de electrones entre la enzima y la superficie del electrodo: Transferencia Electrónica Directa (DET) ó Transferencia Electrónica Mediada (MED). Electrodo enzimático elaborado por inmovilización covalente directa (COV. DIR.) ó mediada (COV. MED.). Electrodo enzimático elaborado por inmovilización covalente directa (COV. DIR.). ND (No Determinado). \*Este trabajo.



**Gráfica 15.** Cronoamperometría de celda Zn-lacasa<sup>MED</sup>. La medición se realizó con ayuda de un potenciostato 1287-Solartron y el software CorrWare. Se evaluó la estabilidad operacional de la celda conformada por un ánodo de zinc y un cátodo de lacasa elaborado por inmovilización covalente mediada. Se fijó el valor de voltaje (0.5V) en el que se obtiene la mayor densidad de potencia (S) media, evaluándose la densidad de corriente eléctrica (J) a lo largo del tiempo. Durante la medición se suministro directamente O<sub>2</sub> al compartimento catódico (flujo de entre 100 y 110 mL/min).

Con la finalidad de evaluar la estabilidad operacional de la celda Zn-lacasa, se realizaron mediciones cronoamperométricas. La cronoamperometría (también denominada como potencioestática) es una medición electroquímica que monitorea el cambio de la intensidad de corriente eléctrica en función del tiempo, a un determinado potencial eléctrico. La celda electroquímica Zn-lacasa<sup>MED</sup> muestra una cierta estabilidad de densidad de corriente eléctrica durante las primeras 6 horas, y posteriormente inicia un gradual decaimiento (gráfica 15). Es importante mencionar, que esta cronoamperometría inicia con una intensidad de corriente eléctrica de 1585  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  (este valor es congruente con las potenciodinámicas Zn-lacasa<sup>MED</sup> a los 0.5 V), y decrece en los primeros 30 segundos hasta los 1200  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Esta disminución de la densidad de corriente eléctrica puede deberse a “perdidas” por activación electroquímica del cátodo de lacasa, que anteriormente se menciono. Por otra parte, el decaimiento gradual en las últimas dos horas de la cronoamperometría, es debida al proceso de pasivación que se presentan en el ánodo de zinc; es decir, el producto de la corrosión en la superficie del zinc, forma una película que dificulta la continua oxidación del zinc (y por ende, la producción de electrones). La pasivación es un proceso de acumulación del producto de la oxidación (usualmente un sólido de color oscuro) en la superficie del metal, que va formando una capa no-reactiva que abate la corrosión; y se ha observado en metales como el Al, Zn, Fe, Mg, Cu y Ti [Larminie y Dicks, 2003; Bagotsky, 2006]. En este caso, probablemente el  $\text{Zn}[\text{C}_2\text{H}_4(\text{COO})_2]_2$  se fue acumulando en la superficie del zinc, formando una capa resistiva que evitó la subsecuente oxidación del zinc. Debe mencionarse que durante y después de la inmersión de la placa de zinc en la solución amortiguadora de succinato 50 mM pH 4.5, se observó un obscurecimiento de su superficie (imagen no mostrada). Otro factor que puede explicar

el decremento de la densidad de corriente eléctrica, es el agotamiento de la solución electrolito (solución amortiguadora de succinato 50 mM pH 4.5). Aunque en la mayoría de las celdas de combustible químicas, el electrolito no contribuye en las reacciones electroquímicas de la celda (más que en el transporte de los iones), existen algunas excepciones. En la batería Pb-ácido, el ácido sulfúrico (electrolito) se consume durante las reacciones electroquímicas (hasta formar agua), al acumularse en los electrodos (como sulfato de plomo) y subsecuentemente disminuye la densidad de corriente eléctrica [Larminie y Dicks, 2003; Bagotsky, 2006]. En este sentido, no se realizó ninguna evaluación de la solución de succinato después de utilizarla como electrolito en las celdas Zn-lacasa. Cabe añadir, que la presencia de la membrana de Nafion puede tener relación con la baja estabilidad operacional de la celda Zn-lacasa<sup>MED</sup>. Como se mencionó anteriormente, algunos autores afirman que la presencia de Nafion tiene un efecto negativo en la actividad de las enzimas [Moore *et al.*, 2004; Neto *et al.*, 2010]. Esto permite plantear la posibilidad de un decremento de la actividad enzimática del cátodo de lacasa en la celda Zn-lacasa<sup>MED</sup>, (por acción de la membrana de Nafion), que se manifestó por la caída gradual de la densidad de corriente eléctrica.

## **VI. Conclusiones y Perspectivas.**

Dentro de los objetivos de este proyecto, se enfocó a la búsqueda y el desarrollo de un método de inmovilización enzimática que fuera lo suficientemente bueno para su aplicación en la construcción de una celda de combustible enzimática. En este sentido, la inmovilización no-covalente (adsorción de la lacasa en una tinta de carbono) resultó ser un método que a pesar de inmovilizar una mayor concentración de lacasa, la deposición y orientación aleatoria de las lacasas representa un obstáculo para la transferencia electrónica directa. Este método de inmovilización puede ser aplicado para la MET, en un sistema de celda de combustible enzimática, siempre y cuando se considere la porosidad de la matriz de la tinta. Al reducir la composición de carbón vulcan en la tinta, se incrementará la porosidad de esta; y por ende se permitirá una mayor accesibilidad de las moléculas de ABTS (mediador redox ampliamente utilizado en MET) al sitio T1 del centro activo de las lacasas.

Con relación a la estabilidad de la actividad catalítica de la lacasa inmovilizada, los cátodos de lacasa hechos por aspersion son más estables que los cátodos elaborados por

inmovilización covalente. Como se mencionó en la sección de —Resultados y Discusión— la presencia de las partículas de carbono de cierta forma protegen la lacasa (mediante posibles interacciones débiles) de la acción destructiva de los radicales libres formados por la oxidación del ABTS. Otra ventaja que mostraron los cátodos de lacasa elaborados por aspersión es su baja resistencia eléctrica; esto se debió a la presencia del carbón vulcan. No obstante, se descartaron estos cátodos de lacasa, para su aplicación en la celda de combustible enzimática, por su aleatoria deposición y orientación de lacasas.

En contraste, la inmovilización covalente mediada por AEBA (ácido 4-[2-aminoetil] benzoico) resultó ser un método que favoreció la orientación de la lacasa hacia la superficie de carbono. Se pudo estimar la unión entre AEBA y sitio T1 de la lacasa, al extrapolar la interacción del ácido benzoico con la lacasa de *C. gallica* UAMH 8260. Además se comprobó que dicha inmovilización, resultó ser una unión química covalente entre los residuos amino externos de la lacasa (específicamente lisinas), con los grupos carboxilos del AEBA; aunque no se descarta una posible interacción con el anillo aromático del mismo. No obstante, la cristalización de la lacasa (en complejo con AEBA) y estudios de dinámica molecular (MD) aportarían en la elucidación de la interacción sitio-específico del AEBA con la lacasa de *C. gallica* UAMH 8260. Los estudios de voltamperometría cíclica permitieron estimar que el potencial redox del cobre T1 de la lacasa de *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 es similar al de otras lacasas de gran potencial redox (550 mV vs SCE).

Dada la relevancia de la orientación de las enzimas en la DET, se inclinó por el uso de cátodos de lacasa. Las celdas Zn-Lacasa<sup>MED</sup> y Zn-Lacasa<sup>DIR</sup> presentaron densidades de potencia superiores (1190 y 866  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  a 0.4 V, respectivamente) a las reportadas en otras celdas de combustible enzimáticas de la misma disposición: ánodo de zinc y cátodo de lacasa. No obstante, después de 6 horas de operación se presentó un decremento de la corriente eléctrica. De esta manera se comprobó la hipótesis planteada en un principio, y se cumplió con el propósito de este proyecto en diseñar y construir una celda de combustible enzimática híbrida de buen rendimiento; desafortunadamente esta resultó de una baja estabilidad operacional. El decaimiento de la corriente eléctrica pudo haberse debido al decremento de la actividad enzimática por efecto de la membrana de Nafion y/o a la pasivación del ánodo de zinc. La acumulación del producto de la oxidación (posiblemente, óxido de zinc ó succinato de zinc) en la superficie del zinc abatió su corrosión (*i.e.* la oxidación de la que se obtienen los electrones del zinc).

### Perspectivas:

Actualmente, en el laboratorio se está desarrollando un método de inmovilización enzimática más sencillo y mayormente eficiente. Se comenzó con la derivatización de láminas de carbono con tirosina (para la posterior inmovilización covalente de la lacasa), considerando la óptima orientación del sitio T1 de la lacasa de *C. gallica* UAMH 8260 hacia la superficie de carbono. Aunque no se mostró una diferencia significativa con relación a la concentración de lacasa inmovilizada (no mostrado), debe mencionarse que estudios de voltamperometría cíclica, exhiben un potencial redox del sitio T1 de la lacasa similar (no mostrado) al de los otros cátodos de lacasa. Además se aplicaron pruebas de voltamperometría cíclica a láminas de carbono derivatizadas con tirosina e incubadas con lacasa (pero sin *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida) que no mostraron picos farádicos de oxidación y reducción. Lo anterior puede sugerir que se inmovilizó poca concentración de lacasa y por ende se trató de una unión covalente entre la tirosina y los residuos de lisina externos de la lacasa.

Esta celda de combustible enzimática no solo puede optimarse en términos de inmovilización y orientación de lacasa para la elaboración de cátodos de lacasa; si no además, trabajar en el diseño y elaboración de un ánodo enzimático. Asimismo se debe trabajar en el diseño del armazón de la celda de combustible enzimática. Como se mencionó anteriormente, la baja estabilidad operacional de la celda de combustible enzimática se debió a las limitaciones presentadas por la pasivación del zinc (reduciendo su capacidad de oxidación). Se propone emplear un ánodo a base de enzimas empleadas (e.g. la glucosa oxidasa, la metanol deshidrogenasa y la alcohol deshidrogenasa) u otro tipo de oxidoreductasas, que de la misma manera posean una óptima orientación (facilitando el proceso de transferencia electrónica directa). Asimismo cabe la posibilidad de emplear nanotubos de carbón adheridos a los electrodos (catódico ó anódico), para incrementar el área superficial, lo que significaría una mayor concentración de enzima inmovilizada y una mayor conductividad eléctrica. Resulta conveniente mencionar, que la solución amortiguadora de succinato es muy susceptible a la contaminación por microorganismos (después de tres días en refrigeración), por lo que debería de renovarse ó emplear otro tipo de solución amortiguadora como electrolito, en caso de ampliar la estabilidad operacional de la celda de combustible enzimática a un plazo mayor.

## Literatura citada

1. Abdullah, J. Ahmad, M., Heng, L. Y., Karuppiah, N. y Sidek, H. (2007). An optical biosensor based on immobilization of laccase and MBTH in stacked films for the detection of catecol. *Sensors* **7**: 2238-50.
2. Amman, M. y Fransaer, J. (2010). Micro-biofuel cell powered by glucose/O<sub>2</sub> based on electro-deposition of enzyme, conducting polymer and redox mediators: Preparation, characterization and performance in human serum. *Biosens. Bioelectron.* **25**: 1474-80.
3. Bagotsky, V. S. (2006). Fundamentals of electrochemistry. 2° ed. John Wiley & Sons, E. U. A.
4. Bajpai P. (1999). Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnol. Prog.* **15**: 147–57.
5. Baldrian, P. (2006). Fungal laccases- occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 215-42.
6. Barton, S. C. Gallaway, J. y Atanassov, P. (2004). Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices. *Chem. Rev.* **104**: 487-86.
7. Benedict, D. J., Parulekar, S. J. y Tsai, S-P. (2006). Pervaporation-assisted esterification of latic and succinic acids with downstream ester recovery. *J. Membrane Sci.* **281**: 435-45.
8. Bond, D. R. y Lovley, D. R. (2003). Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to eletrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1548-55.
9. Bourbonnais, R. y Paice, M. G. (1990). Oxidation of nonphenolic substrates – an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* **267**: 99–102.
10. Bullen, R.A., Arnot, T. C., Lakeman, J. B. y Walsh F. C. (2006). Biofuel cells and their development. *Biosens. Bioelectron.* **21**: 2015–45.
11. Call, H. P. y Mucke, I. (1997). History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym<sup>®</sup>-process). *J. Biotechnol.* **53**: 163–202.
12. Catal, T., Xu, S., Li, K., Bermek, H. y Liu, H. (2008). Electricity generation from polyalcohols in single-chamber microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron.* **24**: 855-60.
13. Caparrós-Ruiz, D., Formaré, S., Sicardi, L., Puigdomènech, P. y Rigau, J. (2006). Isolation and characterization of a family of laccases in maize. *Plant. Sci.* **171**(2):217-25.
14. Chang, R. (1983). Principios básicos de espectroscopía. Ed. AC, Madrid, España.
15. Claus, H. (2003). Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* **179**: 145–50.

16. Claus, H., Faber, G. y König, H. (2002). Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 672–8.
17. Cole, J. L., Tan, G. O., Yang, E. K., Hodgson, K. O. y Solomon, E. I. (1990). Reactivity of the laccase trinuclear copper active site with dioxygen: an X-ray absorption Edge Study. *J. Am. Chem. Soc.* **112**: 2243–9.
18. Coman, V., Vaz-Domínguez, C., Ludwig, R., Harreither, W., Haltrich, D., De Lacey, A. L., Ruzgas, T., Gorton, L. y Shleev, S. (2008). A membrane-, mediator-, cofactor-less glucose/oxygen biofuel cell. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10**: 6093-96.
19. Cracknell, J. A, Vincent, K. A. y Armstrong, F. A. (2008). Enzymes as working or inspirational electrocatalysts for fuel cells and electrolysis. *Chem. Rev.* **108**: 2439–61.
20. D'Acunzo, F., Barreca, A. M. y Galli, C. (2004). Determination of the activity of laccase, and mediated oxidation of a lignin model compound, in aqueous–organic mixed solvents. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* **31**: 25–30.
21. Davis, F. y Higson, S. P. J. (2007). Biofuel cells-recent advances and applications. *Biosens. Bioelectron.* **22**: 1224-35.
22. Deng, L. Wang, F., Chen, H., Shang, L., Wang, L., Wang, T. y Dong, S. (2008). A biofuel cell with enhanced performance by multilayer biocatalyst immobilized on highly ordered macroporous electrode. *Biosens. Bioelectron.* **24**: 329-33.
23. Duran, N., Rosa, M. A., D'Annibale, A. y Gianfreda, L. (2002). Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme Microb. Technol.* **31**: 907-31.
24. Gallardo, I. Pinson, J. y Vilà, N. (2006). Spontaneous attachment of amines to carbon and metallic surfaces. *J. Phys. Chem. B.* **110**: 19521-9.
25. Gao, Y. y Kyratzis, I. (2008). Covalent immobilization of proteins on carbon nanotubes using the cross-Linker 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide—a critical assessment. *Bioconjugate Chem.* **19**: 1945-50.
26. Garavaglia, S., Cambria M. T., Miglio, M., Ragusa, M. M. S., Iacobazzi, V., Palmieri, F., D'Ambrosio, C., Scaloni, A. y Rizzi, M. (2004). The structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. *J. Mol. Biol.* **342**: 1519-31.
27. Gomez, C., Shipovskov, S. y Ferapontova, E. E. (2010). Peroxidase biocathodes for a biofuel cell development. *J. Renewable Sustainable Energy* **2**:1-12.
28. Guerrero-Rangel, N., Rodríguez-de la Garza, J. A., García-García, Y., Ríos-González, L. J., Sosa-Santillán, G. J., de la Garza-Rodríguez, I. M., Martínez-Amador, S. Y.,

- Rodríguez-Garza, M. M. y Rodríguez-Martínez, J. (2010). Comparative study of the three cathodic electron acceptors on the performance of mediatorless microbial fuel cell. *Int. J. Elec. Power Eng.* **4**: 27-31.
29. Heller, A. (2006). Potentially implantable miniature batteries. *Anal. Bioanal. Chem.* **385**: 469-73.
30. Huang, L. Regan, J. M. y Quan, X. (2011). Electron transfer mechanism, new applications, and performance of biocathode microbial fuel cells. *Bioresour. Technology.* **102**: 316-23.
31. Ivnitski, D. y Atanassov, P. (2007). Electrochemical studies of intramolecular electron transfer in laccase from *Trametes versicolor*. *Electroanalysis* **22**: 2307-17.
32. Ivnitski, D. Artyushkova, K. y Atanassov, P. (2008). Surface characterization and direct electrochemistry of redox copper centers of bilirubin oxidase from fungi *Myrothecium verrucaria*. *Biochemistry.* **74**: 101-10.
33. Kamitaka, Y., Tsujimura, S., Setoyama, N., Kajino, T. y Kano, K. (2007). Fructose/dioxygen biofuel cell based on direct electron transfer-type bioelectrocatalysis. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **9**: 1793-1801.
34. Kanai, Y., Khalap, V. R., Collins, P. G. y Grossman, J. C. (2010). Atomistic oxidation mechanism of a carbon nanotube in nitric acid. *Phys. Rev. Soc.* **104**.6:066401.
35. Khani, Z., Jolival, C., Cretin, M., Tingry, S. e Innocent, C. (2006). Alginate/carbon composite beads for laccase and glucose oxidase encapsulation: application in biofuel cell technology. *Biotechnol. Lett.* **28**: 1779-86.
36. Kim, J., Jia, H. Y Wang, P. (2006). Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells. *Biotechnol. Adv.* **24**: 296-308
37. Kim, M-S y Lee, Y-J. (2010). Optimization of culture conditions and electricity generation using *Geobacter sulfurreducens* in a dual-chambered microbial fuel-cell. *Int. J. Hydrogen Energ.* DOI:10.1016/j.ijhydene.2010.04.061.
38. Kolah, A.K., Asthana, N. S., Vu, D. T., Lira, C. T. y Miller, D. J. (2008). Reaction kinetic for the heterogeneously catalyzed esterification of succinic acid with ethanol. *Ind. Eng. Chem. Res.* **47**: 5313-17
39. Kramer, K. J., Kanost, M. R. Hopkins, T. L., Jiang, H., Zhu, Y. C., Xu, R. Kerwin, J. L. y Turecek, F. (2001). Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems. *Tetrahedron* **57**: 385-92.
40. Larminie, J. y Dicks, A. (2003). Fuel cell systems explained. 2a Ed. John Wiley & Sons, Inglaterra.
41. Lee, Y-M, Kwon, O-Y, Yoon, Y-J y Ryu, K. (2006). Immobilization of horsedish peroxide on multi-wall carbon nanotubes and its electrochemical properties. *Biotech. Lett.* **28**: 39-43



42. Liu, Y., Wang, M., Zhao, F., Liu, B. y Dong, S. (2005). A low-cost biofuel cell with pH-dependent power output based on porous carbon as matrix. *Chem. Eur. J.* **11**: 4970-74
43. Martins, L. O., Osares, C. M., Pereira, M. M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G. H. y Henríquez, A. O. (2002). Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *J. Biol. Chem.* **277**:18849–59.
44. Minussi, R. C., Pastore, G. M. y Duran, N. (2002). Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* **13**: 205–16.
45. Minussi, R. C., Pastore, M. G., y Duran, N. (2007). Laccase induction in fungi and laccase/N-OH mediator systems applied in paper mill effluent. *Bioresource Technol.* **98**: 158–64.
46. Mohan, S. V., Mohanakrishna, G. y Sarma, P. N. (2010). Composite vegetable waste as renewable resource for bioelectricity generation through non catalyzed open-air cathode microbial fuel cell. *Bioresource Technol.* **101**: 970-6.
47. Moore, C. M., Akers, N. L., Hill, A. D., Johnson, Z. C. y Minter, S. D. (2004). Improving the environment for immobilized dehydrogenase enzymes by modifying nafion with tetraalkylammonium bromides. *Biomacromolecules.* **5**: 1241-7.
48. Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shleev, S. V. y Yaroplov, A. I. (2007). —~~Ble~~” laccases. *Biochemistry (Moscow)* **72**: 1136-50.
49. Moser, C. C., Keske, J. M., Warncke, K., Farid, R. S. y Dutton, P.L. (1992). Nature of biological electron transfer. *Nature* **355**: 796-802.
50. Naseh, M. V., Khodadadi, A. A., Mortazavi, Y., Sahraei, O. A., Pourfayaz, F. y Sedghi, S. M. (2009). Functionalization of carbon nanotubes using nitric acid and DBD plasma. *Int. J. Chem. Biol. Eng.* **2**:66-8.
51. Neto, S. A. Forti, J. C. y De Andrade, A. R. (2010). An overview of enzymatic biofuel cells. *Electrocatal.* DOI 10.1007/s12678-010-0013-2.
52. Orlova, T. D., Katrovtseva, A. V. y Bychkova, S. A. (2010). Thermodynamic characteristics of formation reactions of Zn<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> complexes with succinic acid n aqueous solutions. *Russ. J. Phys. Chem. A.* **84**: 808-11.
53. Osina, M. A., Bogdanovskaya, V. A. y Tarasevich M. R. (2003). Bioamperometric assay of phenol derivatives using laccase-nafion composite. *Russ. J. Electrochem.* **39**: 407-12.
54. Osman, M. H., Shah, A. A. y Walsh, F. C. (2010). Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part II: microbial. *Biosens. Bioelectron.* **26**: 953-63.
55. Qiao, Y., Li, C. M., Bao, S-J., Lu, Z. y Hong, Y. (2008). Direct electrochemistry and electrocatalytic mechanism of evolved *Escherichia coli* cells in microbial fuel cells. *Chem. Commun.* 1290-2.

56. Page, C. C., Moser, C. C., Chen, X. X. y Dutton, P. L. (1999). Natural engineering principles of electron tunneling in biological oxidation-reduction. *Nature* **402**: 47-52.
57. Palmore, G. T. R., Bertschy, H., Bergens, S. H. y Whitesides, G. M. (1998). A methanol/dioxygen biofuel cell that uses NAD<sup>+</sup> dependent dehydrogenases as catalysts: application of an electro enzymatic method to regenerate nicotinamide adenine dinucleotide at low overpotentials. *J. Electroanal. Chem.* **443**: 155-61
58. Palmore, G. T. R. y Kim, H-H. (1999). Electro-enzymatic reduction of dioxygen to water in the cathode compartment of a biofuel cell. *J. Electroanal. Chem.* **464**: 110-117
59. Pickard, M. A., Roman, R., Tinoco, R. y Vázquez-Duhalt, R. (1999a). Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Corioloropsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3805-09.
60. Pickard, M. A., Vandertol, H., Roman, R. y Vázquez-Duhalt, R. (1999b). High production of ligninolytic enzymes from white rot fungi in cereal bran liquid medium. *Can. J. Microbiol* **45**: 627-31.
61. Piontek, K., Antorini, M. y Choinowski, T (2002). Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90 Å resolution containing a full complement of coppers. *J. Biol. Chem.* **277**: 37663–9.
62. Quan, D., Kim, Y., y Shin, W. (2004). Characterization of an amperometric laccase electrode covalently immobilized on platinum surface, *J. Electroanal. Chem.* **561**: 181-4.
63. Rakov, E. G. (2001). The chemistry and application of carbon nanotubes. *Russ. Chem. Rev.* **70**: 827-63.
64. Reyes, P., Pickard, M. A. y Vázquez-Duhalt, R. (1999). Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dyes decolorized by immobilized laccase. *Biotechnol. Lett.* **21**: 875–80.
65. Rodríguez, E., Pickard, M. A. y Vázquez-Duhalt, R. (1999). Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Curr. Microbiol.* **38**: 27-32
66. Ruiz, A. I., Malavé, A. J., Felby, C. y Griebenow, K. (2000). Improved activity and stability of an immobilized recombinant laccase in organic solvents. *Biotech. Lett.* **22**: 229-33.
67. Schroder, U., Niessen, J. y Scholz, F. (2003). A generation of microbial fuel cells with current output boosted by more than one order of magnitude. *Angew. Chem.* **42**: 2880-83.
68. Servat, K. Tingry, S., Brunel, L. Querelle, S., Cretin, M., Innocent, C., Jolival, C. y Rolland, M. (2007). Modification of porous carbon tubes with enzymes: application for biofuel cells. *J. Appl. Electrochem.* **7**: 121-7.

69. Sezgintürk, M. K. Odacı, D., Pazarlioğlu, N., Pilloton, R., Dinçkaya, E., Telefoncu, A., Timur, S. Construction and comparison of *Trametes versicolor* laccase biosensors capable of detecting xenobiotics. *Artif. Cell Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **4**:192-9.
70. Shie, J-W, Yogeswaran, U. y Chen, S-M (2009). Haemoglobin immobilized on nafion modified multi-walled carbon nanotubes for O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and CCl<sub>3</sub>COOH sensors. *Talanta* **78**: 896-902.
71. Shleev, S., Reimann, C. T., Serezhenkov, V., Burbaev, D., Yaropolov, A. I., Gorton, L. y Ruzgas, T. (2006). Autoreduction and aggregation of fungal laccase in solution phase: possible correlation with a resting form of laccase. *Biochimie*. **88**: 1275–1285
72. Shukla, A. K., Suresh, P., Berchmans, S. y Rajedran, A. (2004). Biological fuel cells and their applications. *Curr. Sci*. **87**: 455–68.
73. Singh, G., Sharma, P. y Capalash, N. (2009). Performance of an alkalophilic and halotolerant laccase from  $\gamma$ - proteobacterium JB in the presence of industrial pollutants. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **55**: 283-9.
74. Smolander, M., Boer, H., Valkiainen, M., Roozeman, R., Bergelin, M., Eriksson, J-E., Zhang, X-C., Koivula, A. y Viikari, L. (2008). Development of a printable laccase-based biocathode for fuel cell applications. *Enzyme Microb. Technol.* **43**: 93-102.
75. Solomon, E. I., Sundaram, U. M., Machonkin, T. E. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* **96**: 2563–605.
76. Soukharev, V. Mano, N. y Heller, A. (2004). A Four-electron O<sub>2</sub>-electroreduction biocatalyst superior to platinum and a biofuel cell operating at 0.88 V. *J. Am. Chem. Soc.* **126**: 8368-9.
77. Spiegel, C. (2007). Designing and Building Fuel Cells. McGraw-Hill, E.U.A.
78. Sund, C. J., McMasters, S., Crittenden, S. R., Harrell, L. E. y Summer, J. J. (2007). Effect of electron mediators on current generation and fermentation in a microbial fuel cell. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**: 561-8.
79. Szot, K. Nogala, W., Niedziolka-Jönsson, J, Jönsson-Niedziolka, M, Marken, F., Rogalski, J. Kirchner, C. N., Wittstock, G. y Opallo, M. (2009). Hydrophilic carbon nanoparticle-laccase thin film electrode for mediatorless dioxygen reduction SECM activity mapping and application in zinc-dioxygen battery. *Electrochim. Acta* **54**: 4620-25.
80. Tan, Y., Deng, W., Ge, B., Xie, Q., Huang, J. y Yao, S. (2009). Biofuel cell and phenolic biosensor base on acid-resistant laccase-glutaraldehyde functionalized chitosan-multiwalled carbon nanotubes nanocomposite film. *Biosens. Bioelectron.* **24**: 2225-31.

81. Taylor, R. F. 1991. Protein immobilization. Fundamentals and applications. 1<sup>a</sup> Ed. Marcel Dekker, Inc. U. S. A.
82. Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*. **140**: 19-26.
83. Tinoco, R. Pickard, M. A. y Vázquez-Duhalt, R. (2001). Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Lett. Appl. Microbiol.* **32**: 331-5.
84. Topcagic, S. y Minteer, S. D. (2006). Development of membraneless ethanol/oxygen biofuel cell. *Electrochim. Acta.* **51**: 2168-72.
85. Torres, E., Bustos-Jaimes, I. y Le Borgne, S. (2003) Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Appl. Catal. B: Environ.* **46**: 1–15.
86. Tsujimura, S., Fujita, M., Tatsumi, H., Kano, K. e Ikeda, T. (2001). Bioelectrocatalysis-based dihydrogen/dioxygen fuel cell operating at physiological pH. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **3**: 1331–35
87. Wolfenden, B. S. y Wilson, R. L. (1982). Radical cations as reference chromogens in studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2, 2azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate). *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2**: 805-12.
88. Vandertol-Vanier, H. A., Vázquez-Duhalt, R., Tinoco, R. y Pickard, M. A. (2002). Enhances activity by poly(ethylene glycol) modification of *Corioloropsis gallica* laccase. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **29**: 214-20.
89. Vaz-Dominguez, C., Campuzano, S., Rüdiger, O., Pita, M., Gorbacheva, M., Shleev, S., Fernandez, V. M. y De Lacey A. L. (2008). Laccase electrode for direct electrocatalytic reduction of O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O with high-operational stability and resistance to chloride inhibition. *Biosens. Bioelectron.* **24**: 531-7.
90. Velasques-Orta, S. B. Heda, I. M., Curtis, t. P. Scott, K., Lloyd, J. R., Canstein, H. v. (2010). The effect of flavin electron shuttles in microbial fuel cells current production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**: 1373-81.
91. Wang, H. X. y Ng, T. B. (2004). Purification of a novel low-molecular-mass laccase with HIV-1reverse transcriptase inhibitory activity from the mushroom *Tricholoma giganteum*. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **315**: 450–4.
92. Xu, F. (1996). Oxidation of phenols, anilines and benzene thiols by fungal laccases: Correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry*, **35**: 7608–14.
93. Yan, Y., Zheng, W., Su, L. y Mao, L. (2006). Carbon-nanotube-based glucose/O<sub>2</sub> biofuel cells. *Adv. Mater.* **18**: 2639–43.
94. Yoon, J., Mirica, L. M., Stack, T. D. P. y Solomon, E. I. (2005). Variable-temperature, variable-field magnetic circular dichroism studies of tris-hydroxy- and í3-oxo-bridged

trinuclear Cu(II) complexes: evaluation of proposed structures of the native intermediate of the multicopper oxidases. *J. Am. Chem. Soc.* **127**: 13680-93.

95. Yoon, J., Liboiron, B. D., Sarangi, R., Hodgson, K. O., Hedman, B. y Solomon, E. I. (2007). The two oxidized forms of the trinuclear Cu cluster in the multicopper oxidases and mechanism for the decay of the native intermediate. *PNAS* **104**: 13609-14.
96. Zhao, H. Y., Zhou, H. M., Zhang, J. X., Zheng, W. y Zheng, Y. F. (2009). Carbon nanotube-hydroxyapatite nanocomposite: A novel platform for glucose/O<sub>2</sub> biofuel cell. *Biosens. Bioelectron.* **25**: 463-8.
97. Zheng, W., Li, Q., Su, L., Ya, Y., Zhang, J. y Mao, L. (2006). Direct electrochemistry of multi-copper oxidases at carbon nanotubes noncovalently functionalized with cellulose derivatives. *Electroanal.* **18**: 587-94.