



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

DISEÑO MOLECULAR DE UNA CELDA DE COMBUSTIBLE ENZIMÁTICA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
MARTÍN BARRAGÁN TRINIDAD

Dr. RAFAEL VÁZQUEZ DUHALT  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA-UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. KATY JUÁREZ LÓPEZ (INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA-UNAM)  
Dr. JOSÉ ROBERTO FLORES HERNÁNDEZ  
(Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas)

MÉXICO, D. F. diciembre, 2013



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.



# Instituto de Biotecnología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

IBQ. MARTIN BARRAGAN TRINIDAD

Por este conducto me permito informarle que la Comisión Académica acordó asignarle el siguiente jurado de examen para obtener el grado de Maestro en Ciencias.

Presidente	Dr.	Agustín López Munguía Canales
Secretario	Dra.	Gloria Saab Rincón
Vocal	Dr.	Eduardo Torres Ramírez
Vocal	Dr.	Ulises Cano Castillo
Vocal	Dr.	Leobardo Serrano Carreón

Sin más por el momento me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuernavaca, Mor. a 09 de octubre de 2013

Dra. Claudia Lidya Treviño Santa Cruz  
Coordinadora de Docencia

En un plazo máximo de **tres semanas**, contados a partir del momento en que el sinodal designado oficialmente reciba la tesis, éste deberá dar su voto fundamentado por escrito, el cual será comunicado al comité académico. Si considera que le será imposible cumplir con esta obligación deberá indicarlo al alumno para ser sustituido de inmediato.



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONACYT y a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM por la financiación económica para la realización de la presente tesis de maestría como por la beca de posgrado.

Quisiera agradecer al Dr. Rafael Vázquez Duhalt por acogerme en su grupo de investigación y hacer posible la realización este trabajo de investigación.

A la Dra. Katy Juárez López y al Dr. José Roberto Flores Hernández por su apoyo, asesorías y comentarios dados durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A los miembros del comité sinodal: Dr. Agustín López Munguía Canales, Dra. Gloria Saab Rincón, Dr. Ulises Cano Castillo, Dr. Eduardo Torres Ramírez y Dr. Leobardo Serrano Carreón por su atenta lectura de este trabajo y sus valiosas observaciones que fueron de gran ayuda para enriquecer esta tesis.

Al Dr. Sergio Andrés Águila Puentes y la Dra. Marcela Ayala Aceves por su apoyo durante la realización del presente trabajo, así como, a la Biol. Rosa Roman Miranda por su asesoría técnica.

A todos los miembros del grupo de recalcitrantes: Dra. Lucía Perezgasga Ciscomani, Andrés A. Arrocha, Joaquín Ramírez, Lorena Sánchez, Lorena Hernández, Abraham Vidal, Guillermo Huerta, Estefania Sierra, Mayra Avelar, Dulce Bustos y muchos más que desfilaron en este laboratorio.

A todo el personal del laboratorio del Laboratorio de Celdas de Combustible e Hidrógeno del Instituto de Investigaciones Eléctricas.

A mis compañeros de generación: Grecia Fuentes Ponce, Arlen Peña Cardeña, Andrés García Romero, Karina Salcedo Vite y en general a todos mis compañeros del Instituto de Biotecnología que tuve la fortuna de conocer y brindar mi amistad.

Al Dr. Lorenzo Segovia y su grupo de trabajo por permitirme formar parte de su grupo por unos meses.

Agradezco a mis padres (Martín Barragán y Natividad Trinidad) y hermanos por haberme apoyado durante todo este tiempo y entender mis ausencias y mis malos momentos.

Y a todas aquellas personas que de forma directa o indirecta contribuyeron a la realización de este trabajo. ¡Muchas gracias!

Martín Barragán Trinidad

## **RECONOCIMIENTO**

Una gran parte de la experimentación realizada se llevó a cabo dentro del Laboratorio de Celdas de Combustible e Hidrógeno del Instituto de Investigaciones Eléctricas (IIE).

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

AEBA	Ácido 4-[2-aminoetil] benzoico
ABTS	2,2'-azidobis(3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfónico)
AC	Corriente alterna
Ag	Área geométrica
Ar	Área real
apoGOx	Apoglucosa oxidasa
BOD	Bilirrubina oxidasa
BSA	Albúmina de Suero Bovino
CCD	Corriente Catalítica Directa
CCM	Corriente Catalítica Mediada
Cu <sup>2+</sup>	Cobre
Cys	Cisteína
C <sub>∞</sub>	Concentración en la disolución
CNT	nanotubos de carbono
<i>D</i>	Coeficiente de difusión
DET	Transferencia Directa de Electrones
dGOx	Glucosa oxidasa desglicosilada
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Ácido glutámico
<i>E</i> <sup>o'</sup>	Potencial redox formal
<i>E</i> <sup>o</sup> <sub>pa,pc</sub>	Potencial de pico anódico, catódico
EDC	N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida hidrocliclorado
ENH	Electrodo Normal de Hidrógeno o ESH
EPR	Resonancia Paramagnética Electrónica
<i>f</i>	Factor de relleno o fill factor
fr	Factor de rugosidad
F	Fenilalanina
<i>F</i>	Constante de Faraday
FAD/FADH <sub>2</sub>	Flavín Adenín Dinucleótido Oxidado/Reducido
<i>g</i> <sub>ll</sub>	Factor de desdoblamiento o factor <i>g</i>
GDL	Capas de Difusión de Gas
GOx	Glucosa oxidasa
H <sup>+</sup>	Protón
HEPES	Sulfonato de N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etano
His	Histidina
HRP	Peroxidasa de rábano
<i>i</i>	Densidad de corriente
<i>i</i> <sup>sat</sup>	Densidad de corriente a saturación
<i>I</i> <sub>pa,pc</sub>	Intensidad de corriente de pico anódico, catódico
<i>i</i> <sub>sc</sub>	Densidad de corriente a corto circuito

K	Lisina
$k_{cat}$	Constante de catalítica
$k_{ET}$	Constante estándar de transferencia de electrones
$K_I$	Constante de Inhibición
$K_M$	Constante de Michaelis
$K_s$	Constante aparente de transferencia de electrones
$M_{ox}$	Mediador oxidado
$M_{red}$	Mediador reducido
MAEs	Monocapas autoensambladas
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
MET	Transferencia Electrónica Mediada
MP-11	Microperoxidasa-11
mU	Miliunidades de actividad enzimática
MWCNT	Nanotubos de Carbono de Pared Múltiple
$n$	Número de electrones transferidos
$NAD^+/NADH$	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Oxidado/Reducido
OCP	Potencial a Circuito Abierto
PEM	Membrana de Intercambio Protónico
$P_{MAX}$	Potencia máxima
Pt	Platino
PQQ	Pirroquinolin quinona
Q	Carga
$R$	Constante universal de los gases
RE	Electrodo de referencia
rpm	Revoluciones por minuto
SCE	Electrodo Saturado de Calomel
SWCNT	Nanotubos de Carbono de Pared Única o de una Sola Pared
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media
THF	Tetrahidrofurano
$TR_{MAX}$	Velocidad de recambio máxima
UV	Ultravioleta
VC	Voltametría Cíclica
w	Molécula de agua
w/v	peso/volumen
W	Triptófano
WE	Electrodo de trabajo
Zn	Zinc
$\alpha$	Coefficiente de transferencia de carga
$\Delta E_p$	Diferencia de potencial de picos farádicos
$\epsilon$	Coefficiente de extinción molar
$\Gamma^*$	Superficie cubierta por una especie

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>1. a) Esquema general de una celda de combustible en fase líquida. b) Estructura general de un cátodo biológico</b>	6
<b>2. Transferencia de electrones en una celda de combustible enzimática</b>	7
<b>3. Estabilidad de la enzima hidrogenasa (al almacenamiento a 4 °C)</b>	9
<b>4. Diferente localización del sitio activo en las enzimas, y la forma en que se lleva a cabo la transferencia de electrones en enzimas sin modificar</b>	10
<b>5. Mecanismos de transferencia de electrones</b>	11
<b>6. Celda de biocombustible implantada directamente en un vaso sanguíneo</b>	12
<b>7. Estructura cristalográfica de la lacasa de <i>Coriopsis gallica</i>, modelada con Pymol</b>	14
<b>8. Sitios de cobre de la lacasa</b>	15
<b>9. Ciclo catalítico de la lacasa mostrando el mecanismo de reducción y oxidación de los sitios de cobre de la enzima</b>	18
<b>10. Posibles orientaciones de la lacasa sobre el electrodo</b>	19
<b>11. Reacción catalizada por GOx</b>	21
<b>12. Sitio activo de la enzima oxidada y del complejo enzima-FAD<sub>ox</sub>-β-D-glucosa</b>	23
<b>13. Mecanismo de abstracción de hidruro</b>	23
<b>14. Modelo molecular del par radical-anión</b>	23
<b>15. Oxidación de flavoproteinoxidasas por oxígeno</b>	23
<b>16. Voltametría cíclica del oro en medio ácido</b>	29
<b>17. Funcionalización de las láminas de grafito con AEBA</b>	30
<b>18. Unión covalente y orientada de la lacasa a las láminas de grafito funcionalizadas</b>	30
<b>19. Carboxilación de láminas de carbono</b>	32
<b>20. Reconstitución de la apoGox sobre electrodos de grafito funcionalizados con un péptido-FAD</b>	33
<b>21. Reconstitución de la apoGox sobre electrodos de grafito funcionalizados con siringaldazina-malónico-FAD</b>	34
<b>22. Reconstitución de apoGOx sobre electrodos de oro funcionalizados con ácido 4-mercaptobenzoico-FAD</b>	35
<b>23. Voltametría cíclica de grafito (SIGRACET GDL 30 BC) en KCl 0.2 M, pH 5.0 conteniendo 1mM de ferricianuro potásico, velocidad de barrido de 25 mV/s</b>	40
<b>24. Voltametría cíclica del electrodo de oro en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 M a 100 mV/s</b>	41
<b>25. Sistema utilizado para medir la resistencia eléctrica por contacto</b>	43
<b>26. Potencial a circuito abierto del cátodo de lacasa vs SCE, en amortiguador succinatos 50 mM, pH 4.5</b>	44
<b>27. Voltamperometría cíclica del cátodo de lacasa</b>	45
<b>28. Estructura cristalográfica de la GOx, resaltando la distancia del sitio activo a la superficie de la enzima</b>	45
<b>29. Dicroísmo circular UV-lejano: espectro de la GOx a pH neutro, estado desnaturalizados a pH 2.6, estado inducido por ácido pH 1.4 y en presencia de 6 M de cloruro de guanidina</b>	46
<b>30. Voltamperograma de la GOx inmovilizada de forma aleatoria sobre láminas de carbono</b>	48
<b>31. Voltametría cíclica en ausencia y presencia de glucosa (50 mM)</b>	48
<b>32. Voltamperograma de la siringaldazina inmovilizada sobre grafito previamente carboxilado</b>	49
<b>33. Voltametría cíclica del ánodo de GOx: antes y después de la reconstitución sobre grafito funcionalizado con siringaldazina-malónico-FAD</b>	50
<b>34. Voltametría cíclica del ánodo de GOx en presencia y ausencia de glucosa</b>	51



<b>35. Corriente electrocatalítica catódica, generada por la GOx reconstituida sobre electrodos de grafito modificados en presencia de concentraciones variables de glucosa</b>	<b>51</b>
<b>36. Curva de saturación de los electrodos de GOx</b>	<b>52</b>
<b>37. Voltametría cíclica de la GOx reconstituida sobre grafito funcionalizado con WWWW-FAD</b>	<b>53</b>
<b>38. Voltametría cíclica de la GOx reconstituida sobre grafito funcionalizado con WWW-FAD</b>	<b>53</b>
<b>39. Voltametría cíclica de la GOx reconstituida sobre grafito funcionalizado con FFFF-FAD</b>	<b>54</b>
<b>40. Voltametría cíclica de un electrodo de carbono “con FAD” en amortiguador fosfatos 0.1 M, pH 7 a 20 mV/s</b>	<b>55</b>
<b>41. Izquierda, FAD nativo; Derecha, N<sup>6</sup>-(2-aminoetil)-FAD</b>	<b>55</b>
<b>42. Voltametría cíclica de dos electrodos GOx, a 150 mV/s en amortiguador fosfatos 0.1 M, pH 7</b>	<b>56</b>
<b>43. Voltametría cíclica del electrodo 2 en amortiguador fosfatos 0.1 M, pH 7, con y sin glucosa</b>	<b>57</b>
<b>44. Bioánodo de GOx</b>	<b>58</b>
<b>45. Configuración esquemática de la celda de combustible enzimática empleando glucosa y oxígeno como combustible y oxidante, respectivamente</b>	<b>59</b>
<b>46. Curva de polarización (azul) y curva de potencia (roja) para la celda GOx-Lacasa. Las mediciones fueron realizadas en amortiguador fosfatos 0.1 M, pH 7</b>	<b>60</b>
<b>47. Curva de polarización característica para una celda de combustible</b>	<b>60</b>
<b>48. Estabilidad de la densidad de corriente con el tiempo para una resistencia de 120 Ω</b>	<b>61</b>

## **ÍNDICE DE TABLAS**

<b>1. Actividad enzimática, concentración de enzima total y de enzima activa, inmovilizada sobre grafito de 1 cm<sup>2</sup> (área geométrica) funcionalizado con AEBA</b>	<b>41</b>
<b>2. Características de los electrodos con la GOx inmovilizada de forma aleatoria</b>	<b>46</b>
<b>3. Actividad enzimática y concentración de enzima total inmovilizada sobre grafito GDL 30 BC de 1 cm<sup>2</sup> (8.93 cm<sup>2</sup>, área real) funcionalizado con siringaldazina-malónico-FAD</b>	<b>50</b>
<b>4. Resultados obtenidos para dos electrodos ensayados de GOx</b>	<b>56</b>
<b>5. Comparación de las características (voltaje (V), potencia (P) y tiempo de vida media (t<sub>1/2</sub>)) de las bioceldas de combustible enzimáticas integradas con un ánodo de GOx y que presentan DET</b>	<b>62</b>

## INDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>2. ANTECEDENTES. ....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. DEFINICIÓN DE CELDAS DE BIOCOMBUSTIBLE.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. HISTORIA DE LAS CELDAS DE BIOCOMBUSTIBLE.....</b>	<b>5</b>
<b>2.3. PRINCIPIO DE FUNCIONAMIENTO DE LAS CELDAS DE COMBUSTIBLE     BIOLÓGICAS. ....</b>	<b>5</b>
<b>2.4. CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS. ....</b>	<b>6</b>
<b>2.5. CELDAS DE COMBUSTIBLE ENZIMÁTICAS. ....</b>	<b>8</b>
2.5.1. Actividad y estabilidad de las enzimas. ....	8
2.5.2. Tipos de enzimas.....	9
2.5.3. Transferencia de electrones. ....	11
<b>2.6. BREVE COMPARACIÓN ENTRE LAS CELDAS DE COMBUSTIBLE     MICROBIANAS Y ENZIMÁTICAS.....</b>	<b>12</b>
<b>2.7. FUTURAS APLICACIONES DE LAS CELDAS DE BIOCOMBUSTIBLE. ....</b>	<b>12</b>
<b>2.8. LACASA.....</b>	<b>13</b>
2.8.1. Características generales. ....	13
2.8.2. Estructura. ....	14
2.8.3. Sitios de cobre. ....	14
2.8.4. Factores que determinan el potencial redox del sitio T1 de la lacasa. ....	15
2.8.5. Propiedades catalíticas y mecanismo de catálisis de la lacasa. ....	16
2.8.6. Propiedades electrocatalíticas de la lacasa. ....	19
<b>2.9. GLUCOSA OXIDASA (GOX).....</b>	<b>20</b>
2.9.1. Características generales. ....	21
2.9.2. Especificidad por el sustrato. ....	22

2.9.3. Mecanismo de catálisis. ....	22
2.9.4. Propiedades electrocatalíticas de GOx. ....	24
<b>3. JUSTIFICACIÓN. ....</b>	<b>26</b>
<b>4. HIPÓTESIS. ....</b>	<b>27</b>
<b>5. OBJETIVOS. ....</b>	<b>27</b>
5.1. OBJETIVO GENERAL .....	27
5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	27
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS. ....</b>	<b>28</b>
6.1. ENZIMAS Y REACTIVOS. ....	28
6.2. ELECTRODOS.....	28
6.2.1. Pretratamiento de los electrodos. ....	28
6.2.2. Área geométrica.....	29
6.2.3. Área microscópica.....	29
6.2.4. Cátodo de lacasa. ....	30
6.2.5. Ánodo de glucosa oxidasa. ....	32
6.2.6. Construcción y evaluación de la celda de combustible enzimática. ....	38
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....</b>	<b>40</b>
7.1. CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LOS ELECTRODOS BASE. ..	40
7.2. CÁTODO DE LACASA. ....	41
7.2.1. Actividad catalítica de la lacasa inmovilizada de forma orientada. ....	41
7.2.2. Caracterización electroquímica.....	42
7.3. ÁNODO DE GOX. ....	45
7.3.1. Inmovilización covalente aleatoria de GOx sobre láminas de carbono carboxiladas (SIGRACET GDL 35 BC). ....	46
7.3.2. Reconstitución sobre electrodos de carbono funcionalizados con siringaldazina-malónico-FAD.....	48
7.3.3. Inmovilización de GOx sobre electrodos de oro. ....	54

7.3.4. Inmovilización covalente aleatoria de GOx sobre electrodos de carbono funcionalizado con nanotubos de carbono (SIGRACET GDL 35BC). .....	56
<b>7.4. DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE LA CELDA DE COMBUSTIBLE ENZIMÁTICA.....</b>	<b>58</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>63</b>
<b>9. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>65</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>66</b>

## RESUMEN

En la presente tesis, se realizó un diseño molecular de una celda de combustible enzimática basada en un ánodo de glucosa oxidasa (GOx) y un cátodo de lacasa. La lacasa fue inmovilizada de forma covalente sobre un electrodo de carbono funcionalizado con ácido 4-[2-aminoetil] benzoico (AEBA), mientras que para inmovilizar la GOx se probaron distintas estrategias de inmovilización covalente, que consistieron en: i) inmovilización aleatoria sobre electrodos de carbono; ii) reconstitución de GOx sobre electrodos de carbono y sobre electrodos de oro y; iii) inmovilización aleatoria sobre electrodos de carbono funcionalizados con nanotubos de carbono. De las estrategias antes mencionadas, solo las dos últimas mostraron generación de corriente asociada a la oxidación de glucosa; sin embargo, debido a la falta de reproducibilidad durante el proceso de reconstitución de GOx, se eligió a los electrodos fabricados con nanotubos de carbono para montar la celda de combustible enzimática. La biocelda enzimática, generó una densidad de corriente a corto circuito de  $112 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , un voltaje a circuito abierto de 0.34 V, una densidad de potencia máxima de  $20.6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  y un factor de relleno de 0.54. En cuanto a la estabilidad, la biocelda de combustible mostró un decremento del 40 % en la densidad de corriente después de 130 min de operación continua.

## ABSTRACT

In this thesis, a molecular design of an enzymatic fuel cell from an anode of glucose oxidase (GOx) and a cathode of laccase were carried out. Laccase was covalently immobilized on a functionalized carbon electrode with 4 - [2-aminoethyl] benzoic acid (AEBA), while for GOx various strategies for its covalent immobilization were tested, which consisted of: i) random immobilization on carbon electrodes; ii) GOx reconstitution on carbon electrodes and gold electrodes and; iii) random immobilization on carbon electrodes functionalized carbon nanotubes. Among the strategies mentioned above, only the latter two showed current generation associated glucose oxidation; however, due to the lack of reproducibility in the process of reconstitution of GOx, the electrodes made with carbon nanotubes were selected to mount the enzymatic fuel cell. The enzymatic biocell generated a short-circuit current density of  $112 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , an open circuit voltage of 0.34 V, a maximum power density of  $20.6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  and a fill factor of 0.54. Regarding stability, the biofuel cell showed a decrease of 40 % in the current density after 130 min of continuous operation.

# 1. INTRODUCCIÓN.

Los problemas ocasionados por la contaminación ambiental a los que se enfrentan la sociedad en el presente siglo, ha generado una gran preocupación por encontrar nuevas fuentes para generar energía limpia. Una de estas posibles alternativas es la conversión directa de la energía química almacenada en los combustibles (Hidrógeno, gas natural, metanol, etanol, hidrocarburos, etc.) en energía eléctrica, mediante dispositivos electroquímicos conocidos como celdas de combustible.

Las celdas de combustible constan de dos electrodos, un cátodo, donde se produce la reacción de reducción del comburente (oxígeno), y un ánodo donde tiene lugar la oxidación del combustible, unidos a través de un hilo conductor que permite el paso de electrones desde el ánodo hasta el cátodo, este circuito externo debe contener una carga (por ejemplo, un motor) para que haya generación de electricidad. Para completar el circuito y que la pila pueda funcionar correctamente es necesario que se compensen las cargas generada mediante el transporte de protones desde el compartimento anódico al catódico [1].

Las celdas de combustible convencionales datan de 1840 y se basan en la oxidación de hidrógeno en el ánodo y la reducción de oxígeno en el cátodo usando catalizadores inorgánicos como el platino. A partir de 1980 se empezaron a desarrollar también celdas de combustible biológicas, o celdas de biocombustible, que emplean enzimas o bacterias como electrocatalizadores. La gran ventaja de las bioceldas es que no requieren las altas temperaturas de funcionamiento, contrariamente a las celdas de combustible convencionales (aunque teóricamente pueden trabajar a altas temperaturas usando organismos extremófilos). Además, en las bioceldas el número de sustancias que pueden usarse como combustible es mucho mayor que en el caso de pilas de combustible convencionales, los biocatalizadores no suelen pasivarse por impurezas de los combustibles, y no requieren platino u otro metal escaso y caro, como catalizador[2].

Por otra parte, la baja densidad de potencia de las bioceldas (del orden de  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  a  $\text{mW}/\text{cm}^2$ , con respecto al orden de  $\text{W}/\text{m}^2$  a  $\text{kW}/\text{m}^2$  de las celdas de combustible químicas), el menor voltaje de celda y la menor estabilidad (algunas celdas de combustible microbianas, en continuo suministro de combustible, son estables varios meses; en cambio las celdas de combustible enzimáticas solo persisten por algunos días o semanas) frente a las celdas de combustible convencionales dificultó su utilización al inicio. Actualmente, las bioceldas de combustible tienen gran interés para el desarrollo de celdas miniaturizadas que puedan implantarse en organismos vivos, usando como combustible sustratos presentes en el torrente sanguíneo, como pueden ser la glucosa y el oxígeno [2, 3].

En el caso de las bioceldas de combustible un sistema biológico es el responsable de la catálisis, siendo precisa la transferencia electrónica entre el biocatalizador y el electrodo, que generalmente se produce a través de mediadores. El uso de biocatalizadores inmovilizados en el electrodo, en lugar de en disolución, mejora tanto la estabilidad del enzima como la transferencia electrónica con el electrodo, siendo posible incluso obtener corrientes catalíticas sin necesidad de mediadores (transferencia directa con el electrodo) [4].

Actualmente se están desarrollando dos tipos de biopilas de combustible que se diferencian en el biocatalizador usado: enzimas o microorganismos. Los microbios pueden catalizar la oxidación/reducción de mayor número de sustancias y su tiempo de vida suele ser mayor, pero la transferencia electrónica con el electrodo es más compleja y menos eficiente en comparación con las enzimas. Las enzimas, por su parte, presentan una alta velocidad catalítica y, en algunos casos, es posible la transferencia directa de los electrones con el electrodo, eliminando así el uso de mediadores y optimizando la transferencia electrónica. Además, los avances en el campo de inmovilización de enzimas en electrodos han permitido aumentar la vida media de las mismas.

El comburente usado por excelencia en las pilas de combustible es el oxígeno, debido a su alta capacidad oxidativa y gran abundancia en el medio. Debido a sus características hay dos enzimas que están cobrando gran importancia en el desarrollo de biocátodos enzimáticos: la bilirrubina oxidasa y la lacasa. El diseño más simple para un biocátodo es aquel en que los electrones pasan directamente del electrodo a la enzima y luego al oxígeno (transferencia electrónica directa). En nuestro laboratorio se construyó recientemente una celda de combustible enzimática híbrida Zn-lacasa, inmovilizando la enzima covalentemente de dos formas distintas (aleatoria y orientada) [5]. La orientación se logró usando como entrecruzante una molécula análoga al sustrato de la enzima. Los resultados mostraron que la inmovilización orientada con el uso del ácido 4-[2-aminoetil] benzoico hidrociorado (AEBA) como entrecruzante fue significativamente superior y alcanzando densidades de potencia de  $1191 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  contra  $866 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  de lacasa inmovilizada aleatoriamente. Lo anterior demuestra que la orientación de las enzimas sobre la superficie del electrodo incrementará la densidad de corriente resultante.

Otra de las enzimas ampliamente utilizada es la glucosa oxidasa (GOx), debido a que emplea glucosa como sustrato, tiene un bajo costo, así como una alta estabilidad, selectividad y velocidad de recambio operando en condiciones fisiológicas. Sin embargo, en esta enzima su cofactor (FAD) se encuentra muy embebido dentro de la estructura proteica y esto dificulta el contacto eléctrico entre su sitio activo y el electrodo. Diversas estrategias se han propuesto para superar dicho obstáculo, siendo la más exitosa la reconstitución de la apoglucosa oxidasa sobre electrodos previamente funcionalizados. Es por ello, que en el presente estudio se diseñó de forma racional un bioánodo con la GOx inmovilizada de forma orientada sobre diferentes soportes y espaciadores para ver el efecto de estos sobre la velocidad de transferencia de electrones.

Por último, el bioánodo de GOx que presentó las mejores características cinéticas y propiedades electroquímicas se acopló a un biocátodo de lacasa previamente caracterizado [5] para la construcción de una celda de combustible enzimática que consume glucosa como combustible y requiere oxígeno como agente oxidante.

## **2. ANTECEDENTES.**

### **2.1. Definición de celdas de biocombustible.**

Las celdas de combustible biológicas o celdas de biocombustibles, son dispositivos de conversión de energía que transforma la energía química en energía eléctrica a través de reacciones electroquímicas y bioquímicas, incluyendo las de las vías metabólicas [6]. Los sustratos para la reacción de oxidación, tales como metanol, ácidos grasos y glucosa; son abundantes, renovables y todos pueden ser producidos por el metabolismo biológico. Por estas razones, las celdas de biocombustibles son una tecnología sustentable y prometedora a largo plazo para la producción de energía [2].

Desde el siglo 20, el consumo de energía ha aumentado dramáticamente y no hay indicios de que esta tendencia vaya a disminuir en un futuro cercano. Además, el daño irreversible al medio ambiente causado por el consumo excesivo de combustibles fósiles es un tema de preocupación entre la población. Una alternativa viable para algunos de los problemas relacionados con la energía es la tecnología de celdas de combustible, dispositivos electroquímicos de conversión de energía química a energía eléctrica. En una celda de combustible típica PEM (membrana de intercambio protónico), el gas hidrógeno es dividido en protones y electrones con la ayuda de platino como catalizador. El electrolito (membrana de intercambio protónico), solo permite el paso a los iones con carga positiva. Al mismo tiempo, los electrones cargados negativamente tienen que viajar a través del circuito externo, creando una corriente eléctrica. En el cátodo los protones, electrones y el oxígeno reaccionan formando agua. Algunas características de las celdas de combustibles son: alta eficiencia, estructura simple y bajo nivel de ruido.

La diferencia principal entre una celda de combustible y una batería es que ésta última almacena energía eléctrica en un sistema cerrado. Una celda de combustible puede funcionar de manera continua, siempre y cuando se mantengan los flujos necesarios de combustible y oxidante.

Las celdas de combustible PEM están disponibles comercialmente en la producción de varios watts a varios cientos de watts en motores de hidrógeno que se utilizan, por ejemplo, en el sistema de transporte urbano [7]. En teoría, el gas de escape de una celda de combustible de este tipo es agua pura, que no daña el medio ambiente. El uso de gas hidrógeno, que se deriva de combustibles fósiles (recurso no renovable), es un obstáculo para una amplia aplicación de las celdas de combustible PEM. La producción de hidrógeno, almacenamiento de hidrógeno y el uso de un catalizador costoso (platino) siguen siendo los tres principales obstáculos que aún no se han logrado superar en la investigación de celdas de combustible PEM. Sin embargo, las celdas de combustible biológicas han de superar este obstáculo por su propia naturaleza, a partir de biomasa renovable como combustible, y microorganismos o enzimas como catalizadores. Por otra parte, la baja potencia, el menor voltaje y la menor estabilidad de las bioceldas frente a las celdas de combustible convencionales ha dificultado su aplicación, siendo la estabilidad la principal limitante [3].



## **2.2. Historia de las celdas de biocombustible.**

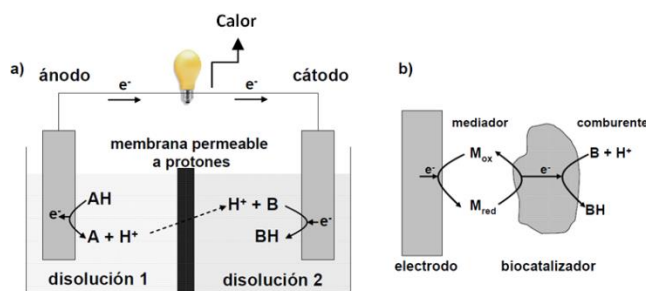
El nombre de bioelectricidad fue introducido por primera vez en el siglo XVIII, cuando Luigi Galvani observó la contracción de un anca de rana [2]. El inicio real de las celdas de biocombustibles se remonta a 1910, cuando el Michael Cress Potter, profesor de botánica de la Universidad de Durham demostró corriente y tensión generada por organismos. En la década de 1960, las celdas de biocombustibles se hicieron populares por primera vez en la historia porque la NASA destinó a convertir los residuos orgánicos en electricidad en los vuelos espaciales. Estuvieron disponibles por primera vez en 1963 como fuente de energía para algunos dispositivos del mar. Desafortunadamente, la energía fotovoltaica, otro dispositivo de conversión de energía, tomó el lugar de las celdas de combustible en los vuelos espaciales de la NASA, porque su fuente de energía es inagotable; sin embargo, la necesidad de una elevada exposición a la luz pero sobre todo su elevado costo, debido a la escasez de silicio grado semiconductor, limitan el uso de esta tecnología. Las celdas de biocombustibles perdieron así el valor comercial en el mercado civil debido a la falta de inversión en investigación. El interés en el desarrollo de celdas de combustible biológicas revivió más tarde en los años 70 y 80 años a causa de la crisis del petróleo. En 1969, Yao *et al.*, [8] anunciaron que la glucosa puede ser utilizada como combustible. Actualmente, las celdas de combustible biológicas tienen gran interés para el desarrollo de biopilas miniaturizadas que puedan implantarse en organismos vivos, incluso en el cuerpo humano, usando como combustibles sustratos presentes en el torrente sanguíneo, como pueden ser glucosa y oxígeno. Además, no se conoce toxicidad alguna asociada a las enzimas glucosa oxidasa, lacasa y bilirrubina oxidasa en las cantidades presentes en las celdas de biocombustible (miligramos); sin embargo, algunos materiales que pueden ser empleados en la fabricación de las mismas han sido considerados como tóxicos por la Unión Europea, como por ejemplo el tetraóxido de osmio [2, 3, 9, 10].

## **2.3. Principio de funcionamiento de las celdas de combustible biológicas.**

El esquema general de una celda de combustible (Figura 1a) consta de dos electrodos, un cátodo, donde se produce la reacción de reducción del comburente, y un ánodo, donde tiene lugar la oxidación del combustible, unidos a través de un hilo conductor externo (el cual debe contener una carga) que permite el paso de electrones desde el ánodo hasta el cátodo. Este flujo de electrones produce electricidad al pasar por un motor u otro aparato eléctrico, la velocidad de carga (corriente eléctrica) depende tanto de la diferencia de voltaje de la celda como de la resistencia eléctrica del conductor. Para completar el circuito y que la celda pueda funcionar correctamente es preciso que se compensen las cargas generadas mediante el transporte de protones desde el compartimento anódico al catódico. Cuando el cátodo y el ánodo se encuentran en un mismo compartimento no se generan problemas para la compensación de cargas. Sin embargo, eso requiere que ambos electrodos funcionen bajo las mismas condiciones sin que se produzcan reacciones cruzadas. La colocación de una membrana de intercambio protónico entre el cátodo y el ánodo permite usar disoluciones diferentes para cada electrodo y permite el paso de

protones que compensen las cargas generadas. Así, este proceso produce agua 100 % pura, corriente eléctrica y calor útil, por ejemplo energía térmica.

En el caso de las bioceldas de combustible, un sistema biológico es el responsable de la catálisis, siendo precisa la transferencia electrónica entre el biocatalizador y el electrodo, que generalmente se produce a través de mediadores (Figura 1b y Figura 2). Dos limitaciones importantes de las bioceldas de combustible frente a las convencionales, basadas en electrocatalizadores de Pt, son la corta estabilidad operacional del sistema biológico y las bajas densidades de corriente. El uso de biocatalizadores inmovilizados en el electrodo, en lugar de estar en disolución, mejora tanto la estabilidad del enzima como la transferencia electrónica con el electrodo, siendo posible incluso obtener corrientes catalíticas sin necesidad de mediadores (transferencia electrónica directa con el electrodo) [4].



**Figura 1.** a) Esquema general de una celda de combustible en fase líquida. b) Estructura general de un cátodo biológico.

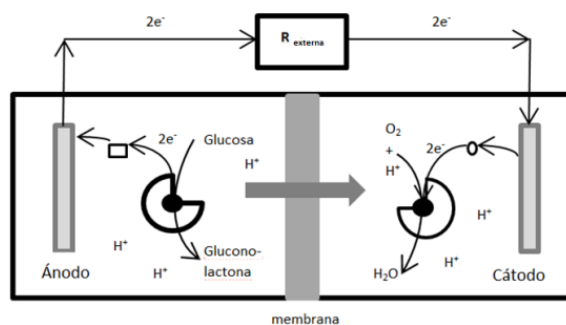
En consecuencia, el trabajo de una celda de combustible se puede ilustrar con los siguientes pasos: oxidación del combustible, transporte de protones, transferencia de electrones y reducción del oxidante. Esencialmente, cualquier literatura publicada se centra en cualquier combinación de los pasos anteriores.

Actualmente se están desarrollando dos tipos de bioceldas de combustibles que se diferencian en el biocatalizador utilizado: enzimas o microorganismos. Los microbios pueden catalizar la oxidación y reducción de un mayor número de sustancias y su tiempo de vida suele ser mayor, pero la transferencia electrónica con el electrodo es más compleja y menos eficiente en comparación con las enzimas. Las enzimas, por su parte, presentan una alta velocidad catalítica y, en algunos casos, es posible la transferencia directa de los electrones con el electrodo, eliminando así el uso de mediadores y optimizando la transferencia electrónica. Además, los avances en el campo de inmovilización de enzimas sobre electrodos han permitido aumentar la vida media de las mismas.

## 2.4. Celdas de combustible microbianas.

Debido a la baja densidad de potencia, las celdas de combustible microbianas fueron utilizadas por primera vez en el tratamiento de aguas residuales domésticas en 1991 [11]. Recientemente, se han desarrollado celdas de combustible microbianas con densidades de potencia de hasta 0.36 mW/cm<sup>2</sup>, este rendimiento da más oportunidades para aplicaciones prácticas que no sean el

tratamiento de aguas residuales. Las celdas de biocombustibles se pueden dividir en 3 grandes categorías según su forma de producir electricidad, ya sea de forma directa o indirecta, de acuerdo con Shukla *et al.*, [6].



**Figura 2.** Transferencia de electrones en una celda de combustible enzimática. El círculo y el recuadro, representan a los mediadores redox.

### 1) Biorreactor integrado a una celda de combustible microbiana.

En este sistema, un biorreactor está siempre conectado con una celda de combustible convencional en serie. El gas hidrógeno producido por fermentación microbiológica va directamente al ánodo de una pila de combustible. Incluso empleando un microorganismo altamente eficiente como *Clostridium butiricum*, la biomasa necesaria para la conversión de hidrógeno debe ser tres órdenes de magnitud mayor que la requerida para la celda de combustible adyacente, en esta configuración el biorreactor se encuentra desacoplado de la celda de combustible [12]. Sin embargo, gases como el CO y H<sub>2</sub>S, además del hidrógeno envenenan los catalizadores en las celdas de combustible y por lo tanto limitan su rendimiento. De modo que, la baja tasa de producción de hidrógeno así como la contaminación por otros gases no hacen de esto una tecnología prometedora para las celdas de biocombustible.

### 2) Celdas de combustible microbianas con transferencia directa de electrones (DET).

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 de electrones del microorganismo) o con apéndices de la membrana interna o externa (por ejemplo, pilis electroconductoras de algunas cepas de *Geobacter*); o b) DET vía mediadores redox endógenos excretados por el microorganismo (por ejemplo, ciertas hidroquinonas liberadas por *Escherichia coli* permiten la transferencia electrónica al electrodo) [3]. Las celdas de biocombustible sin mediadores tienen ventaja sobre aquellas que si los emplean en términos de costos. Sin embargo, esto también limita los tipos de combustibles que pueden ser empleados, por ejemplo, *Shewanella putrefaciens IR-1* en una celda de biocombustible sin mediadores, preparada por Kim et al., [13] pudo proporcionar 0.04 mA usando sólo lactato y piruvato. Recientemente, los microorganismos cultivados en celdas de combustible usando aguas residuales como sustrato muestran una actividad de conversión de energía muy

alta. Celdas de combustible microbianas preparadas con *Clostridium EG3* [14] y *Aeromonas hydrophila PA3* [15], han alcanzado altos rendimientos: 0.22 mA y 1.8 mA respectivamente. Todos estos avances hacen a las celdas de biocombustible sin mediadores una vía prometedora en la investigación de celdas de combustible microbianas.

- 3) Celdas de combustible microbianas que emplean mediadores (transferencia de electrones mediada).

En estos sistemas, se acoplan moléculas exógenas de bajo peso molecular (mediadores) que participan en la transferencia de electrones del microorganismo a la superficie del electrodo [16]. Los mediadores aceptan los electrones de un sustrato oxidado (glucosa, acetato, entre otros materiales orgánicos) por el microorganismo y los transfieren a la superficie del electrodo (dentro del compartimento anódico).

Las membranas microbianas impiden la transferencia eléctrica directa y eficiente. Mediadores, como tionina, naftodiazina y algunos colorantes orgánicos, se han introducido como acarreadores de electrones actuando como intermediarios entre la membrana celular y el electrodo. Sin embargo, utilizando mediadores, se añade complejidad al sistema de la celda de combustible microbiana. En lugar de la simple transferencia de electrones, la electroquímica debe considerar la constante de velocidad de re-oxidación de los mediadores.

Los mediadores pueden ser acoplados a los microorganismos de tres maneras: a) como mediadores de difusión yendo y viniendo entre la suspensión microbiana y la superficie del ánodo, b) los mediadores inmovilizados covalentemente en el electrodo y las células yendo y viniendo; c) los mediadores absorbidos en la superficie de las células microbianas. Una mezcla de sustratos también proporciona un entorno ideal para los microorganismos, ya que pueden tener múltiples mecanismos de oxidación. Por ejemplo, las aguas residuales domésticas se ha señalado como un combustible potencial para la celda de combustible microbiana con gran potencia de salida por Kim *et al.*, [17].

## **2.5. Celdas de combustible enzimáticas.**

El uso de enzimas como catalizadores se origina por el deseo de tener reacciones específicas y definidas en las celdas de combustible. Estas enzimas deben ser separadas y purificadas a partir de organismos vivos. Muchos de los aspectos de los catalizadores enzimáticos son los mismos que para las celdas de combustible microbianas, como la transferencia de electrones entre la enzima y la superficie del electrodo. Sin embargo, en las celdas de combustible enzimáticas es importante tomar en cuenta la selección, actividad y estabilidad del catalizador.

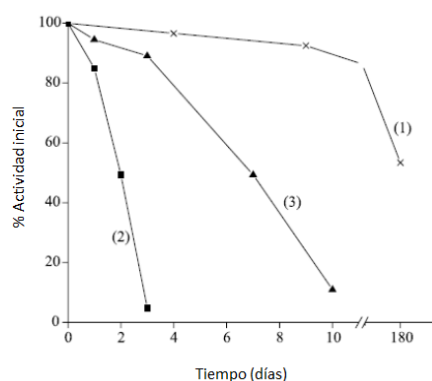
### **2.5.1. Actividad y estabilidad de las enzimas.**

Las enzimas son biológicamente frágiles debido a que su velocidad de catálisis se ve gravemente afectada por la temperatura, ambiente químico (por ejemplo el pH) y concentración de sustrato. A

modo de ejemplo, la glucosa oxidasa, la enzima empleada en este trabajo, muestra la mayor actividad a 30°C y pH 5-7 [18].

El tiempo de vida de una enzima, lo que finalmente determina el tiempo de vida de una celda de biocombustible, también se ve afectada por la configuración para una aplicación dada. Por ejemplo, Kim *et al.*, [19] encontraron que la hidrogenasa inmovilizada, una enzima que se utiliza para la oxidación de hidrógeno, conserva la mitad de su actividad después de medio año. Sin embargo, se encontró que la enzima pierde su actividad al ser disuelta en agua. Esquemáticamente, la dependencia de la actividad con respecto a los electrolitos se ilustra en la Figura 3 [20]. El eje Y, en términos cuantitativos representa la actividad relativa de una enzima específica.

Bioquímicamente, la actividad absoluta de las enzimas se define como la cantidad de enzima que oxida 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  de sustrato a pH 7 y a 25 grados Celsius. Por ser las enzimas un catalizador, mantienen su estructura química antes y después de la reacción química.



**Figura 3.** Estabilidad de la enzima hidrogenasa (al almacenamiento a 4 °C): (1) inmovilizada en fibras de carbono, (2) en solución, (3) en solución con estabilizador (azida de sodio 0.2 %). Las mediciones fueron realizadas en amortiguador fosfatos (0.05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1 M KCl) pH 7 a 30 °C [20].

### 2.5.2. Tipos de enzimas.

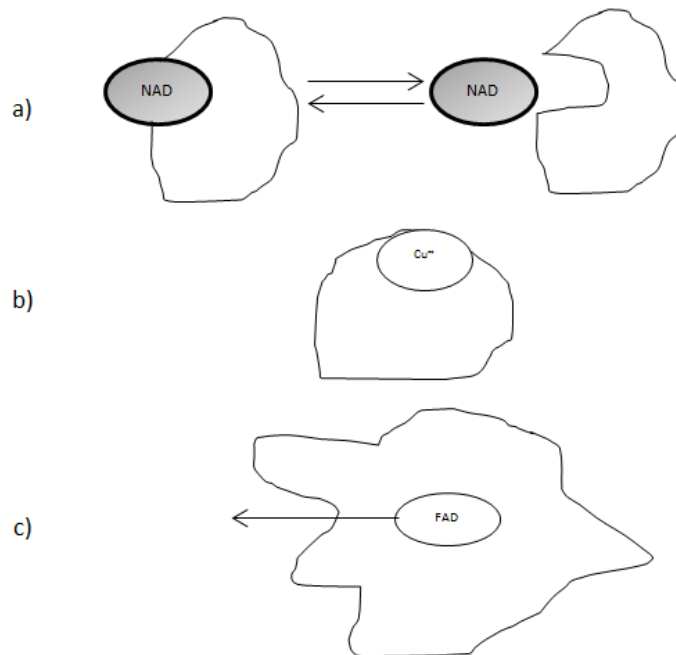
Para mayor claridad se divide a las enzimas redox en tres grupos, las diferencias entre estos grupos no están del todo definidas, pero proporciona un marco de referencia para analizar los diferentes problemas con el uso de enzimas distintas (Figura 4) [2].

Al primer grupo pertenecen enzimas con  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  o  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ , en su centro redox, que a menudo se encuentran débilmente unidos a la enzima. La débil unión permite a los centros redox difundir fuera de la enzima, actuando como transportadores de electrones, una de sus funciones naturales en la célula. Hay tres problemas que deben resolverse en el uso de un sistema  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  o  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ . En primer lugar, los electrodos deben ser diseñados para la transferencia de dos electrones para que la reacción pueda completarse, es decir, cualquier radical libre producido por la transferencia de un solo electrón debe ser estabilizado por la transferencia de un segundo electrón antes de que pueda reaccionar irreversiblemente. En segundo lugar, se

debe impedir la difusión del  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  o  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  fuera de las enzimas y de los electrodos. En tercer lugar, la hidrólisis de  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  o  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  no debe suceder a una alta velocidad, ya que su hidrólisis es lo que determina la vida útil de estos electrodos.

En el segundo grupo de enzimas parte del centro redox se encuentra en o cerca de la periferia de la cubierta proteica (peroxidasa, por ejemplo). Estas enzimas son adecuadas para transferir o aceptar electrones al entrar en contacto con el electrodo por lo que son capaces de interactuar directamente con estos. El principal desafío con este tipo de enzimas es la orientación adecuada de éstas en el electrodo, lo que permitirá una rápida transferencia de electrones y también la difusión del sustrato a la enzima.

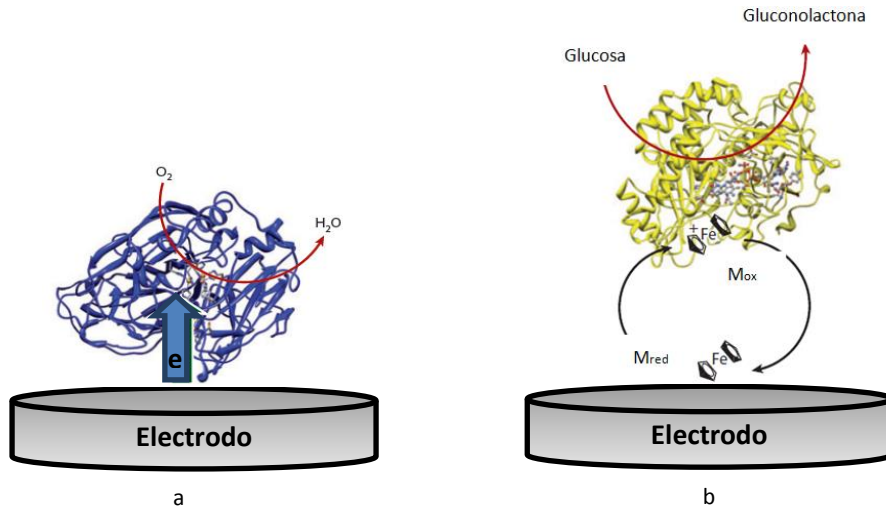
En el tercer grupo, encontramos aquellas enzimas cuyo centro redox está fuertemente ligado al interior de la proteína. Este tipo de enzimas, no interactúan fácilmente con los electrodos, ni liberan el centro redox para que éste transporte los electrones a la superficie del electrodo. La glucosa oxidasa, es por mucho el caso más estudiado, esta enzima tiene al FAD en su sitio activo; pues, emplea glucosa como sustrato, tiene un bajo costo, así como una alta estabilidad, selectividad y velocidad de recambio operando en condiciones fisiológicas.



**Figura 4.** Diferente localización del sitio activo en las enzimas, y la forma en que se lleva a cabo la transferencia de electrones en enzimas sin modificar. (A) El  $\text{NAD(H)}$  o  $\text{NADP(H)}$ , se encuentran en el sitio activo de la enzima. Estas moléculas pueden difundir desde el sitio activo a la superficie del electrodo y así llevar a cabo la transferencia de electrones. (B) El sitio activo (a menudo derivados de porfirinas o átomos de cobre) se encuentra en la superficie de la enzima, y se pueden transferir (o recibir) electrones directamente de un electrodo. (C) El centro redox de la enzima se une fuertemente a ella. La transferencia directa de electrones desde el sitio activo es extremadamente difícil o imposible, que requieren el uso de moléculas mediadoras capaces de penetrar al enzima para el transporte de carga [2].

### 2.5.3. Transferencia de electrones.

Las celdas de combustible biológicas pueden ser clasificadas en base al mecanismo de transferencia de electrones que emplean, siendo dos los posibles mecanismos: transferencia electrónica directa (DET) y transferencia electrónica mediada (MET), estos mecanismos son ilustrados en la Figura 5 [3].



**Figura 5.** Mecanismos de transferencia de electrones. (a) Transferencia directa de electrones; (b) Transferencia de electrones a través de un mediador.

La DET ha sido observada en pocas enzimas, como citocromo *c*, lacasa, hidrogenasa y varias peroxidasas. En la DET, los electrones son transferidos directamente del sitio activo de la enzima al electrodo (o viceversa), o bien a un conductor metálico (por ejemplo, nanopartículas) que interaccionan con la superficie del electrodo. Como se describió en la sección 1.5.2, algunas enzimas presentan su centro redox en la periferia, y esta propiedad intrínseca de las enzimas hace posible una DET.

La descripción anterior de la DET es un caso simplificado. En realidad, en muchos casos, la DET se ve dificultada por la cubierta espesa de proteína (y además no conductora), que aloja el sitio activo de la enzima. Para superar esta barrera, se introducen mediadores redox para facilitar la transferencia de electrones, los cuales pueden estar en solución o inmovilizados a la superficie del electrodo. De acuerdo a la Figura 5b, el mediador se encuentra en forma oxidada antes de que llegue a la superficie del electrodo. Al recibir los electrones en el paso anterior, el mediador es reducido y se desplaza hacia la superficie de la enzima. El mediador retorna a la superficie del electrodo en su forma original (oxidado) una vez que ha transferido los electrones a la enzima. La fuerza impulsora para la transferencia de electrones en el mediador es la diferencia de potencial causado por la reacción electroquímica. El mediador debe tener un potencial cercano al potencial redox de las enzimas, a fin de minimizar la pérdida de potencial causada por los mediadores. El potencial a circuito abierto de una celda de biocombustible, se determina principalmente por la

diferencia de potencial redox de la pareja de mediadores que se empleen, siempre y cuando las pérdidas de potencial causadas por otras fuentes sean despreciables.

## 2.6. Breve comparación entre las celdas de combustible microbianas y enzimáticas.

Las celdas de combustible microbianas, tienen un tiempo de vida teóricamente ilimitado, siempre y cuando el suministro de combustible se mantenga. Las celdas de combustible enzimáticas, tienen un tiempo de vida limitado, por la desactivación de la enzima. La extracción de enzimas es un proceso mucho más caro que el crecimiento de microorganismos en un medio de cultivo. En el caso de las celdas de combustible enzimáticas, se considera que vale la pena la investigación sobre pequeños electrodos, ya que el uso propuesto para las celdas enzimáticas es principalmente para aplicaciones *"in vivo"*. Una alta resistencia interna debido a las membranas de las células microbianas, es en parte responsable de su baja densidad de potencia de las celdas microbianas. En contraste, las celdas de combustible enzimáticas son compatibles con la inmovilización y las técnicas de cableado molecular, lo que proporciona un futuro brillante para la construcción de dispositivos con una alta densidad de potencia.

## 2.7. Futuras aplicaciones de las celdas de biocombustible.

Las celdas de combustible biológicas se introdujeron por primera vez en el mercado en la década de 1960 y posteriormente perdieron su valor comercial por la competencia frente a otros dispositivos de energía como la energía fotovoltaica.

Una aplicación prometedora son los dispositivos implantables o sensores como el que se muestra en la Figura 6. Este tipo de celdas se pueden utilizar en un sistema de administración de fármacos o como un sensor del nivel de azúcar en la sangre. El combustible para las bioceldas sería la glucosa, un azúcar presente en la sangre.

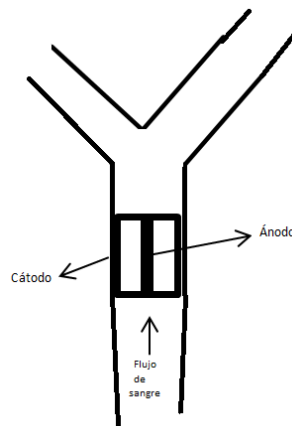


Figura 6. Celda de biocombustible implantada directamente en un vaso sanguíneo.



Otra aplicación importante para las celdas de combustible microbianas, está en el campo de la ingeniería de aguas residuales. Los microorganismos son capaces de oxidar completamente múltiples sustancias, sin embargo, la densidad de potencia que se genera es baja. Si la densidad de potencia del sistema es mayor en el futuro, el costo del tratamiento de aguas residuales puede ser compensado por la energía generada mediante este proceso de limpieza.

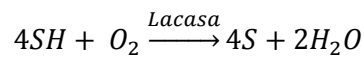
En el 2007 Sony anunció el desarrollo de una celda enzimática, utilizando la glucosa como combustible y varios mediadores [21]. La potencia de salida fue de 50 mW (1.5 mW/cm<sup>2</sup>), que fue suficiente para alimentar un reproductor MP3 portátil por unos cuantos segundos, tiempo que duró la demostración. Sin embargo, Sony no hizo mención sobre la durabilidad de la pila de combustible.

## **2.8. Lacasa.**

La lacasa fue una de las primeras enzimas en ser descritas, gracias a Yoshida que la extrajo en 1883 de los exudados de *Rhus vernicifera* (*japanese lacquer tree*, árbol de la laca). Algunos años después, en 1896, Bertrand demostró su existencia en hongos. Desde entonces se han encontrado en numerosos hongos y plantas, así como en algunas bacterias e incluso en insectos. En los últimos años se han publicado varias revisiones [22], que abarcan todos los aspectos relacionados con la lacasa: estructura, función, propiedades y aplicaciones.

### **2.8.1. Características generales.**

Las lacasas (oxígeno oxidoreductasas, EC 1.10.3.2) pertenecen a la familia de las enzimas multicobre, y se caracterizan por su capacidad de catalizar la reacción de reducción de oxígeno molecular a agua, acoplada a la oxidación de diferentes sustratos, como pueden ser fenoles, aminas, ligninas y algunos compuestos inorgánicos, de acuerdo con la reacción:



Como se ha comentado, las lacasas se encuentran fundamentalmente en plantas y hongos, y su función se relaciona con la lignificación (síntesis y degradación), aunque su mecanismo de actuación no está del todo esclarecido. En plantas también se relaciona su actividad con la protección frente a patógenos y la eliminación de fenoles, mientras que en hongos se asocia a diversos procesos celulares como esporulación y producción de pigmentos. Así, la gran mayoría de las lacasas se localizan fuera de la célula, aunque existe un pequeño porcentaje (5-12 %) de lacasas intracelulares [23].

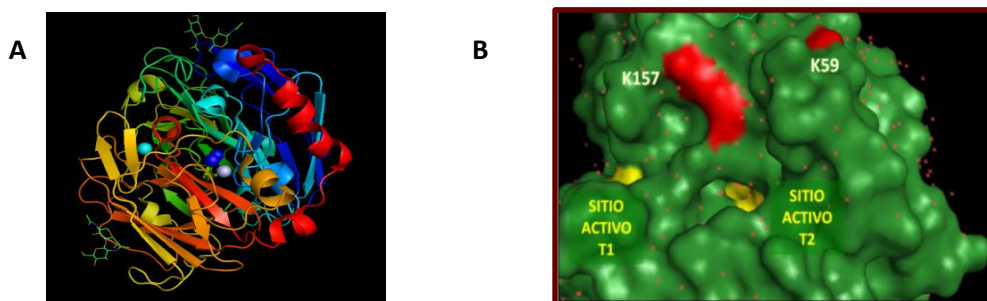
En general, las lacasas son glicoproteínas con un peso molecular de 50-130 kDa, siendo las de hongo menores (60-70 kDa). El porcentaje de carbohidratos como manosa, N-acetilglucosamina y galactosa, representa cerca de un 45 % de la masa de las lacasas de planta y un 10-20 % en las lacasas de hongo.

Las lacasas de hongos tienen un punto isoeléctrico cercano a 4.0, su pH óptimo de actividad es generalmente ácido, y su temperatura óptima de funcionamiento se encuentra entre 50 y 70 °C, aunque la estabilidad a dichas temperaturas varía mucho dependiendo de su origen [22].

### 2.8.2. Estructura.

La mayoría de lacasas son monoméricas, con tres dominios globulares conectados consecutivamente, y contienen cuatro iones cobre, repartidos en tres diferentes sitios (Figura 7). El sitio T1 se localiza en el tercer dominio, mientras que los sitios T2 y T3 se encuentran entre el primer y el tercer dominio formando el “cluster” o agrupamiento T2/T3. Existen dos canales que permiten el acceso de disolventes hacia el sitio T2/T3, uno con acceso directo al sitio T3, por el que entrará el O<sub>2</sub> que se unirá a los cobres, y otro simétrico, con acceso al T2, por el que el agua será expulsada al exterior [24, 25]. Los residuos aminoácidos del segundo y tercer dominio están involucrados en la formación del bolsillo al que se une el sustrato.

Estudios cristalográficos de la lacasa de *Corioloopsis gallica* [26], revelan que se trata de una proteína globular cuyas dimensiones son aproximadamente 55 x 51 x 69 Å. El sitio T1 se encuentra a unos 8 Å bajo la superficie de la enzima y se conecta a través de un motivo tripéptido histidina-cisteína-histidina al sitio T2/T3, que se encuentra a unos 12 Å de distancia (Figura 7).



**Figura 7.** Estructura cristalográfica de la lacasa de *Corioloopsis gallica*, modelada con Pymol: A) Mostrando los átomos de cobre en el sitio activo, B) Residuos de lisina (K) que pueden participar en la unión covalente y orientada de la enzima, mostrados en rojo. En amarillo, se muestra el sitio activo de la enzima [27].

En la Figura 7 puede apreciarse que hay un residuo de lisina (K157) muy próximo al sitio T1 de la enzima y que puede ser aprovechado para unir la enzima a través de dicho residuo en una orientación en la que dicho centro se encuentre hacia el electrodo. Siendo el ácido 4-[2-aminoetil] benzoico (AEBA), un compuesto que por su naturaleza aromática puede acoplarse directamente al sitio T1 [5].

### 2.8.3. Sitios de cobre.

El sitio activo de la lacasa contiene 4 iones cobre: un ion cobre mononuclear “azul” (sitio T1) y un sitio trinuclear de cobre (sitio T2/T3) consistiendo en un ion cobre en T2 y dos iones cobre en T3 (Figura 7). La distancia entre los sitios T2/T3 de la enzima es de 4 Å y el ion cobre del sitio T1 está localizado aproximadamente a 12 Å de ellos.

Los iones cobre de la lacasa están clasificados de acuerdo a sus diferentes espectros y propiedades paramagnéticas en estudios de resonancia paramagnética electrónica (EPR):

- Sitio T1: contiene un ión. Se caracteriza por la pronunciada banda de absorción a 600 nm ( $\epsilon \sim 5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y por un estrecho desdoblamiento en el espectro EPR ( $g_{\parallel}=2,30$ ,  $A_{\parallel}=(40-95) 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ). Los ligandos del sitio T1 son dos histidinas, a las que se une a través de un nitrógeno, y una cisteína, a la que se une a través del grupo sulfuro (Figura 8). Esta unión entre el cobre del sitio T1 y el azufre es la que proporciona el color azul característico de las lacasas. Algunas lacasas presentan otro ligando en posición axial, a una distancia mayor, que generalmente es una metionina o un aminoácido alifático.

- Sitio T2: contiene un ión cobre. Presenta un estrecho desdoblamiento en el espectro EPR ( $g_{\parallel}=2,24$ ,  $A_{\parallel}=(140-200) 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ), lo cual es típico para iones cobre en complejos tetragonales. Sus ligandos son un hidroxilo y dos histidinas, a las que se une a través de un nitrógeno (Figura 8). El sitio T2 puede ser removido de la enzima lo que provoca una pérdida significativa en la actividad enzimática.

- Sitio T3: el sitio T3 de la lacasa es un sitio de cobre binuclear con los iones de cobre emparejados antiferromagnéticamente a través de un puente hidroxilo lo que hace a este sitio diamagnético y evita su detección en el espectro de EPR. El sitio T3 puede caracterizarse por su absorción electrónica a 330 nm (en su forma oxidada). Ocho imidazoles de histidina son ligandos del sitio T2/T3 [23].

La cisteína del sitio T1 se encuentra unida a las histidinas del sitio T3, lo que proporciona un camino electrónico de enlaces covalentes entre los centros de cobre [28].

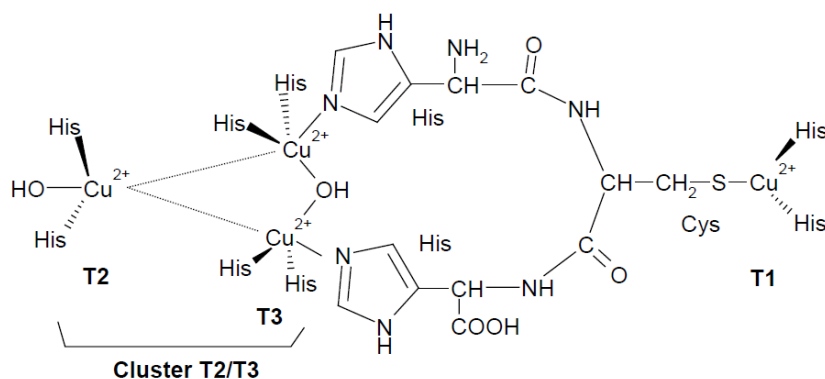


Figura 8. Sitios de cobre de la lacasa (modificado de Salomon *et al.*, [28]).

#### 2.8.4. Factores que determinan el potencial redox del sitio T1 de la lacasa.

Una característica por la cual se diferencian las distintas lacasas es el potencial de sus sitios redox. El potencial de los sitios T2 y T3 ha sido determinado para contadas lacasas [29], sin embargo el potencial del sitio T1 es conocido para gran número de lacasas [23]. Según el potencial de este sitio, las lacasas se pueden clasificar en lacasas de alto y bajo potencial. Se consideran de alto

potencial aquellas cuyo sitio T1 tiene un potencial entre 790-700 mV vs. ENH, y de bajo potencial aquellas en las que tiene un valor de 650-430 mV vs. ENH.

En un principio se pensaba que el potencial del sitio T1 estaba relacionado con el tipo de aminoácido coordinado en posición axial, puesto que las lacasas de alto potencial presentan un residuo fenilalanina como ligando axial del cobre T1, mientras que las de bajo potencial presentan un residuo leucina o metionina [23, 30]. Sin embargo, estudios de mutagénesis dirigida de diferentes lacasas han demostrado que el entorno del cobre T1 no tiene gran influencia en su potencial, y por ejemplo, el cambio del residuo leucina por fenilalanina apenas varía el potencial [31]. Por otro lado, Piontek *et al.*, [32] han sugerido que un incremento en la distancia del enlace cobre-nitrógeno (de la histidina) aumenta el potencial del sitio T1 debido a una disminución de la contribución del par electrónico libre del nitrógeno. Dicho aumento en la distancia Cu-N se daría por formación de un enlace de hidrógeno, entre un residuo glutámico, presente solo en las lacasa de alto potencial, cercano al sitio T1 y un residuo serina presente en el dominio 1, que afecta a la estructura de la lacasa incrementando la distancia de la histidina al cobre [23]. Más recientemente Durão *et al.*, [33] señalan que la accesibilidad de las moléculas de agua al sitio activo estabilizarían el estado oxidado del sitio, al contribuir con la carga negativa del oxígeno, disminuyendo el potencial redox del mismo. Matera *et al.*, [25] defienden que el potencial redox del sitio T1 no se puede atribuir a un solo factor, sino que a él contribuyen tanto la naturaleza de los ligandos y su geometría de coordinación, como otros residuos presentes en la estructura que varían el entorno del sitio T1, siendo necesario varias mutaciones para modificar el potencial redox del sitio T1 de la lacasa de *T. troglia* [25].

El sitio T1 de la enzima es el aceptor primario de electrones de sustratos reducidos. Las lacasas pueden oxidar directamente solo aquellos compuestos con potenciales de ionización menores que el ión cobre del sitio T1 de la enzima [34]. El potencial del sitio T1 de la enzima también determina la eficiencia de la catálisis de oxidación de los sustratos de la lacasa, y esto hace a las lacasas con alto potencial del sitio T1 una de las alternativa prometedoras en biotecnología.

### **2.8.5. Propiedades catalíticas y mecanismo de catálisis de la lacasa.**

#### *2.8.5.1. Reducción de oxígeno molecular.*

Como hemos visto, las lacasas son enzimas capaces de catalizar la reducción de oxígeno molecular a agua. A grandes rasgos, el sitio T1 acepta electrones del sustrato en cuatro pasos monoeléctricos, y se los pasa al sitio T2/T3, que los transmite al oxígeno en dos pasos bielectrónicos. El ciclo catalítico completo conlleva la reducción total del oxígeno formando dos moléculas de agua, para lo cual se oxidan cuatro moléculas de sustrato (Figura 8).

Aunque no hay una idea definitiva acerca del camino electrónico dentro de la proteína, ni del mecanismo por el que se produce la reducción del oxígeno, se sabe que implica la formación de un intermediario peróxido [35, 36].

Un esquema del ciclo catalítico de reducción de oxígeno, basado en estudios espectroscópicos y cristalográficos, puede verse en la Figura 9. Partiendo del intermediario nativo de la lacasa, el sustrato se oxida reduciendo el cobre del sitio T1, que transmite los electrones al cluster T2/T3, a través de los enlaces covalentes de la cadena histidina-cisteína-histidina [28] (Figura 8), formando el intermediario totalmente reducido. La forma totalmente reducida de la enzima interacciona con una molécula de oxígeno, obteniendo un intermediario peróxido en el que dos de los cobres se encuentran oxidados. En un segundo paso de reducción bielectrónica, se regenera el intermediario nativo con desprendimiento de agua. Aunque este es un modelo de ciclo catalítico ampliamente aceptado [28], Bento *et al.*, a partir de estudios de rayos de X de la estructura de la lacasa de *CotA* [24], sostienen que la entrada de oxígeno en la estructura se produce cuando todos los centros se encuentran oxidados, obteniéndose sólo la forma totalmente reducida en ausencia de oxígeno. El resto del ciclo propuesto por Bento *et al.*, es similar al detallado antes, formándose en una primera etapa bielectrónica el intermedio peróxido, que pasará en la segunda etapa a dos grupos hidroxilos que serán expulsados en forma de agua a través del cobre T2, obteniendo de nuevo la estructura oxidada.

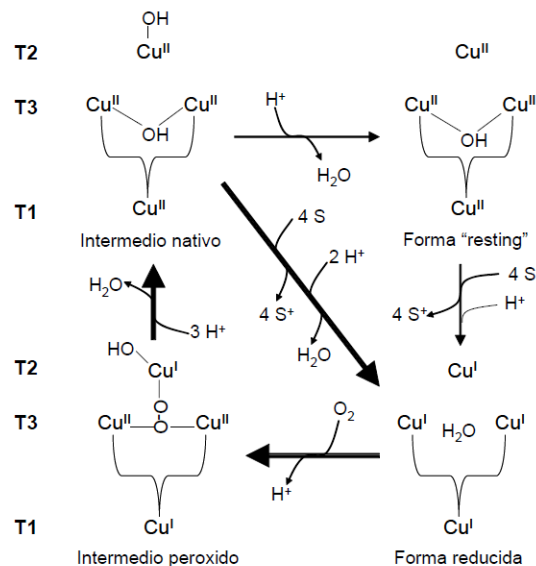
El intermedio nativo representado en la Figura 9 puede pasar a una forma “resting” por pérdida de un hidroxilo [29]. Dicha forma es una forma activa de la lacasa, aunque presenta una cinética más lenta, por lo que en presencia de sustrato el intermediario nativo evoluciona hacia el intermediario totalmente reducido, repitiendo así el ciclo catalítico [37].

Solomon *et al.*, [28] postulan dos posibles mecanismos que conllevan a la reducción del cluster T2/T3: 1) el cluster trinuclear es reducido secuencialmente por electrones que le llegan a través del sitio T1; 2) en un primer paso el cobre del sitio T1, reducido por el sustrato, pasa el electrón al sitio T2. En un segundo paso el sitio T1, nuevamente reducido por el sustrato, y el sitio T2 pasan sendos electrones a los cobres T3. En la siguiente reducción el T1 pasa de nuevo un electrón al T2 y en el cuarto paso el sitio T1 se reduce de nuevo, obteniendo una estructura en la que todos los cobres se encuentran reducidos.

#### 2.8.5.2. Oxidación de sustratos reducidos. Tipos de sustratos oxidados por la lacasa.

Como donadores de electrones las lacasas aceptan un gran número de compuestos fenólicos, a excepción de la tirosina, así como aminas, ligninas y algunos iones inorgánicos como  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ . La mejor manera de caracterizar la enzima es determinando las constantes cinéticas ( $K_M$  y  $k_{cat}$ ) para varios sustratos, pudiendo variar su valor varios órdenes de magnitud entre los mismos. Los sustratos más comúnmente utilizados en estudios con lacasas son  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ , 2,2'-azidobis(3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfónico) (ABTS), catecol, hidroquinona, guayacol y 2,6-dimetoxifenol.

La reacción catalítica implica la reducción tetraelectrónica del oxígeno acoplada a la oxidación monolectrónica del sustrato. Por lo tanto, por cada molécula de oxígeno se generan dos moléculas de agua consumiendo cuatro moléculas de sustrato.



**Figura 9.** Ciclo catalítico de la lacasa mostrando el mecanismo de reducción y oxidación de los sitios de cobre de la enzima (tomado de Shleev *et al.*, [29]. S representa un sustrato en su forma reducida.

Como ya se ha mencionado antes, el oxígeno se reduce en el cluster T2/T3, al que accede a través de un canal que comunica el cluster con el exterior. Por otra parte, el sitio T1 es el encargado de extraer los electrones del sustrato. Un estudio de la estructura cristalina de la lacasa de *CotA* en presencia de ABTS realizado por el grupo de Enguita *et al.*, [38] demostraron que el sustrato se une en una cavidad, cercana al sitio T1, formada por residuos apolares (alanina, glicina). En ese estudio se observó que el ABTS se encuentra sólo parcialmente embebido en la estructura de la lacasa. Teniendo en cuenta dicha estructura obtuvieron un modelo en el cual, parte del ABTS inmerso en la cavidad, establecía un puente de hidrógeno entre el oxígeno del sulfonato del ABTS y una glicina de la lacasa. Por otro lado, el grupo de Bertrand *et al.*, [39] reportaron en la estructura de la lacasa de *T. versicolor* la presencia de 2,5-xilidina en una cavidad bastante amplia cercana al sitio T1. La 2,5-xilidina es una arilamina usada como inductor del crecimiento en cultivos de lacasa, pudiendo actuar también como sustrato. En este caso también existen interacciones hidrofóbicas entre el sustrato y la cavidad (con residuos fenilalanina y leucina) y se establecen dos puentes de hidrógeno con la arilamina, uno con un residuo histidina coordinado al sitio T1 y otro con el oxígeno terminal de un grupo aspartato. Recientemente Matera *et al.*, [25] han reportado la estructura de la lacasa de *T. troglia* con el *p*-tolueno alojado en la cavidad cercana al sitio T1, observando que se forma un puente de hidrógeno entre el carboxilato del sustrato y una histidina de la lacasa, así como la existencia de interacciones hidrofóbicas con residuos fenilalanina, prolina y valina de la lacasa. En resumen, estos estudios indican que en la unión sustrato-lacasa son importantes tanto las interacciones hidrofóbicas como la posibilidad de establecer puentes de hidrógeno.

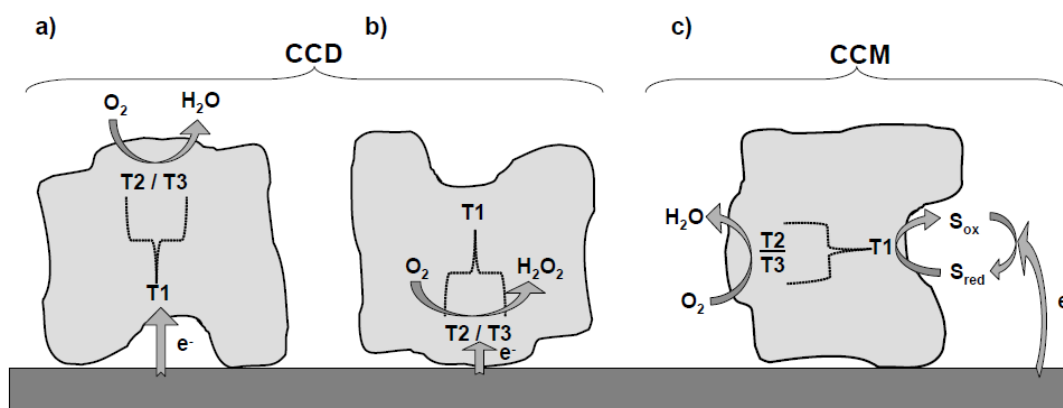
Las lacasas son inhibidas fuertemente por una gran variedad de compuestos [22]. Entre ellos destacan haluros, azidas, cianuros, hidroxilos y otros pequeños aniones. Se piensa que dichos aniones se unen al cluster T2/T3 interrumpiendo la transferencia electrónica con el T1 y, por tanto,

la catálisis [31, 40, 41]. Sin embargo, no todas las lacasas son inhibidas por el mismo anión en el mismo grado. Esto puede ser explicado debido a la diferente accesibilidad de los aniones al canal que comunica el cluster con el exterior [42].

### 2.8.6. Propiedades electrocatalíticas de la lacasa.

Cuando una enzima redox es inmovilizada de forma que su sitio activo se encuentra a una distancia adecuada del electrodo, es posible la transferencia electrónica directa (DET) entre la enzima y el electrodo. La inmovilización de la enzima en electrodos desnudos o funcionalizados con monocapas cortas o conductoras ofrece una distancia adecuada para la obtención de DET. En este caso los electrones se transmiten directamente desde el electrodo hasta el sitio activo de la enzima, para lo que es necesario que el sitio activo se encuentre orientado hacia el electrodo.

Para el caso de las lacasas, existen dos posibilidades de DET: cuando el sitio T1 se encuentra orientado hacia el electrodo, o cuando es el cluster T2/T3 el que se encuentra orientado hacia el electrodo (Figura 10 a y b). En estos casos, una medida electroquímica en presencia de oxígeno resultará en la obtención de una corriente catalítica directa (CCD). La CCD es el resultado de la reducción total de oxígeno a agua, en el caso de que el sitio T1 se encuentre orientado hacia el electrodo (Figura 10a), o la reducción parcial de oxígeno a peróxido de hidrógeno, en el caso de que la orientación sea a través del cluster T2/T3 (Figura 10b) [43].



**Figura 10.** Posibles orientaciones de la lacasa sobre el electrodo. **a)** Sitio T1 en DET con el electrodo; **b)** cluster T2/T3 en DET con el electrodo; **c)** sin DET con el electrodo, requiere la presencia de mediadores redox (S). Tomado de Shleev *et al.*, [43].

En el 2009, Vaz Domínguez [44] inmovilizó a la lacasa covalentemente a superficies de oro funcionalizadas con grupos amino mediante la reducción electroquímica de dos sales de diazonio, 4-nitrobenceno y 2-nitrofenol. La inmovilización fue realizada de dos formas: mediante formación de enlace amida entre los grupos carboxílicos de la enzima y los grupos amino de las monocapas; y mediante formación de enlace imida o base de Schiff entre los grupos aldehído de los azúcares de la lacasa y los grupos amino de la monocapa. Para ambas inmovilizaciones el potencial al que se produce la catálisis (+800 mV vs. ENH) corresponde al del potencial del sitio T1 (+780 mV vs. ENH), lo que indica que es la transferencia directa de electrones entre el electrodo y el sitio T1 de la lacasa la responsable de la corriente catalítica. Cuando la inmovilización se realiza a través de los

azúcares de la enzima (base de Schiff), se obtiene mayor recubrimiento de enzima con posibilidad de transferencia directa con el electrodo, pero su grado de orientación es menor que cuando la lacasa se orienta a través de los grupos carboxilatos (enlace amida). Esto se explica porque la distribución global de grupos carboxílicos en la lacasa es menor que la distribución de azúcares (y por tanto las posibilidades de unión de forma no orientada son mayores). En cuanto a la estabilidad operacional de los electrodos de lacasa para la reducción de O<sub>2</sub>, los electrodos modificados mediante formación de enlace amida son los que presentan una mayor estabilidad (retienen el 75 % de la corriente inicial después de 10 días de funcionamiento continuo), debido a que las bases de Schiff se hidrolizan en medio acuoso.

Un año después Martínez-Ortiz *et al.*, [5], diseñaron una celda de combustible enzimática híbrida Zn-lacasa, inmovilizando la enzima covalentemente de dos formas distintas (aleatoria y orientada). La orientación fue lograda usando como espaciador una molécula análoga al sustrato de la enzima. Los resultados mostraron que la inmovilización orientada con el uso del ácido 4-[2-aminoetil] benzoico (AEBA) como entrecruzante fue significativamente superior y alcanzando densidades de potencia de 1191  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  contra 866  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  de lacasa inmovilizada aleatoriamente, cuando la celda de combustible fue evaluada en amortiguador succinatos 50 mM, pH 4.5. La densidad de potencia que alcanza esta celda de combustible es la mayor reportada hasta ese momento para celdas de este tipo (Zn-lacasa). Sin embargo, después de 6 horas de operación se presentó un decremento del 20% en la corriente eléctrica, esta disminución la asociaron a la pasivación del ánodo de zinc, debido a la acumulación de productos de oxidación sobre la superficie del electrodo; sin embargo, también se sabe de estudios previos que la lacasa de *Corioloopsis gallica* tiene una vida media menor a 10 horas a pH de 4.5 [45].

La obtención de DET está condicionada a la distancia a la que se encuentra el sitio activo del electrodo, y, por tanto, a la orientación de la enzima. Sin embargo en la mayoría de los estudios publicados la lacasa se encuentra dispuesta al azar en el electrodo, siendo necesario en estos casos establecer contacto electrónico entre todas las moléculas de enzima activa y el electrodo mediante el uso de mediadores redox. Este tipo de transferencia se conoce como transferencia electrónica mediada (MET), puesto que es el mediador el que toma los electrones del electrodo y los transporta hasta el centro activo de la enzima (Figura 10c). Para el caso de la enzima lacasa, medidas electroquímicas en presencia de oxígeno darán como resultado la obtención de corrientes catalíticas mediadas (CCM) [46].

## 2.9. Glucosa oxidasa (GOx).

La glucosa oxidasa ( $\beta$ -D-glucosa:oxígeno 1-oxidorreductasa, EC 1.1.3.4) fue descubierta por Muller en 1828 [47]. Un año después Fleming aisló la penicilina del hongo *Penicillium notatum* [48]. El descubrimiento de Fleming lo impulsó a la búsqueda de bactericidas similares en hongos del mismo género. Ensayos de bactericidas obtenidos de los filtrados de cultivos de hongos sobre *Staphylococcus aureus*, mostraron que los filtrados contenían una sustancia similar a la ya antes descrita por Fleming; sin embargo, algunos otros solo tenían propiedades bactericidas en presencia de glucosa. Inicialmente, esta última sustancia fue denominada penicilina A [49], pero



después su nombre fue cambiado a notatina con el fin de distinguirla de la penicilina [50]. En otros lugares, casi al mismo tiempo, fueron aisladas la penicilina B y la penatina [51]. Pronto se supo que la penicilina B y la penatina eran idénticas a la notatina y además que todas ellas eran idénticas a la GOx descubierta por Muller.

La GOx ha sido aislada de numerosas fuentes, como: algas rojas [52], cítricos [53], insectos [54], bacterias [55] y hongos. En el presente trabajo, nos centraremos en la GOx de *Aspergillus niger*.

### 2.9.1. Características generales.

La GOx cataliza la oxidación de  $\beta$ -D-glucosa por oxígeno molecular a  $\delta$ -gluconolactona, la cual es hidrolizada espontáneamente a ácido glucónico (Figura 11).

La GOx es una glucoproteína que tiene unido no covalentemente al FAD, el cual actúa como transportador de electrones durante la catálisis. La enzima de *Aspergillus niger* es un homodímero de aproximadamente 80 kDa cada subunidad [56], tiene desde 10-16 % de carbohidratos (principalmente manosa) y 583 residuos de aminoácidos por cadena polipeptídica [57].

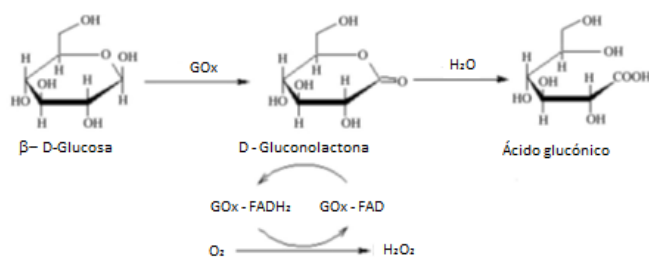


Figura 11. Reacción catalizada por GOx.

La disociación y la pérdida de FAD de cada una de las subunidades es posible bajo condiciones desnaturalizantes [58].

La GOx liofilizada es un enzima extremadamente estable: a 0 °C es estable por 2 años y a -15 °C por 8 años [47]. En solución la estabilidad depende del pH. La enzima es estable hasta por 20 horas en un rango de pH de 4-7.5 a 25 °C. Es muy resistente a la proteólisis ya que no se ve afectada por exposición prolongada a tripsina, papaína y pepsina [50].

Dado que la actividad enzimática es dependiente del estado de ionización de los aminoácidos en el sitio activo, el pH juega un papel importante en el mantenimiento de la conformación adecuada de la enzima. El pH óptimo de la GOx de *Aspergillus niger* varía desde 5 a 7 y, tiene un punto isoeléctrico de 4.2. En cuanto a la relación que existe entre la velocidad de reacción y la temperatura, se ha informado que por cada incremento de 10 °C en la temperatura la velocidad de reacción se duplica. Kalisz *et al.*, [59] reportan una temperatura óptima de 40-60 °C para GOx.

Esta enzima es fuertemente inhibida por iones  $Ag^+$ ,  $Hg^{2+}$  y  $Cu^{2+}$ , (con una  $K_i$  del orden de  $\mu$ moles/L; [60])

## 2.9.2. Especificidad por el sustrato.

Los sustratos de la GOx pueden separarse en dos grandes grupos: donadores de electrones en la media reacción de reducción, y los aceptores de electrones en la media reacción de oxidación. Dentro del primer grupo se ha reportado que numerosos azúcares y derivados de la D-glucosa son sustratos potenciales para la GOx, pero la  $\beta$ -D-glucosa es por mucho el mejor. Además, Chan and Bruice [61] han informado que compuestos con  $\alpha$ -hidroxicarbonilos tales como gliceraldehído y dihidroxiacetona son sustratos de la GOx, al actuar como análogos de la glucosa. Se ha encontrado que estos últimos compuestos reducen directamente Enzima-FAD a Enzima-FADH<sub>2</sub>, bajo condiciones anaeróbicas.

El segundo grupo de sustratos son los aceptores de electrones en la media reacción de oxidación. Wohlfahrt *et al.*, [62] han reportado a la benzoquinonas, naftoquinonas y al oxígeno molecular, como buenos aceptores de electrones, sin embargo, GOx muestra mayor afinidad por este último sustrato.

## 2.9.3. Mecanismo de catálisis.

### 2.9.3.1. Media reacción de oxidación.

Investigaciones cristalográficas de la glucosa oxidasa indican que el acceso al sistema de flavina en el sitio activo está provisto por un profundo hueco; el grupo prostético, FAD, está localizado en el fondo del hueco (aproximadamente a 19 Å de la superficie de la proteína) [63]. El centro de la reacción catalítica es la posición N5 del anillo de isoaloxacina del FAD (Figura 13).

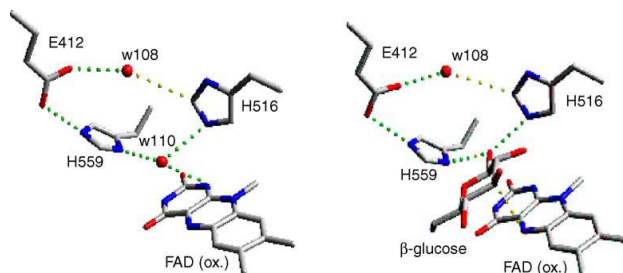
Solamente las cadenas laterales de 3 aminoácidos están cercanas al centro de reacción, la cadena lateral del ácido glutámico, E412, y la cadena lateral de dos residuos de histidina, H516 y H559.

En la enzima oxidada libre, el sitio activo contiene una molécula de agua, w110, que forma puentes de hidrógeno con dos residuos conservados de histidina, H516 y H559, y con la posición N1 del FAD (2.61, 2.92 y 2.70 Å, respectivamente). En el primer modelo en la Figura 12 (enzima oxidada libre), la enzima está cristalizada a pH 5.6 y la simulación con dinámica molecular muestra baja estabilidad de la H516 en su forma neutral, por lo que se asume que ambas histidinas están protonadas en ambos nitrógenos [64].

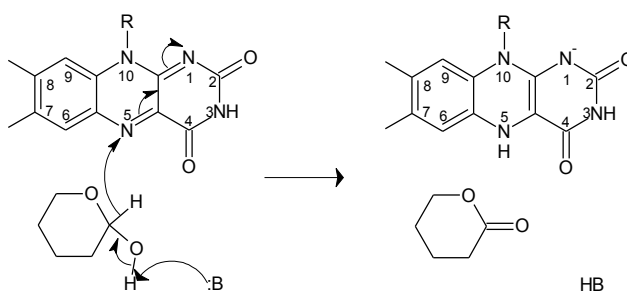
En el segundo modelo de la Figura 12 (complejo enzima oxidada-glucosa), se obtiene un modelo molecular estable cuando ambos nitrógenos de la H559 están protonados y solo uno de la H516. La distancia entre el N5 de la flavina oxidada y el C1 de la glucosa es 3.42 Å; además de una distancia óptima, también el ángulo es favorable para la transferencia de hidruro del C1 de la glucosa al N5 de la flavina [65].

El mecanismo de abstracción de hidruro se describe como la remoción de un protón del grupo hidroxilo de C1 de la glucosa por un grupo básico de la enzima (H516Nε2), aunado a la transferencia directa de hidruro de la posición C1 de la glucosa a la posición N5 del FAD [66, 67] (Figura 13). La remoción de una carga positiva de la glucosa facilita la transferencia de hidruro de

C1 de la glucosa al anillo de isoaloxacina. La transferencia de hidruro de C1 de la glucosa al N5 del anillo de isoaloxacina creará una carga negativa alrededor de N1 y, es el paso limitante en la media reacción de reducción de la GOx. Estudios de NMR de la GOx a pH de 5.6, en ausencia de oxígeno, indican la presencia de una carga negativa en la posición N1-C<sub>2</sub>=O<sub>2</sub> de la coenzima reducida [68].



**Figura 12.** Sitio activo de la enzima oxidada y del complejo enzima-FAD<sub>ox</sub>-β-D-glucosa [64].



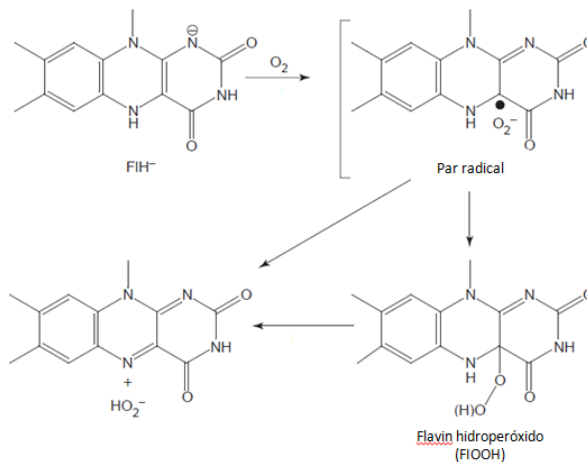
**Figura 13.** Mecanismo de abstracción de hidruro.

### 2.9.3.2. Media reacción de oxidación.

En la media reacción de oxidación, la coenzima reducida, FADH<sup>-</sup>, es reoxidada por oxígeno molecular el cual es reducido a peróxido de hidrógeno; esta reacción procede a través de dos etapas de transferencia de un electrón. Los intermediarios de esta reacción son el par radical-anión superóxido y el radical flavin semiquinona [67] (Figura 14 y 15).



**Figura 14.** Modelo molecular del par radical-anión [60].



**Figura 15.** Oxidación de flavoprotein oxidasas por oxígeno [64].

Cabe mencionar que, la reacción entre la flavina libre y oxígeno exhiben una constante de velocidad de segundo orden de  $2.5 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  en solución acuosa. En contraste, con la reacción catalizada con la enzima, cuya constante de velocidad es de  $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Estudios recientes sugieren que es la protonación de la cadena lateral de la H516, lo que potencia la reactividad en un orden de magnitud de  $1 \times 10^4$ . Este residuo está ubicado frente al C4a- y N5 del anillo de isoaloxacina y, el resto de los aminoácidos (H559 y E412), mediante sus interacciones electrostáticas favorecen la reacción para la formación del par radical-anión superóxido y flavin semiquinona [69].

Existe evidencia espectroscópica a bajo pH que afirma que la etapa que limita la velocidad de reacción entre  $\text{FADH}^-$  y  $\text{O}_2$  ocurre después de la formación del complejo  $[\text{E}(\text{FADH}^\bullet, \text{HisH}^+)\text{O}_2]$  y antes de la desaparición del complejo  $[\text{E}(\text{FADH}^\bullet, \text{HisH}^+)\text{O}_2]$  [67].

#### 2.9.4. Propiedades electrocatalíticas de GOx.

Como se mencionó anteriormente, las enzimas que tienen al FAD como centro redox, tienen dificultad para llevar a cabo una transferencia directa de electrones, ya que el FAD se encuentra aproximadamente a  $19 \text{ \AA}$  de la superficie de la enzima, esta distancia supera la distancia que los electrones pueden viajar por efecto túnel; y es por ello que normalmente requieren mediadores que sean capaces de tener contacto con la enzima para la transferencia de carga [2]. Los más utilizados son, el ferroceno y los polímeros redox basados en osmio.

La primera celda de combustible enzimática glucosa/oxígeno, que operaba a pH neutro fue descrita por Yahiro *et al.*, en 1964 [70]. Posteriormente, Willner *et al.*, desarrollaron una celda de biocombustible que empleaba enzimas en ambos electrodos [71]. En la reacción anódica se llevaba a cabo la oxidación de glucosa a ácido glucónico en presencia de GOx reconstituida en una monocapa PQQ-FAD, en el cátodo se reducía el peróxido de hidrógeno por la microperoxidasa-11 (MP-11). Se estima que la GOx reconstituida de esta forma, funciona a una velocidad de intercambio de transferencia de electrones ( $\text{TR}$  o  $k_{\text{cat}}$ ) ligeramente superior a la GOx nativa con el oxígeno como aceptor de electrones ( $k_{\text{cat}} = 700 \text{ s}^{-1}$ ), siendo este parámetro el más relevante en cuanto al diseño molecular de un electrodo. Esta celda de biocombustible produjo una densidad de corriente de  $114 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  y una máxima densidad de potencia de  $32 \mu\text{W}$ . La potencia de salida disminuyó en un 50 % después de 3 horas de operación, lo cual puede atribuirse al agotamiento del combustible, entre otras cosas [71]. Posteriormente, Katz *et al.*, diseñaron una celda de combustible reemplazando a la MP-11 por el complejo citocromo c/citocromo oxidasa [72]. El potencial a circuito abierto fue de 110 mV y la densidad de potencia máxima fue de  $5 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ . Además de las modificaciones antes mencionadas, Katz *et al.*, desarrollaron otra variante del sistema GOx/MP-11, que implicó la separación de las dos reacciones (anódica y catódica) por medio de una interfase líquido-líquido (agua-diclorometano). Ambos electrodos biocatalíticos, Au/PQQ-FAD-GOD y Au/MP-11, se integraron en un solo sistema, dicha celda empleaba glucosa y peróxido de cumeno como combustible y oxidante, respectivamente. Este sistema produjo una potencia máxima de  $520 \mu\text{W}$  y una corriente a corto circuito de  $830 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  [73]. Otra estrategia empleada para lograr la DET empleando a la GOx, es la propuesta por Liu *et al.*, en 2007 [74]. Electrodo de

carbono vítreo fueron modificados con una monocapa mixta de 4-carboxifenil y un oligo (feniletinil) de 20 Å de longitud (cable molecular), ensambladas a partir de las sales de aril diazonio correspondiente. Este sistema mostro una velocidad de transferencia de electrones de  $1.1 \text{ s}^{-1}$ , esta velocidad es significativamente menor a la reportada por Willner et al., ( $\sim 900 \text{ s}^{-1}$ ) [75].

En 2003, Xiao *et al.*, [76] reconstituyeron la apo-glucosa oxidasa sobre nanopartículas de oro (1.4 nm de diámetro) funcionalizadas con FAD e integradas dentro de una película conductora que rendía un sistema bioelectroquímico con excepcional contacto eléctrico con el electrodo, con la velocidad de recambio de transferencia de electrones más alta reportada hasta el momento. La velocidad de transferencia de electrones de este sistema fue de  $\sim 5000 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente 7 veces más alta que la  $k_{cat}$  con el oxígeno molecular ( $\sim 700 \text{ s}^{-1}$ ), quien es el aceptor natural de la glucosa oxidasa. Ellos concluyeron, que las nanopartículas de oro actúan como unidades transportadoras de electrones o “electrical nanoplug” para el alineamiento de la enzima sobre la película conductora y para el “cableado eléctrico” del sitio activo de la enzima a la superficie del electrodo. Un año más tarde Patolsky *et al.*, [77] por primera vez reconstituían la apoGOx sobre el borde de nanotubos de carbono de una sola pared (SWCNT, por sus siglas en inglés) alineados sobre una superficie de oro. Ellos revelan que los SWCNT actúan como nanoconectores entre el sitio activo de la enzima y el electrodo; además, demuestran que la velocidad de transporte de electrones está controlada por la longitud de los SWCNT y cuando éste último tiene una longitud de 25 nm, obtienen una  $k_{cat}$  de hasta  $4100 \text{ s}^{-1}$ .

Estudios recientes demuestran que, electrodos modificados con GOx desglucosilada (dGOx) exhiben mayor densidad de corriente que aquellos con GOx nativa [78]. Esto se debe a que la desglucosilación de la proteína permite un mayor acercamiento del sitio activo a la superficie del electrodo y permite la transferencia directa de electrones. Por ejemplo, Demin y Hall [79] observaron una constante de transferencia de electrones de  $350 \text{ s}^{-1}$  en condiciones anaeróbicas después de inmovilizar dGOx a un electrodo a través de una cola de histidinas. En años recientes, Courjean *et al.*, 2009 [80], lograron desglucosilar casi por completo a la GOx y la inmovilizaron sobre electrodos de carbono vítreo, produciendo  $235 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  a  $-200 \text{ mV}$  vs Ag/AgCl. La velocidad de recambio máxima fue de  $1300 \text{ s}^{-1}$ .

Los antecedentes disponibles hacen notar, que las propiedades tanto del soporte como del espaciador empleados en la fabricación de los electrodos enzimáticos juegan un papel crucial en el adecuado contacto eléctrico entre las proteínas redox inmovilizadas de forma orientada y la superficie del electrodo, lo que se ve reflejado en su valor de la  $k_{cat}$ .

### **3. JUSTIFICACIÓN.**

Actualmente es primordial la búsqueda, desarrollo e implementación de fuentes de energía alternativas que sean económicas y ambientalmente sustentables. Los avances realizados en la investigación de las celdas de combustible biológicas han permitido comprender sus ventajas y aplicaciones potenciales (las cuales no solo se centran en la generación de energía eléctrica; sino además en el campo de la biorremediación).

Uno de los elementos críticos en la eficiencia de las celdas de combustible, se relaciona con el método de inmovilización de la enzima empleada (aleatorio o sitio-específica). Es por ello, que este trabajo está enfocado en la construcción de una celda de combustible enzimática, con ambos electrodos diseñados molecularmente. Todo con la finalidad de incrementar tanto la densidad de enzima activa inmovilizada como de orientar apropiadamente la enzima hacia la superficie del electrodo, para lograr una transferencia electrónica directa. Esto nos permitirá obtener una mayor densidad de potencia eléctrica y mejor estabilidad operacional; así como también nos evitará usar mediadores, los cuales además de ser costosos, son potencialmente tóxicos y de baja estabilidad.

## **4. HIPÓTESIS.**

La naturaleza química de los soportes y espaciadores modulan la transferencia de electrones en electrodos con enzimas inmovilizadas de forma orientada.

## **5. OBJETIVOS.**

### **5.1. OBJETIVO GENERAL**

Construir y estudiar el desempeño una celda de combustible enzimática integrada por un ánodo de glucosa oxidasa y un cátodo de lacasa, inmovilizadas en forma orientada.

### **5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Inmovilizar covalentemente y de manera orientada a la enzima glucosa oxidasa (ánodo), utilizando soportes y espaciadores con distintas propiedades.
- Evaluar la capacidad de los electrodos en términos de actividad enzimática y propiedades electroquímicas.
- Construir la celda de combustible enzimática complementando con un cátodo de lacasa previamente caracterizado.
- Evaluar la funcionalidad y estabilidad operacional de la celda de combustible enzimática.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 6.1. Enzimas y reactivos.

Las láminas de grafito laminado SIGRACET (GDL 30 BC, GDL 35 BC) y de oro que se emplean como soporte, fueron proporcionadas por el Dr. Roberto Flores (Instituto de Investigaciones Eléctricas, Cuernavaca, Morelos, México). El N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida hidroclicado (EDC), ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES), ácido malónico, ácido 4-[2-aminoetil] benzoico hidroclicado (EABA), ácido 4-marcaptobenzoico, albumina de suero bovino (BSA), la sal disódica del FAD, la siringaldazina, la Peroxidasa de rábano tipo X y el ABTS fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Chemical Coportarion. El hidróxido de sodio, cloruro de potasio, ferricianuro potásico, ácido succínico, sulfato de amonio, ácido malónico, fosfato de potasio monobásico/dibásico, ácido nítrico, ácido sulfúrico concentrado, isopropanol, metanol y acetona fueron adquiridos de J. T. Baker. El tolueno de Fisher Scientific, el dimetilsulfóxido (DMSO) y diclorometano de Honeywell y el tetrahidrofurano (THF) de Burdick & Jackson. La glucosa oxidasa (12 U/mg) se adquirió de Merck, el kit para la cuantificación de proteína de Bio-Rad Laboratories y la membrana de ultrafiltración de 10 kDa de Milipore Corporation. Los nanotubos de carbono de pared múltiple carboxilados (MWCNT) fueron adquiridos de US Research Nanomaterials, Inc.

Durante el texto se emplearán de forma indistinta los términos láminas de carbono y láminas de grafito para hacer referencia al mismo soporte.

### 6.2. Electrodo.

#### 6.2.1. Pretratamiento de los electrodos.

Los electrodos de grafito primeramente se pulieron con una lija (1500) con la finalidad de retirar la capa microporosa hidrofóbica que viene depositada en uno de los lados. Posteriormente, fueron lavados con diclorometano y THF.

Los electrodos de oro (1 cm<sup>2</sup>, área geométrica) fueron limpiados en una solución de KOH 2 M llevada a ebullición por 1 hora seguido de un enjuague con agua. A continuación, los electrodos fueron almacenados en ácido sulfúrico concentrado. Antes de la modificación química de los electrodos, estos fueron enjuagados con agua, después se sumergieron por 10 min en ácido nítrico concentrado y nuevamente enjuagados con agua. Posteriormente, se lleva a cabo una voltametría cíclica en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M para determinar el factor de rugosidad de la superficie del electrodo [81]. Una vez concluida la voltametría cíclica el electrodo está listo para ser modificado químicamente. La determinación de este factor es importante ya que influye en la resistencia de transferencia de carga, una rugosidad muy alta puede presentar problemas de transferencia de masa a través de ella (sustratos); así como también, se pueden presentar problemas estéricos al no poder penetrar las enzimas a través de los poros (en caso de ser un poro de menor tamaño al de la proteína), lo que además implica que haya área activa que no puede ser aprovechada.



### 6.2.2. Área geométrica.

Tanto para los electrodos de oro como para los electrodos de grafito, el área geométrica se calculó a partir de la relación  $A_g = \pi r^2$  o  $A_g = L \cdot L$ , en donde “r” es el radio de los electrodos de oro y “L” la longitud de cada lado de los electrodos de carbono. Para determinar el factor de rugosidad, el área que se empleó fue de 0.03 cm<sup>2</sup>.

### 6.2.3. Área microscópica.

#### 6.2.3.1. Electrodos de grafito laminado SIGRACET.

El área real de los electrodos de grafito, se determinó a través de la relación  $I_{pa\text{ exp}}/I_{pa\text{ teórico}}$ , donde  $I_{pa\text{ exp}}$  es la corriente del pico de oxidación del ión  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  en una solución de KCl 0.2M, pH 5.0. El potencial del electrodo se barrió entre 560 y -40 mV vs SCE a 25 mV/s hasta obtener un VC constante y  $I_{pa\text{ teórico}}$  es la corriente que se calcula a partir de la ecuación de Randles-Sevick [82]:

$$I_{pa} = (2.69 \times 10^5) n^{\frac{3}{2}} A_g D^{\frac{1}{2}} C_{\infty} v^{\frac{1}{2}}$$

Donde  $I_{pa}$  es la corriente del pico,  $n$  es el número de electrones transferidos en el proceso ( $n=1$ ),  $A_g$  es el área geométrica del electrodo (cm<sup>2</sup>),  $D$  es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva ( $7.6 \times 10^{-6}$  cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>),  $C_{\infty}$  es la concentración en la disolución de la especie ( $1 \times 10^{-6}$  mol cm<sup>-3</sup>), y  $v$  es la velocidad de barrido de potencial ( $0.025$  V s<sup>-1</sup>).

#### 6.2.3.2. Electrodos de oro.

Para el caso de los electrodos de oro, el área microscópica se calculó barriendo el potencial (100 mV/s) del electrodo entre -240 y +1660 mV vs SCE en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M, hasta obtener un VC constante. Para el cálculo se integró el pico de reducción obtenido aproximadamente a unos 860 mV, que está asociado a la desorción de una monocapa completa de óxido de oro (Au<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (Figura 16). La concentración de átomos de oro superficial depende del plano que se encuentre expuesto, puesto que no presentan la misma concentración un plano (111) que un plano (110). Cuando se trata de oro policristalino es difícil determinar el porcentaje de cada plano que se encuentra expuesto, por lo que se puede usar una concentración media basada en la densidad del oro (19.3 g/cm<sup>3</sup>, oro puro), su peso atómico (196.967 g/mol) y un espesor correspondiente al diámetro atómico (2.6 Å). De esta forma se establece que, para la oxidación completa de la superficie de oro, es necesaria una carga de 400 μC/cm<sup>2</sup> [83].

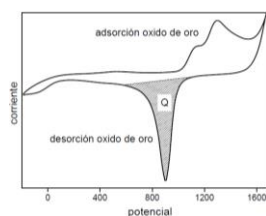
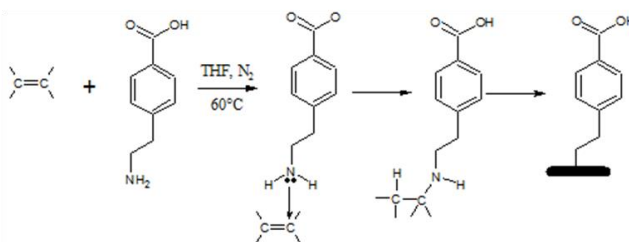


Figura 16. Voltametría cíclica del oro en medio ácido [44].

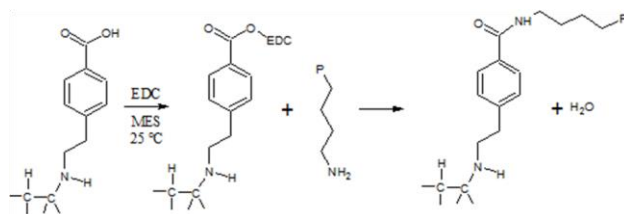
## 6.2.4. Cátodo de lacasa.

### 6.2.4.1. Inmovilización de lacasa sobre grafito.

Las láminas de grafito se modificaron con ácido 4-[2-aminoetil] benzoico según el procedimiento descrito por Buttry *et al.*, (1999) [84]. Se disolvieron 180 mg de AEBA en 10 mL de hidróxido de sodio 0.2 M, esto con la finalidad de desproteger el grupo amino. El AEBA se extrajo con 1.5 mL de tolueno y se añadió a 3 mL de THF. La lámina de grafito (1 cm<sup>2</sup>, en todos los casos de hará referencia al área geométrica a menos que se indique lo contrario) se sumergió en la solución de AEBA (1 mL) y se calentó a 60 °C por 15 horas. Posteriormente, las láminas de grafito se lavaron secuencialmente con 10 mL de metanol, acetona, THF y agua destilada, por último fueron secadas. Debido a la inestabilidad del AEBA, todos los reactivos empleados para este proceso fueron previamente desoxigenados burbujeando nitrógeno y las reacciones se llevaron a cabo bajo atmósfera de nitrógeno (Figura 17). Una vez modificadas las láminas de grafito, se incubaron durante 4 horas en 1 mL de amortiguador MES 50 mM (pH 5) que contiene 10 µL de solución de lacasa (528 U/mg) y 5 mg/mL de EDC (Figura 18). Las láminas de grafito cubiertas con lacasa se lavaron exhaustivamente con amortiguador de fosfatos 10 mM (pH 6) y se almacenaron en esta solución a 4 °C hasta su uso.



**Figura 17.** Funcionalización de las láminas de grafito con AEBA.



**Figura 18.** Unión covalente y orientada de la lacasa a las láminas de grafito funcionalizadas. Solo se muestra la cadena lateral de un residuo de lisina, pues, a través de estos residuos se formara un enlace amida; la letra “P” hace referencia al resto de la proteína.

### 6.2.4.2. Actividad lacasa

La actividad lacasa se determinó espectrofotométricamente a 436 nm. La mezcla de reacción contenía ABTS 500 µM en amortiguador de acetatos 100 mM (pH 4.5) usando un coeficiente de extinción de 29,300 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> [85]. La actividad enzimática en las láminas de grafito se estima al sumergir la lámina de carbono 1 cm<sup>2</sup> en 1 mL de amortiguador acetatos 100 mM (pH 4.5) con 500 µM de ABTS. Después de 1 minuto de reacción se mide el cambio de absorbancia a 436 nm en un

espectrofotómetro Beckman DU 530. Una unidad de lacasa como 1  $\mu\text{mol}$  de ABTS transformado por minuto. Así mismo, se realizó la oxidación del ABTS sobre electrodos sin lacasa como control.

#### 6.2.4.3. Cuantificación de proteína inmovilizada.

La cuantificación de proteína por unidad de área ( $\text{cm}^2$ ), se realizó de la siguiente manera: con 250  $\mu\text{L}$  de BSA (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) se determinó la proporción de reactivo de Bradford requerida para obtener una absorbancia control de 0.41. Posteriormente, las láminas de carbono cubiertas con lacasa fueron incubadas en una solución de reacción de Bradford establecida: 700  $\mu\text{L}$  de amortiguador fosfatos 10 mM (pH 6), 250  $\mu\text{L}$  de una solución de albúmina de suero bovino (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y 50  $\mu\text{L}$  del 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 respecto al control. Asimismo, se realizó la medición en las láminas de carbono sin lacasa como control adicional.

#### 6.2.4.4. Caracterización electroquímica.

##### a. Resistencia eléctrica por contacto.

Las mediciones de resistencia eléctrica por contacto de los electrodos de lacasa se realizaron mediante la técnica de impedancia utilizando un potenciostato Solartron-1287 y un analizador de frecuencia/impedancia Solartron-SI 1260. La resistencia eléctrica fue evaluada mediante el software Zplot y Zwie 2-2.zv2. Se aplicó un potencial eléctrico AC de 10 mV, y se midió la resistencia en función del torque ejercido sobre dos placas de cobre que contenían el electrodo de lacasa entre ellas. Las placas de cobre se aislaron entre sí por dos láminas de acetato (0.16 y 0.1 mm de espesor), existiendo solo contacto eléctrico en la región central ( $1 \text{ cm}^2$ ) donde se ubicaba el electrodo de lacasa. La presión efectuada por las placas de cobre sobre el electrodo, fue provocada por la torsión de los tornillos (a través de un torquímetro graduado) que sujetaban las placas metálicas.

##### b. Potencial a circuito abierto

El potencial a circuito abierto (OCP, por sus siglas en inglés) del electrodo de lacasa ( $1 \text{ cm}^2$ ) fue medido con un potenciostato Solartron-1287 y el software CorrWare y CorrView versión 3.1c. El sistema de medición se integró por un electrodo de trabajo (WE, por sus siglas en inglés) a base del cátodo de lacasa sumergido en amortiguador succinatos 50 mM, pH 4.5; y un electrodo de referencia (RE, por sus siglas en inglés) de calomel  $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ , en solución saturada de KCl (SCE, por sus siglas en inglés), el cual tiene un potencial eléctrico de +0.242 V (vs electrodo estándar de hidrógeno, SHE por sus siglas en inglés).

##### c. Voltamperometría cíclica

Las mediciones de voltamperometría cíclica del cátodo de lacasa ( $1 \text{ cm}^2$ ) se llevaron a cabo en el potenciostato Solartron-1287 y el software CorrWare y CorrView 3.3. Las mediciones se hicieron en un rango de -0.1 V a +1.2 V a 10 mV/s (4 ciclos). El sistema de control consta de 3 electrodos: el

cátodo de lacasa, un electrodo de referencia (Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en solución saturada de KCl) y una malla de platino como contraelectrodo. Este sistema se coloca en amortiguador fosfatos 100 mM, pH 5.0. Durante las mediciones, el amortiguador fosfatos se saturó con oxígeno.

## 6.2.5. Ánodo de glucosa oxidasa.

### 6.2.5.1. Inmovilización covalente aleatoria de GOx sobre grafito.

Las láminas de carbono de 1cm<sup>2</sup> fueron oxidadas al ser tratadas a reflujo con HNO<sub>3</sub> a 80 °C por 2 horas dentro de un termo-block Equatherm. La finalidad de este tratamiento es la de producir grupos carboxilo sobre la superficie de la lámina de carbono [86] (Figura 19). Después las láminas de carbono se lavaron exhaustivamente con agua destilada y se secan. Las láminas de carbono fueron incubadas en amortiguador MES 50 mM, pH 5.0 (1 mL) y de EDC (5 mg/mL), adicionado con 100 µL de una solución de GOx (50 mg/mL). La reacción de unión química (entre los residuos carboxilos de la superficie de carbono y los residuos amino externos de GOx) se desarrolla a temperatura ambiente y en condiciones de agitación (80 rpm) por 4 horas. Finalmente, se realizaron 3 lavados con un amortiguador fosfatos 10 mM (pH 7). Estas láminas de carbono cubiertas con GOx fueron sumergidas en un amortiguador fosfatos 10 mM (pH 7) y almacenadas en condiciones de refrigeración.

### 6.2.5.2. Inmovilización covalente y orientada de la GOx sobre láminas de grafito.

#### a. Reconstitución sobre tri o pentapéptidos\* (Modificado de Willner *et al.*, 1996 [87])

Las láminas de grafito (1 cm<sup>2</sup>) son carboxiladas al ser tratadas a reflujo con HNO<sub>3</sub> a 80 °C por 2 horas. Después, las láminas de carbono, se lavaron exhaustivamente con agua destilada y se secan. Posteriormente, un péptido (tri o pentapéptido) se une covalentemente a los grupos carboxilos de la superficie de carbono en presencia de EDC (5 mg/mL, en amortiguador MES 50 mM, pH 5.0). Más tarde, el FAD es enlazado covalentemente a la superficie de carbono funcionalizada (con algún péptido), usando nuevamente EDC como activador de grupos carboxilos. Por último, estos electrodos son empleados para reconstituir la apoglucosa oxidasa (apoGOx). La Figura 20, muestra un esquema general de la construcción del ánodo de glucosa oxidasa de forma orientada.

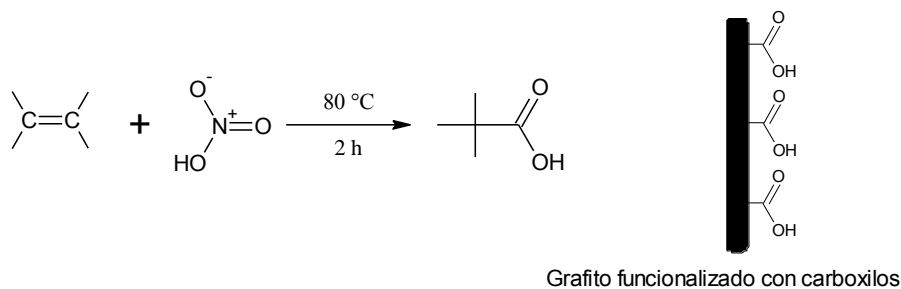
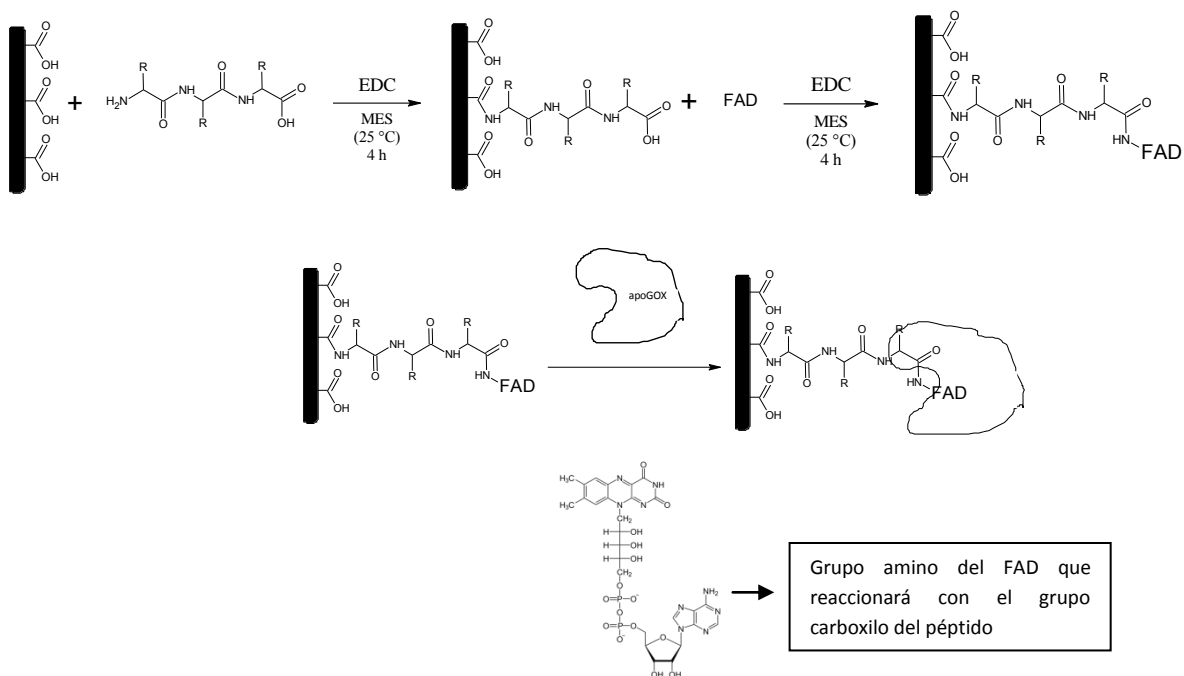


Figura 19. Carboxilación de láminas de carbono.



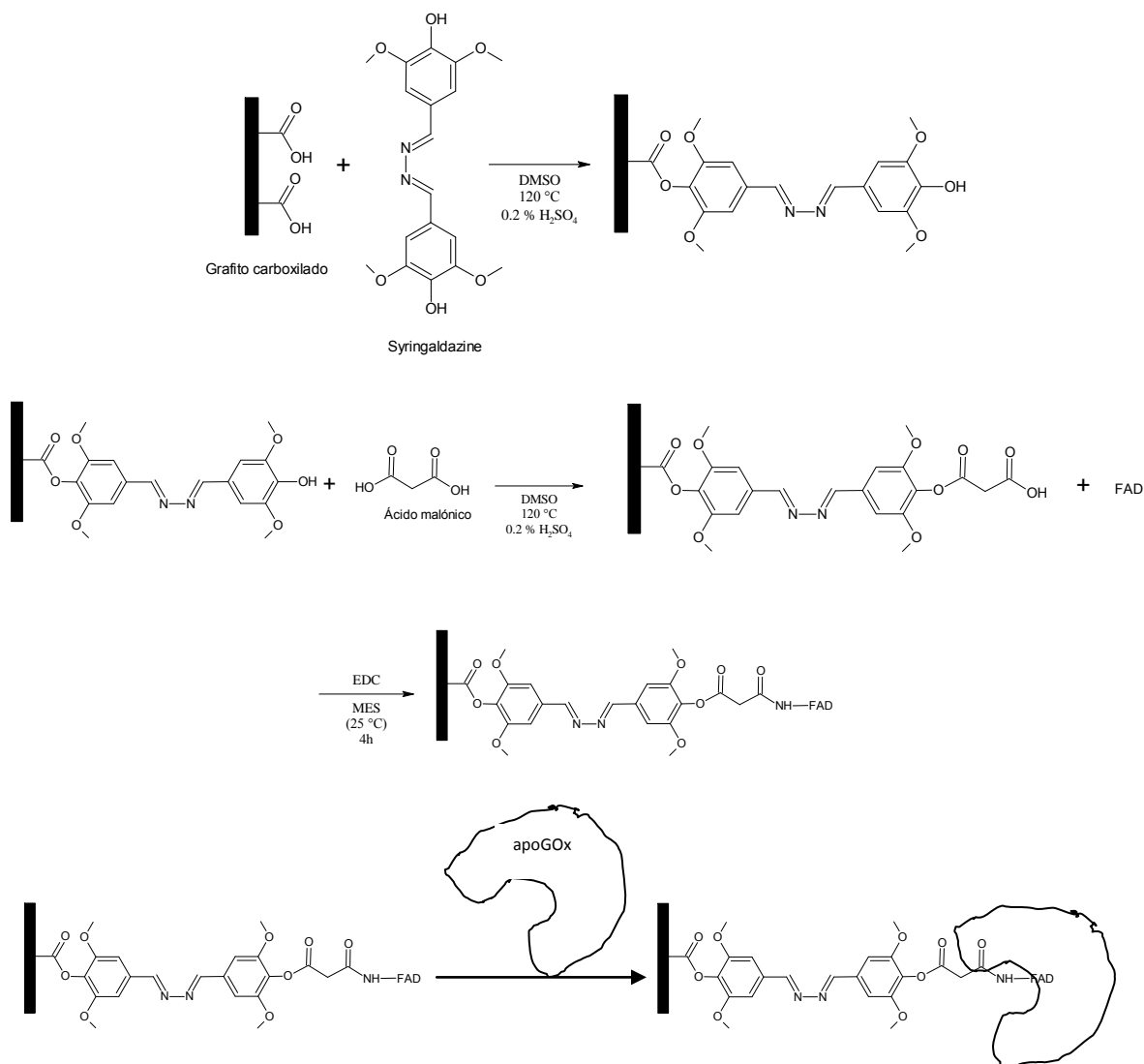
**Figura 20.** Reconstitución de la apoGox sobre electrodos de grafito funcionalizados con un péptido-FAD. Por comodidad solo se muestra el tripéptido pero también se emplearán pentapéptidos de fenilalanina (F) y triptófano (W).

#### b. Reconstitución sobre un espaciador a base de Siringaldazina-malónico.

Otra opción para lograr la transferencia directa de electrones se basa en reconstituir la apoGOx sobre un espaciador a base de siringaldazina-malónico, esto se hace con la finalidad de aprovechar la resonancia que presenta la siringaldazina y un potencial redox más oxidante que el FAD.

Primeramente el grafito ( $1 \text{ cm}^2$ ) es carboxilado, siguiendo el procedimiento del apartado anterior. Una vez carboxilado, se llevará a cabo una primera reacción de esterificación entre los grupos  $-\text{OH}$  de la siringaldazina y los carboxilos del grafito funcionalizado [88]. Posteriormente, se lleva a cabo una segunda reacción de esterificación entre la siringaldazina y el ácido malónico. Después, el FAD es unido covalentemente al grafito funcionalizado con siringaldazina-malónico a través de un enlace tipo amida, usando EDC (5 mg/mL) como activador de grupos carboxilos. Por último, la apoGOx es reconstituida sobre estos electrodos. La Figura 21, muestra el proceso completo.

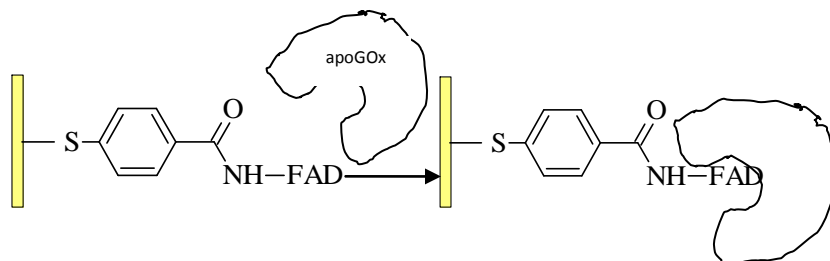
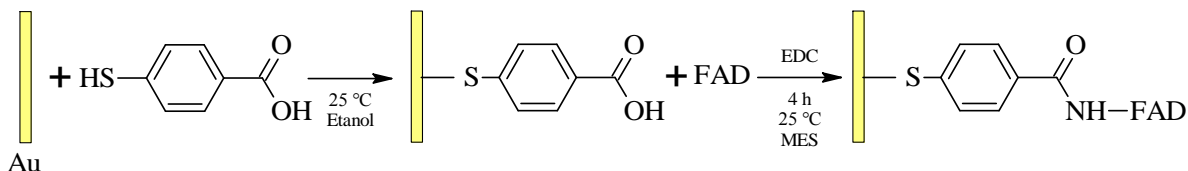
La reacción de esterificación se realizó sumergiendo la lámina de carbono carboxilada en DMSO conteniendo siringaldazina (0.01 g/mL) o ácido malónico (0.075 g/mL) y ácido sulfúrico en concentraciones traza (0.2 %). La mezcla de reacción anterior es calentada hasta  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  por 6 horas, y está acoplada a una trampa de agua para impedir que se lleve a cabo la hidrólisis del enlace éster.



**Figura 21.** Reconstitución de la apoGOx sobre electrodos de grafito funcionalizados con siringaldazina-malónico-FAD.

### 6.2.5.3. Inmovilización covalente y orientada de la GOx sobre electrodos de oro.

Los electrodos de oro (1 cm<sup>2</sup>, área geométrica), fueron incubados toda la noche a temperatura ambiente con una solución de etanol que contiene ácido 4-mercaptobenzoico 10 mM, después fueron lavados con etanol y agua. Posteriormente, se sumergió el soporte funcionalizado en amortiguador HEPES 0.03 M, pH 7.9, conteniendo 700 μM de FAD por una hora a temperatura ambiente y después toda la noche a 4 °C; el amortiguador contenía 5 mM de EDC. Finalmente, la apoGOx es reconstituida sobre estos electrodos. En la siguiente figura se esquematiza el proceso de inmovilización.



**Figura 22.** Reconstitución de apoGOx sobre electrodos de oro funcionalizados con ácido 4-mercaptobenzoico-FAD.

- Obtención de la apoglucosa oxidasa (apoGOx) (Método de Swoboda, 1969 [89])

Una solución saturada de sulfato de amonio al 25 % (5 mL) es acidificada a pH 1.4 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Posteriormente, 37.5 mg de GOx en 0.5 mL de solución fueron adicionados gota a gota a esta solución de sulfato de amonio acidificada, en agitación a 4°C. La solución es centrifugada a 13,000 rpm por 15 min y es removido el sobrenadante (que contiene el FAD). El precipitado es redisuelto y neutralizado por adición de acetato de sodio. La solución neutralizada es sometida a 2 ciclos más de precipitación, centrifugación y neutralización. Finalmente, la proteína es lavada 3 veces en una celda de ultrafiltración (Amicon) con amortiguador fosfatos 10 mM (pH 7). La apoGOx es almacenada a 0°C en amortiguador fosfatos pH 7 y tiene la capacidad de ser reactivada con FAD.

- Obtención de la apoglucosa oxidasa (apoGOx) (Método de Morris *et al.*, 1983 [90])

La glucosa oxidasa (75 mg) es disuelta en 1 mL de amortiguador fosfatos 25 mM, pH 6, el cual contiene glicerol al 30 % (w/v) (esta solución enzimática debe prepararse a 4 °C). La concentración exacta de la solución enzimática es calculada a partir de la absorbancia de la solución a 450 nm, longitud de onda de máxima adsorción del FAD usando un coeficiente de extinción molar de 14.1 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

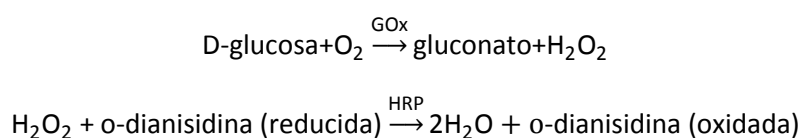
La solución de GOx es agitada en un baño de hielo y acidificada hasta un pH de 1.7, por la adición de una solución “helada” de fosfato de sodio 0.25 mM con glicerol al 30 % (w/v) (previamente ajustada a pH 1.1 adicionando ácido sulfúrico concentrado). La mezcla es incubada por 3 horas a 0 °C, posteriormente se carga en una columna (28 cm x 5 cm) de Shepadex G-50, la cual es equilibrada con fosfato de sodio 25 mM, pH 1.7, con glicerol al 30 % (w/v), manteniendo una temperatura de 4 °C. La columna se eluye con el mismo medio a un flujo de 3 mL/min. La colección de las fracciones se inicia cuando se detecta proteína en el eluyente por el método de Bradford y se culmina en el momento en que la proteína ya no es detectada. Entonces, la solución de apoenzima es colectada en una solución agitada (8 mL) de amortiguador fosfatos 0.4 M, pH 8.

Mientras se colecta la apoenzima, el pH es ajustado continuamente a 7 adicionando NaOH 1 N gota a gota. Finalmente, la proteína es lavada 3 veces en una celda de ultrafiltración (Amicon) con amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7. La apoGOx tiene la capacidad de ser reactivada con FAD durante algunas semanas cuando se almacena a 0 °C (pH 7).

- Reconstitución de la apoGOx en solución (Método de Morris *et al.*, 1983 [90])

Para verificar que la apoGOx es capaz de recuperar su actividad, la apoGOx (150 µg/mL) se incubó con diluciones seriadas de FAD (0 – 5 µM) en amortiguador fosfatos 0.1 M, pH 7, a temperatura ambiente por toda una noche.

La actividad glucosa oxidasa se basa en el método descrito por Trinder (1969) [91], cuyo principio es el siguiente:



Durante el curso de la reacción el peróxido de hidrógeno liberado por la GOx, es utilizado como sustrato para la reacción que cataliza la HRP (Peroxidasa de rábano). El peróxido de hidrógeno entonces es reducido por la *o*-dianisidina, la cual da un producto color marrón al ser oxidada. Es por ello que la oxidación de la *o*-dianisidina ( $\epsilon = 8.3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) es una medida indirecta de la actividad de la GOx.

La mezcla de reacción para determinar la actividad GOx debe contener: i) 2.47 mL de solución de *o*-dianisidina 23 mM, en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7, saturada con oxígeno; ii) 500 µL solución de glucosa (0.5 M); iii) 10 µL de suspensión de HRP 3.2 M (en solución de sulfato de amonio) y iv) 20 µL de muestra. La mezcla de reacción se agita y se lee el cambio de absorbancia a 436 nm a los 5 min.

#### 6.2.5.4. Inmovilización covalente aleatoria de GOx sobre grafito funcionalizado con nanotubos de carbono.

En los últimos años ha habido importantes avances en el desarrollo y aplicación de nanomateriales tales como los nanotubos de carbono. Este tipo de materiales, mejoran la estabilidad e inmovilización de biocatalizadores; incrementan la conductividad y área superficial de los electrodos; y adicionalmente facilitan la transferencia de masa en la superficie de los mismos [92]. Es por ello, que en esta tesis se propone el empleo de nanotubos de carbono para lograr el contacto eléctrico entre la GOx y las láminas de carbono.

Primeramente las láminas de carbono fueron carboxiladas con ácido nítrico (80 °C, por 2 horas), lavadas exhaustivamente con agua y secadas. Posteriormente, se funcionalizaron con etilendiamina (0.3 M) empleando EDC (5 mg/mL) como activador de grupos carboxilos, después los electrodos son lavados y secados. Se realiza una segunda reacción en presencia de EDC (5 mg/mL) incubando las láminas de grafito funcionalizadas con etilendiamina en una solución que



contiene nanotubos de carbono carboxilados (disueltos en DMSO). Después, las láminas de carbono activadas con nanotubos de carbono son incubadas en 1 mL de amortiguador MES 50 mM, pH 5.0 y EDC (5 mg/mL), adicionando 100  $\mu$ L de una solución de GOx (50 mg/mL). Finalmente, los electrodos son lavados con amortiguador fosfatos 10 mM (pH 7) e incubados en este mismo amortiguador en condiciones de refrigeración hasta realizar las evaluaciones pertinentes.

#### 6.2.5.3. Actividad glucosa oxidasa.

La actividad GOx en las láminas de grafito se mide sumergiendo la lámina de 1 cm<sup>2</sup> en 3 mL de una mezcla de reacción que contiene: i) 2.49 mL de solución de o-dianisidina 23 mM, en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7, saturada con oxígeno; ii) 500  $\mu$ L solución de glucosa 0.5 M y; iii) 10  $\mu$ L de suspensión de HRP 3.2 M (en solución de sulfato de amonio). Se agita la mezcla de reacción, se toma 1 mL de la mezcla y se lee el cambio de absorbancia a 436 nm a los 5 min.

#### 6.2.5.4. Cuantificación de proteína inmovilizada

##### a. Método de Bradford

La cuantificación de GOx inmovilizada en láminas de grafito se realizó de la misma forma como se describe en el apartado 5.2.4.3, salvo que, el exceso de reactivo de Bradford se titula con una solución de GOx.

##### b. Método electroquímico.

Aprovechando que la separación de los picos farádicos para el electrodo de glucosa oxidasa muestra una transferencia de carga reversible, es posible cuantificar la cantidad de proteína depositada sobre el electrodo graficando la densidad de corriente como una función de la velocidad de barrido:

$$i_p = \frac{n^2 F^2 A v \Gamma^*}{4RT}$$

Donde  $A$  es el área del electrodo,  $n$  el número de electrones transferidos (para el caso de la glucosa oxidasa,  $n=2$ ),  $F$  la constante Faraday,  $v$  es la velocidad de barrido,  $R$  es la constante universal de los gases,  $T$  la temperatura en Kelvin y  $\Gamma^*$  es la cantidad de proteína inmovilizada.

También, de una manera más sencilla es posible realizar un análisis coulombimétrico, integrando el pico de oxidación (o reducción) del FAD. Lo anterior tomando como principio la primera Ley de Faraday, la cual nos dice que “La cantidad de sustancia depositada (o desprendida) en una celda electroquímica depende de la cantidad total de electricidad que circula sobre ella y es proporcional a ésta”.

$$\Gamma^* = \frac{Q}{Fn} = \frac{Q}{192,960 \text{ C/mol}}$$

Donde  $\Gamma^*$  es la cantidad de proteína inmovilizada,  $Q$  es la carga total en C,  $F$  es la constante de Faraday (96,480 C/mol) y “ $n$ ” es el número de electrones transferidos ( $n = 2$ , para GOx).

#### 6.2.5.5. Caracterización electroquímica.

##### a) Potencial a circuito abierto.

El potencial a circuito abierto del electrodo de GOx (1 cm<sup>2</sup> área geométrica) fue medido con el apoyo de un potenciostato Solartron-1287 y el software CorrWare y CorrView versión 3.1c. El sistema de medición se integró por un electrodo de trabajo (ánodo de GOx) y un electrodo de referencia de calomel Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (SCE, 0.242 V vs SHE), ambos electrodos sumergidos en un amortiguador fosfatos 0.1 M, pH 7.

##### b) Voltamperometría cíclica.

Al igual que en el cátodo de lacasa, las mediciones se realizan en un potenciostato Solartron-1287 y el software CorrWare y CorrView 3.3; además, de un sistema de 3 electrodos (ER, WE y contraelectrodo). Los rangos de potencial variaron dependiendo del estudio en cuestión: 1) en electrodos de carbono con GOx inmovilizada de forma aleatoria, de -1.0 V a 1.0 V cuando se pretenda observar la presencia de especies redox, como por ejemplo , el FAD y de -0.2V a 0.8V cuando se estudie la electrooxidación de glucosa en estos mismos electrodos; 2) entre -1.0 V a +1.0 V para los electrodos funcionalizados con siringaldazina-malónico-FAD (4 ciclos, en presencia y ausencia de glucosa); 3) de -1.0 a 0 V vs SCE -para aquellos funcionalizados con péptidos- a 20 mV/s (4 ciclos, en ausencia de glucosa); 4) -0.8 V a -0.2 V cuando se trate de electrodos funcionalizados con CNT (sin glucosa) y de -0.2 V a 0.8 V cuando se sumerjan estos electrodos en el amortiguador adecuado con glucosa y; 5) de -0.7 V a -0.3 V para electrodos de oro funcionalizados con FAD.

Las mediciones se realizaron en amortiguador fosfatos 0.1 M (pH 7.0) con y sin glucosa. Todas las mediciones se hicieron en atmosfera de nitrógeno y los potenciales antes mencionados son en referencia al electrodo de calomel.

#### **6.2.6. Construcción y evaluación de la celda de combustible enzimática.**

La celda de combustible enzimática fue construida con un ánodo de GOx de 1cm<sup>2</sup> (capaz de generar corriente en presencia de glucosa) y un cátodo de lacasa de 1 cm<sup>2</sup>. Ambos electrodos fueron sumergidos en amortiguador fosfatos 0.1 M, pH 7 (en caso del ánodo, el amortiguador contenía 0.1 M de glucosa); y separados por una membrana de intercambio protónico de Nafion de un espesor de 180  $\mu$ m. Los electrodos fueron sujetos a la pared del armazón mediante una película adhesiva y conectados a tornillos de acero inoxidable. Para evitar la fuga del amortiguador, la celda fue ensamblada junto con sellos elaborados a base de Silastic (material elastomérico eléctricamente aislante y químicamente inerte). El armazón de la celda de combustible enzimática se conformó de dos compartimentos fabricados en acrílico que fueron

sujetados por tornillos de acero inoxidable (los cuales no mantenían contacto con el amortiguador fosfatos, ni con los electrodos de la celda).

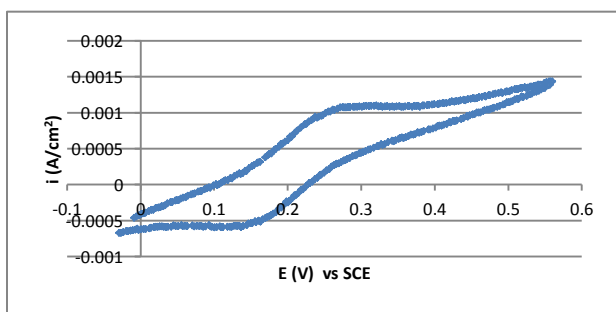
Una vez fabricada la celda de combustible enzimática, se realizaron las mediciones electroquímicas pertinentes con el apoyo de un potencióstato 1287-Solartron y el software CorrWare y CorrView. Antes de cada medición, se determinó el OCP de la celda electroquímica. Se realizaron mediciones potenciodinámicas, estableciendo un potencial eléctrico inicial de 0 V (con respecto al OCP) y un potencial eléctrico final igual al OCP de la celda de combustible enzimática. Las mediciones potenciodinámicas de la celda electroquímica, se efectuaron con suministro continuo y directo de  $N_2$  y  $O_2$  en el compartimento anódico y catódico, respectivamente. Por otra parte, para evaluar la estabilidad de la celda, se impuso al sistema una resistencia eléctrica externa de  $120 \Omega$  midiendo la variación del voltaje en función del tiempo. La densidad de corriente de la celda se calculó en este caso teniendo en cuenta la ley de Ohm ( $V = IR$ ) y la potencia como la relación de  $V^2/R$ .

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Durante el texto a menos que se indique lo contrario, la inmovilización sobre capas de difusión de gas (grafito) es sobre SIGRACET GDL 30 BC. La única razón por la cual se empleó otro tipo de grafito (SIGRACET GDL 35 BC), es porque el grafito SIGRACET GDL 30 BC se discontinuó. Sin embargo, las características de interés en este estudio de ambos grafitos son similares. Estos son materiales porosos compuestos de una matriz densa de fibra de carbono y sus funciones son: facilitar la difusión del oxidante hasta el catalizador, como conductor de electrones hasta el circuito externo, permite la evacuación del agua que se acumule en los procesos de manera que no quede bloqueado el acceso del oxidante hasta el catalizador y da soporte mecánico a toda la estructura. Además, los resultados mostrados en este apartado corresponden a los valores más representativos de una serie de experimentos (al menos 3) realizados para cada caso en cuestión.

### 7.1. Caracterización electroquímica de los electrodos base.

El área real y del factor de rugosidad de los electrodos de grafito fueron determinados por voltametría cíclica (Figura 23), usando ferricianuro como sonda electroquímica y empleando un área geométrica de  $0.03 \text{ cm}^2$ .



**Figura 23.** Voltametría cíclica de grafito (SIGRACET GDL 30 BC) en KCl 0.2 M, pH 5.0 conteniendo 1mM de ferricianuro potásico, velocidad de barrido de 25 mV/s.

De la Figura 23, se tiene que  $i_{pa \text{ exp}} = i_{pa \text{ exp}} * A = 0.0010476 \text{ A/cm}^2 (0.03 \text{ cm}^2) = 3.1428 \times 10^{-5} \text{ A}$ , y de la ecuación de Randles-Sevcik se obtiene una  $i_{pa \text{ teo}} = 3.511763 \times 10^{-6} \text{ A}$ , de este modo de la relación  $i_{pa \text{ exp}} / i_{pa \text{ teo}}$  se obtiene un factor de rugosidad ( $fr = A_{\text{activa}} / A_{\text{geométrica}}$ ) de 8.93 para los electrodos de grafito SIGRACET GDL 30BC. Repitiendo el mismo procedimiento para los electrodos de grafito SIGRACET GDL 35 BC, se obtiene un  $fr = 6.04$ ; así, ambos electrodos utilizados presentan una alta rugosidad. Como se mencionó anteriormente, los electrodos se pulieron previamente, lo cual se realizó con la finalidad de dejar una monocapa de grafito unida covalentemente a la superficie del electrodo; además, se las especificaciones del fabricante, se sabe que el tamaño promedio de los poros de los electrodos de trabajo es de  $70 \mu\text{m}$ , un tamaño adecuado tanto para que las enzimas (GOx y lacasa) penetren y queden fuertemente adsorbidas, así como también, para una rápida transferencia de electrones.

De forma semejante a los electrodos de grafito, los electrodos de oro fueron caracterizados por voltametría cíclica en ácido sulfúrico 0.1 M a 100mV/s. El área real ( $A_r$ ) del electrodo de oro, se determinó por el método de desorción de óxidos. Del voltamperograma de la Figura 24, se determinó la carga experimental ( $Q_{exp}$ ) expresada en  $\mu C$ , del pico de reducción correspondiente a la redisolución catódica del óxido formado y considerando que se necesita una carga de  $400 \mu C/cm^2$  para oxidar completamente la superficie de oro, se obtiene un área real de  $1.1 cm^2$  a partir de la relación  $Q_{exp}/Q_{teórica}$ . El factor de rugosidad del electrodo fue determinado a través de la relación  $A_{real}/A_{geométrica}$  obteniéndose un valor de 1.1. En promedio el factor de rugosidad para los electrodos de oro fue de  $1.08 \pm 0.03$ , lo que significa que la rugosidad en estos electrodos es despreciable.

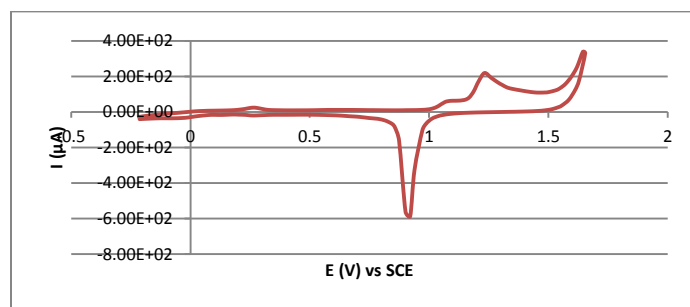


Figura 24. Voltametría cíclica del electrodo de oro en  $H_2SO_4$  0.1 M a 100 mV/s.

## 7.2. Cátodo de lacasa.

### 7.2.1. Actividad catalítica de la lacasa inmovilizada de forma orientada.

Como se mencionó en los antecedentes, el ácido 4-[2-aminoetil] benzoico (AEBA), es una molécula que por su naturaleza aromática puede acoplarse directamente al sitio T1 de la lacasa. De modo, que 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 unirá covalentemente de manera orientada (con el residuo K157, que se encuentra en la superficie de la estructura proteica).

Primeramente se midió la actividad enzimática, la concentración de proteína y se estimó la concentración de lacasa activa inmovilizada sobre la superficie de los electrodos de carbono funcionalizados con AEBA. Lo cual arrojó los siguientes resultados:

**Tabla 1.** Actividad enzimática, concentración de enzima total y de enzima activa, inmovilizada sobre grafito de  $1 cm^2$  (área geométrica) funcionalizado con AEBA.

Lámina de carbono	Actividad catalítica ( $mU/cm^2$ )	Concentración de enzima activa al ABTS ( $\mu g/cm^2$ )	Concentración de enzima total ( $\mu g/cm^2$ )
SIGRACET GDL 30 BC	$2.766 \pm 0.341$	$0.005 \pm 6.7 \times 10^{-4}$	$0.172 \pm 0.016$ ( $2.60 \pm 0.24 pmol/cm^2$ )
SIGRACET GDL 35 BC	$2.426 \pm 0.087$	$0.004 \pm 0.0001$	$0.282 \pm 0.011$ ( $4.27 \pm 0.0.17 pmol/cm^2$ )

La concentración de enzima activa se calculó dividiendo la actividad catalítica entre la actividad específica (528 U/mg), mientras que la concentración de enzima total se cuantificó por el método de Bradford. Los datos son reportados en función del área real.

Asumiendo que el porcentaje de enzima detectada por la 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. De esta forma, se estima que aproximadamente el 97 % y 98 % de la enzima se encuentra orientada con el sitio T1 hacia la superficie de carbono, para los electrodos SIGRACET GDL 30 Y 35 BC respectivamente. Es importante señalar que el porcentaje de lacasa orientada es una determinación aproximada y que debe considerarse con cierta precaución; pues cabe la posibilidad de que cierta proporción de lacasa que oxida al ABTS pueda estar orientada, colaborando con el proceso de transferencia electrónica directa. Se sabe que en las proteínas redox los electrones pueden viajar a una distancia de 14 Å entre sus centros redox a través de la proteína [93]. Esta proximidad es suficiente para permitir el paso de los electrones, descrito en la literatura como “efecto túnel”, incluso a velocidades mayores que en el proceso de las reacciones enzimáticas. En consecuencia, puede darse la oxidación de ABTS, aun cuando el sitio T1 esté ocupado. Además, es probable que parte de la proteína que no presenta actividad al ABTS, sea proteína inactiva debida al proceso de inmovilización.

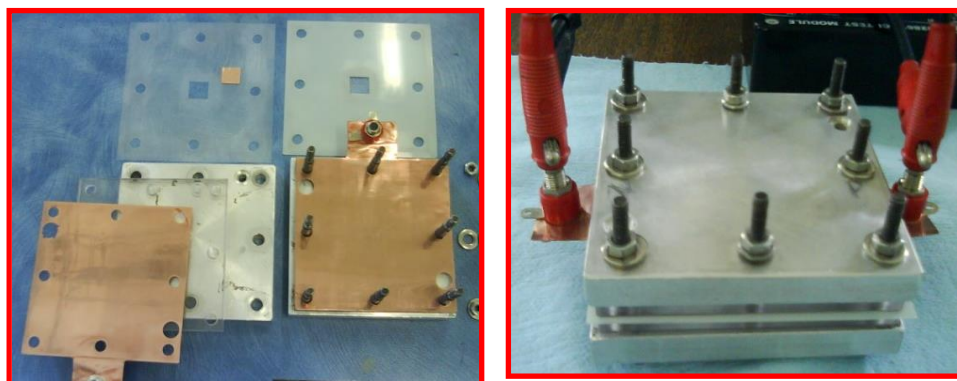
Por otro lado, la superficie cubierta por proteína sobre el electrodo se aproxima al recubrimiento de una monocapa compacta de lacasa que se estima en aproximadamente 5 pmol/cm<sup>2</sup> (estimación teórica en base a las dimensiones de la lacasa), esto mismo ha sido descrito por Vaz, 2009 [94] quien inmovilizó lacasa sobre un electrodo de grafito de alta rugosidad ( $f = 6.5$ ), previamente funcionalizado con una monocapa de aminofenoles. No obstante, cabe mencionar que cuando se estima la cantidad de proteína inmovilizada sobre el electrodo, integrando el pico de oxidación de la voltametría cíclica, los valores obtenidos difieren mucho ~88 pmol/cm<sup>2</sup>, lo que implicaría que hay formación de capas múltiples de lacasa sobre la superficie del electrodo. Sin embargo, habría que probar otras técnicas para definir mejor el pico de oxidación correspondiente al sitio T1, como la voltametría de onda cuadrada, que es una técnica electroquímica donde se elimina la contribución de la intensidad de corriente capacitiva al voltamperograma obtenido y, aumenta la sensibilidad de las corrientes faradáicas, otra alternativa sería emplear elipsometría óptica, una técnica con la cual se puede cuantificar el espesor de la capa de proteína inmovilizada sobre el electrodo.

### **7.2.2. Caracterización electroquímica.**

La caracterización electroquímica del electrodo de lacasa inició con la cuantificación de la resistencia eléctrica por contacto. Esta propiedad fue monitoreada conforme se incrementaba la presión de las placas de cobre sobre el cátodo de lacasa, tras la aplicación del método de impedancia (Figura 25). La impedancia es una oposición al paso de señal eléctrica, cuando un elemento es expuesto a corriente alterna y es una función de la frecuencia y el tiempo. En general, la impedancia es la suma vectorial de una componente resistiva (resistencia óhmica) y de una componente reactiva (capacitores); sin embargo, a frecuencias muy altas el capacitor aparece en corto circuito, es decir, conduce libremente obteniéndose solo la contribución de la resistencia óhmica. De este modo, se obtuvo una resistencia eléctrica del electrodo de lacasa de 18.6±0.8 mΩcm<sup>2</sup> ( $1.6 \times 10^{-4} \text{ S} \cdot \text{m}^{-1}$ ) a una frecuencia de 10 kHz, 80 mV amplitud y un torque 12.5 pulg·lb. Por

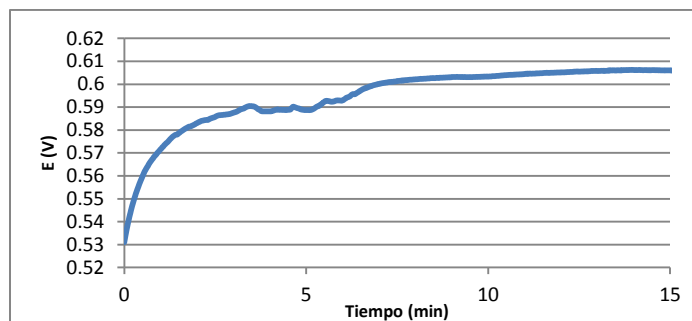
lo que este electrodo se comporta como un semiconductor si lo comparamos con los valores reportados para metales.

El potencial a circuito abierto (OCP, por sus siglas en inglés), es un parámetro electroquímico que se obtiene al medir la diferencia de potencial eléctrico entre dos pares redox o electrodos, sin permitir el paso de corriente eléctrica (a una resistencia infinitamente grande). El OCP entre dos pares redox es un indicador de la fuerza electromotriz, que puede generarse dentro de un circuito cerrado. Es importante evaluar este parámetro para establecer aquel par redox que proporcione el mayor OCP. El potencial del electrodo de lacasa (electrodo de trabajo, WE) fue determinado empleando al electrodo de calomel saturado en KCl (SCE, por sus siglas en inglés) como electrodo de referencia (RE). Para cualquier sistema electroquímico, el electrodo de trabajo (WE) se define como el electrodo en el cual ocurre la reacción de interés (electrodo de lacasa). El electrodo de referencia (RE), es aquel que tiene un potencial de equilibrio estable y conocido (SCE).



**Figura 25.** Sistema utilizado para medir la resistencia eléctrica por contacto. En la imagen del lado izquierdo aparecen los constituyentes del sistema (placas de acero, placas de acrílico, láminas de cobre y láminas de mylar) que permite realizar las mediciones de resistencia eléctrica. Los electrodos 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 al analizador de impedancia.

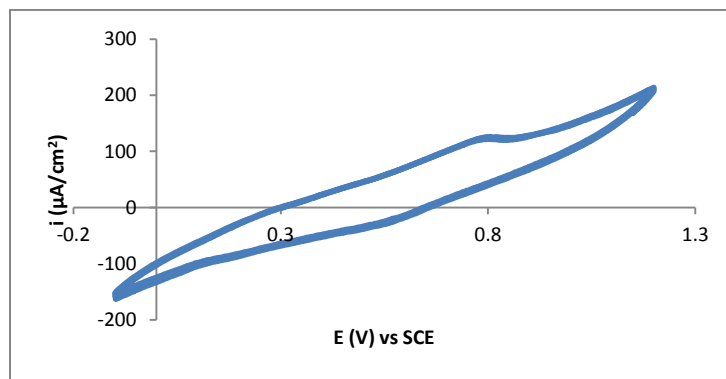
Como se observa en la Figura 26, el OCP del electrodo de lacasa fue monitoreado en función del tiempo, hasta alcanzar un potencial estable de 0.604 V vs SCE; lo que equivale a 0.862V vs SHE (electrodo estándar de hidrógeno) e implica dos cosas: 1) la lacasa de *Corioloipsis gallica* UAMH 8260 pertenece a la familia de las lacasas con alto potencial redox en el sitio T1 y, 2) la enzima se encuentra mayoritariamente inmovilizada de forma orientada, pues, el OCP corresponde al potencial del sitio T1. Algo que también es importante notar en la Figura 26, es que en los primeros minutos (hasta antes de aproximadamente 10 minutos) hay una zona de activación del electrodo de lacasa; es decir, hay una migración de partículas cargadas eléctricamente hacia la interface de la superficie del electrodo de lacasa-electrolito, hasta alcanzar un equilibrio eléctrico y de concentración. La estabilización del OCP indica que el equilibrio electroquímico se ha alcanzado. Esto no sucede en los metales como Pt o Zn, ya que el equilibrio se alcanza de forma inmediata.



**Figura 26.** Potencial a circuito abierto del cátodo de lacasa vs SCE, en amortiguador succinatos 50 mM, pH 4.5.

Para corroborar tanto que la lacasa de *Corioloopsis gallica* UAMH 8260 es de alto potencial redox y que la transferencia de electrones es directa, fue necesario realizar una voltamperometría cíclica. En general, la voltamperometría abarca un grupo de métodos electroanalíticos en los que la información (picos farádicos asociados a reacciones de óxido-reducción y mecanismo de transferencia de electrones en la superficie de electrodos) sobre el analito se deduce de la medida de la intensidad de corriente en función del potencial aplicado, en condiciones que favorezcan la polarización del electrodo de trabajo (cátodo de lacasa). La Figura 27 muestra el voltamperograma obtenido después de 4 ciclos electroquímicos (se omite el primer ciclo) a una velocidad de barrido de 10 mV/s. El cátodo de lacasa presenta un pico anódico de  $121 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (a 0.78 V vs SCE) y un pico catódico de  $-20 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (a 0.56 V vs SCE), de estos resultados se calcula que el potencial formal del par redox del sitio T1 ( $\text{Cu}^{+2}/\text{Cu}^{+1}$ ) es de 0.67 V vs SCE (0.912 V vs SHE), este potencial es muy cercano al equilibrio termodinámico del par redox  $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$  (1.23 V vs SHE). De modo que se concluye que la mayor parte de la enzima se encuentra inmovilizada de forma orientada (la transferencia de electrones es directa) y que la lacasa empleada es de alto potencial redox. La razón por la que el OCP es menor al potencial calculado por voltametría cíclica, se debe a que en el OCP también se considera el potencial de aquellas enzimas que no se encuentran orientadas y por tal motivo el potencial del cátodo de lacasa disminuye ligeramente, de hecho en la voltamperotría cíclica se aprecian unos picos no bien definidos aproximadamente a 0.29 V vs SCE (anódico) y 0.21 V vs SCE (catódico), es decir, con un potencial formal de 0.25 V vs SCE y que corresponden al potencial redox del cluster T2/T3 [43]. Otro aspecto a destacar, es el comportamiento cuasireversible de la lacasa, esto en función de la diferencia de potenciales entre los picos catódico y anódico (220 mV), de modo que no es posible emplear el método de Laviron para calcular la constante de velocidad de transferencia de electrones ( $k_{\text{ET}}$ ), ya que este método solo es aplicable a procesos reversibles, y en su lugar se determinó la constante de velocidad de transferencia de electrones a un sobrepotencial específico ( $k_s$ ), dicha constante se calculó como la razón entre la intensidad de corriente del pico de oxidación y la carga del mismo, obteniendo entonces una  $k_s = 0.06\text{s}^{-1}$ , este valor en general no se reporta para los electrodos de lacasa y por ello no es posible compararlo con lo que está reportado en la literatura.

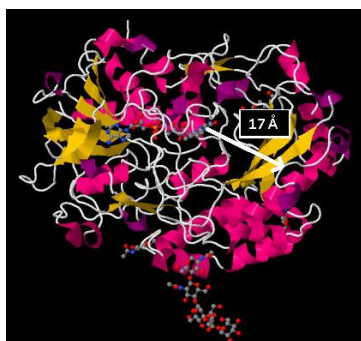




**Figura 27.** Voltamperometría cíclica del cátodo de lacasa. Se empleó una malla de platino y un SCE como contraelectrodo y electrodo de referencia respectivamente. Las mediciones se realizaron a una velocidad de 10 mV/s en amortiguador fosfatos 0.1 M, pH 5.

### 7.3. Ánodo de GOx.

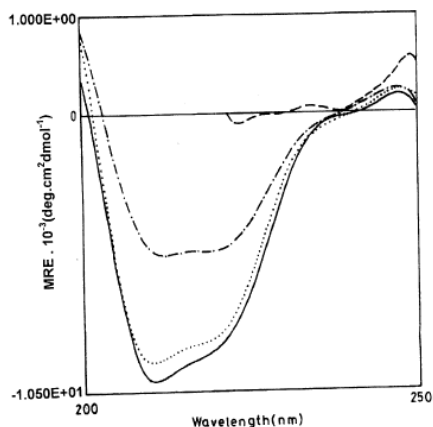
Tomando en cuenta que el FAD se encuentra en un hueco de la enzima a unos 17 Å de la superficie (Figura 28) y que esta distancia supera aquella distancia que pueden viajar los electrones por efecto túnel (14 Å), se propuso inmovilizar a la GOx por medio de un proceso de reconstitución. Este método consiste en primeramente separar el FAD de la enzima y obtener la apoGOx, la cual posteriormente se reconstituirá sobre un electrodo de grafito funcionalizado con un espaciador (siringaldazina-malónico o péptidos) más FAD, todo esto aprovechando la capacidad de la apoGOx de regenerarse y recuperar su actividad en presencia de su cofactor[89]. Como control se dispuso a construir electrodos con GOx inmovilizada de forma aleatoria, a través de los residuos de lisina que se encuentran en la superficie de la proteína.



**Figura 28.** Estructura cristalográfica de la GOx, resaltando la distancia del sitio activo a la superficie de la enzima.

Para lograr lo anterior, primeramente había que obtener la apoGOx y para ello se emplearon dos métodos: el método de Swoboda [89] y de Morris *et al.*, [90]. En el método de Swoboda se obtuvo un 1 % de recuperación de proteína, lo cual, indica que muy probablemente el proceso de precipitación no se realizó correctamente; mientras que con el método de Morris se logró recuperar un 60 % de proteína y un 25 % de actividad (de la cual un 10 % es actividad residual), todo con relación a la cantidad de proteína y actividad inicial.

En ambos métodos, el proceso de desflavinización se llevó a cabo en condiciones ácidas (pH 1.7) y aun cuando estos métodos ya habían sido empleados con éxito, fue hasta el 2003 que Khutan Haq *et al.*, [95] demostraron que la enzima a pH 1.7 conserva aproximadamente el 90 % de su estructura secundaria ya como apoflavoproteína (Figura 29) y se encuentra en un estado denominado “glóbulo fundido”, este estado ha sido descrito como un estado intermedio entre una proteína en su estado nativo y una proteína desnaturalizada, cuando la proteína se encuentra bajo el efecto de desnaturalizantes, como: pH ácido (o alcalino), alta temperatura, agentes caotrópicos (urea, guanidina), etc. Se ha identificado que estos intermediarios estables se forman durante el plegamiento de muchas proteínas globulares. Del artículo se concluye, que la proteína a pH 1.7: i) libera el FAD, ii) se encuentra como proteína dimérica, iii) conserva el 90% de su estructura secundaria y iv) tiene porciones de la superficie hidrofóbica expuesta al solvente, todo esto con respecto a la proteína en su estado nativo (pH 7.0); cabe mencionar, que este intermediario estable, no se observa a un pH ligeramente menos ácido (pH 2.6).



**Figura 29.** Dicroísmo circular UV-lejano: espectro de la GOx nativa a pH neutro (—), estado desnaturalizado a pH 2.6 (---), estado inducido por ácido a pH 1.4 (·····), y en presencia de 6 M de cloruro de guanidina (- · - · -) [95].

### 7.3.1. Inmovilización covalente aleatoria de GOx sobre láminas de carbono carboxiladas (SIGRACET GDL 35 BC).

Primeramente, sabiendo que esta enzima tiene su sitio activo muy embebido dentro su estructura proteica, se realizó una inmovilización aleatoria de la enzima sobre una lámina de carbono carboxilado como control. La Tabla 2 resume las características del comportamiento de los electrodos con la GOx inmovilizada de forma aleatoria (Figura 30).

**Tabla 2.** Características de los electrodos con la GOx inmovilizada de forma aleatoria.

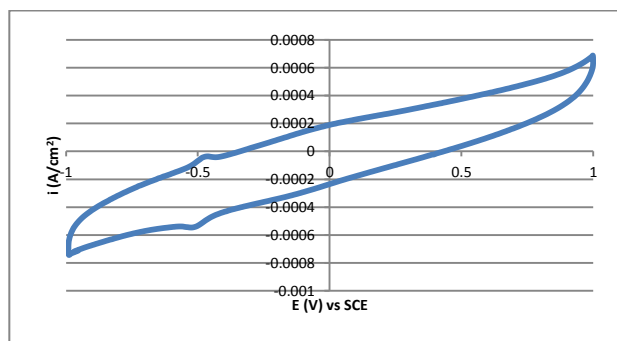
$E^{\circ'}$	-0.48 V vs SCE
$\Delta E_p$	59.3 mV
$\Gamma^*$	90.1 pmol/cm <sup>2</sup> (Bradford) 73.16 pmol/cm <sup>2</sup> (voltametría cíclica)
Actividad GOx	0.512 mU/cm <sup>2</sup>

De lo anterior se confirma la existencia de un contacto eléctrico entre la enzima y el electrodo, debido a la presencia del potencial formal característico del FAD ( $E^{\circ} = -0.48$  V vs SCE). De la separación de picos se deduce que este electrodo exhibe un comportamiento de transferencia de carga cercano a la reversibilidad y que la cantidad de proteína inmovilizada es superior a la cantidad máxima teórica de proteína que puede ser inmovilizada en forma de monocapa (por  $\text{cm}^2$ ), que es de  $\sim 33$  pmoles/ $\text{cm}^2$  [63], estimación hecha en base a las dimensiones de la GOx. Lo que quiere decir, que hay formación de multicapas de proteína sobre la superficie de la lámina de grafito carboxilada, lo que puede contribuir a que existan problemas de transferencia de masa del sustrato, además de que parte de ésta proteína puede encontrarse desplegada.

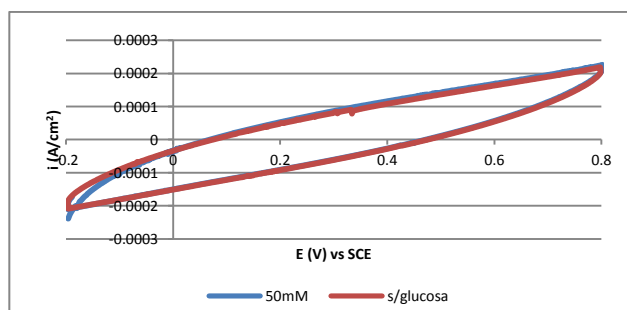
Una vez calculados los datos anteriores y teniendo en cuenta que  $n\Delta E_p < 200$  mV, es posible calcular la constante de velocidad estándar de transferencia de electrones ( $k_{ET}$ ) empleando el método de Laviron, obteniendo un valor de  $\alpha = 0.64$  y de  $k_{ET} = 1.94$   $\text{s}^{-1}$ ; donde, “ $\alpha$ ” representa el coeficiente de transferencia de carga y está relacionado con la caída de potencial a través de la doble capa que rodea al electrodo. Con este valor de  $k_{ET}$  y, considerando que la proteína inmovilizada activa es aquella cuantificada por métodos electroquímicos, se estima que puede extraerse una corriente máxima de este electrodo de  $13.7$   $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  (superficie cubierta de proteína  $\cdot k_{ET}$   $\cdot$  constante de Faraday). Cabe resaltar que este valor de  $k_{ET}$  es consistente con lo reportado para una GOx inmovilizada por adsorción sobre electrodos de carbono ( $1.6$   $\text{s}^{-1}$ ) [96], pero, es significativamente menor a lo obtenido por Liu *et al.*, 2007 ( $\sim 78$   $\text{s}^{-1}$ ) [74], quien inmovilizó a la GOx en una monocapa mixta de 4-carboxifenil y oligo (feniletinil); Liu *et al.*, 2006 ( $\sim 100$   $\text{s}^{-1}$ ) [97], reconstitución de apoGOx sobre un electrodo de oro modificado con “**norbornylogous**”, un espaciador con  $18$  Å de longitud, con un motivo disulfuro y grupos carboxilos en sus extremos y una alta velocidad de transferencia de electrones ( $> 10^{10}$   $\text{s}^{-1}$ ); y Demin y Hall, 2010 ( $\sim 350$   $\text{s}^{-1}$ ) [79], quienes inmovilizaron glucosa oxidasa desglucosilada (recombinante) a través de colas de histidinas, sobre electrodos de oro.

Sin embargo, el verdadero ensayo para determinar un verdadero contacto molecular entre la GOx y el electrodo, es la capacidad de la enzima para convertir glucosa en gluconolactona con la consecuente generación de corriente. La Figura 31 confirma que no hay un incremento en la corriente cuando se realizó la voltametría cíclica en presencia de glucosa ( $50$  mM), para este caso, la ventana de potenciales solo se llevó a cabo entre  $-0.2$  V y  $0.8$  V vs SCE, ya que normalmente la generación de corriente asociada a la oxidación de glucosa se lee entre  $0.2$  V a  $0.6$  V vs SCE. Este fenómeno no es sorprendente cuando la GOx es inmovilizada de forma aleatoria sobre electrodos de rugosidad despreciable pero no para electrodos de alta porosidad, como es el caso de estudio, lo que quiere decir que la porosidad del material tuvo un efecto positivo en el contacto eléctrico entre la enzima y el electrodo, pero ésta no fue capaz de generar corriente asociada a la oxidación de glucosa debido a: i) que no hay el correcto posicionamiento de la proteína sobre el electrodo; ii) la distancia que hay del sitio activo a la superficie del electrodo supera la distancia que pueden viajar los electrones por efecto túnel ( $14$  Å); iii) la formación de multicapas de proteína sobre la superficie del electrodo lo que representa una barrera extra a vencer en el transporte de masa y masa y; iv) parte de la proteína inmovilizada se encuentra desplegada. Esto confirma que en esta

proteína es muy difícil lograr el contacto eléctrico eficiente bajo esta estrategia; por lo que, en la mayoría de los casos se emplean polímeros conductores, mediadores, nanomateriales o bien la reconstitución de la apoenzima sobre un electrodo modificado funcionalizado con FAD. De modo que la primera estrategia para lograr una transferencia directa de electrones consistió en reconstituir la apoGOx sobre electrodos de carbono.



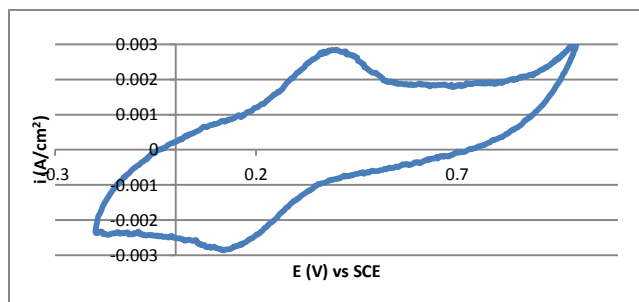
**Figura 30.** Voltamperograma de la GOx inmovilizada de forma aleatoria sobre láminas de carbono. Amortiguador fosfatos 0.1 M, pH 7, bajo atmosfera de N<sub>2</sub>. 50 mV/s.



**Figura 31.** Voltametría cíclica en ausencia y presencia de glucosa (50 mM). Amortiguador fosfatos 0.1 M, pH 7, bajo atmosfera de N<sub>2</sub>. 10 mV/s.

### 7.3.2. Reconstitución sobre electrodos de carbono funcionalizados con siringaldazina-malónico-FAD.

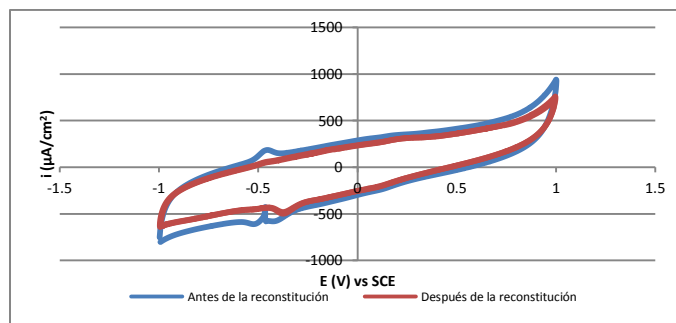
Como primer paso previo a la inmovilización de la enzima, se comprobó que se llevara a cabo con éxito la reacción de esterificación (entre la siringaldazina y el grafito carboxilado). En la Figura 32, se esquematiza la voltametría cíclica de la siringaldazina inmovilizada sobre grafito previamente carboxilado, donde se pueden apreciar el potencial formal característico de ésta especie redox ( $E^{\circ} = 0.26$  V vs SCE) [98], lo que estaría indicando que la reacción de esterificación se ha logrado llevar a cabo exitosamente; además, la importancia de emplear la siringaldazina como espaciador radica en su potencial formal, el cual es mayor al del FAD (0.48 V vs SCE) y debido a esto puede abstraer los electrones de este último y transportarlos a la superficie del electrodo. Del voltamperograma se observa que la diferencia de potenciales ( $\Delta E_p$ ) entre los picos catódico y anódico es de 0.267 V, lo cual nos indica que la siringaldazina exhibe un comportamiento cuasireversible y por medio de un análisis columbimétrico del pico de oxidación se determinó una cobertura superficial de la siringaldazina de 12.732 nmoles/cm<sup>2</sup>.



**Figura 32.** Voltamperograma de la siringaldazina inmovilizada sobre grafito previamente carboxilado. Las mediciones fueron realizadas en amortiguador acetatos 0.1 M, pH 5, 20 mV/s.

Una vez obtenida la apoGOx, ésta se reconstituyó sobre grafito funcionalizado con siringaldazina-malónico-FAD. En la Figura 33 pueden apreciarse el potencial formal característico del FAD -0.48 V vs SCE [71] y a  $E^{\circ} = +0.2\text{V}$  vs SCE [98] se observa el par redox de la siringaldazina, el cual se ha desplazado un poco debido al cambio en el amortiguador que se realizó la voltametría cíclica (fosfatos pH 7, 0.1 M). La superficie cubierta por FAD en la superficie del electrodo fue de  $93.07\text{ pmol/cm}^2$  (calculada por integración del pico de oxidación), lo que representa el 97 % de lo que teóricamente puede formar una monocapa sobre una superficie de carbono ( $10^{-10}$  moles FAD/ $\text{cm}^2$ ) [99]. Algo que también debe notarse, es que antes de la reconstitución de la apoGOx, los picos farádicos asociados al par redox FAD/FADH<sub>2</sub> son más evidentes, este fenómeno ya había sido descrito por Willner *et al.*, [71] y lo atribuyen a que cuando la enzima se reconstituye aísla al FAD y debido a esto la intensidad de estos picos farádicos disminuye. Otra cosa a resaltar de las ciclovoltametrías, es el hecho que la separación de los picos ( $\Delta E_p$ ) es de aproximadamente 30 mV, lo que quiere decir, que este electrodo exhibe una transferencia de carga reversible y, la aparición de un pico redox  $\sim -0.35\text{ V}$ , que probablemente pueda ser algún intermediario que se forma durante el proceso de oxidación-reducción del FAD.

Además, se obtuvo un OCP para el electrodo de GOx de  $0.185 \pm 0.018\text{ V}$  vs SCE, lo cual es coherente con el hecho de que la especie redox que se encuentra más cercana al electrodo es precisamente la siringaldazina, cuyo potencial formal obtenido por voltametría cíclica es de  $0.2\text{ V}$  vs SCE (figura no mostrada). Al igual que en el cátodo de lacasa, el OCP tardo en estabilizarse aproximadamente 10 minutos; ya que como se explicó anteriormente, es necesario un periodo de activación electroquímica del electrodo de trabajo, donde se produce un desplazamiento de partículas cargadas eléctricamente hacia la interface electrodo de trabajo-electrolito hasta alcanzarse un equilibrio eléctrico y de concentración.



**Figura 33.** Voltametría cíclica del ánodo de GOx: antes y después de la reconstitución sobre grafito funcionalizado con siringaldazina-malónico-FAD. Las mediciones fueron realizadas en amortiguador fosfatos 0.1 M, pH 7. Velocidad de barrido de 20 mV/s.

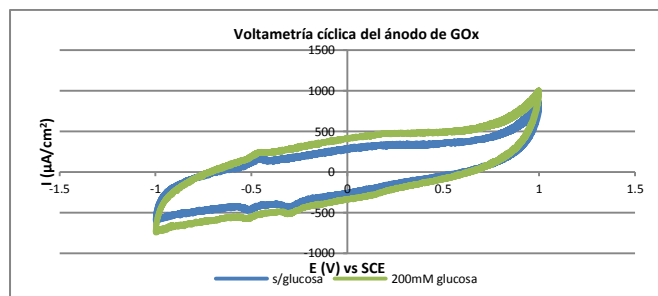
Por otra parte, se llevó a cabo la caracterización cinética del ánodo de GOx. La Tabla 3 resume los resultados obtenidos. Para el caso de la concentración de proteína inmovilizada, ésta fue cuantificada por el método de Bradford y por voltametría cíclica.

**Tabla 3.** Actividad enzimática y concentración de enzima total inmovilizada sobre grafito GDL 30 BC de 1 cm<sup>2</sup> (8.93 cm<sup>2</sup>, área real) funcionalizado con siringaldazina-malónico-FAD.

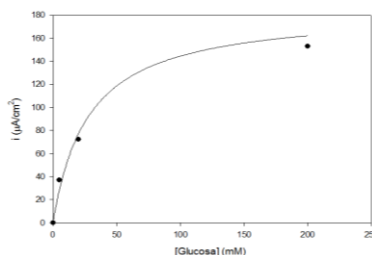
Actividad catalítica (mU/cm <sup>2</sup> )	Concentración de enzima total (μg/cm <sup>2</sup> )	
	Bradford	voltametría cíclica
0.851 ± 0.003	10.9 ± 0.420 (68.8 ± 0.02 pmol/cm <sup>2</sup> )	14.34 ± 1.020 (89.6 ± 0.60 pmol/cm <sup>2</sup> )

Realizando una prueba t de Student ( $|t_0| = 6.92$ ) de los resultados anteriores, se llega a la conclusión que existe diferencia significativa en la cuantificación de proteína por estos métodos con un nivel de confianza del 95 %. Sin embargo, haciendo una estimación teórica de la proteína inmovilizada de aproximadamente 33 pmol/cm<sup>2</sup> (40 - 50 nm<sup>2</sup>, [63]), los datos cuantificados por Bradford y voltametría cíclica son superiores a este valor, lo que podría estar indicando la formación de multicapas de GOx sobre el electrodo. Además, con los datos anteriores y empleando el método de Laviron, se obtuvo una  $k_{ET} = \sim 23 \text{ s}^{-1}$  y con ello se estimó una corriente máxima teórica de  $\sim 200 \text{ μA/cm}^2$ . El valor obtenido para  $k_{ET}$ , es menor al obtenido por Liu *et al.*, 2006 [97] ( $\sim 100 \text{ s}^{-1}$ ), quien reconstituyó la apoGOx sobre un electrodo de oro modificado con “norbornylogous” o aquel bioánodo diseñado por Patolsky *et al.*, 2004 [77] ( $83 \text{ s}^{-1}$ ), quien reconstituyó la apoGOx sobre un electrodo de oro funcionalizado con nanotubos de carbono de 25 nm de longitud.

Posteriormente, para confirmar que el ánodo de GOx es electroquímicamente activo, se realizó la voltamperometría cíclica en presencia de concentraciones crecientes de glucosa (Figura 34), con la finalidad de construir una curva de saturación ( $i$  vs [S]) que se muestra en la Figura 35, en realidad lo que se gráfica es la diferencia de corriente que se obtiene a 0.2 V, ya que a este voltaje se observa la oxidación de los grupos aldehídos de la molécula de glucosa [100], tomando como blanco la densidad de corriente obtenida en la voltametría cíclica en ausencia de glucosa.



**Figura 34.** Voltametría cíclica del ánodo de GOx en presencia y ausencia de glucosa. Las mediciones fueron realizadas en amortiguador fosfatos 0.1 M, pH 7, en atmósfera de N<sub>2</sub>. Velocidad de barrido de 5 mV/s. Se omiten las demás ciclo voltametrías para mejor apreciación.



**Figura 35.** Corriente electrocatalítica catódica, generada por la GOx reconstituida sobre electrodos de grafito modificados en presencia de concentraciones variables de glucosa (0, 5, 20, 200 mM). En atmósfera de N<sub>2</sub>.

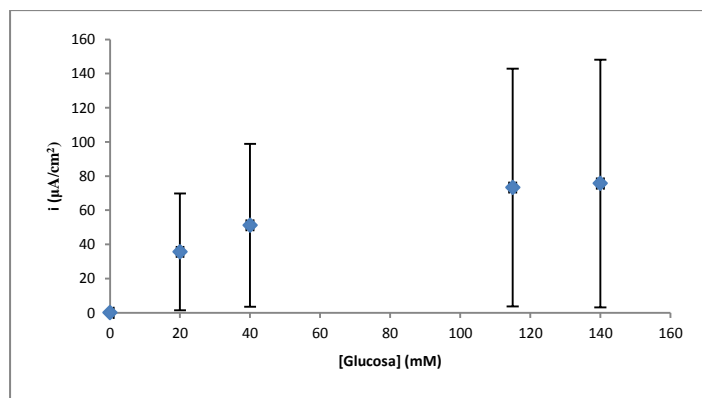
A partir del ajuste de la gráfica anterior es posible determinar la eficiencia de recambio de la enzima y el electrodo, calculando la velocidad de recambio máxima ( $TR_{MAX}$  o  $k_{cat}$ ), que está dada por:

$$TR_{MAX} = \frac{i_{cat}^{sat}}{nF\Gamma^*}$$

Donde  $i_{cat}^{sat}$  es la densidad de corriente a una concentración de saturación,  $n$  es el número de electrones transferidos – en este caso  $n=2$ -,  $F$  es la constante de Faraday (96480 C/mol) y  $\Gamma^*$  es la superficie cubierta por la proteína. Para este electrodo se estima una  $TR_{MAX}$  de  $\sim 7 \text{ s}^{-1}$ , esta velocidad de recambio es significativamente menor a la reportada por Willner *et al.*, ( $900 \text{ s}^{-1}$ ) [87], quien empleo el método de reconstitución de la apoGOx para construir sus electrodos. A partir de la  $TR_{MAX}$ , se puede deducir que el electrodo construido será sensible al oxígeno (caso contrario con el ánodo diseñado por el grupo de Willner *et al.*, [87], [71], [75], [73], [76]), es decir, cuando el ánodo de GOx opere bajo condiciones aeróbicas, se espera que haya formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y por lo tanto la densidad de corriente generada disminuya significativamente, esto se debe a que la velocidad de recambio entre la GOx y el O<sub>2</sub> es de  $\sim 700 \text{ s}^{-1}$ . La baja eficiencia en la transferencia de electrones puede ser debido a que hay mucha proteína inmovilizada- 2.7 veces más que la cantidad de proteína que se estima de forma teórica- pero, la gran mayoría de esta proteína no contribuye a la generación de corriente, debido a que en el electrodo se forman multicapas de proteína. Con la finalidad de eliminar proteína adsorbida sobre el electrodo, los electrodos de grafito con GOx inmovilizada fueron lavados con una solución de NaCl 1 M, sin embargo, las voltametrías para aquellos electrodos que fueron solo lavados con amortiguador fosfatos tienen el

mismo perfil que aquellos lavados con solución salina, es decir, la proteína se encuentra fuertemente adsorbida en la superficie del grafito y no se desorbe durante los lavados con solución salina.

Además, cabe mencionar que el proceso de fabricación del electrodo no es reproducible, pues, en cada lote de fabricación del electrodo se obtienen resultados distintos (Figura 36). Este mismo problema ya ha sido reportado por Miyawaki and Wingard [99], quienes inmovilizaron por adsorción FAD, GOx y reconstituyeron apoGOx sobre electrodos de grafito de baja porosidad. Sin embargo, no es claro el mecanismo de reconstitución de la apoGOx sobre la superficie del electrodo y ellos al igual que en el presente trabajo encuentran que hay formación de multicapas (en su caso incluso de FAD), de modo que sugieren que una baja respuesta del electrodo puede ser debido a problema a la transferencia de masa (del sustrato a través de las multicapas formadas). Además, hay cambios en la actividad específica de la enzima libre y aquella que es reconstituida; la apoGOx y el FAD, pueden encontrarse separados espacialmente en la superficie del electrodo; la holoenzima formada sobre la superficie del electrodo, se libera a la solución; hay evidencia de que la enzima puede desnaturizarse dentro de la estructura de electrodos de carbono de alta porosidad; entre otras posibilidades.



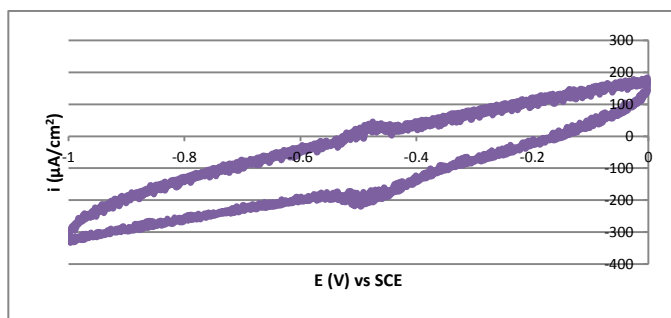
**Figura 36.** Curva de saturación de los electrodos de GOx. Pruebas realizadas en amortiguador fosfatos 0.1 M, pH 7.

Paralelo a esto, otra alternativa para inmovilizar la GOx sobre el electrodo de grafito, consistió en reconstituirla sobre una monocapa de tripéptidos (FFF-FAD o WWW-FAD) o pentapéptidos (FFFFF-FAD o WWWWW-FAD), que debido a la naturaleza aromática de sus cadenas laterales podrían facilitar la transferencia electrónica al electrodo. Los resultados preliminares eran prometedores, ya que, los electrodos con la GOx reconstituida mostraron actividad: 0.1 mU/cm<sup>2</sup> (FFF-GOx), 0.215 mU/cm<sup>2</sup> (FFFFF-GOx), 0.05 mU/cm<sup>2</sup> (WWW-GOx) y 0.20 mU/cm<sup>2</sup> (WWWWW-GOx); además, a excepción del tripéptido de fenilalaninas en el resto de los electrodos, como se observa en las siguientes figuras, se aprecian picos farádicos con un potencial formal que corresponde al del FAD (~ -0.5 V vs SCE), cuando las mediciones son realizadas en amortiguador fosfatos 0.1 M, pH 7 y bajo atmósfera de nitrógeno. De los datos de actividad, se deduce que a mayor distancia del espaciador el proceso de reconstitución es mejor y en las Figuras 37-39 se observa que los picos

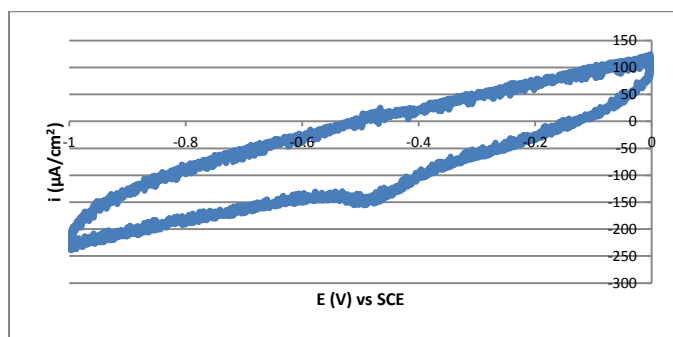


farádicos asociados al FAD están mejor definidos en los electrodos funcionalizados con peptapéptidos, lo que también indicaría que la reconstitución fue mejor al usar pentapéptidos. Posiblemente al ser el espaciador más grande, la proteína tiene más posibilidad de reconstituirse de forma correcta sin quedar “tensada” al estar más alejada de la superficie del electrodo. Del análisis coulombimétrico de los picos farádicos se calculó la superficie cubierta por GOx: 144 pmol/cm<sup>2</sup>, para WWW; 182 pmol/cm<sup>2</sup> sobre WWWW y; 150 pmol/cm<sup>2</sup>, en FFFF.

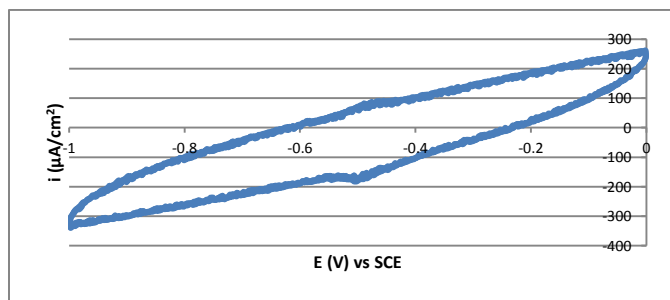
Sin embargo, las voltametrías realizadas en presencia de glucosa, no muestran el incremento en la corriente catódica o este debe de ser muy pequeño (Figura no mostrada). Esto al igual que en el caso anterior (reconstitución sobre electrodos de carbono funcionalizados con siringaldazina-malónico-FAD), puede ser por la formación de multicapas sobre la superficie del electrodo, lo que representa una resistencia a la transferencia del sustrato (glucosa) a través de estas capas de proteína. Además, como se mencionó anteriormente, aun no es claro el proceso de reconstitución de apoGOx sobre electrodos de grafito poroso; es por eso, que para este propósito es necesario emplear una superficie lisa (factor de rugosidad despreciable), con la finalidad de evitar las interacciones que pueda haber entre la enzima y el electrodo poroso y, así surge la siguiente estrategia de inmovilización de la apoGOx sobre electrodos de oro.



**Figura 37.** Voltametría cíclica de la GOx reconstituida sobre grafito funcionalizado con WWWW-FAD. Mediciones realizadas en amortiguador fosfatos 0.1 M, pH 7, a una velocidad de barrido de 20 mV/s, bajo atmósfera de nitrógeno.



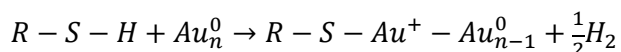
**Figura 38.** Voltametría cíclica de la GOx reconstituida sobre grafito funcionalizado con WWW-FAD. Mediciones realizadas en amortiguador fosfatos 0.1 M, pH 7, a una velocidad de barrido de 20 mV/s, bajo atmósfera de nitrógeno.



**Figura 39.** Voltametría cíclica de la GOx reconstituida sobre grafito funcionalizado con FFFFF-FAD. Mediciones hechas en amortiguador fosfatos 0.1 M, pH 7, a una velocidad de barrido de 20 mV/s, bajo atmósfera de nitrógeno.

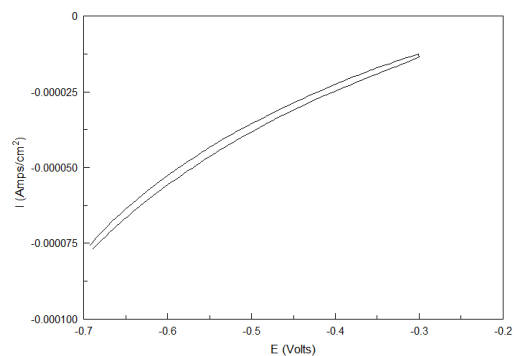
### 7.3.3. Inmovilización de GOx sobre electrodos de oro.

Una vez limpios los electrodos de oro y conociendo su factor de rugosidad ( $fr = \sim 1$ ), se dispuso a funcionalizarlos con ácido *p*-mercaptobenzoico por la formación de monocapas autoensambladas (MAEs). Esta técnica es muy sencilla ya que consiste en la inmersión de un sustrato en una solución diluida de un determinado compuesto orgánico activo en condiciones ambientales el cual se adsorbe sobre el sustrato como consecuencia de una reacción química superficial dando como resultado una monocapa orgánica de orientación y empaquetamiento bien definido. Se sabe, que los tioles y sulfuros son de particular interés debido a su adsorción química espontánea en la superficie del oro, lo que genera una organización regular y elevada estabilidad térmica, mecánica y química. Se ha propuesto que la adsorción de tioles a la superficie de oro se lleva a cabo mediante la adición oxidativa del enlace S-H a la superficie del metal, acoplada a la eliminación reductiva de un átomo de hidrogeno:



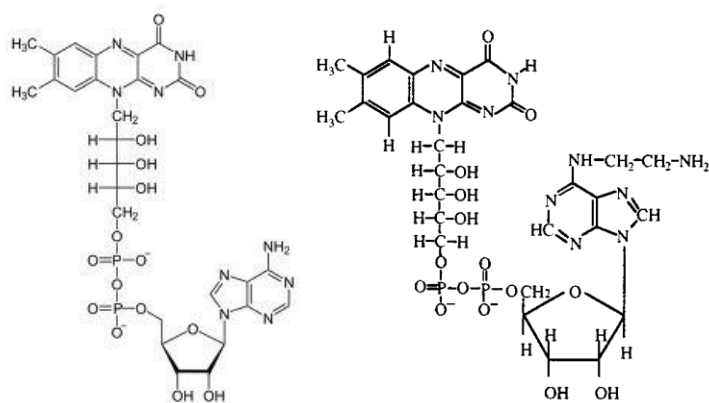
La naturaleza del enlace covalente entre el electrodo de oro y el átomo de azufre (Au-S) ha sido confirmada por diversas técnicas [101].

Posterior a la funcionalización del electrodo de oro con ácido *p*-mercaptobenzoico, se intentó funcionalizar estos electrodos con FAD, sin embargo, bajo todas las condiciones exploradas (solución amortiguador MES 50 mM (pH 5) con EDC; solución amortiguador HEPES 30 mM (pH 7.9) con EDC) no fue posible activar dichos electrodos con FAD, ya que en ningún voltamperograma fue posible observar los picos farádicos asociados a la oxidación y reducción del FAD ( $\sim 0.5$  V vs SCE) (Figura 40).



**Figura 40.** Voltametría cíclica de un electrodo de carbono “con FAD” en amortiguador fosfatos 0.1 M, pH 7 a 20 mV/s. El voltaje es referido al SCE y se omiten las demás voltamperogramas ya que todos dan el mismo perfil.

Es importante recalcar, que en la presente tesis se intentó funcionalizar con FAD nativo mientras que la mayoría de los artículos publicados emplean un análogo del FAD ( $N^6$ -(2-aminoetil)-FAD) (Figura 41). Es probable, que el par de electrones del grupo amino del FAD nativo no se encuentren tan disponibles -debido a la deslocalización de los electrones dentro del anillo de la adenina- para llevar a cabo la reacción entre este grupo y el intermediario O-acilurea formado por la condensación de EDC y un ácido carboxílico (del ácido *p*-mercaptobenzoico, en este caso), siendo esta la probable justificación de haber modificado el FAD con etileneimina para rendir el  $N^6$ -(2-aminoetil)-FAD; más sin embargo, desde el año 1985 Miyawaki y Wingard [102] inmovilizaron de forma covalente FAD nativo a un electrodo de carbono vítreo (de baja porosidad, 1-2 %) carboxilado, por lo que, no debió ser en principio un problema el no haber usado el análogo de FAD antes mencionado y por tanto sigue siendo una incógnita la razón por la cual no fue posible la inmovilización de este cofactor.



**Figura 41.** Izquierda, FAD nativo; Derecha,  $N^6$ -(2-aminoetil)-FAD.

En vista de los resultados obtenidos y la gran dificultad de reconstituir la apoGOx sobre un electrodo, se procedió a emplear una estrategia que no afectara la integridad de nuestra flavoenzima, y, aprovechando las características de los nanomateriales para ser utilizados como “cables moleculares” en nanodispositivos, se procedió a inmovilizar la GOx nativa sobre electrodos de carbono funcionalizados con nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT).

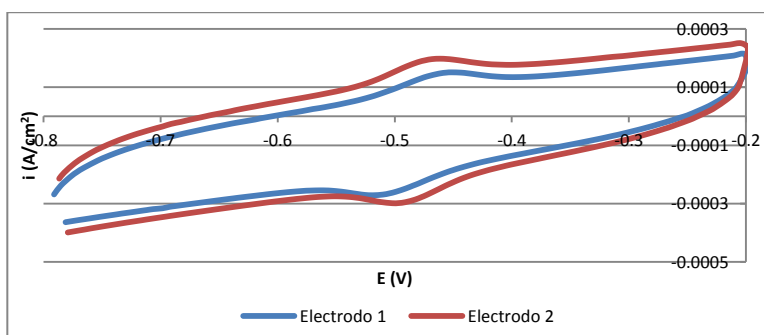
### 7.3.4. Inmovilización covalente aleatoria de GOx sobre electrodos de carbono funcionalizado con nanotubos de carbono (SIGRACET GDL 35BC).

Con el rápido desarrollo de la nanotecnología en las últimas décadas, los nanomateriales con el tamaño y sus propiedades físicas y químicas únicas tienen amplias aplicaciones en bioanalítica. Una de las aplicaciones es facilitar la electroquímica directa de las proteínas redox, modificando la superficie del electrodo con materiales nanoestructurados que proveen un microambiente similar a los sistemas nativos; por lo que, este tipo de materiales mejoran la estabilidad e inmovilización de los biocatalizadores; así como también, incrementan el área superficial de los electrodos y facilitan la transferencia de masa en la superficie del electrodo[103].

La siguiente tabla resume algunos aspectos electroquímicos (Figura 42) y cinéticos obtenidos para los electrodos ensayados:

**Tabla 4.** Resultados obtenidos para dos electrodos ensayados de GOx.

	<b>Electrodo 1</b>	<b>Electrodo 2</b>
E°oxidación (V)	-0.456	-0.461
E°reducción (V)	-0.519	-0.502
E' (V)	-0.488	-0.482
$\Delta E_p$ (V)	0.062	0.041
mU/cm <sup>2</sup>	3.11	4.48
pmol/cm <sup>2</sup>	138.4	160.4
OCP (V vs SCE)	0.17	0.15

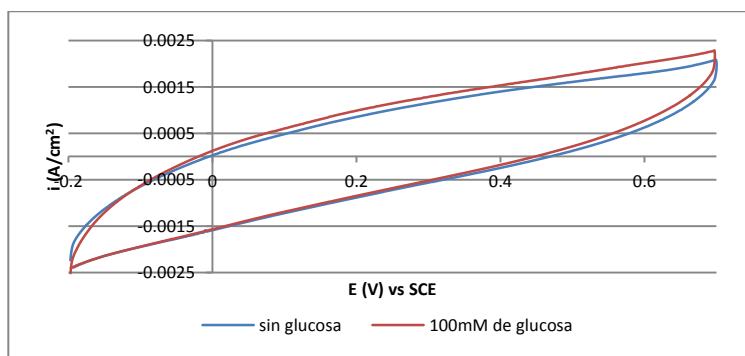


**Figura 42.** Voltametría cíclica de dos electrodos GOx, a 150 mV/s en amortiguador fosfatos 0.1 M, pH 7. Atmósfera de nitrógeno.

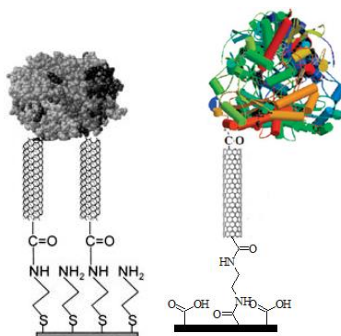
De lo anterior se puede concluir, que ambos electrodos presentan características tanto cinéticas como electroquímicas semejantes; que usando nanotubos de carbono es posible lograr un contacto eléctrico entre la GOx y el electrodo de carbono; además, el electrodo 2 se acerca más a un proceso de transferencia de carga reversible y; en ambos casos la superficie cubierta por GOx supera la estimación teórica para una monocapa de esta proteína (33 pmoles/cm<sup>2</sup>). Al mismo tiempo, con los datos anteriores y las voltametrías cíclicas a distintas velocidades de barrido se obtuvo una  $k_{ET} \sim 8.5 \text{ s}^{-1}$ , y, con ella se estimó una corriente máxima para estos electrodos de  $\sim 130 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , esto considerando que toda la proteína cuantificada por voltametría cíclica es activa y

capaz de transferir electrones durante la oxidación de glucosa. Sin embargo, como se ha mencionado en ocasiones anteriores, la única forma de corroborar que estos electrodos son electroquímicamente activos consiste en observar generación de corriente asociada a la oxidación de glucosa.

A continuación se muestran los voltamperogramas que corresponden al electrodo 2 con 100 mM de glucosa (concentración de saturación), y, su control correspondiente. A un potencial de 0.2V vs SCE se observa un incremento en densidad de corriente de  $131.5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ( $i^{sat}$ ) y de aquí se obtiene una velocidad de recambio máxima de  $4.25 \text{ s}^{-1}$ , mucho menor a la  $k_{cat}$  de la GOx con  $\text{O}_2$  ( $\sim 700 \text{ s}^{-1}$ ). Algo que es curioso notar, es que la densidad de corriente obtenida por la oxidación de glucosa a concentración de saturación, es igual que la estimada a partir de la  $k_{ET}$  calculada por el método de Laviron, y, probablemente pueda deberse más que al hecho de tener un electrodo con un excelente contacto eléctrico, a la dificultad para calcular  $k_{ET}$ , pues a velocidades de barrido bajas fue difícil establecer con exactitud el valor de  $E_{pc}$  a partir de los voltamperogramas (figura no mostrada), lo cual probablemente traiga como consecuencia que la  $k_{ET}$  calculada esté subestimada, ya que  $E_{pc}$  varía de forma logarítmica con la velocidad de barrido y ligeros cambios en los potenciales estimados pueden provocar grandes cambios en los valores calculados para la constante de velocidad. Por otro lado, el valor obtenido para  $k_{cat}$  es superior a lo reportado por Liu *et al.*, 2005 [104] ( $0.3 \text{ s}^{-1}$ ), quienes usaron una estrategia similar a la de la presente tesis, primeramente modificaron electrodos de oro con una monocapa de cisteamina, posteriormente activaron este electrodo con nanotubos de carbono de una sola pared (SWCNT) para después inmovilizar de forma aleatoria la GOx sobre éstas nanoestructuras (Figura 44); por el contrario, es muy inferior a lo reportado por Patolsky, *et al.*, [77], quienes reconstituyeron apoGOx sobre electrodos de oro funcionalizados con nanotubos de carbono (SWCNT) de 25 nm de longitud y obtuvieron una  $k_{cat}$  de hasta  $4100 \text{ s}^{-1}$ , un valor apenas por debajo del alcanzado por Xiao, *et al.*, [76] ( $\sim 5000 \text{ s}^{-1}$ ), reconstituyendo apoGOx sobre electrodos de oro modificados químicamente con nanopartículas de oro. Siendo este último valor, el más alto alcanzado hasta el momento para bioánodos de GOx.



**Figura 43.** Voltametría cíclica del electrodo 2 en amortiguador fosfatos 0.1 M, pH 7, con y sin glucosa. En atmósfera de  $\text{N}_2$  a una velocidad de barrido de 10 mV/s.



**Figura 44.** Bioánodo de GOx. Izquierda) Liu et al., 2005 [104]; derecha) presente trabajo.

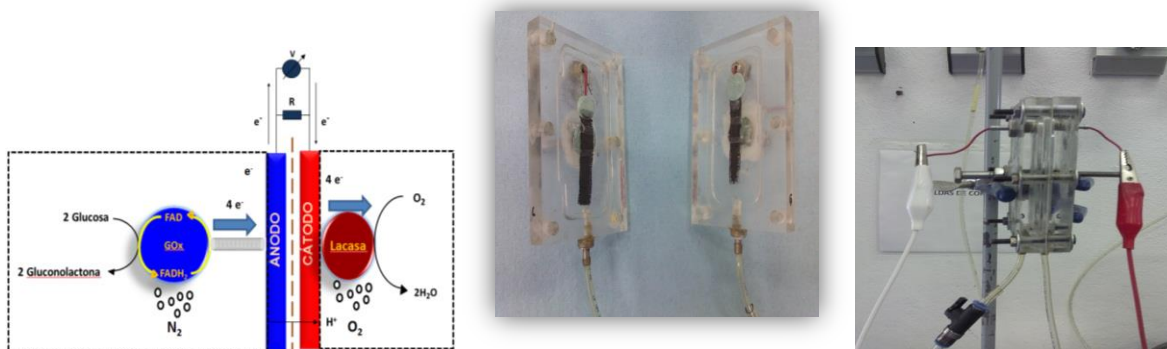
Algo que es importante recalcar, es que en la presente tesis se emplean MWCNT en lugar de SWCNT, siendo que estos últimos son los más empleados debido a su alta conductividad (superconductores), alta uniformidad estructural, mayor superficie área/volumen, menor diámetro y a que su alineamiento sobre superficies solidas es más fácil controlar; sin embargo, son mucho más costosos (aproximadamente 10 veces más que los MWCNT). Además, los nanotubos de carbono utilizados en este estudio tienen una longitud de  $\sim 50 \mu\text{m}$ , una longitud 3 órdenes de magnitud por encima de aquellos que emplearon Patolsky, *et al.*, quienes además observaron que la  $k_{\text{cat}}$  varía en proporción inversa a la longitud de los nanotubos de carbono, de manera que, una forma de optimizar nuestro electrodo de GOx es emplear nanotubos de carbono de una sola pared y además de menor longitud.

#### 7.4. Diseño y caracterización de la celda de combustible enzimática.

Las celdas de combustible enzimáticas basadas en la transferencia directa de electrones poseen una gran importancia debido a la simplicidad en su construcción, a la posibilidad de miniaturizarlas y a la ausencia de mediadores, por lo que se consideran no tóxicas pudiendo usarse para desarrollar micro-baterías implantables en el torrente sanguíneo de mamíferos [3].

En este apartado se describe la caracterización de una celda enzimática basada en la oxidación enzimática de glucosa bajo condiciones anoxigénicas por un ánodo de GOx y la reducción enzimática de oxígeno por un cátodo de lacasa, ambos mediante transferencia electrónica directa.

La Figura 45 representa un esquema de la configuración de la biocelda de combustible enzimática. Ésta celda consta de dos electrodos, ambos de  $1 \text{ cm}^2$  de área geométrica, un ánodo de GOx inmovilizada sobre nanotubos de carbono y un cátodo de lacasa. Ambos electrodos fueron separados por una membrana de intercambio protónico de Nafion<sup>®</sup>, permitiendo de esta manera la difusión selectiva de  $\text{H}^+$  hacia el cátodo y previniendo el paso de oxígeno al ánodo de GOx. Los electrodos de la celda electroquímica fueron acoplados con tornillos de acero inoxidable, los cuales establecieron el punto de conexión del circuito externo (a través del cual fluyen los electrones).



**Figura 45.** Configuración esquemática de la celda de combustible enzimática empleando glucosa y oxígeno como combustible y oxidante, respectivamente. El compartimento anódico fue burbujeado con  $N_2$  y el catódico con  $O_2$ . El panel de la izquierda muestra un esquema general de la celda; el panel intermedio, como se observa por dentro el dispositivo empleado y; el panel derecho, la celda ya ensamblada.

Las medidas de caracterización de la biocelda se realizaron un amortiguador fosfatos 0.1 M, pH 7.0, que pese a no ser el pH óptimo para la lacasa, es un punto de comparación con otras celdas que intentan simular las condiciones fisiológicas y por ser necesario mantener el mismo pH a ambos lados de la membrana de intercambio protónico, de no ser así, inicia la difusión de  $H^+$  hasta equilibrar la  $[H^+]$  a ambos lados de la membrana. Una diferencia para ambos compartimentos, es que el ánodo es burbujeado con  $N_2$  (para evitar formación de  $H_2O_2$ ) mientras el cátodo con  $O_2$ .

La reacción global de la celda de combustible enzimática es,

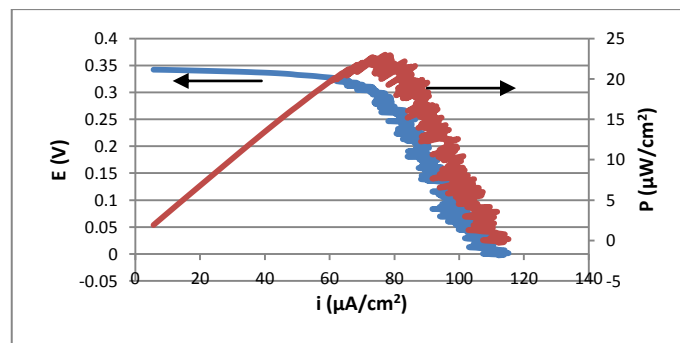


El voltaje a circuito abierto máximo de la biocelda (OCV) calculado como la diferencia de potencial a circuito abierto del cátodo ( $0.49 \pm 0.02$  V vs SCE, en amortiguador fosfatos 0.1 M, pH 7) y del ánodo ( $GOx$   $0.15 \pm 0.01$  V vs SCE) fue de 0.34 V, el cual fue corroborado experimentalmente arrojando un OCV de  $0.335 \pm 0.007$  V. Esta diferencia de potencial es mucho menor a la fuerza electromotriz máxima a pH 7 para el par glucosa/ $O_2$ , siendo ésta de 1.18 V, puesto que los potenciales formales de los pares glucosa/gluconolactona y  $O_2/H_2O$  a pH 7 son -0.36 V y 0.82 V vs ESH respectivamente, lo que indica que hay una caída de voltaje provocadas por pérdidas en la velocidad de reacción en la superficie del electrodo, por elementos resistivos o por una limitación debida al transporte de combustible u oxidante.

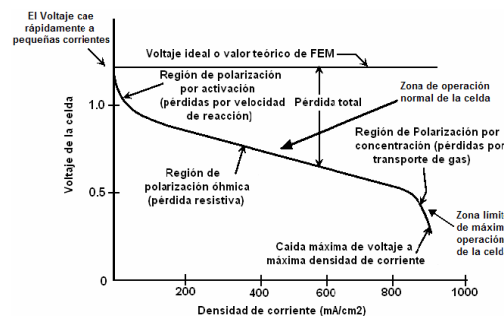
Otra parte fundamental dentro de la caracterización electroquímica de la biocelda, consistió en realizar medidas potenciodinámicas. En este tipo de técnica, las medidas se realizan en un sistema fuera del equilibrio (hay flujo de electrones) y, consiste en monitorear la corriente producida en un determinado rango de potencial eléctrico. En la Figura 46 puede verse como varía la potencia de la biocelda, así como la densidad de corriente, en función del potencial aplicado. Se obtiene una potencia máxima de  $20.6 \mu W/cm^2$  a 0.31 V y densidad de corriente a corto circuito ( $i_{sc}$ ) de  $112 \mu A/cm^2$ . De los resultados obtenidos se logra un *factor de relleno* o *fill factor* igual a 0.54, este factor sirve para estimar la eficiencia en la conversión de energía en una celda de combustible y,

se define como la relación entre la potencia máxima de una celda de combustible y el producto de la corriente a corto circuito y el voltaje a circuito abierto, es decir,  $f = \frac{P_{max}}{I_{sc} * OCV}$ . Por otro lado, de la Figura 46 es difícil ver con claridad el perfil característico (i vs E) para una celda de combustible (Figura 47), en el cual se distinguen 3 fases:

- Fase de activación. Está referida a las pérdidas de voltaje que se tienen a causa de la lentitud de las reacciones que se llevan a cabo en la superficie de los electrodos. Una parte del voltaje generado se pierde en impulsar la transferencia de electrones hacia o de los electrodos. Esta caída de voltaje no tiene un comportamiento lineal.
- Fase óhmica. Esta región se caracteriza por tener pérdidas de carácter resistivo relacionadas con el flujo de electrones a través del material de los electrodos y varias interconexiones, así como la resistencia al flujo de electrones a través del electrolito. Se considera la zona óptima de operación de la celda. En la presente celda, esta zona se encontraría aproximadamente entre los 0.3 V y 0.05 V.
- Fase de decaimiento por concentración. En esta región se presentan pérdidas por el cambio en la concentración de los reactantes en la superficie de los electrodos. No es recomendable esta zona de operación, pues el voltaje cae a valores muy bajos [1]. Probablemente para la biocelda de estudio, esta fase se encuentre asociada al agotamiento de oxígeno en el electrodo de lacasa, pues, el consumo de glucosa es prácticamente despreciable durante el ensayo.



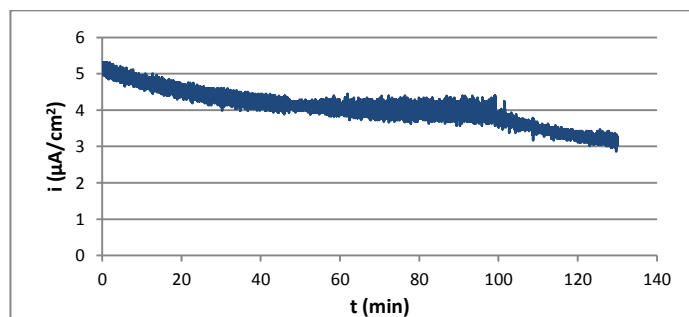
**Figura 46.** Curva de polarización (azul) y curva de potencia (roja) para la celda GOx-Lacasa. Las mediciones fueron realizadas en amortiguador fosfatos 0.1 M, pH 7. Se suministró directamente N<sub>2</sub> en el compartimento anódico, el cual además contenía 100mM de glucosa y O<sub>2</sub> al compartimento catódico.



**Figura 47.** Curva de polarización característica para una celda de combustible [1].



Por último, para evaluar la estabilidad operacional de la celda de combustible GOx/lacasa, se acopló este sistema a una resistencia externa de  $120 \Omega$  y se monitoreó la variación del voltaje en función del tiempo. Estos datos de voltaje se transforman a corriente a partir de la Ley de Ohm. La siguiente figura muestra la estabilidad de la biocelda, iniciando con una densidad de corriente de  $5.16 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , y, conserva  $3.1145 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  después de 130 minutos de operación continua, es decir, el 60 % de la densidad de corriente inicial. Cabe mencionar que este decaimiento en la densidad de corriente, no es debido a la falta de combustible (glucosa) dentro del compartimento anódico, ya que, después de dicho experimento solo se consumió el  $\sim 15\%$  de la glucosa; pero, por otro lado, a pesar de que la lacasa mantiene solo el 10 % de su actividad a pH 7 (con respecto a su actividad a pH 4.5), no muestra pérdida de actividad significativa hasta por 5 días cuando es almacenada a este pH [45]. No obstante, de la curva de polarización (Figura 46) se calcula por la Ley de Ohm que la biocelda opera óptimamente cuando se expone a una resistencia externa de  $3 \text{ k}\Omega$  y en la presente tesis se trabajó con una resistencia de  $120 \Omega$ , la cual es una resistencia externa pequeña y probablemente bajo estas condiciones se esté trabajando en la zona de decaimiento por concentración de reactantes (oxígeno, en este caso) en donde estos son consumidos a una velocidad mayor de la cual son suministrados y los productos son acumulados a mayor velocidad de la cual pueden ser liberados y este efecto inhibe reacciones futuras.



**Figura 48.** Estabilidad de la densidad de corriente con el tiempo para una resistencia de  $120 \Omega$ . Las medición se realizó en amortiguador fosfatos 0.1 M, pH 7, con suministro continuo de  $\text{N}_2$  en el ánodo (100 mM glucosa) y  $\text{O}_2$  en el cátodo.

En la Tabla 5 se recoge un resumen de las características, voltaje a circuito abierto (OCV), corriente a corto circuito, potencia máxima, tiempo de vida media operacional y algunos comentarios adicionales de las celdas de combustible enzimáticas (con GOx en el ánodo) con transferencia electrónica directa. Considerando el proceso de inmovilización de las enzimas redox sobre los electrodos y las condiciones de operación, solo es posible comparar la celda descrita en el presente trabajo con aquellas diseñadas por Willner, I., et al., [71] y Zhao, H. Y., et al., [105]. Con respecto a esta última se obtienen mejores rendimientos en términos de corriente y de potencia; sin embargo, en comparación con la propuesta por el grupo Willner, aunque el OCV, la  $J_{sc}$  y la  $P_{max}$  son muy semejantes, la  $k_{cat}$  del ánodo de GOx es superior a la  $k_{cat}$  de esta enzima con el oxígeno, por lo que este electrodo no se ve afectado por la presencia de oxígeno, además, los autores proponen que el tiempo de vida media es muy corto, debido a un decremento en la concentración de sustrato, por lo que, ellos proponen emplear un sistema continuo para eliminar dicho efecto. Algo importante que cabe resaltar de la Tabla 5, es que la biocelda que reporta la más alta

densidad de corriente y potencia es una celda lacasa/GOx, donde cada electrodo se obtiene por compresión mecánica hasta formar un pellet y las enzimas se encuentran inmovilizadas de forma aleatoria dentro de una matriz de nanotubos de carbono, esto se debe a que los nanotubos de carbono presentan una elevada conductividad y estabilidad eléctrica, aunado a que su área de contacto es mayor y puede ser mejor aprovechada; ya que en un electrodo con superficie sólida, la densidad de corriente límite que pueda alcanzarse será aquella que se obtenga únicamente por la monocapa de enzima inmovilizada (y activa electroquímicamente) sobre el electrodo. Lo anterior revela que la orientación de las enzimas no siempre conllevará a una mayor densidad de corriente y que según los fines que se tengan (como celda de combustible o biosensor), se tendrá que elegir un diseño con enzimas orientadas o uno con enzimas inmovilizadas de forma aleatoria.

**Tabla 5.** Comparación de las características (voltaje (V), potencia (P) y tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) de las bioceldas de combustible enzimáticas integradas con un ánodo de GOx y que presentan DET.

Cátodo	Combustible/oxidante	OCV (V)	$i_{sc}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$P_{max}$ ( $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ )	$t_{1/2}$ (h)	Comentarios	Referencia
Microperoxidasa	Glucosa / $\text{H}_2\text{O}_2$	0.310	114	32 ( $\mu\text{W}$ )	~ 3	Reconstitución de apoGOx sobre electrodos de oro	Willner, I., E. Katz, <i>et al.</i> , [71]
Microperoxidasa	Glucosa/peróxido de cumeno	0.990	830	520 ( $\mu\text{W}$ )	>3	Reconstitución de apoGOx sobre electrodos de oro. La celda funciona en dos solventes inmiscibles	Katz, E., B. Filanovsky, <i>et al.</i> , [73]
Lacasa	Glucosa/ $\text{O}_2$	0.95	8000	1300	Estable por un mes	Ambos electrodos son pellets obtenidos por compresión mecánica	Zebda, A., C. Gondran, <i>et al.</i> , [106]
Citocromo c/Citocromo oxidasa	Glucosa/ $\text{O}_2$	0.125	550	21.5	-----	Controlado por sistemas lógicos (pulsos de voltaje)	Katz, E. and I. Willner, [107]
Citocromo c/Citocromo oxidasa	Glucosa/ $\text{O}_2$	0.120	600	26	-----	Controlado por sistemas lógicos (aplicación de un campo magnético)	Katz, E., O. Lioubashevski, <i>et al.</i> , [108]
Lacasa	Glucosa/ $\text{O}_2$	0.58	60	15.8	-----	Electrodos funcionalizados con MWCNT-hidroxiapatita	Zhao, H. Y., H. M. Zhou, <i>et al.</i> , [105]
<b>Lacasa</b>	<b>Glucosa/<math>\text{O}_2</math></b>	<b>0.34</b>	<b>112</b>	<b>20.6</b>	<b>&gt;2</b>	<b>GOx inmovilizada sobre electrodo de carbono funcionalizados con MWCNT</b>	<b>Presente tesis</b>

## 8. CONCLUSIONES.

En base a los resultados obtenidos es evidente el efecto que tiene la naturaleza química tanto de los espaciadores como de los sustratos empleados durante la construcción del bioánodo de GOx.

En todos los electrodos de GOx descritos a continuación, a partir de los voltamperogramas se deduce que estos diseños muestran un comportamiento reversible de transferencia de carga o muy cercano a este comportamiento, de modo que fue posible determinar  $k_{ET}$  por el método de Laviron.

La apoGOx fue inmovilizada de forma orientada a soportes de carbono funcionalizados con péptidos -FAD y siringaldazina-malónico-FAD, habiendo en ambos casos contacto directo entre la enzima y la superficie del electrodo. Sin embargo, ésta enzima no fue electroquímicamente activa cuando fue inmovilizada sobre péptidos-FAD, donde los péptidos por su naturaleza aromática sirven como un “cable molecular” a través de los cuales pueden viajar los electrones desde el sitio activo de la enzima al electrodo. No obstante, empleando siringaldazina fue posible obtener un bioánodo electroquímicamente activo, un espaciador que además de su naturaleza aromática presenta un potencial redox (0.26 V vs SCE) mayor al FAD, lo que favorece la transferencia de electrones a la superficie del electrodo. De los electrodos que emplean siringaldazina-malónico-FAD como espaciador, se calculó una  $k_{ET} = 23 \text{ s}^{-1}$  y una  $k_{cat} = 7 \text{ s}^{-1}$  (para el caso más exitoso). Este último valor es muy inferior a aquella velocidad de recambio que tiene la GOx con su aceptor natural de electrones, es decir, el oxígeno ( $\sim 700 \text{ s}^{-1}$ ). Este abatimiento en el valor de  $k_{cat}$  es debido a la formación de multicapas de proteína sobre la superficie del electrodo, lo que representa una barrera extra a la transferencia de carga, por lo que es deseable eliminarlas; sin embargo, debido a la fuerte adsorción de la proteína sobre el grafito fue imposible eliminar éstas capas de enzima, lo que además trajo consigo una baja reproducibilidad en la fabricación de estos electrodos. Este último fenómeno no está del todo comprendido, pero, se sabe que en electrodos de alta rugosidad es muy difícil (o hasta imposible) tener reproducibilidad en la fabricación de electrodos sobre los cuales se busca reconstituir apoGOx.

Además, se intentó reconstituir la apoGOx sobre electrodos de oro, los cuales tenían un  $fr = 1.1$ , se eligieron estos soportes debido a su alta actividad electroquímica y con la finalidad de eliminar las interferencias que provocaba la alta rugosidad en los electrodos de carbono. Los electrodos de oro fueron previamente funcionalizados con ácido p-mercaptobenzoico, nuevamente valiéndose de la naturaleza de aromática de este espaciador así como de la adsorción espontánea de tioles sobre electrodos de oro para formar monocapas autoensambladas. No obstante, resulto imposible inmovilizar el FAD, hecho que no es posible explicar con las pruebas realizadas en el presente estudio.

Por último, se eligieron los nanotubos de carbono de pared múltiple para conectar eléctricamente a la GOx inmovilizada de forma covalente aleatoria a la superficie del electrodo. Los nanotubos de carbono funcionan como un “cable molecular” a través del cual viajan los electrones. De las pruebas electroquímicas llevadas a cabo se obtuvo una  $k_{ET} = 8.5 \text{ s}^{-1}$  y una  $k_{cat} = 4.5 \text{ s}^{-1}$ , a 0.2 V vs SCE y a una concentración de saturación de 100 mM de glucosa. Sin embargo, también se

formaron multicapas sobre la superficie del electrodo y que sumado a la gran longitud de los nanotubos de carbono (50  $\mu\text{m}$ ) conllevan a una baja velocidad de recambio.

Los bioánodos contruidos con MWCNT se emplearon para la construcción de la celda de combustible enzimática y se acoplaron a un cátodo de lacasa, el cual ya había sido previamente caracterizado y se sabe que presenta una transferencia de carga cuasirreversible y una  $k_s = 0.06 \text{ s}^{-1}$ . Ésta biocelda, operando bajo las condiciones descritas anteriormente rindió una  $i_{sc} = 112 \text{ A/cm}^2$ , un OCV = 0.34 V y una  $P_{MAX} = 20.6 \text{ W/cm}^2$ . En cuanto a la estabilidad, la biocelda mostró un decremento del 40% de la densidad de corriente inicial después de 130 minutos de operación continua. Este decremento no se debe al agotamiento de glucosa, la cual se consumió solo en un 15% y probablemente se deba a problemas de transferencia de oxígeno en el lado del cátodo de lacasa.

## 9. PERSPECTIVAS.

Uno de los aspectos claves para lograr una alta  $k_{cat}$  en electrodos funcionalizados con nanotubos de carbono, es el tipo de nanoestructura empleada y la distancia del mismo. En la biocelda diseñada, se emplearon nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) con una longitud de  $\sim 50 \mu\text{m}$ , pero, es bien sabido que en cuestiones de conductividad eléctrica son mucho mejores los nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT). De tal forma que una opción para hacer más eficiente la DET en el bioánodo de GOx sería usar SWCNT en lugar de MWCNT, y que además, estos fueran de menor longitud, del orden de los nanómetros.

En cuanto al diseño del hardware usado para evaluar el desempeño de la celda, es necesario mejorar el contacto eléctrico para reducir las pérdidas por caídas óhmicas, así como emplear un sistema de alimentación continuo, de modo que la concentración de glucosa sea independiente del tiempo y que no haya acumulación de ácido glucónico (producto de la oxidación de glucosa), el cual puede inhibir la actividad GOx. Otra posibilidad, sería emplear otra enzima que pertenezca a la familia de las multicobre oxidasa cuya actividad no se vea afectada a pH 7, como es el caso de la bilirrubina oxidasa, además, de que la actividad de esta enzima no se ve inhibida por iones haluro. Esto último es muy importante si se pretende diseñar una celda para un microdispositivo implantable en el cuerpo humano (150 mM NaCl), ya que la lacasa es inhibida por iones cloruro.

La fabricación de bioceldas de combustible que muestran una transferencia electrónica directa elimina los inconvenientes de usar mediadores, los cuales además de ser inestables, son muy costosos, tóxicos y contribuyen a pérdidas en el voltaje. Sin embargo, en este tipo de dispositivos presentan dos grandes limitantes: i) que la distancia entre el sitio activo de la enzima y el electrodo sea la necesaria para lograr DET y, ii) cuando los electrodos son superficies sólidas, la densidad de corriente límite que pueda alcanzarse, será aquella que se obtenga únicamente por la monocapa formada sobre dicho electrodo. De modo que actualmente, se han diseñado electrodos por compresión mecánica, en los cuales, se puede depositar una gran cantidad de enzima que puede lograr contacto eléctrico si se usan nanoestructuras, y el ejemplo más sobresaliente es la celda construida por Zebda *et al.* (2011).

Actualmente además se están diseñando celdas de combustible, en las cuales alguno de los electrodos se encuentra controlado por un cambio de pH o en el voltaje, lo cual se hace con la finalidad de emular cambios que se dan dentro de un organismo como resultado de las reacciones bioquímicas llevadas a cabo dentro del mismo, tal es el caso de los electrodos diseñados por Katz *et al.*, en el 2003 y en el 2005, que precisamente responden a los cambios mencionados en el presente párrafo.

## 10. REFERENCIAS.

1. Larminie, J. and A. Dicks, *Fuel cell systems explained. 2a Ed. John Wiley and Sons. Inglaterra.* 2003.
2. Bullen, R.A., et al., *Biofuel cells and their development.* Biosensors and Bioelectronics, 2006. **21**(11): p. 2015-2045.
3. Calabrese Barton, S., J. Gallaway, and P. Atanassov, *Enzymatic Biofuel Cells for Implantable and Microscale Devices.* Chemical Reviews, 2004. **104**(10): p. 4867-4886.
4. Moehlenbrock, M.J. and S.D. Minteer, *Extended lifetime biofuel cells.* Chemical Society Reviews, 2008. **37**(6): p. 1188-1196.
5. Martinez-Ortiz, J., R. Flores, and R. Vazquez-Duhalt, *Molecular design of laccase cathode for direct electron transfer in a biofuel cell.* Biosensors and Bioelectronics, 2011. **26**(5): p. 2626-2631.
6. Shukla, A.a.S., P and Berchmans, S and Rajendran, A, *Biological fuel cells and their applications.* Current Science, 2004. **87**(4): p. 455-468.
7. Spiegel, C., *Designing and Building Fuel Cell.* 2007(Mc Graw-Hill, E.U.A.).
8. Yao, S.J., Appleby, A. J., Geise, A., Cash, H. R. and Wolfson, S. K., *Anodic oxidation of carbohydrates and their derivatives in neutral saline solution.* Nature, 1969. **224**: p. 921-922.
9. Davis, F. and S.P.J. Higson, *Biofuel cells—Recent advances and applications.* Biosensors and Bioelectronics, 2007. **22**(7): p. 1224-1235.
10. Heller, A., *Miniature biofuel cells.* Phys. Chem. Chem. Phys., 2004. **6**(2): p. 209-216.
11. Gil, G.-C., et al., *Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell.* Biosensors and Bioelectronics, 2003. **18**(4): p. 327-334.
12. Chaudhuri, S.K. and D.R. Lovley, *Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells.* Nature Biotechnology, 2003. **21**(10): p. 1229.
13. Kim, H.J., et al., *A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, Shewanella putrefaciens.* Enzyme and Microbial Technology, 2002. **30**(2): p. 145-152.
14. Park, H.S., et al., *A Novel Electrochemically Active and Fe(III)-reducing Bacterium Phylogenetically Related to Clostridium butyricum Isolated from a Microbial Fuel Cell.* Anaerobe, 2001. **7**(6): p. 297-306.
15. Pham, C.A., et al., *A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to Aeromonas hydrophila, isolated from a microbial fuel cell.* FEMS Microbiology Letters, 2003. **223**(1): p. 129-134.
16. Palmore, G.T.R. and H.-H. Kim, *Electro-enzymatic reduction of dioxygen to water in the cathode compartment of a biofuel cell.* Journal of Electroanalytical Chemistry, 1999. **464**(1): p. 110-117.
17. Kim, N., et al., *Effect of initial carbon sources on the performance of microbial fuel cells containing Proteus vulgaris.* Biotechnology and Bioengineering, 2000. **70**(1): p. 109-114.
18. Wilson, R. and A.P.F. Turner, *Glucose oxidase: an ideal enzyme.* Biosensors and Bioelectronics, 1992. **7**(3): p. 165-185.
19. Kim, J., H. Jia, and P. Wang, *Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells.* Biotechnology Advances, 2006. **24**(3): p. 296-308.
20. Karyakin, A.A., et al., *Hydrogen fuel electrode based on bioelectrocatalysis by the enzyme hydrogenase.* Electrochemistry Communications, 2002. **4**(5): p. 417-420.
21. <http://www.sony.net/SonyInfo/News/Press/200708/07-074E/index.html>.
22. Baldrian, P., *Fungal laccases – occurrence and properties.* FEMS Microbiology Reviews, 2006. **30**(2): p. 215-242.

23. Morozova, O., et al., "Blue" laccases. *Biochemistry (Moscow)*, 2007. **72**(10): p. 1136-1150.
24. Bento, I., et al., *Dioxygen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective*. *Dalton Transactions*, 2005(21): p. 3507-3513.
25. Matera, I., et al., *Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus *Trametes trogii* complexed with *p*-toluate*. *Inorganica Chimica Acta*, 2008. **361**(14–15): p. 4129-4137.
26. De La Mora, E., Valderrama, B., Horjales, E., Rudino-Pinera, E., *Crystal Structure of *Coriolopsis Gallica* Laccase at 1.7 Å Resolution*. 2006.
27. Martínez-Ortiz, J., *Diseño y construcción de una celda de combustible enzimática híbrida Zn-lacasa*. Tesis de maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM., 2010.
28. Solomon, E.I., U.M. Sundaram, and T.E. Machonkin, *Multicopper Oxidases and Oxygenases*. *Chemical Reviews*, 1996. **96**(7): p. 2563-2606.
29. Shleev, S., et al., *Autoreduction and aggregation of fungal laccase in solution phase: possible correlation with a resting form of laccase*. *Biochimie*, 2006. **88**(9): p. 1275-1285.
30. Quintanar, L., et al., *Shall We Dance? How A Multicopper Oxidase Chooses Its Electron Transfer Partner*. *Accounts of Chemical Research*, 2007. **40**(6): p. 445-452.
31. F. Xu, R.M.B., J.A. Wahleithner, B.A. Nelson, J.R. Shuster, S.H. Brown, A.E. Palmer, y E.I. Solomon, *Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity y pH profile*. *Biochemical Journal*, 1998. **334**: p. 63-70.
32. Piontek, K., M. Antorini, and T. Choinowski, *Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(40): p. 37663-37669.
33. Durão, P., et al., *Proximal mutations at the type 1 copper site of CotA laccase: spectroscopic, redox, kinetic and structural characterization of I494A and L386A mutants*. *Biochemical Journal*, 2008. **412**(2): p. 339-346.
34. Xu, F., *Effects of Redox Potential and Hydroxide Inhibition on the pH Activity Profile of Fungal Laccases*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**(2): p. 924-928.
35. Lee, S.-K., et al., *Nature of the Intermediate Formed in the Reduction of O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O at the Trinuclear Copper Cluster Active Site in Native Laccase*. *Journal of the American Chemical Society*, 2002. **124**(21): p. 6180-6193.
36. Rulíšek, L., E.I. Solomon, and U. Ryde, *A Combined Quantum and Molecular Mechanical Study of the O<sub>2</sub> Reductive Cleavage in the Catalytic Cycle of Multicopper Oxidases*. *Inorganic Chemistry*, 2005. **44**(16): p. 5612-5628.
37. Solomon, E.I., et al., *Oxygen Binding, Activation, and Reduction to Water by Copper Proteins*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2001. **40**(24): p. 4570-4590.
38. Enguita, F.J., et al., *Substrate and Dioxygen Binding to the Endospore Coat Laccase from *Bacillus subtilis**. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**(22): p. 23472-23476.
39. Bertrand, T., et al., *Crystal Structure of a Four-Copper Laccase Complexed with an Arylamine: Insights into Substrate Recognition and Correlation with Kinetics†,‡*. *Biochemistry*, 2002. **41**(23): p. 7325-7333.
40. A. Naqui, S.D.V., *Inhibition mechanism of *Polyporus* laccase by fluoride ion*. *FEBS Letters*, 1980. **113**(2): p. 157-160.
41. Spira-Solomon, D.J., M.D. Allendorf, and E.I. Solomon, *Low-temperature magnetic circular dichroism studies of native laccase: confirmation of a trinuclear copper active site*. *Journal of the American Chemical Society*, 1986. **108**(17): p. 5318-5328.
42. Xu, F., *Oxidation of phenols, anilines, and benzothiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition*. *Biochemistry*, 1996. **35**: p. 7608-7614.

43. Shleev, S., et al., *Direct Heterogeneous Electron Transfer Reactions of Trametes hirsuta Laccase at Bare and Thiol-Modified Gold Electrodes*. *Electroanalysis*, 2006. **18**(19-20): p. 1901-1908.
44. VAZ, D.C., *Inmovilización covalente y orientada de enzima lacasa sobre distintas superficies para su uso como cátodo en pilas de combustible*. Tesis de Doctorado-Universidad Autónoma de Madrid. En línea. [http://digitool-uam.greendata.es//exlibris/dtl/d3\\_1/apache\\_media/L2V4bGlicmlzL2R0bC9kM18xL2FwYWVNoZV9tZWVpYS8xNjQ4Nw==.pdf](http://digitool-uam.greendata.es//exlibris/dtl/d3_1/apache_media/L2V4bGlicmlzL2R0bC9kM18xL2FwYWVNoZV9tZWVpYS8xNjQ4Nw==.pdf), 2009.
45. Vandertol -Vanier, H.A., *THE ROLE OF LACCASE FROM CORIOLOPSIS GALLICA IN POLYCYCLIC AROMATE HYDROCARBON METABOLISM*. Tesis de maestría. Universidad de Alberta. Canadá, 2000.
46. Klis, M., et al., *Electroreduction of laccase covalently bound to organothiol monolayers on gold electrodes*. *Electrochimica Acta*, 2007. **52**(18): p. 5591-5598.
47. Bentley, R., *Glucose oxidase*. In *The Enzymes*. P. D. Boyer, H. Lardy & K. Myrback. Academic Press, London, 1963. **7**: p. 567-86.
48. Fleming, A., *On the antibacterial action of cultures of a Penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. injluenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*, 1929. **10**: p. 226-236.
49. Coulthard, C.E., Short, W. F., Michaelis, R, Sykes, G., Skrimshire, G. E. H., Standfast, A F. B., Birkinshaw, J. H. & Raistrick, H., *Notatin: an antibacterial glucose aerohydrogenes from Penicillium notatum Westling*. *Nature*, 1942. **150**: p. 634-635.
50. Coulthard, C.E., Michaelis, R, Short, W. F., Skrimshire, G. E. H., Standfast, A F. B., Birkinshaw, J. H. & Raistrick, H, *Notatin: an antibacterial glucose aerohydrogenes from Penicillium notatum Westling and Penicillium resticulosum sp*. *Biochem. J.*, 1945. **39**: p. 24-36.
51. Kocholaty, W., *Purification and properties of penatin: the second antibacterial substance produced by Penicillium notatum Westling*. *Arch. B&hem.*, 1943. **2**(73-86).
52. Bean, R.C. and W.Z. Hassid, *CARBOHYDRATE OXIDASE FROM A RED ALGA, IRIDOPHYCUS FLACCIDUM*. *Journal of Biological Chemistry*, 1956. **218**(1): p. 425-436.
53. Bean, R.C., G.G. Porter, and B.M. Steinberg, *Carbohydrate Metabolism of Citrus Fruits*. *Journal of Biological Chemistry*, 1961. **236**(5): p. 1235-1240.
54. Schepartz, A.I. and M.H. Subers, *The glucose oxidase of honey I. Purification and some general properties of the enzyme*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Enzymological Subjects*, 1964. **85**(2): p. 228-237.
55. Levine, J.H.D.a.H.B., *HEXOSE OXIDATION BY AN ENZYME SYSTEM OF MALLEOMYCES PSEUDOMALLEI* *J. Bacteriol.*, 1956. **72**: p. 555-560.
56. Swoboda, B.E.P. and V. Massey, *Purification and Properties of the Glucose Oxidase from Aspergillus niger*. *Journal of Biological Chemistry*, 1965. **240**(5): p. 2209-2215.
57. Frederick, K.R., et al., *Glucose oxidase from Aspergillus niger. Cloning, gene sequence, secretion from Saccharomyces cerevisiae and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme*. *Journal of Biological Chemistry*, 1990. **265**(7): p. 3793-802.
58. Gouda, M.D., et al., *Thermal Inactivation of Glucose Oxidase*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(27): p. 24324-24333.
59. Kalisz, H.M., J. Hendle, and R.D. Schmid, *Structural and biochemical properties of glycosylated and deglycosylated glucose oxidase from Penicillium amagasakiense*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1997. **47**(5): p. 502-507.
60. Nakamura S, O.Y., *Mode of inhibition of glucose oxidase by metal ions*. *J Biochem*, 1968. **64**: p. 439-447.



61. Chan, T.W. and T.C. Bruice, *One and two electron transfer reactions of glucose oxidase*. Journal of the American Chemical Society, 1977. **99**(7): p. 2387-2389.
62. Wohlfahrt, G., et al., *The chemical mechanism of action of glucose oxidase from Aspergillus niger*. Molecular and Cellular Biochemistry, 2004. **260**(1): p. 69-83.
63. Hecht, H.J., et al., *Crystal Structure of Glucose Oxidase from Aspergillus niger Refined at 2.3 Å Resolution*. Journal of Molecular Biology, 1993. **229**(1): p. 153-172.
64. Wohlfahrt, G., et al., *1.8 and 1.9 Å resolution structures of the -Penicillium amagasakiense and Aspergillus niger glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes*. Acta Crystallographica Section D, 1999. **55**(5): p. 969-977.
65. Wohlfahrt, G., et al., *The chemical mechanism of action of glucose oxidase from &i&t;Aspergillus niger&/i&t;*. Molecular and Cellular Biochemistry, 2004. **260**(1): p. 69-83.
66. Bright, H.J. and M. Appleby, *The pH Dependence of the Individual Steps in the Glucose Oxidase Reaction*. Journal of Biological Chemistry, 1969. **244**(13): p. 3625-3634.
67. Leskovac, V., et al., *Glucose oxidase from Aspergillus niger: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2005. **37**(4): p. 731-750.
68. Sanner, C., et al., *15N- and 13C-NMR investigations of glucose oxidase from Aspergillus niger*. European Journal of Biochemistry, 1991. **196**(3): p. 663-672.
69. Andrea, M., *To be or not to be an oxidase: challenging the oxygen reactivity of flavoenzymes*. Trends in Biochemical Sciences, 2006. **31**(5): p. 276-283.
70. Yahiro, A.T., S.M. Lee, and D.O. Kimble, *Bioelectrochemistry: I. Enzyme utilizing bio-fuel cell studies*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Biophysical Subjects, 1964. **88**(2): p. 375-383.
71. Willner, I., et al., *Biofuel cell based on glucose oxidase and microperoxidase-11 monolayer-functionalized electrodes*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2, 1998(8): p. 1817-1822.
72. Katz, E., I. Willner, and A.B. Kotlyar, *A non-compartmentalized glucose#xa0;/&#xa0;O2 biofuel cell by bioengineered electrode surfaces*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1999. **479**(1): p. 64-68.
73. Katz, E., B. Filanovsky, and I. Willner, *A biofuel cell based on two immiscible solvents and glucose oxidase and microperoxidase-11 monolayer-functionalized electrodes*. New Journal of Chemistry, 1999. **23**(5): p. 481-487.
74. Liu, G., M.N. Paddon-Row, and J. Justin Gooding, *A molecular wire modified glassy carbon electrode for achieving direct electron transfer to native glucose oxidase*. Electrochemistry Communications, 2007. **9**(9): p. 2218-2223.
75. Zayats, M., E. Katz, and I. Willner, *Electrical Contacting of Glucose Oxidase by Surface-Reconstitution of the Apo-Protein on a Relay-Boronic Acid-FAD Cofactor Monolayer*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(10): p. 2120-2121.
76. Xiao, Y., et al., *"Plugging into Enzymes": Nanowiring of Redox Enzymes by a Gold Nanoparticle*. Science, 2003. **299**(5614): p. 1877-1881.
77. Patolsky, F., Y. Weizmann, and I. Willner, *Long-Range Electrical Contacting of Redox Enzymes by SWCNT Connectors*. Angewandte Chemie International Edition, 2004. **43**(16): p. 2113-2117.
78. PrévotEAU, A., O. Courjean, and N. Mano, *Deglycosylation of glucose oxidase to improve biosensors and biofuel cells*. Electrochemistry Communications, 2010. **12**(2): p. 213-215.
79. Demin, S. and E.A.H. Hall, *Breaking the barrier to fast electron transfer*. Bioelectrochemistry, 2009. **76**(1-2): p. 19-27.

80. Courjean, O., F. Gao, and N. Mano, *Deglycosylation of Glucose Oxidase for Direct and Efficient Glucose Electrooxidation on a Glassy Carbon Electrode*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009. **48**(32): p. 5897-5899.
81. Zayats, M., et al., *Reconstitution of Apo-Glucose Dehydrogenase on Pyrroloquinoline Quinone-Functionalized Au Nanoparticles Yields an Electrically Contacted Biocatalyst*. *Journal of the American Chemical Society*, 2005. **127**(35): p. 12400-12406.
82. Faulkner, A.J.B.y.L.R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. New York, 1980.
83. Sarapuu, A., et al., *Electrochemical reduction of oxygen on thin-film Au electrodes in acid solution*. *Electrochemistry Communications*, 2001. **3**(8): p. 446-450.
84. Buttry, D.A., et al., *Immobilization of amines at carbon fiber surfaces*. *Carbon*, 1999. **37**(12): p. 1929-1940.
85. Wolfenden, B.S. and R.L. Willson, *Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2[prime or minute]-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1982(7): p. 805-812.
86. Lee, Y.-M., et al., *Immobilization of Horseradish Peroxidase on Multi-Wall Carbon Nanotubes and its Electrochemical Properties*. *Biotechnology Letters*, 2006. **28**(1): p. 39-43.
87. Willner, I., et al., *Electrical Wiring of Glucose Oxidase by Reconstitution of FAD-Modified Monolayers Assembled onto Au-Electrodes*. *Journal of the American Chemical Society*, 1996. **118**(42): p. 10321-10322.
88. Offenbauer, R.D., *The direct esterification of phenols*. *Journal of Chemical Education*, 1964. **41**(1): p. 39.
89. Swoboda, B.E.P., *The relationship between molecular conformation and the binding of flavin-adenine dinucleotide in glucose oxidase*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 1969. **175**(2): p. 365-379.
90. Morris, D.a.R.B., *Methods in Enzymology*. ed. J. J. Langone and H. Vunakis, Academic Press, New York,, 1983. **92**(part E): p. 413-417.
91. Trinder, P., *Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor*. *Ann. Clin. Biochem.*, 1969. **6**: p. 24-28.
92. Minteer, S.D., et al., *New materials for biological fuel cells*. *Materials Today*, 2012. **15**(4): p. 166-173.
93. Page, C.C., et al., *Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction*. *Nature*, 1999. **402**(6757): p. 47-52.
94. VAZ, D.C., *Inmovilización covalente y orientada de enzima lacasa sobre distintas superficies para su uso como cátodo en pilas de combustible*. Tesis de Doctorado-Universidad Autónoma de Madrid., 2009.
95. Khatun Haq, S., M. Faiz Ahmad, and R. Hasan Khan, *The acid-induced state of glucose oxidase exists as a compact folded intermediate*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003. **303**(2): p. 685-692.
96. Chi, Q., et al., *Direct electrochemistry and surface characterization of glucose oxidase adsorbed on anodized carbon electrodes*. *Electrochimica Acta*, 1994. **39**(16): p. 2431-2438.
97. Liu, J., M.N. Paddon-Row, and J.J. Gooding, *Surface reconstitution of glucose oxidase onto a norbornylogous bridge self-assembled monolayer*. *Chemical Physics*, 2006. **324**(1): p. 226-235.
98. Fernández-Sánchez, C., et al., *Voltammetric monitoring of laccase-catalysed mediated reactions*. *Bioelectrochemistry*, 2002. **58**(2): p. 149-156.

99. Miyawaki, O. and L.B. Wingard, *Electrochemical and enzymatic activity of flavin adenine dinucleotide and glucose oxidase immobilized by adsorption on carbon*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1984. **26**(11): p. 1364-1371.
100. Park, S., H. Boo, and T.D. Chung, *Electrochemical non-enzymatic glucose sensors*. *Analytica Chimica Acta*, 2006. **556**(1): p. 46-57.
101. Nuzzo, R.G., B.R. Zegarski, and L.H. Dubois, *Fundamental studies of the chemisorption of organosulfur compounds on gold(111). Implications for molecular self-assembly on gold surfaces*. *Journal of the American Chemical Society*, 1987. **109**(3): p. 733-740.
102. Miyawaki, O. and L.B. Wingard Jr, *Electrochemical and glucose oxidase coenzyme activity of flavin adenine dinucleotide covalently attached to glassy carbon at the adenine amino group*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1985. **838**(1): p. 60-68.
103. Liu, Y., Y. Du, and C.M. Li, *Direct Electrochemistry Based Biosensors and Biofuel Cells Enabled with Nanostructured Materials*. *Electroanalysis*, 2013. **25**(4): p. 815-831.
104. Liu, J., et al., *Achieving Direct Electrical Connection to Glucose Oxidase Using Aligned Single Walled Carbon Nanotube Arrays*. *Electroanalysis*, 2005. **17**(1): p. 38-46.
105. Zhao, H.Y., et al., *Carbon nanotube–hydroxyapatite nanocomposite: A novel platform for glucose/O<sub>2</sub> biofuel cell*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009. **25**(2): p. 463-468.
106. Zebda, A., et al., *Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes*. *Nature Communications*, 2011. **2**: p. 1-6.
107. Katz, E. and I. Willner, *A Biofuel Cell with Electrochemically Switchable and Tunable Power Output*. *Journal of the American Chemical Society*, 2003. **125**(22): p. 6803-6813.
108. Katz, E., O. Lioubashevski, and I. Willner, *Magnetic Field Effects on Bioelectrocatalytic Reactions of Surface-Confined Enzyme Systems: Enhanced Performance of Biofuel Cells*. *Journal of the American Chemical Society*, 2005. **127**(11): p. 3979-3988.