



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis

TÍTULO DE LA TESIS

**DISEÑO DE UNA CELDA DE COMBUSTIBLE
ENZIMÁTICA, ALCOHOL OXIDASA/LACASA**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

ANDRÉS ALBERTO ARROCHA ARCOS

DIRECTOR DE TESIS:

**Dr. RAFAEL VÁZQUEZ DUHALT
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA-UNAM**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

**Dr. ULISES CANO CASTILLO (INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
ELÉCTRICAS)**

Dr. EDMUNDO CASTILLO ROSALES (INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA-UNAM)

CUERNAVACA, MORELOS

Mayo 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Rafael Vazquez Duhalt, en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para la realización del mismo se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) través de la beca CONACyT No. De Registro 270385

AGRADECIMIENTO ESPECIAL.

Esta tesis es el producto de dos años de trabajo en una colaboración conjunta del Dr. Rafael Vázquez Duhalt con el Dr. Ulises Cano Castillo del Instituto de Investigaciones Eléctricas, a quien agradezco su labor como codirector y su significativa aportación al trabajo. El Dr. Ulises Cano es un experto en el área de celdas de combustible y participó activamente en el desarrollo de este proyecto de investigación.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES.

A mi madre, por todo tu amor, comprensión y paciencia. Después de mucho tiempo tal vez he entendido el enorme esfuerzo que has hecho y lo difícil que ha sido educar a tres hijos, con todos los infortunios del camino. Te amo mucho y este es un pedacito de lo que hemos hecho juntos. Gracias por creer siempre en mí, te amo mamá!!

A Diana Laura, me has dado todo tu apoyo durante este proceso, te agradezco todo lo que has hecho. Por toda tu paciencia y amor, por estar en las buenas y en las malas. Te amo mucho Dianita.

A mis hermanos Yessica y Luis por ser un apoyo en Veracruz, ahora que no estoy en casa. Se han comportado a la altura los dos, los amo hermanitos.

A los que hoy no son parte de nuestras vidas pero que tuvieron un impacto en ellas. Mis abuelitos y Luis mi papá.

A los buenos amigos que hice en el IBT:

Abraham que siempre me has alentado a seguir por este camino, has sido una guía y un invaluable apoyo, realmente atesoró tu amistad.

Sergio sin duda me has ensañado mucho, pero no sólo eso siempre has sido una persona alegre y fraternal con tus amigos, la verdad has dado cátedra de cómo salir delante de situaciones difíciles (sonriendo). Eres un gran científico y admiró las enseñanzas que nos has dado.

Guillermo has sido un gran amigo, siempre has sido un tipazo, veras que el futuro será de lo mejor. Muchas gracias por tu apoyo y amistad.

Al Dr. Luis Alberto Peralta y Rogelio Cervantes por ser amigos y una guía en mis primeros pasos.

A todos los recalcitrantes por su compañerismo, apoyo y camaradería: Marcela, Luci, Rosa, Estefanía, Joaquín, Mayra, Karina, Martín y Jesús.

A los “segovias” por ser buenos compañeros y los momentos de risas: Mario, Gus, Iris, Fernando, Claudia, Dago y Vanesa.

AGRADECIMIENTOS ACÁDEMICOS.

A los miembros del jurado, por un extenuante proceso de revisión, que mejoró enormemente la calidad de este documento de Tesis. Muchas gracias.

Al Dr. Rafael Vazquez Duhalt por aceptarme en su laboratorio, por su energía positiva y ganas. Le agradezco mucho la oportunidad.

Al Dr. Ulises Cano por tus asesorías, guía, tiempo y claro cuando las cosas no salían, por el apoyo y el café.

A la Biol. Rosa Román Miranda por su valiosa asistencia técnica en el laboratorio, su apoyo y consejo.

A la Dra. Lucia Perezgasga Ciscomani por su asesoría técnica y asistencia en múltiples temas durante mi formación como Maestro en Ciencias.

A la Unidad de Docencia del Instituto de Biotecnología de la UNAM, por las incontables veces que me ayudaron con trámites y otros, su trabajo facilita enormemente el proceso de titulación de todos los alumnos del Instituto, en mi humilde opinión la mejor Unidad de Docencia de la UNAM.

A toda la gente del Instituto de Investigaciones Eléctricas por su ayuda en el tema de celdas, por su compañerismo y camaradería: Jorge, Roberto, Félix, Manuel, Adán, Ulises, Lorena y Tatiana.

A la Dra. Marcela Ayala que siempre me has incentivado a ser cauto con los resultados y poner CONTROLES. Por tus enseñanzas, apoyo y paciencia. GRACIAS.

Al Dr. Roberto Flores por apoyarme en incontables ocasiones durante mi trabajo en el IEE.

Al Dr. Lorenzo Segovia por su hospitalidad, al aceptarme en su nuevo laboratorio, por sus comentarios formativos y charlas sobre diversos temas. Gracias!!

Al Dr. Sergio Águila por tu apoyo en todas las instancias de la generación de este documento, por tus ideas, pero por la enorme aportación que hiciste al sugerir la 4-azidoanilina como ligando de la AOx.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.	2
2.1 PRINCIPIOS BÁSICOS DE ELECTROQUÍMICA.	2
2.1.1 PROCESOS FARADÁICOS Y NO-FARADÁICOS.	2
2.1.2 EL ELECTRODO DE REFERENCIA.	3
2.2 CELDAS DE COMBUSTIBLE.	5
2.3 CELDAS DE COMBUSTIBLE ENZIMÁTICA (CCE).	6
2.4 LA TRANSFERENCIA DE ELECTRONES EN ELECTRODOS CON ENZIMAS COMO CATALIZADORES.	7
2.4.1 RECONSTITUCIÓN DE ENZIMAS EN ELECTRODOS.	8
2.4.2 POLÍMEROS IÓNICOS Y POLÍMEROS REDOX.	10
2.4.3 LA ORIENTACIÓN POR LIGANDO Y EL ELECTRODO DE LACASA.	10
2.4.4 EL USO DE NANOTUBOS DE CARBONO PARA LOGRAR EL CONTACTO DIRECTO DE LAS ENZIMAS.	12
2.5 CELDAS DE COMBUSTIBLE ENZIMÁTICAS DE ETANOL.	12
2.6 TÉCNICAS Y EQUIPO ELECTROQUÍMICO PARA EVALUAR ELECTRODOS Y CELDAS ENZIMÁTICAS.	16
2.6.1 VOLTAMETRÍA CÍCLICA Y SU APLICACIÓN EN PROTEÍNAS.	16
2.6.2 CRONOAMPEROMETRÍAS Y ESTABILIDAD OPERACIONAL.	18
2.6.3 CURVAS POLARIMÉTRICAS.	19
2.7 ALCOHOL OXIDASA (AOx).	20
2.7.1 LA NATURALEZA OCTAMÉRICA DE LA ENZIMA AOx Y SU PAPEL EN LAS LEVADURAS.	20
2.7.2 CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS Y ESTRUCTURALES DE LA AOx.	22
2.7.3 EL MECANISMO DE REACCIÓN DE LA AOx EN COMPARACIÓN CON OTRAS OXIDASAS DE LA FAMILIA GLUCOSA-METANOL-COLINA OXIDASAS (GMC).	25
2.8 ESTUDIOS ELECTROQUÍMICOS EN EL FAD Y EN LAS OXIDASAS DE LA FAMILIA DE LAS GMC.	25
2.9 ESTUDIOS ELECTROQUÍMICOS EN LA AOx.	27
3. JUSTIFICACIÓN.....	31
4. HIPÓTESIS.	32
5. OBJETIVO GENERAL.....	32
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	32
7. MATERIALES Y MÉTODOS.	33

7.1 REACTIVOS.	33
7.2 EQUIPOS.	33
7.3 ENSAYOS BIOQUÍMICOS.....	35
7.4 ESTRATEGIAS PARA INMOVILIZACIÓN ORIENTADA.....	36
7.4.1 ORIENTACIÓN DE AO _x POR RECONSTITUCIÓN.....	36
7.4.1.2 PRODUCCIÓN DE APO-AO _x UTILIZANDO β-MERCAPTOETANOL..	38
7.4.1.3 PRODUCCIÓN DE APO-AO _x A pH ÁCIDO.....	39
7.4.2 ORIENTACIÓN DE AO _x POR AFINIDAD.	39
7.4.2.1 PROCEDIMIENTO DE INMOVILIZACIÓN DE LA AO _x CON 4- AZIDOANILINA DE FORMA COVALENTE.	40
7.4.2.2 PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO EMPLEANDO NANOTUBOS DE CARBÓN MULTICAPA (MWCNT) Y ADSORCIÓN DIRECTA.	42
7.4.3 INMOVILIZACIÓN DE LACASA SOBRE GRAFITO.....	44
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	45
8.1 DESFLAVINIZACIÓN DE AO _x CON β-MERCAPTOETANOL Y RECONSTITUCIÓN DE APO-AO _x CON FAD.	45
8.2 RESULTADOS DE DESFLAVINIZACIÓN/RECONSTITUCIÓN CON ENSAYO A pH ÁCIDO.....	48
8.3 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LOS MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE APO-AO _x Y DE LOS ENSAYOS DE RECONSTITUCIÓN.	51
8.4 ESTUDIO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA AO _x Y LA MOLÉCULA DE 4-AZIDOANILINA.	53
8.5 CARACTERIZACIÓN DE 4-AZIDOANILINA POR VOLTAETRÍA CICLÍCA.	56
8.6 EVALUACIÓN DEL CONTATO ELÉCTRICO ENTRE LA AO _x Y ELECTRODO CON 4-AZIDOANILINA POR MEDIO DE VOLTAMETRÍA CÍCLICA.	57
8.7 TRANSFERENCIA DIRECTA DE LA AO _x AL ELECTRODO CON NANOTUBOS MODIFICADOS CON 4-AZIDOANILINA.....	60
8.8 CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE ALCOHOLES DE CADENA CORTA CON ELECTRODO DE AO _x -4AZIDOANILINA.	67
8.9 CELDA AO _x VS. PLATINO.	69
8.10 CELDA AO _x VS. LACASA.	73
9. CONCLUSIONES.....	77
10. PERSPECTIVAS.....	78
11. REFERENCIAS.	79
ÍNDICE DE FIGURAS.	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Doble capa eléctrica del modelo de Helmholtz.	3
Figura 2. Electrodo de referencia de calomel.	4
Figura 3. Celda de combustible y celda de combustible enzimática.	6
Figura 4. Estrategias para establecer contacto eléctrico entre las enzimas y los electrodos.	8
Figura 5. Ánodo de GOx orientada en una Nano-Partícula de Oro.....	9
Figura 6. Electrodo de lacasa inmovilizada de forma orientada y de forma aleatoria.	11
Figura 7. Ánodo de Alcohol Deshidrogenasa inmovilizada en Nafión.	13
Figura 8. Ánodo de Alcohol Deshidrogenasa inmovilizada en Polietilenimina.	14
Figura 9. Sistema de tres electrodos para estudios electroquímicos.	17
Figura 10. Voltagrama de un proceso óxido-reducción.	18
Figura 11. Comportamiento real de una celda de combustible microbiana (línea sólida), Efecto simulado con aumento de resistencia interna en una celda de combustible microbiana (línea punteada).	20
Figura 12. Posible ruta de oligomerización de AOx en levaduras.	21
Figura 13. Espectro de la AOx de <i>P. pastoris</i>	23
Figura 14. Modelo de la AOx obtenido por I-Tasser.	24
Figura 15. Estados redox del FAD y sus estados de Ionización dependientes del pKa.	27
Figura 16. Voltimetría AOx en nanotubos-Nf-Oro.	29
Figura 17. Voltimetría AOx-Nanotubos, Voltagramas.	30
Figura 18. Esquema detallado de la celda de combustible enzimática AOx vs. Pt.....	34
Figura 19. Procedimiento para la fabricación de una celda de combustible enzimática, utilizando un ánodo diseñado por reconstitución.....	37
Figura 20. Apo-AOx producida con urea y KBr	38
Figura 21. Ensayo de desflavinización reconstitución AOx con β mercaptoetanol.	39
Figura 22. Molécula de 4-Azidoanilina	40
Figura 23. AOx inmovilizada por medio de orientación con 4-Azidoanilina.	41
Figura 24. AOx Inmovilizada con Nafión Y MWCNT.....	43
Figura 25. AOx Inmovilizada con Nafión.....	43
Figura 26. AOx Inmovilizada con Nafión Y MWCNT derivatizados con 4-Azidoanilina....	44
Figura 27. Ensayo de desnaturalización con β -Mercaptoetanol.....	46
Figura 28. Diálisis después del ensayo con β -Mercaptoetanol y reconstitución con 10 veces más FAD.....	47
Figura 29. Ensayo con estabilizantes después de usar β -Mercaptoetanol para reconstitución.....	48
Figura 30. Ensayo de reconstitución con tratamiento en pH ácido.....	49
Figura 31. Dicroísmo circular AOx en pH 7.5 y pH 1.7 en 30% glicerol.....	50
Figura 32. Modelo de monómero de AOx con FAD	50
Figura 33.1 y 33.2 (A) Espectros de absorción de AOx con distintas concentraciones de 4- Azidoanilina y (B) Curva de ajuste tipo Michaelis.	55
Figura 34. Voltametrías cíclicas con 4-Azidoanilina.	56
Figura 35. Gráfico de la voltimetría de un electrodo de Aox+4-Azidoanilina.	58
Figura 36. Gráfico de las voltametrías realizadas en el electrodo de AOx+4-Azidoanilina con concentraciones crecientes de metanol.	59
Figura 37. Voltametrías cíclicas de las distintas variantes de electrodos.....	61
Figura 38. Voltametrías de AOx-MWCT-Nf con distinta concentraciones.....	62
Figura 39. Voltametrías cíclicas de la ANA-MWCNT-Nf con distintas concentraciones de metanol.....	63
Figura 40. Voltametrías cíclicas de la AOx-ANA-MWCNT-Nf con distintas concentraciones de metanol.....	65
Figura 41. Curvas de saturación de los tres tipos de electrodos..	66

Figura 42. Ajuste de la respuesta de AOx-ANA-MWCNT-Nf con distinta concentraciones de etanol.	68
Figura 43 Ajuste de la respuesta de AOx-ANA-MWCNT-Nf con distinta concentraciones de metanol.	69
Figura 44. (1) Curvas de polarización a 10 mVs^{-1} , (2) Curvas de potencia calculadas a partir de las curvas de polarización.	72
Figura 45. Celda AOx-ANA-MWCNT-Nf vs. Lacasa, la línea punteada es metanol como sustrato y la línea sólida es etanol.	74
Figura 46. Celda AOx-ANA-MWCNT-Nf vs. Lacasa.	75

ABREVIATURAS.

ADH	Alcohol deshidrogenasa
AEBA	Ácido aminoetil benzoico
AOx	Alcohol oxidasa
Apo-AOx	Apoenzima de Alcohol oxidasa
C	Coulomb
C_i	Concentración especie oxidada
C_o	Concentración especie reducida
CCE	Celda de combustible enzimática
F	Constante de Faraday
FAD	Flavín Adenín Dinucleótido
GDH	Glucosa deshidrogenasa
GOx	Glucosa oxidasa
M	Concentración molar (moles/Litro)
μA	micro ampers
μM	micro molar
μL	micro litro
μW	micro Watt
NAD	Nicotín Adenosín Dinucleótido
pH	Potencial de hidrógeno
PQQ	Pirroloquinolina Quinona
Pyc1p	Piruvato carboxilasa citósolica
Q	Carga en Coulombs
R	Constante universal de los gases
T	Temperatura
TDE	Transferencia directa de electrones
THF	Tetrahidrofurano

RESUMEN

El desarrollo de nuevas formas para generar energía basadas en recursos renovables y con una filosofía amigable con el ambiente, han motivado la investigación en tecnologías alternativas y novedosas (Chum *et al.*, 2011), como las celdas de combustible enzimáticas.

Las celdas de combustible enzimáticas pueden incursionar en diversas áreas, como los dispositivos remotos y sensores *in situ* (Katz, *et al.*, 2001). La idea de usar enzimas como catalizadores en los electrodos de las celdas, resulta atractiva ya que estas son renovables y pueden producirse en grandes cantidades.

En el presente trabajo se diseñó y se construyó una celda de combustible enzimática alcohol oxidasa/lacasa. El diseño consistió en dos electrodos enzimáticos orientados, el ánodo de grafito con la enzima alcohol oxidasa inmovilizada orientada por medio de la molécula de 4-azidoanilina y en el cátodo de grafito se inmovilizó la enzima lacasa por medio del ligando AEBA (Ácido aminoetil benzoico). La celda enzimática generó una potencia máxima de $60 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ y una corriente máxima de $500/\mu\text{A cm}^2$. El ánodo de AOx presenta picos de oxidación para el metanol -63 mV vs. SCE y -73 mV vs. SCE para el etanol. De forma adicional esto permite cuantificar las concentraciones de alcoholes de cadena corta como metanol y etanol.

ABSTRACT.

The development of new ways for energy generation based on an environmental friendly philosophy with the renewable resources is the central motivation for the research on alternative technologies (Chum *et al.*, 2011), like enzyme fuel cells.

The enzyme fuel cells have a potential grow capacity on different areas, like portable devices and *in situ* sensors (Katz, *et al.*,2001). The idea of using enzymes on the electrodes as catalysts is attractive because enzymes are renewable and can be produced on large amounts.

On the present work an enzyme fuel cell of alcohol oxidase/ lacasse was designed and constructed. The design consisted on two orientated enzymatic electrodes, a graphite anode of alcohol oxidase immobilized on an orientated manner and on the graphite cathode the enzyme lacasse was immobilized using the molecule AEBA as a ligand. The enzymatic fuel cell generated a maximum power density of $60 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ and maximum current density of $500/\mu\text{A cm}^2$. The AOx anode presents oxidation peaks at -63 mV vs. SCE for methanol and for the ethanol at -73 mV vs. SCE. Additionally these allow the quantification of low chain alcohols as methanol and ethanol.

1. INTRODUCCIÓN.

La obtención de energía eléctrica de forma renovable y amigable con el ambiente, así como el desarrollo de dispositivos capaces de satisfacer las necesidades de sensores inalámbricos y de monitoreo remoto, han motivado el desarrollo de distintas tecnologías capaces de aprovechar la energía almacenada en compuestos orgánicos como: glucosa, fructosa, etanol, metanol y glicerol, entre otros (Ramanavicius y Ramanaviciene, 2009).

De acuerdo con el IPCC (*International Panel for Climate Change*), el costo de la producción de biomasa puede ser combinado con tecnologías de conversión que deriven en mercados potenciales al nivel de segundos transportadores de energía, por ejemplo: bioelectricidad y biocombustibles para el transporte (Chum *et al.*, 2011). Lo cual sugiere que los dispositivos capaces de convertir la energía contenida en la biomasa de forma eficiente tienen un gran futuro, más aún si estos sistemas son amigables con el ambiente.

En décadas recientes, las celdas de combustible enzimáticas (CCE) han generado un interés creciente ya que son dispositivos que tienen un mercado potencial en aplicaciones relacionadas con las comunicaciones, la bioelectrónica y la medicina, entre otros (Osman *et al.*, 2011).

Por otro lado, en el 2007 la Compañía SONY patentó una CCE capaz de oxidar la glucosa y proveer de energía eléctrica a un reproductor de música, utilizando el diseño de Sakai (Sakai *et al.*, 2009). En los Estados Unidos la empresa Akermin (Gellett *et al.*, 2010) es pionera en realizar investigaciones orientadas en promover la introducción de estas tecnologías en aplicaciones remotas, para los sectores de comunicaciones y de defensa.

Una ventaja más de las CCE es que se pueden autoalimentar sensores con los sustratos que se encuentran en el medio de medición. Un ejemplo es en los fermentadores de etanol, en donde se puede determinar la concentración de etanol del fermentador usando una CCE que no requeriría energía extra para funcionar, ya que obtendría electricidad del analito (etanol en este caso), pudiendo determinar al mismo tiempo la concentración del etanol en el medio de fermentación (Katz *et al.*, 2001).

El diseño de las CCE involucra la investigación en varios campos de conocimiento, los cuales deben integrarse y evaluarse con rigor científico, ya que de esa forma se podrá vislumbrar su desarrollo y sus potenciales aplicaciones. Lo que indica que las CCEs aún son un concepto en prueba pero tienen un gran potencial y variedad de aplicaciones en un futuro.

2. ANTECEDENTES.

2.1 PRINCIPIOS BÁSICOS DE ELECTROQUÍMICA.

Las bases teóricas para entender los procesos en los electrodos se desarrollaron a partir del estudio de celdas electroquímicas, las cuales producen una corriente eléctrica debido a reacciones químicas en dos electrodos (típicamente metales) separados por un electrolito. A la corriente eléctrica producida de esta manera se le conoce como corriente galvánica, donde el número de electrones producidos se expresa en términos de la carga total Q , la cual se conduce a través de un circuito externo. La unidad de medida para Q son los Coulombs (C), de manera tal que 1 C equivale a 6.24×10^{18} electrones. La relación entre la carga y la cantidad del producto formado esta dado por la ley de Faraday, la cual define que el paso de 96,584.4 C (constante de Faraday) genera un equivalente de reacción. Entiéndase por equivalente de reacción al consumo de un mol de reactante o la producción de un mol de producto en una reacción de un mol de electrones (Bard, 1976).

2.1.1 PROCESOS FARADÁICOS Y NO-FARADÁICOS.

En los electrodos se producen dos tipos de procesos, unos llamados procesos Faradáticos; los cuales son el producto de una reacción química (o bioquímica en el caso de sistemas biológicos) y los procesos no-Faradáticos; los cuales se presentan por alteraciones de carga en lo que se define como la doble capa del electrodo (fig. 1). De esta manera los cambios en el potencial del electrodo, el electrolito y el tamaño del electrodo se pueden presentar como procesos de transferencia de carga que no están relacionados con ninguna reacción. A este efecto de carga se le suele asociar como un efecto de capacitancia (analogía con los capacitores eléctricos, los cuales pueden almacenar carga por medio de aislantes). La capacitancia de la doble capa puede ser de 10-30 μF (Sawyer, 1995).

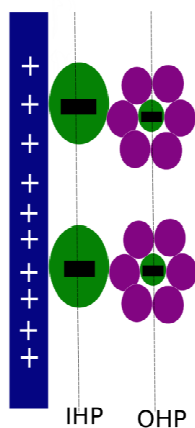


Figura 1. Doble capa eléctrica del modelo de Helmholtz. IHP conocida como capa interna de Helmholtz, OHP capa externa de Helmholtz solvatada por iones.

Por otro lado, los procesos Faradáticos pueden ser representados por la ecuación de Nernst la cual se basa en el equilibrio químico entre reactivos y productos de una reacción química. Si el proceso sigue la ecuación de Nernst, se dice que es reversible o Nernstiano. Sin embargo, existen reacciones electroquímicas con carácter irreversible que serán procesos Faradáticos y podrán ser modelados por la ecuación de Nernst, al menos parcialmente (Wang, 2006).

$$E = E^{\circ} + 2.3 \frac{RT}{nF} \log \frac{C_i}{C_o}$$

Donde E° es el potencial estándar del electrodo (esto es a una concentración de 1 M y presión atmosférica), R es la constante universal de los gases, F es la constante de Faraday, T la temperatura, n número estequiométrico de electrones en la reacción, C_i la concentración de la especie oxidada, C_o la concentración de la especie reducida. Esta ecuación permite seguir en la superficie del electrodo ya sea la aparición de un producto o la desaparición de sustrato, o si se tiene especies redox inmovilizadas en el electrodo estas podrán ser cuantificadas por la ecuación de Nernst (Bard, 1976).

2.1.2 EL ELECTRODO DE REFERENCIA.

En electroquímica, se suele referir al potencial estándar con referencia al potencial del hidrógeno con un alambre de platino. Debido a que el par de H_2 con el platino es muy estable en medio ácido, se le asigna por convención el potencial 0, de manera que se le denomina: electrodo estándar de hidrógeno (SHE, *Standar Hydrogen Electrode*). Por motivos prácticos los electrodos estándares de hidrógeno no son utilizados

(aunque hay aplicaciones en las que si se usan) y en vez de ellos se utilizan electrodos de referencia que se ajustan con este electrodo, estos son: electrodo de calomel $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ saturado con KCl 240 mV vs. SHE, y el electrodo de Ag/AgCl de 220 mV vs. SHE. Sin embargo existen otros electrodos estables, tales como: electrodo de Cu/CuSO_4 , Hg/HgO , $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{SO}_4$ (Bard , 1976). De aquí en adelante se referirán a todos los potenciales contra el electrodo de calomel (SCE, *Standart Calomel Electrode*) debido a que todas las mediciones en el presente trabajo fueron realizadas con este electrodo (fig. 2).

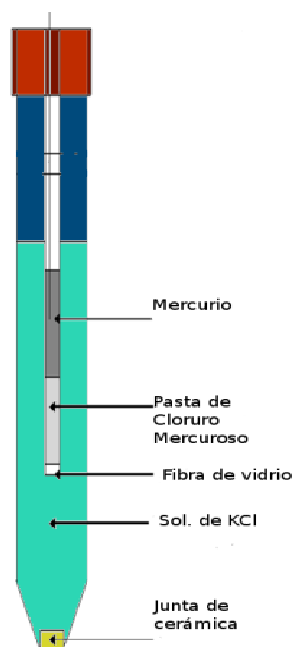


Figura 2. Electrodo de referencia de calomel.

Algunas reglas generales que se deben cumplir para la elección de un electrodo de referencia, son las siguientes: (1) se debe elegir un electrodo de referencia que sea reversible y obedezca la ecuación de Nernst, (2) su potencial debe mantenerse constante con el tiempo, (3) debe regresar a su valor inicial aún cuando pasen pequeñas corrientes a través de él y (4) la transferencia de sales propias del electrodo al sistema de estudio es inevitable por lo que debe de haber compatibilidad entre el electrodo de referencia y el sistema de estudio, de manera que no se presenten reacciones químicas entre estos (Sawyer, 1995).

2.2 CELDAS DE COMBUSTIBLE.

En el siglo XIX, las investigaciones de Alessandro Volta lo llevaron al descubrimiento de la batería en 1799. Para el año de 1832 Michael Faraday formuló las ahora conocidas como Leyes de Faraday para que posteriormente William Robert Grove diseñara la primera celda de combustible, la cual realizaba la conversión de hidrógeno y oxígeno en dos electrodos en corriente eléctrica. Sus palabras fueron: “Cada acción de síntesis química puede, por una disposición adecuada, producir una corriente Voltaica” (Sundmacher, 2010).

Desde 1960 hasta ahora, el ejemplo que ha alentado a la investigación en esta área de celdas fue la utilización de una celda alcalina que abastecía de energía eléctrica al programa espacial Apolo en 1960 (Lockney, 2011). A partir de esto, son muchos los diseños y propuestas que se han desarrollado por una creciente comunidad científica, cada vez más involucrada en el tema. Las distintas líneas derivadas del estudio de celdas de combustible se enfocan en los siguientes temas:

1. El material de los electrodos (ánodos y cátodos) es un punto de mejora continua, los electrodos usan catalizadores diversos por lo que en este rubro hay mucha investigación, debido a la variedad de elementos catalíticos que se pueden utilizar en su fabricación. A continuación, se enlistan algunas de las variantes que se pueden emplear para obtener distintos ánodos o cátodos: metales preciosos (Pt, Ru y Pd) (Choi, *et al.*, 2011), utilizados como ánodos para oxidar alcoholes; aleaciones con elementos de transición (Co, Ni, Fe) (Nakamura, *et al.*, 2011), los cuales han sido empleados como cátodos, enzimas (proteínas con actividades catalíticas), que se pueden usar indistintamente como ánodos o cátodos, microorganismos (propriadamente estos son bioconvertidores y no catalizadores), mayormente utilizados como ánodos capaces de convertir material orgánico diverso en electricidad (Osman, *et al.*, 2010).

2. El tipo de sustrato a oxidar; inicialmente se pensaba en hidrógeno (Balta-Ozkan y Baldwin, 2013) con el inconveniente de la producción de este combustible, el cual por si solo es un tema de investigación. Debido a lo anterior se consideran otros combustibles como: el etanol, azúcares (glucosa y sacarosa), ácidos orgánicos o biomasa (celulosa y hemicelulosa).

3. El modo de operación: temperaturas altas o bajas, sistema por lotes o continuo, pH neutro o extremo.

4. El escalamiento de los sistemas ya existentes; principalmente celdas de combustible convencionales con Pt en soporte de grafito, separadas por una membrana de intercambio de protones. Estos sistemas escalados son conocidos como *Stacks*, que son un conjunto de celdas compactadas para generar energía eléctrica en la mayor cantidad posible (Logan, *et al.*, 2006).

2.3 CELDAS DE COMBUSTIBLE ENZIMÁTICA (CCE).

Una celda de combustible enzimática se ejemplifica en la fig. 3 y se define como: “Una celda que utiliza enzimas como biocatalizador para llevar a cabo la oxidación de los sustratos (glucosa, etanol, lactosa etc.) en el ánodo, lo que libera electrones que se transportan por un circuito eléctrico hasta llegar al cátodo, donde los protones producidos por la oxidación de los sustratos se combinan con un oxidante (el más utilizado es el oxígeno) para dar lugar a un producto (comúnmente agua)” (Meredith y Minteer, 2012).

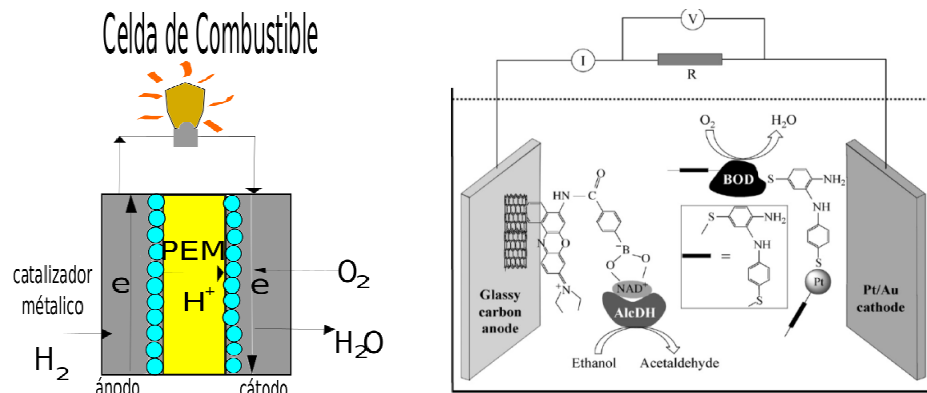


Figura 3. Celda de combustible y celda de combustible enzimática.
Modificado de Ivanov *et al.* 2010)

La primera celda de combustible enzimática fue reportada por Yahiro, *et al.*,(1964) con Glucosa oxidasa (GOx) y D-Amino oxidasa las cuales alcanzaban una ΔV entre 175 a 350 mV utilizando cátodos de platino, alcanzando densidades de corriente de $0.18 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ en cortocircuito.

2.4 LA TRANSFERENCIA DE ELECTRONES EN ELECTRODOS CON ENZIMAS COMO CATALIZADORES.

Hasta el momento, se conocen al menos 1000 enzimas oxidorreductasas y potencialmente todas se podrían usar para diseñar CCE. Sin embargo, sólo se conocen menos de 100 enzimas que son capaces de realizar una transferencia directa de electrones (hemoproteínas, oxidasas y enzimas con centros metálicos expuestos) (Ramanavicius y Ramanaviciene, 2009). Debido a que no todas las enzimas pueden realizar una transferencia directa de electrones hacia los electrodos (este es el caso de los ánodos) o de los electrodos a un agente oxidante (O_2 y H_2O_2 , para el caso de los cátodos), se han propuesto diferentes estrategias para lograr dicho objetivo.

Algunas de estas estrategias proponen la orientación molecular adecuada de la proteína sobre la superficie del electrodo (Vazquez-Duhalt, *et al.*, 2013). Las estrategias más usadas se describen a continuación: (1) la reconstitución de las apo-enzimas con sus respectivos cofactores los cuales se encuentran inmovilizados en monocapas sobre los electrodos (Willner, *et al.*, 1998), (2) la inmovilización de las enzimas en geles con actividad redox que se asocien con los electrodos (Addo, *et al.*, 2010), (3) la utilización de nano-elementos que permitan el contacto eléctrico con los centros redox de las enzimas (nano-tubos de carbono en la mayoría de los casos) (Willner, *et al.*, 2009), aunque estos nano-elementos han sido usados ampliamente no queda claro si hay sinergias con las enzimas una vez que se genera corriente o si sólo asisten a la orientación de las enzimas y la recolección de corriente.

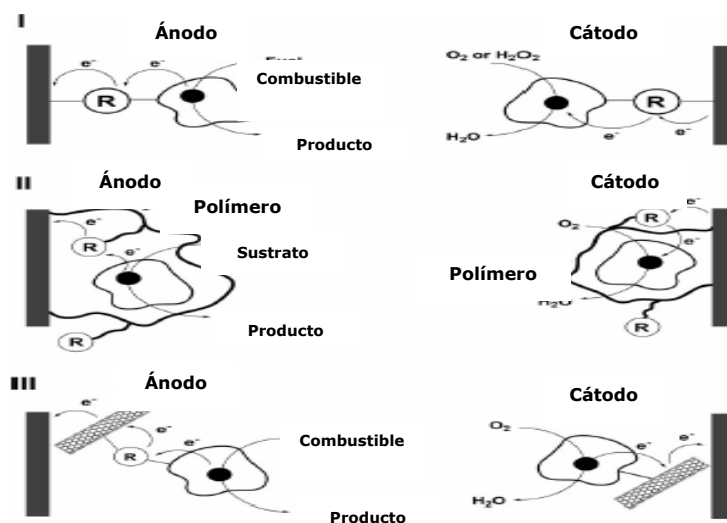


Figura 4. Estrategias para establecer contacto eléctrico entre las enzimas y los electrodos, (donde R, representa una molécula redox capaz de mediar la transferencia de electrones). Tomado y modificado de Willner, *et al.*, 2009.

2.4.1 RECONSTITUCIÓN DE ENZIMAS EN ELECTRODOS.

Para alcanzar el contacto directo de las enzimas en los electrodos existen diversas técnicas de inmovilización, una de las técnicas más elaboradas y eficientes es la inmovilización del cofactor sobre la superficie del electrodo y la reconstitución de la apo-enzima sobre su cofactor. Itamar Willner en el año de 1998 propuso la reconstitución de las apo-enzima de Glucosa (GOx) en FAD (Flavín Adenín Dinucleótido) inmovilizado por medio de un espaciador que lo une al electrodo. En la fig. 5 se detalla la composición de un electrodo de GOx construido por reconstitución. Este enfoque ha sido ampliamente usado en la fabricación de electrodos orientados (Blonder, *et al.*, 1998).

La obtención de la apo-GOx es por medio de un tratamiento ácido para su posterior reconstitución a pH fisiológico. Curiosamente hasta no hace mucho se elucidó que la GOx puede mantener su estructura secundaria a pH ácido, en un estado conformacional llamado estado "A", el cual fue descubierto por estudios de dicroísmo circular. El estado "A" es la causa que permite la reconstitución de la GOx (Khatun Haq *et al.*, 2003) y todas las aplicaciones biotecnológicas que derivan

de ella. Durante el estado “A” la enzima permanece en su forma dimérica.

Aunque resulta en una buena estabilidad cuando se atrapan oxidoreductasas en polímeros conductores, la orientación de las apoenzimas por medio de cofactores inmovilizados promueve una transferencia directa de electrones, lo cual es más prometedor para la producción de corriente y la generación de potencia.

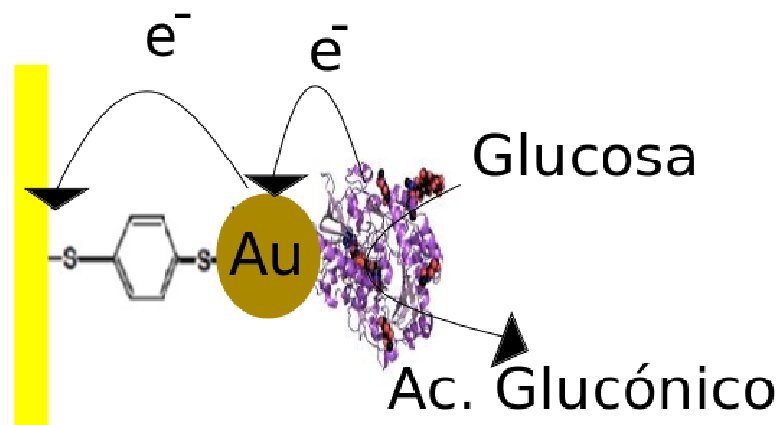


Figura 5. Ánodo de GOx orientada en una nano-partícula de oro.
Tomado y modificado de Willner *et al*, 2007.

Otras flavoenzimas que han podido ser orientadas e inmovilizadas por medio de esta estrategia son la colesterol oxidasa (CHO) (Vidal *et al.*, 2004) y la glucosa deshidrogenasa (GDH) (Zayats *et al.*, 2005). Técnicamente, si se conoce un ensayo de reconstitución para la enzima que se desea orientar en un electrodo, esta puede ser inmovilizada.

La inmovilización por el método de reconstitución suele realizarse en superficies no porosas como el oro, que permitan controlar la cantidad de cofactor unido covalentemente, así como evitar adsorción de enzima que no se reconstituye, ya que esto puede afectar enormemente la reproducibilidad de los experimentos (Miyawaki y Wingard, 1984).

Idealmente se considera la estrategia de reconstitución como la mejor forma para orientar las apo-enzimas, tomando en cuenta que en muchos casos los sitios activos poseen un grupo prostéticos de manera que no sólo las enzimas oxidasas con FAD pueden ser orientadas, sino también enzimas con cofactor PQQ y grupo hemo (Fruk *et al.*, 2009).

2.4.2 POLÍMEROS IÓNICOS Y POLÍMEROS REDOX.

La utilización de polímeros que permiten la transferencia de electrones de la proteína hacia el electrodo ha tenido un auge en distintos grupos. Muchos de estos polímeros derivan de colorantes como: Azul de Mendola, Rojo Nilo, Rojo Neutral, Azul de Metileno, entre otros (Ivanov *et al.*, 2010) (ver Tabla 1).

El Nafión es un fluoropolímero descubierto en 1960 por Walther Grot para la empresa Dupont. Este polímero posee propiedades iónicas por lo que es llamado ionómero y ha sido fundamental para la fabricación de la membrana de transporte de protones (PEM por sus siglas en inglés) utilizadas en las celdas de combustible. En su forma líquida se usa para permitir la formación de canales iónicos que permitan el paso de protones y como pegamento en la inmovilización de catalizadores en soporte de carbono (Mauritz y Moore, 2004), tales como Pt y Ru o enzimas oxidorreductasas.

Las propiedades de los polímeros redox, les permiten funcionar como indicadores de cambios de pH y sus potenciales de óxido-reducción facilitan la transferencia de electrones.

Tabla 1. Polímeros mediadores para inmovilización.
Modificado de Ivanov *et al.*, 2010.

Mediador	Potencial Redox vs. SCE (Volts)
Poli (metileno azul)	- 0.180
Poli (azul cresil brillante)	- 0.090
Verde metileno*	- 0.18/- 0.03
Azul Nilo	- 0.33

*(El verde de metileno posee dos potenciales redox detectados por voltametría)

2.4.3 LA ORIENTACIÓN POR LIGANDO Y EL ELECTRODO DE LACASA.

La inmovilización de enzimas de forma orientada utilizando algún ligando, que permita una transferencia directa de electrones, es una estrategia desarrollada por Blanford, quien usó grafito derivatizado con antraceno para construir un bio-cátodo con la enzima lacasa, la cual fue inmovilizada sobre las moléculas de antraceno, lo que le permitió generar $650 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Blanford *et al.*, 2007). Esta estrategia demostró ser muy efectiva y es diferente a las estrategias que descritas por Willner, *et al.*, 1999 (fig. 4).

En un trabajo previo al presente, nuestro grupo inmovilizó a la enzima lacasa de forma orientada para ser usada como catalizador en el cátodo. La estrategia de inmovilización consistió en usar un ligando, en este caso el ácido 4-aminoetil benzoico (AEBA). El ligando provoca que la enzima se oriente por el cobre T1, posteriormente la enzima es unida de los grupos amino de las lisinas o argininas a los grupos carboxilos del electrodo, por medio de una reacción química facilitada por el activador carbodiimida. De esta manera, los enlaces amida mantienen a la enzima unida covalentemente al soporte a través del ácido aminoetilbenzoico (AEBA) de cara al electrodo (Martinez-Ortiz, *et al.*, 2011). A los electrodos que se fabricaron con esta técnica se les llamó electrodos de lacasa orientados y unidos covalentemente, de manera que, la corriente generada fue de aproximadamente dos veces más que en el caso de la enzima inmovilizada de forma aleatoria sobre la superficie del electrodo (fig. 6).

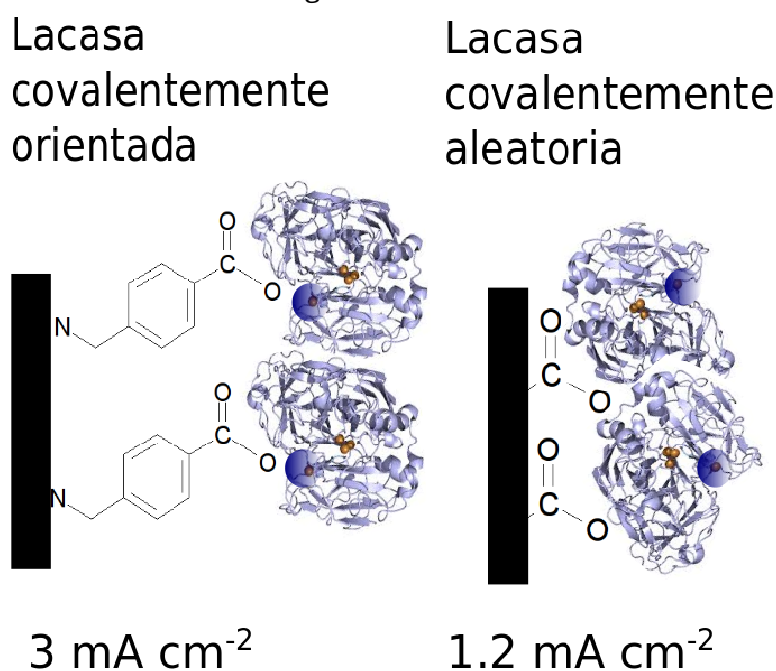


Figura 6. Electrodos de lacasa inmovilizada de forma orientada y aleatoria, en ambos casos la enzima se unió al electrodo de forma covalente, el cobre T1 de la lacasa se encuentra dentro de una esfera (morada), en el diseño orientado el cobre T1 se encuentra de cara al electrodo (Martinez-Ortiz *et al.*, 2011).

2.4.4 EL USO DE NANOTUBOS DE CARBONO PARA LOGRAR EL CONTACTO DIRECTO DE LAS ENZIMAS.

Los nanotubos de carbono son láminas de grafeno dobladas que poseen características de conductividad superiores a otros materiales, estos pueden ser de una pared (*single wall carbon nanotubes*, SWCNT) o de pared múltiple (*multi walled carbon nanotubes*, MWCNT). Los nanotubos pueden funcionalizarse con compuestos que faciliten la transferencia de electrones (Willner *et al.*, 2007). Por ejemplo (Kowalewska y Kulesza, 2012), utilizan Poli(cloruro dialildimetilamonio) adsorbido en MWCNT que les permite un mejor contacto con la enzima Alcohol deshidrogenasa (ADH), de forma que puede generar un contacto directo con la enzima y su cofactor NADH. Una variante del método ha sido emplear nanotubos modificados con antracenos, permitiendo un buen contacto con el sitio T₁ de la lacasa. Este enfoque sigue obedeciendo la inmovilización por ligando. Los resultados de estabilidad no fueron óptimos, ya que sólo se generó el 2% de la corriente teórica fue generada con esta inmovilización, de manera que hubo una menor transferencia que lo esperado en una simple adsorción (Meredith *et al.*, 2011).

2.5 CELDAS DE COMBUSTIBLE ENZIMÁTICAS DE ETANOL.

Las CCEs que permiten oxidar alcoholes de cadena corta como el etanol, han recibido especial atención a partir de la inmovilización covalente de la enzima málica por medio de un espaciador de pirroloquinolina quinona (PQQ) a un laminilla de oro. Esta enzima es dependiente del cofactor nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) (Willner y Riklin 1994), lo que abrió la puerta a la inmovilización de otras enzimas dependientes del NAD⁺ como la ADH y que comúnmente es un dímero con átomos de Zn (Leskovac *et al.*, 2002). La desventaja de estas celdas es que el cofactor debe ser reciclado constantemente o realimentado, para que la enzima continúe con su actividad catalítica y pueda transferir los electrones al ánodo.

El grupo de Minter ha diseñado un sistema que utiliza ADH. Sin embargo, para lograr que estos dispositivos puedan trabajar de forma constante es necesario que el NAD⁺ sea inmovilizado en un polímero como verde de metileno. En la fig. 7 se representa el electrodo de ADH que utiliza NAD⁺ para que este libere los electrones al ánodo y se regenere para volver a recibir los electrones de la enzima ADH,

producto de la oxidación de etanol. La enzima está inmovilizada en Nafión (Akers *et al.*, 2005).

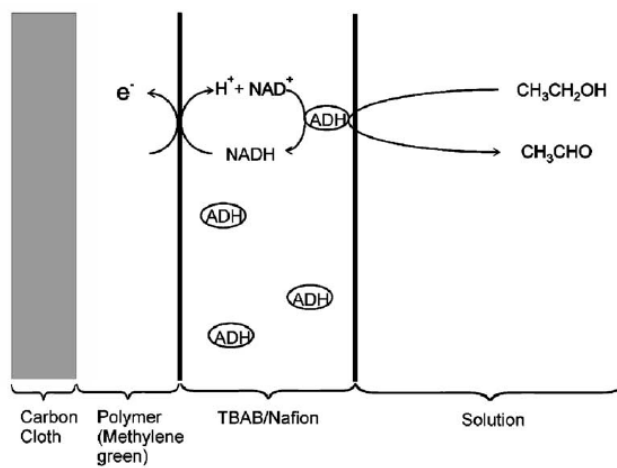


Figura 7. Ánodo con ADH inmovilizada en Nafión.
Tomado de Akers *et al.*, 2005.

Otra idea similar es la del grupo de Hassler que propone la utilización de un espaciador, el cual transfiere electrones por medio de interacciones electrostáticas con una interface entre el polímero polietilenimina y la enzima ADH, tal como puede verse en la fig. 8 (Hassler *et al.*, 2007). La ventaja de este enfoque es la regeneración de la interface por medio de cambios de pH, ya que un cambio a pH ácido usando HCl 0.1 M remueve la polietilenimina y permite que la superficie pueda volver a ser funcionalizada.

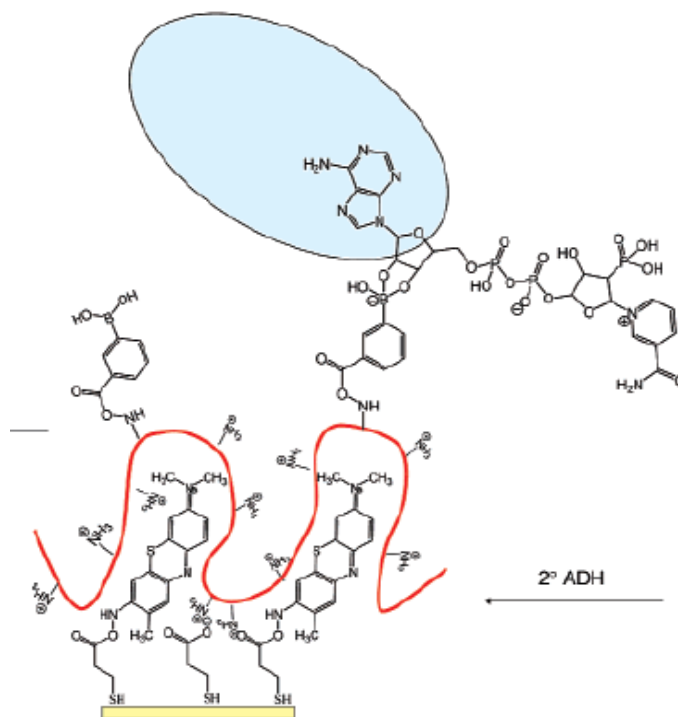


Figura 8. Ánodo con ADH inmovilizada en polietilenimina (línea roja), enzima ADH (elipse azul). Tomado de Hassler *et al.*, 2007.

Probablemente, la forma ideal de establecer la interacción entre la enzima y el electrodo es por medio de la transferencia directa de electrones (TDE). Una enzima que es capaz de realizar la oxidación de alcoholes de cadena corta y que además puede establecer un contacto directo con el electrodo, es la alcohol deshidrogenasa dependiente de PQQ y de grupo hemo (ADH-PQQ). El grupo hemo se encuentra más expuesto con respecto al cofactor PQQ y es el candidato a realizar la transferencia de los electrones hacia la superficie del electrodo (Yakushi y Matsushita 2010). En el año 1992, el grupo de Ikeda demostró la TDE con la ADH-PQQ, desde entonces ha sido inmovilizada en distintas superficies, obteniendo potenciales eléctricos en circuito abierto que van desde los 220 a los 400 mV contra el EEH (Electrodo Estándar de Hidrógeno). La diferencia entre los potenciales eléctricos, probablemente se debe a que estas enzimas tienen varios cofactores que pueden hacer TDE con el electrodo (Tkac *et al.*, 2009).

Recientemente, la enzima ADH dependiente de PQQ, ha sido inmovilizada en una lámina de grafito, utilizando nanotubos de carbono y un poli-electrolito conocido como poli-amidoamina de 4 cuatro cadenas ramificadas (PAMAM), el cual es una especie de Nafión modificado; este es utilizado para lograr un acercamiento de la superficie del electrodo con el grupo hemo expuesto de la enzima. De esta manera se logra una transferencia directa de electrones. El pico

de oxidación de la enzima en grafito vítreo se encuentra cerca de 200 mV vs. SCE, que es característico del grupo hemo. El electrodo con la ADH inmovilizada fue utilizado para fabricar una celda de combustible enzimática híbrida la cual se caracterizó por alcanzar una potencia máxima de hasta $38 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (Aquino Neto *et al.*, 2013).

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos con distintos electrodos diseñados por diferentes grupos utilizando ADH, ya sea dependiente de NAD^+ o de PQQ. La mayoría de los diseños se caracterizan por usar cátodos de grafito que contienen platino, la densidad de corriente varía de 100 a $1000 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, por lo que el tipo de diseño de ánodo, como el diseño de la celda es lo que marca la diferencia entre la cantidad de corriente y potencia obtenida.

En materia de celdas de combustible el enfoque común es usar un cátodo con platino que permita evaluar sin limitaciones al ánodo.

En un caso excepcional, la mayor densidad de potencia y corriente fue obtenida por medio de un diseño con dos enzimas, en una celda ADH vs. lacasa, contactadas por nanopartículas de oro (Deng *et al.*, 2010). Probablemente la cantidad elevada de enzima utilizada para el diseño de ambos electrodos (10 mg) es la razón por la cual se generó elevada densidad de corriente y densidad de potencia.

Tabla 2. Celdas con ánodo enzimático para la oxidación de alcoholes de cadena corta.

Densidad de corriente ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	Densidad de potencia ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$)	Masa de enzima ($\mu\text{g ADH}$)	Tipo de cátodo	Sustrato	Referencia
544	136	33.33	Vulcan XC-72 %20 Pt	Metanol	(Addo <i>et al.</i> 2010)
27.489	10.21	1500	Azul prusia, FeCl_3 , Ferricianida, líquido iónico BMIMCl.	Etanol	(Addo <i>et al.</i> 2011)
3210	1780	1×10^4	Lacasa contactada con nanopartícula de Oro	Etanol	(Deng <i>et al.</i> 2010)
1180	1160	96	Vulcan XC-72 %20 Pt	Etanol	(Akers <i>et al.</i> 2005)
100	38	*	Vulcan XC-72 %20 Pt	Metanol	(Aquino Neto <i>et al.</i> 2013)

* No reporta la cantidad de enzima usada en su diseño

Es importante señalar que comparar las celdas de combustible enzimáticas resulta una tarea difícil, tomando en cuenta que los autores no siempre reportan las áreas de los electrodos o la cantidad

de enzima que fue utilizada en el diseño de estos. De igual manera la pureza de las enzimas usadas no siempre es reportada. Tomando todo esto en cuenta, se puede decir que un sistema eficiente en materia de celdas de combustible enzimática es aquel que alcanza por arriba de un 20% de la potencia máxima teórica de la celda (Katz *et al.*, 1999).

2.6 TÉCNICAS Y EQUIPO ELECTROQUÍMICO PARA EVALUAR ELECTRODOS Y CELDAS ENZIMÁTICAS.

2.6.1 VOLTAMETRÍA CÍCLICA Y SU APLICACIÓN EN PROTEÍNAS.

La voltametría cíclica se define como una técnica voltamperométrica, en donde el potencial es variado para observar cambios en la generación o reducción de corriente de un electrodo (ánodo o cátodo). Es la técnica más empleada para adquirir información cualitativa y cuantitativa acerca de las reacciones electroquímicas y permite localizar rápidamente los potenciales redox de las especies reactivas (Wang, 2006).

Esta técnica no sólo sirve con propósitos puramente electroquímicos, también permite entender mejor la interacción de las enzimas con los electrodos, ya que si el centro redox de la enzima hace contacto con el electrodo, entonces: “Cualquier cambio en la corriente nos informa acerca de un cambio relativo en la actividad” (Léger, 2007-2013).

La superficie del electrodo, en donde la enzima se inmoviliza, hace las veces del aceptor de electrones. Los aceptores naturales de las enzimas oxidorreductasas son: O_2 , $NAD(P)^+$, Citocromo C, entre otros compuestos, capaces de recibir los electrones generados producto de la catálisis (Osman, *et al.*, 2011). Lo anterior es de suma relevancia, no sólo para la construcción y diseño de celdas o biosensores, sino que además permite entender mejor el funcionamiento del ambiente redox de la enzima a evaluar.

Para poder realizar una voltametría se requiere de un equipo que regule el potencial y pueda registrar la corriente generada, este equipo es el potenciostato; puede realizar pruebas a voltaje o corriente constante e inclusive se puede operar aplicando pulsos de voltaje o corriente según se requiera. En la prueba de voltametría se puede realizar registros a distintas velocidades de barrido desde 1 mV s^{-1} hasta velocidades altas de 700 mV s^{-1} , se prefieren las velocidades altas ya que permiten la identificación de reacciones redox.

El estudio de reacciones electroquímicas se realiza en un arreglo de tres electrodos: (1) El electrodo de referencia (RE); por ejemplo un electrodo de calomel, (2) un contra electrodo (CE) o electrodo auxiliar como segundo; comúnmente este electrodo es de platino pero también se utiliza oro e inclusive grafito, su función es recibir o generar la corriente requerida por el sistema y (3) el electrodo de trabajo (WE) (Limoges y Savéant 2003).

El sistema puede ser burbujeado con gases según se requiera. Los gases que se pueden usar para burbujear la cámara, pueden ser gases inertes como: Argón o Nitrógeno o en su defecto oxígeno o aire. Las razones del burbujeo pueden ser varias, la principal es que el oxígeno debe ser parte de la reacción, por lo que puede ser necesario usarlo para ver la actividad deseada. En su defecto se puede necesitar de gases inertes para evitar efectos adversos por la presencia de oxígeno. Otro gas que puede necesitarse por motivos de catálisis es el hidrógeno, ya que algunos electrodos pueden oxidarlo por controlar la concentración de este gas en solución.

En la fig. 9 puede verse un arreglo de tres electrodos donde se muestra al contra electrodo de platino (CE), electrodo de referencia (ER), electrodo de trabajo (WE), conectados a un potenciostato (caja gris) y con un sistema de burbujeo integrado (varilla azul claro y burbujas en medio).

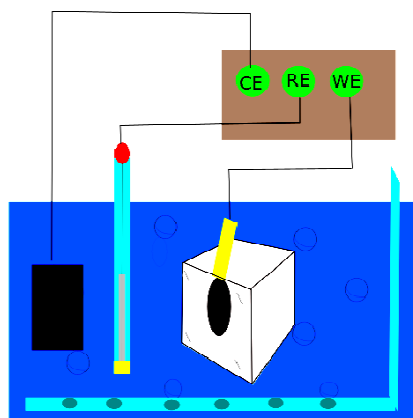


Figura 9. Sistema de tres electrodos para estudios electroquímicos.

En la fig. 10 se muestra un ejemplo de una curva de voltametría cíclica típica (voltagrama), en el que una especie química gana un electrón (curva roja) y después cuando la polaridad es invertida, éste es regresado (curva azul), por lo que se tiene un proceso de óxido-reducción del tipo reversible.

El aumento de los picos de óxido-reducción puede relacionarse con la actividad de la especie en el electrodo. En el caso de los bio-electrodos pueden evaluarse por esta técnica electroquímica para cuantificar la reacción de interés, ya sea en el ánodo o el cátodo según sea el caso.

Con esta técnica no sólo pueden observarse los procesos de óxido-reducción de un par reversible, sino también la aparición y desaparición de productos. Por lo que se pueden definir condiciones de operación para un electrodo dependiendo de lo que se quiere medir.

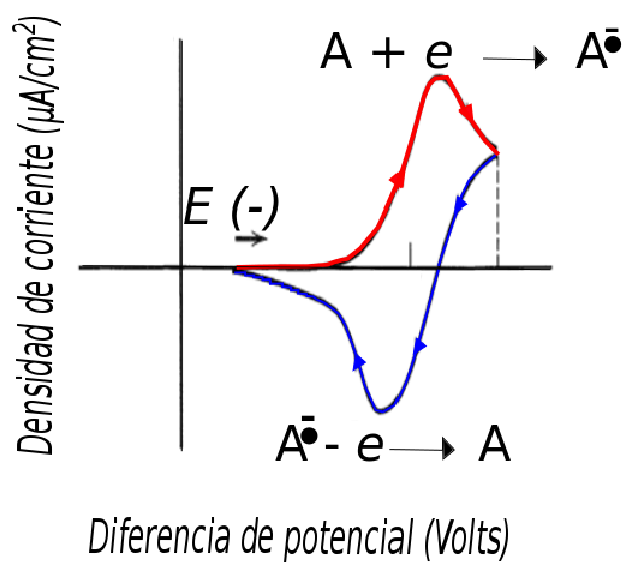


Figura 10. Voltograma de un proceso óxido-reducción. En rojo la especie “A” gana un electrón con el cambio de potencial E (pico anódico), en azul “A” entrega un electrón al electrodo al invertirse la polaridad E (pico catódico).

2.6.2 CRONOAMPEROMETRÍAS Y ESTABILIDAD OPERACIONAL.

Para determinar el tiempo de duración de la potencia eléctrica del electrodo, se realizan pruebas a un potencial constante (Kamat *et al.*, 2010) o en su defecto se puede ajustar un valor de resistencia eléctrica que permita cuantificar la corriente a lo largo del tiempo.

Una forma de interpretar el paso de corriente eléctrica a través de una resistencia es haciendo la analogía hidráulica, de manera que la resistencia eléctrica es como una compuerta que permite el paso de

flujo de agua. El corto circuito sería una compuerta infinitamente grande y abierta. Una resistencia muy grande sería una compuerta muy pequeña para la salida del potencial acumulado, la durabilidad de la corriente y potencia dependen del valor de resistencia externa (R).

2.6.3 CURVAS POLARIMÉTRICAS.

Para evaluar la potencia máxima y la corriente a corto circuito (paso de corriente con resistencia cero) la técnica más empleada son las curvas polarimétricas. Estas curvas pueden ser obtenidas de dos formas: una es empleando una caja de resistencias eléctricas que permitan cambiar la resistencia y medir la caída de potencial así como el paso de la corriente.

La otra es con un potenciostato haciéndolo trabajar en modo de potenciodinámica, de forma que se haga un barrido de voltajes a una velocidad normalmente de 1 a 10 mV s⁻¹. Estas curvas permiten caracterizar sistemas galvánicos para la generación de corriente como son las celdas de combustible (con catalizadores convencionales, enzimáticos y/o microbianos) así como sistemas de corrosión (Zhang *et al.*, 2009).

La generación de corriente en una bio-celda puede estudiarse por medio de una curva polarimétrica (fig.11 sección a). En la intersección con el eje “Y” se observa el voltaje a circuito abierto (OCP, *Open Circuit Potential*) con un valor de 0.8 V, en dicho punto no hay generación de corriente; conforme la resistencia externa es disminuida, la celda genera mayor corriente y el voltaje disminuye hasta alcanzar la intersección con el eje “X”, donde se genera la mayor cantidad de corriente, este punto es conocido como corriente en corto circuito (SCC, *Short Circuit Current*). La línea sólida (fig.11 sección a) representa una bio-celda experimental que genera más corriente que la línea punteada, la cual es el resultado de la simulación computacional de una bio-celda con una resistencia interna mayor (Logan, *et al.*, 2006).

Por último, la potencia de las celdas puede ser obtenida por medio del producto de la diferencia de potencial por la corriente (fig. 11 sección b), el punto donde la potencia es máxima (Pmax) es donde el voltaje de la celda genera la mayor corriente.

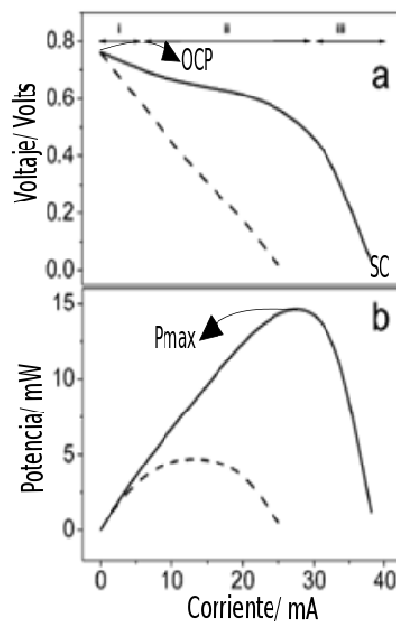


Figura 11. Comportamiento de una celda de combustible microbiana (línea sólida), efecto simulado con aumento de resistencia interna en una celda de combustible microbiana (línea punteada). (a) curva de voltaje vs. corriente, (b) curva de potencia (Logan, *et al.*, 2006).

2.7 ALCOHOL OXIDASA (AOx).

2.7.1 LA NATURALEZA OCTAMÉRICA DE LA ENZIMA AOx Y SU PAPEL EN LAS LEVADURAS.

La AOx es un octámero de 600 kDa con 8 subunidades iguales y un cofactor FAD que realiza la oxidación de alcoholes en levaduras (metanol como principal fuente de carbono). Esta enzima es muy importante para el metabolismo de las levaduras metilotróficas, ya que les permite usar metanol como única fuente de carbono (Ozimek *et al.*, 2005). Esta enzima ha sido ampliamente utilizada en el diseño de biosensores para etanol, midiendo la producción de H_2O_2 en electrodos de platino o por medio de algún otro mediador de electrones, para realizar una cuantificación indirecta del etanol en la solución (Azevedo *et al.*, 2005).

Hasta el momento no se sabe si el monómero de AOx es activo ya que no se ha logrado reconstituir el FAD en el apo-monómero. Parte de esto puede explicarse porque la obtención de los apo-monómeros de AOx se ha realizado con agentes caotrópicos fuertes como dimetilsulfóxido (Visser *et al.*, 2007) y KCN (Zlateva, *et al.*, 2001). Sin embargo, se sabe que los monómeros pueden auto-ensamblarse en el octámero siempre

y cuando tengan FAD. Este auto-ensamblaje ocurre después de un tratamiento con 80% glicerol (Evers, *et al.*, 1995) lo cual desensambla los octámeros en monómeros, después de las respectivas diluciones la enzima oligomeriza y vuelve a su estado de octámero.

La posible ruta de oligomerización de la AOx implica varios pasos, después de que la cadena polipeptídica es generada por el RNA ribosomal, el monómero se acopla a Pyc1p para recibir el grupo prostético FAD. Una vez que la AOx contiene el FAD, la proteína Pex5p lo introduce en el peroxisoma; posteriormente Pex5p se recicla y los monómeros de AOx oligomerizan dentro del peroxisoma. La proteína Pex5p es una proteína receptora la cual es un monómero no-globular encargado de exportar proteínas al peroxisoma, por medio de uniones a una región llamada PTS1. La proteína Pex5p posee un tripéptido SKL en el C-Terminal que les permite unirse a varias proteínas del peroxisoma, no sólo al monómero de AOx (Costa-Rodríguez, *et al.*, 2008).

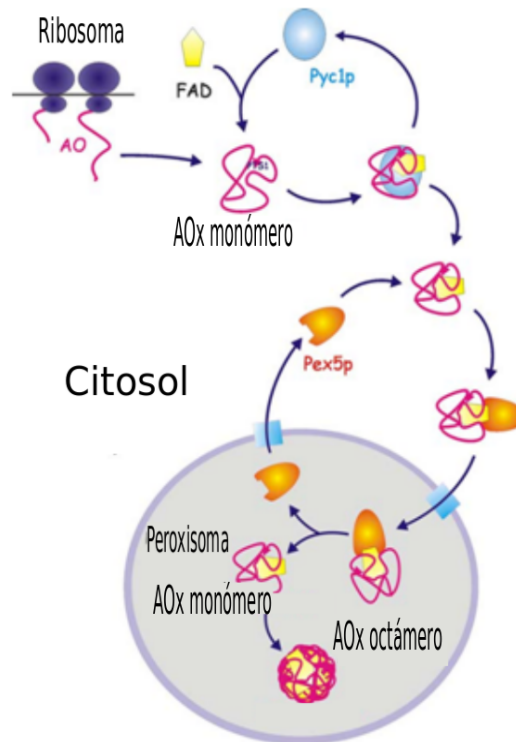


Figura 12. Posible ruta de oligomerización de AOx en levaduras.
Tomado y modificado de: Boteva, *et al.*, 2001.

La AOx es una enzima compleja, despierta mucho interés para ser utilizada en aplicaciones biotecnológicas, hay factores importantes a considerar que suceden *in vivo*, por ejemplo: el acoplamiento del FAD

en la enzima parece estar mediado por una enzima chaperona, que en este caso es la piruvato carboxilasa citosólica (Pyc1p) (Ozimek, *et al.*, 2005), el posible proceso de oligomerización de la enzima se presenta en la fig. 12.

Se ha demostrado que cuando se mutan los residuos Y542, A557 y S762 del N-terminal de la Pyc1p en cepas de levadura, se generan variantes incapaces de metabolizar metanol. Estos residuos de la Pyc1p se encuentran conservados en las levaduras que utilizan metanol como fuente de carbono. No se ha logrado la expresión heteróloga de la AOx en *S. cerevisiae*, ya que no posee la Pyc1p de las levaduras metilotróficas, los aminoácidos adecuados para ensamblar el FAD en el monómero de AOx (Ozimek, *et al.* 2003).

2.7.2 CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS Y ESTRUCTURALES DE LA AOx.

Otro factor importante a considerar es la estabilidad de los estados conformacionales que dan lugar al octámero de AOx, ya que de esto dependerá si es posible alcanzar a reconstituir la enzima en una superficie activada. Los reportes de Boteva (Boteva *et al.*, 1999) indican la pérdida de estructura secundaria de la AOx después de un tratamiento con agentes caotrópicos.

Recientemente el grupo de Goswami ha plegado y desplegado la AOx utilizando microondas y enfriamiento a 4°C. En este tratamiento hay un desplegamiento de la enzima sin obtener estados conformacionales intermedios y con una reactivación completa después de exponer la enzima a 2.45 GHz a 900 W durante 10 segundos (Chinnadayala y Goswami, 2012). Durante estos estudios se observó la alteración de la estructura secundaria de la enzima con cambios de las α hélices de un 32.7 % a un 42% y de un 41% a un 30.9%. Estas transiciones para las hojas β también se observaron en presencia de KCN y glicerol.

La AOx posee 8 flavinas. Sin embargo, sólo del 30 al 35 % son catalíticas (Mincey, *et al.*, 1980), lo que implica que de 2 a 3 monómeros son activos. Un 35% de las flavinas se encuentran estabilizadas en forma semiquinona (forma radical de la flavina), por lo que no están habilitadas para oxidar alcoholes. La función de la forma semiquinona es desconocida, se piensa que pueda estar involucrada en procesos de estabilización de la proteína, hasta el día de hoy no se ha elucidado más al respecto.

Otra peculiaridad del FAD en la AOx es que este grupo prostético presenta una afinidad por la azida de sodio al grado de ser un inhibidor competitivo de la enzima, pero no un desactivador. En la fig. 13 puede verse el espectro del complejo FAD-azida, el cual produce un color rojizo distintivo que ha sido aprovechado para su purificación. El color del complejo es consecuencia del incremento en la intensidad a 520 nm del espectro del FAD (Hopkins y Muller, 1987).

Se ha propuesto que cada FAD puede fijar una azida. Sin embargo, debido a que la AOx se incubaba con excesos de 200 a 5×10^7 moles/mol de enzima, por lo que la afinidad de la AOx por la azida no se encuentra en el orden de la de un ligando que se asemeja al sustrato, ya que su constante de disociación K_d es de 47.5 ± 4 mM. Esta constante fue calculada a partir de datos reportados por Hopkins, 1984.

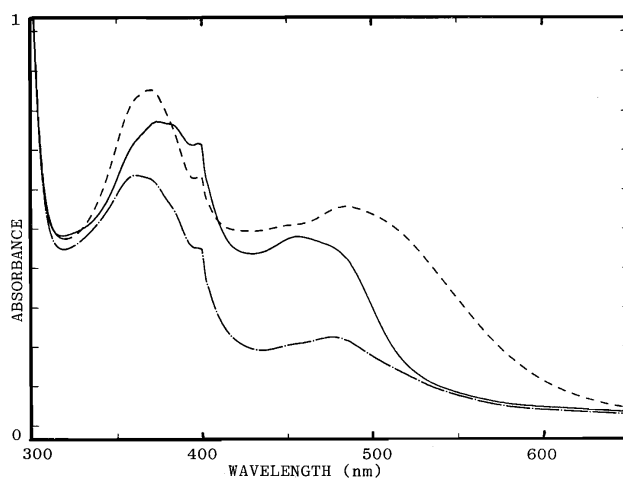


Figura 13. Espectro de la AOx de *P. pastoris*, la línea sólida es la AOx sin ningún sustrato, el espectro representado por una línea alternada con puntos muestra a la AOx en contacto con metanol, el espectro en línea punteada es la AOx expuesta a la Azida de Sodio donde se ve un incremento en 520 nm que indica una interacción directa con el FAD (Tomado de Hopkins y Muller, 1989).

Aún no ha sido resuelta la estructura cristalográfica de la AOx, a pesar de que la enzima cristaliza de forma sencilla a temperatura ambiente, el octámero mide 11-12 por 12-13 nm (Kato *et al.*, 1976) y es probable que esto dificulte la obtención de un buen cristal con propósitos de difracción. Estudios con resonancia paramagnética nuclear sobre la AOx de *Pichia pinus* revelaban que el anillo de isoxasina se encontraba a sólo 4 Å de la superficie (Averbakh, 1995). Sin embargo, el embebimiento del FAD es algo común en las oxidasas de la familia de las metanol-colina-oxidasas (GMC). Actualmente existen programas computacionales que permiten la obtención de modelos de estructuras

cristalinas de proteínas a partir de la homología con secuencias de enzimas similares, por lo que la secuencia de la AOx puede ser usada para poder predecir el sitio del FAD a partir del modelo de mejor ajuste.

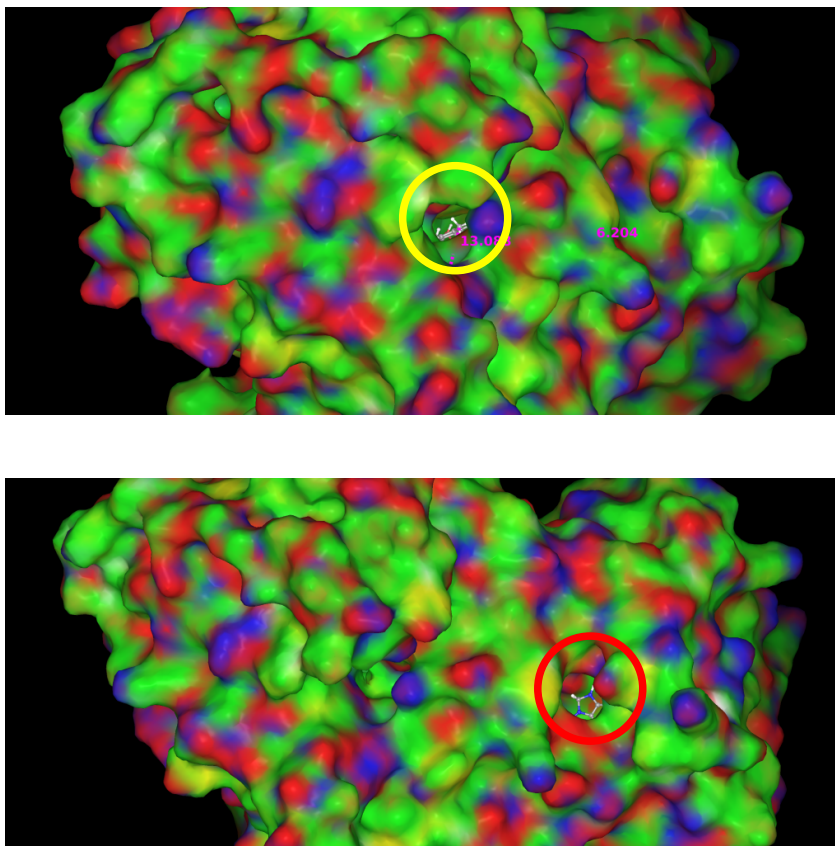


Figura 14. Modelo tridimensional de la AOx obtenido con I-Tasser. (Arriba) AOx: vista de la cavidad que conecta el anillo de isoloxasina del FAD con la superficie, el círculo amarillo indica la cavidad dónde se encuentra. (Abajo) puede verse la base adenina más expuesta al solvente, el círculo rojo indica la cavidad donde se encuentra.

Un modelo tridimensional preliminar de la AOx fue obtenido en el presente trabajo, usando la secuencia de la enzima para ingresarla en el servidor I-Tasser (Zhang, 2008). El modelo de la AOx que se obtuvo de I-Tasser tiene un CscoreLB (C score para el ligando) de 0.79, siendo el valor más alto el de 1. El modelo fue refinado con el programa MAESTRO de Shröndiger. Como puede verse en la fig. 14, se puede observar el FAD embebido en la enzima con un túnel que mide entre 13 a 15 Å por el lado del anillo de Isoloxasina y de 6 Å del lado de la base adenina en la región no catalítica del FAD (fig. 14). Favorecer la transferencia de electrones en estas condiciones puede ser complicado,

ya que se ha demostrado en la GOx que distancias superiores a los 14 Å no favorecen la transferencia de electrones (Demin y Hall, 2009). Sin embargo, podría presentarse efectos en la periferia que favorecieran la transferencia a través de una ruta de aminoácidos redox, esto se ha observado en enzimas como el Citocromo P450BM3 (Vidal-Limón *et al.*, 2013).

2.7.3 EL MECANISMO DE REACCIÓN DE LA AOx EN COMPARACIÓN CON OTRAS OXIDASAS DE LA FAMILIA GLUCOSA-METANOL-COLINA OXIDASAS (GMC).

La familia de las GMC se caracteriza por enzimas en las que el FAD coordina a una histidina protonada. En el caso de la GOx, se ha propuesto que la enzima realiza la sustracción de dos electrones para formar un hidruro (Leskovac *et al.*, 2005). Sin embargo, en el caso de la enzima Aryl Alcohol Oxidasa se generan una serie de intermediarios no relacionados con la formación de ese hidruro (Ferreira *et al.*, 2009).

En el caso específico de la enzima AOx su mecanismo no está bien definido, principalmente por falta de información de carácter cristalográfico que permita reconocer los residuos importantes para la catálisis. No obstante, los estudios cinéticos de finales de 1970 y mediados 1980 señalan que la enzima pudiera realizar una sustracción de protón de los alcoholes, esto involucraría un mecanismo del tipo de un radical en el que se produce una doble transferencia de electrones (Williams *et al.*, 1975).

El intermediario que da lugar a la doble transferencia podría ser una semiquinona, la cual no ha sido observada por técnicas espectrofotométricas. Se especula que la formación de este intermediario y su desaparición se da en un tiempo <5 ms (Geissler *et al.*, 1986).

2.8 ESTUDIOS ELECTROQUÍMICOS EN EL FAD Y EN LAS OXIDASAS DE LA FAMILIA DE LAS GMC.

El FAD de las flavoenzimas es probablemente, junto con el grupo hemo de las peroxidasas y citocromos, uno de los grupos prostéticos más estudiados sobre todo por voltametría cíclica. Este grupo se distingue por una diferencia de potencial que va de los -250 mV vs. SHE o -500 mV vs. SCE. El FAD posee tres estados de oxidación: la forma oxidada, semiquinona e hidroquinona, con tres estados de ionización los cuales

pueden verse en la fig.15. Cada uno estos dependen del pH o del ambiente de la proteína.

Los distintos pKa del FAD son de amplio interés, ya que se puede estudiar a la molécula a distintos pH para observar los cambios en los picos redox, que son consecuencia de los distintos estados de ionización. Es importante señalar que en solución es difícil poder ver la transferencia de un electrón. Sin embargo, se sabe que esta transferencia de electrones sucede, ya que al determinar el número de electrones transferidos por el FAD, por medio de los picos oxidoreducción obtenidos por voltametría, la cantidad de electrones transferidos fue de 1.8 cuando debería ser de 2. Estos resultados sugieren que parte de los electrones se quedaron en la forma semiquinona (Ksenzhek y Petrova, 1983), por lo que no se obtienen los 2 electrones en la transferencia observada en un sólo pico de la voltametría.

Para el caso del FMN (Flavín Adenín Mono nucleótido) el panorama es diferente ya que si es posible ver la doble transferencia en este cofactor. La forma semiquinona es más estable, de hecho las flavodoxinas emplean FMN y realizan una transferencia de electrones doble. Sin embargo, los picos redox de las formas semiquinona/hidroquinona y quinona/semiquinona están al revés de como se esperaría: el par redox de la semiquinona/hidroquinona se observó a -500 mV vs SCE y el de la quinona/semiquinona a -250 mV SCE (Astuti *et al.*, 2004) .

Las simulaciones computacionales demuestran que es posible la transferencia de un electrón por parte del FAD y se realizaron predicciones de la voltametría que debería poder observarse en caso de que alguna proteína realice este proceso (Smith *et al.*, 2003).

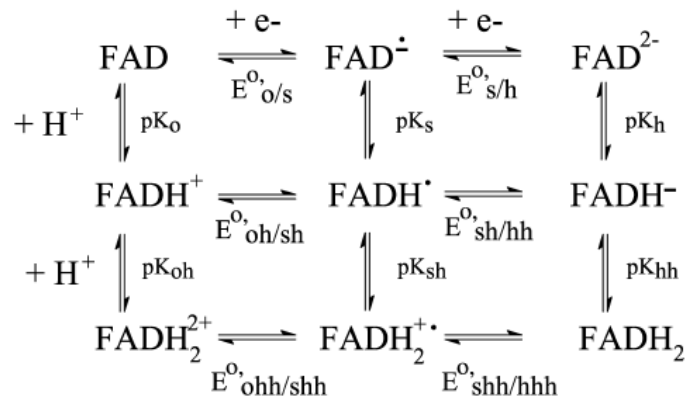


Figura 15. Estados redox del FAD y sus estados de ionización dependientes del pKa.
Tomado de Smith, *et al.*, 2003.

2.9 ESTUDIOS ELECTROQUÍMICOS EN LA AOx

La evidencia de que la AOx puede transferir electrones a un electrodo se encuentra en un estudio del año 2005, donde se logró sustituir el aceptor natural de la AOx por *p*-benzoquinona. En este estudio, la transferencia de la AOx hacia la *p*-benzoquinona se registró en un potencial de oxidación de 72 mV vs. SCE, dando un giro a lo que se conocía acerca del mecanismo de reacción de esta enzima. A la enzima AOx se le ha denominado verdadera oxidasa, ya que no se conocía que otro compuesto diferente del O₂ que pudiera ser aceptor de electrones de la AOx (Shumakovich *et al.*, 2007).

El potencial del óxido-reducción del FAD puede variar dependiendo del ambiente de la proteína. Para el caso de la oxidación de alcoholes son pocas las flavoenzimas estudiadas por métodos electroquímicos. La Aryl Alcohol Oxidasa de *Pleurotus eryngii* ha sido estudiada recientemente por voltametría cíclica, la enzima alcanza un potencial de 180 mV vs. SCE inmovilizada en electrodos de grafito por medio del cual oxida alcoholes aromáticos. El alto potencial redox del FAD en la enzima con respecto a su potencial redox en solución (-500 mV vs. SCE) indica que en el FAD hay un efecto de aumento de potencial al estar embebido en esta enzima (Munteanu *et al.*, 2008). Algo similar puede ocurrir en la AOx debido a que posee un cofactor muy embebido.

Debido a las complicaciones existentes para lograr la transferencia de electrones de la AOx hacia los electrodos, la opción de utilizar un polímero redox resulta novedosa, la propuesta del grupo de Brett consiste en utilizar un polímero a base del colorante rojo neutral (el polímero se conoce como PNR, Poly Neutral Red) (Barsan y Brett 2008), la transferencia de electrones se da después de que la AOx convierte los alcoholes en aldehídos.

Los autores proponen dos mecanismos de transferencia de acuerdo al potencial aplicado al electrodo. Uno de los mecanismos propuestos es por reducción de H_2O_2 , un segundo posible mecanismo consiste en la transferencia directa de electrones al electrodo a -300 mV vs. SCE. Los autores prueban la sustitución del O_2 por el PNR con evaluaciones en atmósfera de N_2 aumentando la sensibilidad en un 20% (Barsan y Brett 2008). Sin embargo, los autores no proporcionan los voltogramas que permitan elucidar las transferencias que pudieran estar ocurriendo en su electrodo. Aunque los trabajos posteriores con el polímero redox PNR revelaron la existencia de un pico de oxidación por encima de -500 mV vs. SCE (Pauliukaite *et al.*, 2007), por lo que el modelo de transferencia por competencia con el O_2 que propusieron en sus primeros experimentos está cerca del valor experimental cuando el electrodo es operado a -350 mV vs. SCE.

Recientemente Das y Goswami en el 2013 diseñaron un electrodo de AOx utilizando nanotubos de carbono. En este diseño la enzima se encuentra inmovilizada por atrapamiento, de forma que los nanotubos hacen contacto con el FAD de la AOx y la enzima a su vez es estabilizada por el polímero de Nafión con polietilenima, en este caso el Nafión podría estar ayudando a un mejor transporte de protones debido a que se sustrae un electrón del alcohol para dar paso al aldehído. Tal como puede verse en la fig.16, el electrodo con AOx posee un par de óxido-reducción de 200 mV vs SCE, se atribuye que este pico es el par redox del FAD que ha sido contacto por los nanotubos, en el caso de que la inmovilización se realice sin nanotubos, el pico de óxido-reducción no puede verse ya que el FAD se encuentra embebido en la proteína. Estos experimentos fueron realizados en una atmósfera de argón.

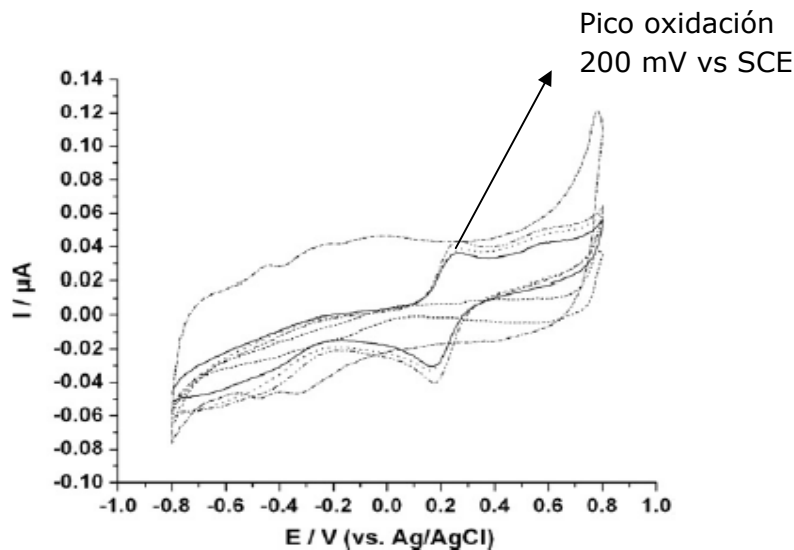


Figura 16. Voltametría AOx en nanotubos-nf-Oro.
Tomado de Das y Goswami, 2013.

Este es el primer caso en el que se inmoviliza la AOx para la transferencia directa de electrones en un ánodo. En la fig. 17 se observan voltagramas de: (a) solución amortiguadora, (b) 8 μM , (c) 33 μM , (d) 42 μM de etanol. Puede verse el incremento de las curvas conforme se aumenta la concentración de etanol. Sin embargo, aunque el ánodo de AOx de ese trabajo realiza contacto directo con los nanotubos de carbono, no evita la competencia con el oxígeno. El pico de de 650 mV a 700 mV revela la oxidación de H_2O_2 como se ve en la fig.17. El desplazamiento del pico de reducción a 100 mV corresponde a la reducción del oxígeno disuelto por parte del FADH_2 (voltajes vs. Ag/AgCl). Esto debido a que parte de la enzima no realiza contacto directo con el electrodo, por lo que hay pérdidas en la transferencia de electrones hacia el electrodo.

En el trabajo anterior la constante de transferencia de electrones fue estimada en $1.69 \pm 0.15 \text{ s}^{-1}$ y se obtuvo un rango de respuesta lineal de 8 a 42 μM de etanol. Debido a lo anterior, los autores consideran este electrodo como un buen biosensor (Das y Goswami 2013).

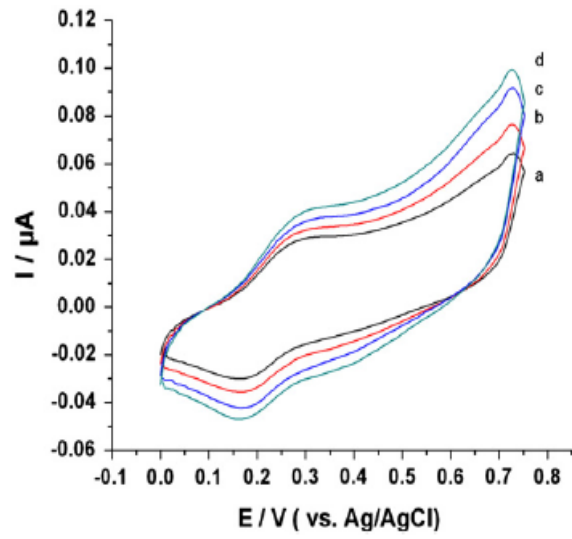


Figura 17. Voltametría AOx-nanotubos, voltagramas en: (a) solución amortiguadora KPBs pH 7.5, (b) 8 μM , (c) 33 μM , (d) 42 μM de etanol. Tomado de Das y Goswami, 2013.

3. JUSTIFICACIÓN.

El advenimiento de las energías renovables es una realidad, sin embargo, es probable que ninguna de las tecnologías emergentes ocupe totalmente el lugar que tuvieron los combustibles fósiles en la civilización actual. Es por esto que son muchas las fuentes de energía alternativas que actualmente se estudian, donde las celdas de combustible enzimáticas buscan ocupar un lugar en donde otras tecnologías no pueden incursionar.

Las aplicaciones de las celdas enzimáticas son variadas: desde dispositivos de monitoreo remoto, sensores *in situ*, equipos que actualmente usan baterías convencionales y las tendencias nuevas que puedan surgir con el tiempo. Tales como analizadores bioquímicos o biosensores en biotecnología.

El desarrollo de nuevas celdas enzimáticas es una labor que tomará tiempo, no sólo para mejorar el contacto eléctrico de las enzimas hacia los electrodos o los aspectos ingenieriles del diseño de las celdas. Sino también para entender mejor el lugar que estos dispositivos pueden llegar a tener en nuestra cotidianidad.

Actualmente muchos países (principalmente E.U.A., India y China) invierten en el desarrollo tanto de celdas de combustible enzimáticas como microbianas. Si bien estos aún son conceptos a prueba, resulta prometedor imaginar que estos dispositivos podrían alcanzar independencia de los catalizadores metálicos, además de ser capaces de funcionar con metabolitos comunes como: el etanol y los azúcares reductores.

La construcción de electrodos con AOx orientada es un procedimiento que puede servir para obtener sensores, pero también estos electrodos pueden servir como ánodos de celdas de combustible. Si se tiene un procedimiento para inmovilizar una enzima en el cátodo y se desea acoplar esta con la AOx en el ánodo, entonces se puede fabricar una celda enzimática completa. Es importante señalar que la inmovilización de la lacasa en electrodos de grafito ya ha sido estudiada por nuestro grupo, obteniendo resultados del orden de 1 mA cm^{-2} en una celda lacasa vs. Zinc (Martínez-Ortiz, *et al.*, 2013). El siguiente paso es obtener un ánodo que puede oxidar alcoholes de cadena corta. De manera que se diseñe una celda AOx vs. lacasa, en

donde ambas enzimas se encuentren orientadas en sus respectivos electrodos.

4. HIPÓTESIS.

Es posible diseñar, construir y caracterizar un ánodo con la enzima alcohol oxidasa orientada para la transferencia directa de electrones, en una celda de combustible enzimática alcohol oxidasa/lacasa, la cual genere mayor densidad de potencia y corriente que electrodos con inmobilizaciones aleatorias de alcohol oxidasa.

5. OBJETIVO GENERAL.

Diseñar, construir y caracterizar una celda de combustible enzimática inmobilizando alcohol oxidasa en el ánodo y lacasa en el cátodo, orientando a ambas enzimas para una transferencia directa de electrones.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1.- Diseñar y establecer un procedimiento para la inmobilización de AOx de forma orientada para aumentar la transferencia de electrones.
- 2.- Caracterizar electroquímicamente la AOx inmobilizada en el electrodo de grafito.
3. Construir, ensamblar y caracterizar la celda de combustible enzimática AOx/Lacasa.
- 4.- Evaluar la eficiencia y capacidad de la celda enzimática AOx/Lacasa.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 REACTIVOS.

Para la realización del presente trabajo se emplearon los siguientes reactivos.

Productos Sima-Aldrich: ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), AOx de *Pichia pastoris* 38 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (1000 U), N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida hidroclicorado (EDC), peroxidasa de rábano tipo X en sulfato de amonio, BSA, 4-azidoanilina, ácido aminoetilbenzoico (AEBA).

Productos Baker: fosfato monobásico y dibásico de potasio, fosfato monobásico de sodio, ácido nítrico, ácido sulfúrico concentrado, isopropanol, metanol y acetona. Fisher Scientific: tolueno, dimetilsulfóxido (DMSO) y diclorometano de Honeywell.

Láminas tipo TORAY marca SIGRACET GDL 35 BC, Nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) fueron adquiridos de US Research Nanomaterials, Inc., Nafión 115 en solución al 5% de la marca DUPONT.

7.2 EQUIPOS.

Espectrómetro marca Perkin Elmer lambda 25, Potenciostato marca SOLARTRON, electrodo de referencia de Calomel saturado con KCl.

La celda de combustible consistió en dos compartimientos divididos con membrana Nafión 232 de 50 μm (DUPONT), con electrodos contactados eléctricamente por tela de grafito, la cual a su vez estaba unida a un cable de cobre aislado con resina epóxica. La separación de los electrodos es de aproximadamente 1 cm^2 . Para las pruebas con un cátodo control se utiliza un difusor SIGRACET GDL 35 BC con Platino al 75% y dimensiones de 2.5 cm X 3.5 cm. La cámara anódica fue alimentada con N_2 y el cátodo fue burbujeado con O_2 . Las pruebas con platino se realizaron a pH 7.5 con un amortiguador de fosfatos a una concentración 100 mM. Las pruebas con el electrodo de lacasa se realizaron con amortiguador de succinato pH 4.5 a concentración 60 mM en la cámara catódica y en la cámara anódica se uso solución amortiguadora de fosfatos 100 mM a pH 7.5 con 200 mM de etanol o metanol (fig. 18).

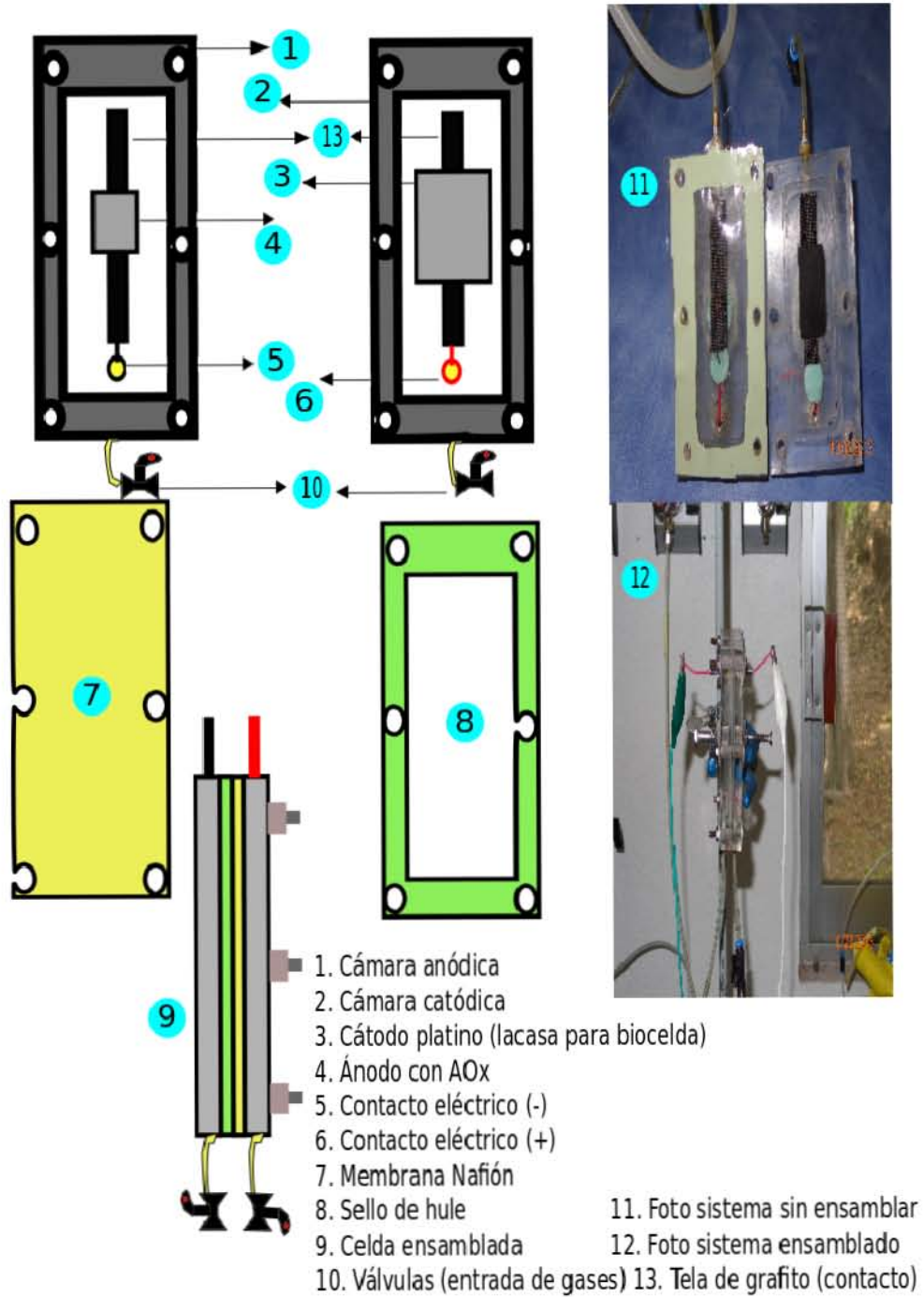


Figura 18. Esquema detallado de la celda de combustible enzimática AOX vs. Pt utilizada en el presente estudio, para el caso de la lacasa el cátodo es del mismo tamaño que el ánodo.

7.3 ENSAYOS BIOQUÍMICOS.

Ensayo de actividad enzimática.

Para realizar las pruebas de actividad enzimática se utilizó: ABTS, metanol al 0.1%, amortiguador de fosfatos 100 mM a pH 7.5. El ensayo de actividad se realizó en una celda de 1 ml y se midió el cambio de absorbancia a 405 nm durante 5 minutos, determinándose la pendiente. Con este valor se calculó la actividad con el coeficiente de extinción $\epsilon=36.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ correspondiente al diradical de ABTS (Kemp, *et al.*, 1988).

Ensayo de determinación de proteína.

Se determinó proteína a 595 nm utilizando el método Bradford con el reactivo de BioRad.

Ensayos de reconstitución urea y KBr.

Se realizó la desflavinización con 6.5 M de urea y 3.5 M de KBr utilizando 550 μM de AOx (calculado en función del monómero 83 kDa) a temperatura ambiente, la desflavinización se realizó durante 1 minuto y se inyectó en una columna Sephadex G-50 con fase móvil de 6 M urea con sales de fosfatos 100 mM a pH 7.5 para asegurar que el cambio solo se deba a la urea y no al pH. La altura de la columna fue de 8 cm, a la que previamente se le alimentó 200 μL de FAD 2 mM en fosfatos 100 mM pH 7.5 a 4°C. La apo-enzima fue incubada con FAD con concentración 10 veces mayor a la concentración de proteína.

Ensayos de desflavinización con β -mercaptoetanol.

Se incubó la enzima con concentraciones crecientes de β -mercaptoetanol comenzando en 0.74 M, diluido en agua mili-Q, por 12 horas para posteriormente dializar en amortiguador fosfatos 100 mM a pH 7.5 en una membrana de celulosa con límite de exclusión de 15 kDa durante 4 horas con 3 cambios de amortiguador de fosfatos, posteriormente se toma la apo-enzima y se incuba con FAD en una relación 1:10.

Ensayos de reconstitución a pH ácido.

Se realizó la incubación de AOx a pH 1.7 con 25 mM de fosfatos en 30% de glicerol, durante 30 minutos en baño de agua-hielo, para después pasarlo por una columna de Sephadex G-50 de 20 cm de alto con fase móvil a pH 1.7 con 20 mM de fosfatos en 30% glicerol, para esto se

utilizó un flujo de 3.5 ml/min. Se colectaron las fracciones y se neutralizan con solución amortiguadora de fosfatos pH 7 a 100 mM y posteriormente se realizó el ensayo de reconstitución.

Inmovilización de AOx con 4-azidoanilina.

Las láminas de grafito (electrodos) fueron cortados de 1 cm x 1cm, posteriormente las láminas fueron lavadas con diclorometano y tetrahidrofurano aproximadamente 1 ml de cada uno. Una vez lavados, para eliminar algún contaminante del material, se procedió a carboxilar con 1 ml de HNO₃ durante 2 horas a 80 °C, se lavaron los electrodos con amortiguador de fosfatos 100 mM a pH 7, y se incubaron con 1 mg/ml de 4-azidoanilina y 2 mg/ml de EDC (N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida hidroclicorado), durante 4 horas en solución amortiguadora MES 50 mM a pH 5.

Voltametrías Cíclicas.

Las voltametrías fueron realizadas con un arreglo de 3 electrodos en un recipiente volumétrico con un volumen de 400 ml, en ciclos de 50 mVs⁻¹, atmosfera de N₂, utilizando un equipo Solartron con los programas CoreWare y CoreView para la visualización.

7.4 ESTRATEGIAS PARA INMOVILIZACIÓN ORIENTADA.

En el presente trabajo se plantearon dos estrategias para orientar la AOx en la superficie del electrodo. La primera fue una inmovilización por reconstitución. Es decir, extraer el cofactor de la enzima para unir covalentemente el FAD al electrodo y posteriormente que la apo-proteína reconozca el cofactor unido, facilitando la orientación del sitio activo. La segunda estrategia fue utilizar un análogo a un ligando natural (azida de sodio) unido covalentemente al electrodo, para posteriormente orientar el sitio activo al electrodo. Para esta estrategia se utilizó como análogo la 4-azidoanilina.

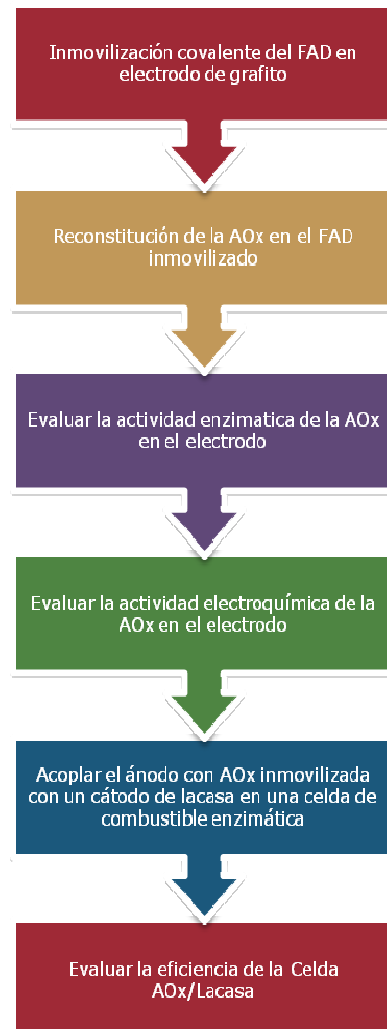
7.4.1 ORIENTACIÓN DE AOx POR RECONSTITUCIÓN.

Para favorecer la orientación de la enzima AOx en el electrodo se puede partir de la premisa que es una flavoenzima y se puede usar el enfoque de reconstitución de Willner, *et al.*, 1998. Para lo cual se busca un ensayo de obtención de apo-enzima, esto es enzima sin cofactor que posteriormente pueda reconstituirse sobre el cofactor unido covalentemente a un electrodo.

Aunque una gran cantidad de flavoenzimas han podido ser convertidas en apo-enzimas y posteriormente ser reconstituidas, no existe un método generalizado para obtención de apo-enzimas y su posterior reconstitución, ya que cada enzima posee características estructurales particulares. En algunos casos ha bastado con una simple diálisis (en condiciones ácidas o con bajas concentraciones de KBr), para remover el cofactor y realizar pruebas con la apo-enzima obtenida. Pero en otros casos se debe recurrir a métodos más agresivos (p. ej., urea y precipitación con sulfato de amonio), lo cual puede llevar a la desnaturalización irreversible de la proteína, por lo que mucho de lo que se sabe acerca de reconstitución ha sido resultado de observaciones fenomenológicas del comportamiento de estas enzimas en distintas condiciones desnaturalizantes, lo cual ha permitido el desarrollo de biosensores por el enfoque de reconstitución (Hefti *et al.*, 2003).

En la fig. 19 se desglosan los pasos para la construcción de una celda de combustible enzimática AOx vs. lacasa. Una vez que se produce apo-enzima en solución se procede a realizar el ensayo de reconstitución en el electrodo. En este caso se usar un espaciador de sirilgaldazina-ácido Malónico-FAD que permita una transferencia de electrones por resonancia.

Figura 19. Procedimiento para la fabricación de una celda de combustible enzimática, utilizando un ánodo diseñado por reconstitución.



7.4.1.1 PRODUCCIÓN DE APO-AOx CON UREA Y KBr.

El único ensayo de reconstitución reportado para esta enzima consiste en obtener la apo-enzima por un tratamiento con 6.5 M de urea y 3.5 M de KBr, separándola del FAD en una columna de exclusión por gel, el método se esquematiza en la fig. 20. Los autores reportaron un 50% de recuperación de la actividad original inclusive lograron reconstituir la AOx con 5-deazaflavina (análogo estructural del FAD)(Sherry *et al.*, 1985), sin embargo no se observó oxidación de alcoholes con este compuesto.

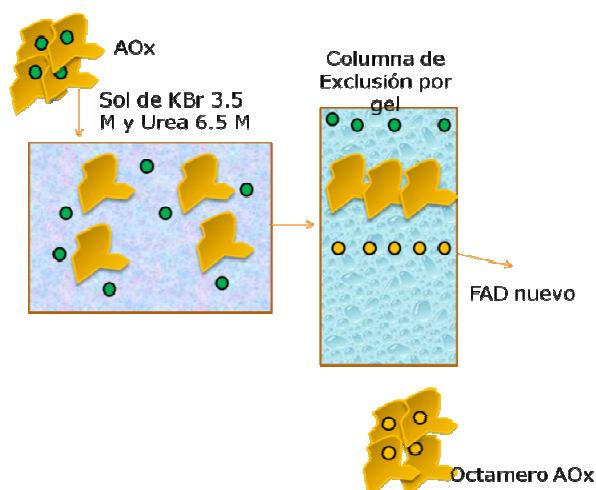


Figura 20. Apo-AOx producida con urea y KBr

7.4.1.2 PRODUCCIÓN DE APO-AOx UTILIZANDO β -MERCAPTOETANOL.

Recientemente, Kumar y colaboradores aislaron una AOx de *Aspergillus terreus*, que transforma alcoholes de cadena larga (heptanol y mayores) en sus respectivos aldehídos (Kumar y Goswami 2008). Además reportaron la desflavinización y disociación utilizando β -Mercaptoetanol como agente caotrópico a 0.74 M, de manera que después de incubar la enzima durante 12 horas y haber retirado el β -mercaptoetanol por diálisis (4 h), reconstituyeron la AOx de *A. terreus* con FAD, en una relación de 10 moles de FAD contra 1 mol de apoenzima y en presencia del sustrato en este caso heptanol en exceso (10 mM) (Kumar y Goswami 2009).

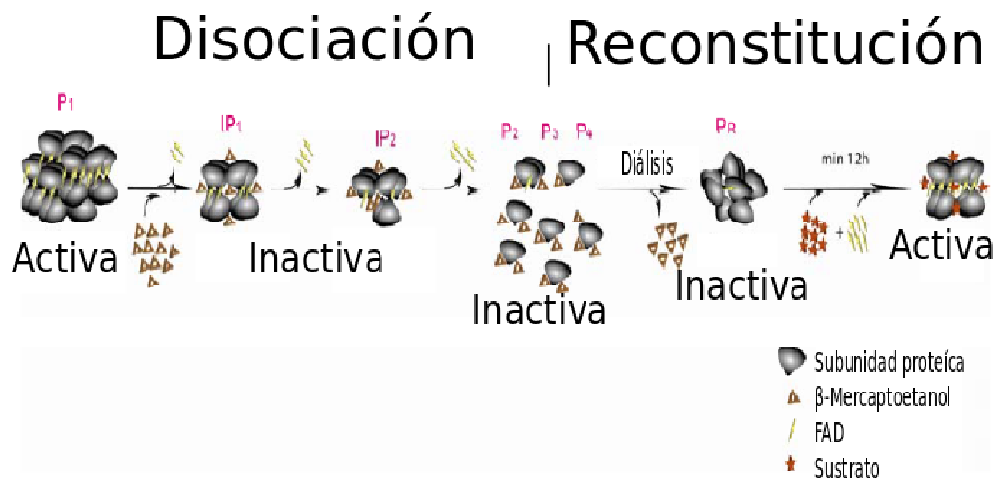


Figura 21. Ensayo de desflavinización reconstitución AOx con β -Mercaptoetanol. Tomado de Kumar y Goswami 2009.

7.4.1.3 PRODUCCIÓN DE APO-AOx A pH ÁCIDO.

La GOx, como se señaló anteriormente, ha sido la enzima Diana para diseñar sensores y que permitió a Itamar Willner implementar el enfoque de reconstitución de enzimas en la fabricación de bio-ánodos desde 1965; se conoce el tratamiento para despojar a este dímero de su cofactor y se solía utilizar comúnmente para diseñar inmuno-ensayos colorimétricos (Morris y Buckler, 1983).

El ensayo para desflavinizar la GOx consiste en llevarla a un pH de 1.7 a 1.4 en el que la enzima libera el cofactor. Posteriormente se separa por centrifugación o por columna de exclusión, se neutraliza y esta apo-enzima queda lista para reconstituir en presencia de FAD. El ensayo es relevante ya que la GOx se encuentra en la familia GMC (glucosametanol-colina oxidasas) al igual que la AOx. El ensayo de reconstitución ha sido de utilidad para otras enzimas de la familia como la colesterol oxidasa (CHOx) (Vidal *et al.*, 2004) y es posible que permita la obtención de la apo-AOx, para que pueda ser reconstituida posteriormente.

7.4.2 ORIENTACIÓN DE AOx POR AFINIDAD.

Un enfoque diferente al enfoque de reconstitución consiste en orientar a la enzima con un sustrato o inhibidor que reconozca el sitio activo. En este caso el sitio activo es de la AOx es el FAD.

Considerando que la enzima tiene una afinidad por la azida de sodio de 8 moles de azida/mol de AOx (Bringer *et al.*, 1979), es posible que la enzima quede orientada y anclada hacia el electrodo, utilizando un derivado de azida como espaciador, la cual interactuaría directamente con el sitio activo. Por lo tanto, se consideró un espaciador derivado de azida aromática con el fin de facilitar la transferencia de electrones. El espaciador elegido es la 4-azidoanilina.

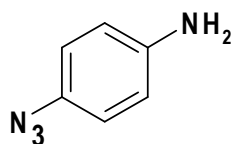


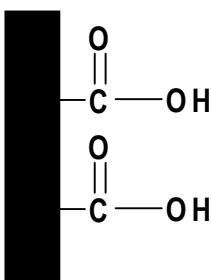
Figura 22. Molécula de 4-azidoanilina

A continuación se describe el proceso de derivatización e inmovilización de la AOx de forma que se favorezca la orientación del FAD sobre la superficie del electrodo.

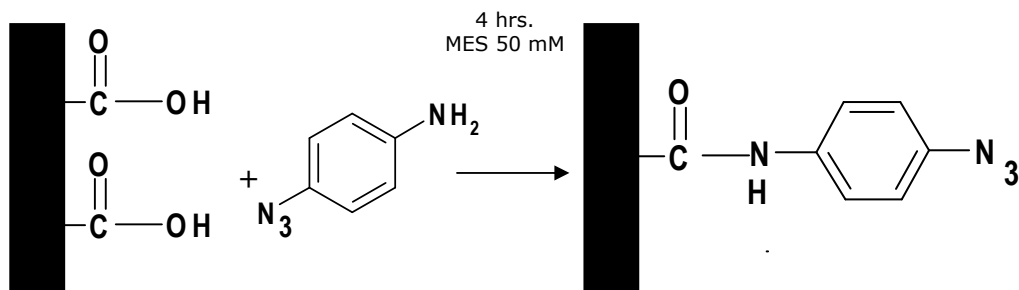
7.4.2.1 PROCEDIMIENTO DE INMOVILIZACIÓN DE LA AOx CON 4-AZIDOANILINA DE FORMA COVALENTE.

El proceso de inmovilización de la AOx en los electrodos derivatizados con 4-azidoanilina, consiste en cuatro etapas que se describen a continuación.

1.-Carboxilación del electrodo. La carboxilación se realiza en tubos de vidrio con 1 ml de HNO₃ concentrado, los electrodos previamente lavados con tetrahidrofurano, diclorometano y agua (absolutos), se colocan en el ácido nítrico concentrado y se mantienen en reflujo a 80 °C durante 2 horas.



2.- Esterificación. Se realiza la reacción de esterificación con carbodiimida en solución amortiguadora MES 50 mM a pH 5 a temperatura ambiente y usando una bandeja agitadora a 60 rpms, para favorecer la formación del carbocatión y la subsecuente formación de un intermediario O-acilisourea. De manera que el grupo amino de la 4-azidoanilina se une covalentemente al carboxilo de las láminas de grafito.



3- Una vez inmovilizada la azida aromática, se deja que la AOx oriente el sitio del FAD hacia el grupo N_3 , en amortiguador fosfatos 100 mM a pH 7.5, a temperatura ambiente a 50 rpms, posteriormente se inmoviliza covalentemente la enzima desde sus aminas que se encuentran cercanas al sitio del FAD con los carboxilos libres del electrodo.

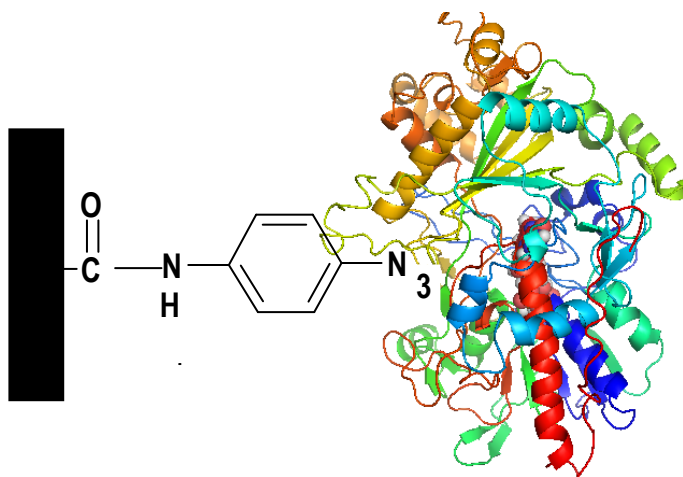


Figura 23. AOx inmovilizada por medio de orientación con 4-azidoanilina.

7.4.2.2 PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO EMPLEANDO NANOTUBOS DE CARBÓN MULTICAPA (MWCNT) Y ADSORCIÓN DIRECTA.

Con la intención de mejorar el proceso de inmovilización y la orientación de la AOx, se plantea una estrategia utilizando nanotubos derivatizados con 4-azidoanilina que permita un mejor contacto y acercamiento al sitio activo.

1.- Se realizó la carboxilación de los electrodos de grafito en las condiciones ya antes descritas en la sección 6.4.2.1.

2.- Se derivatizaron los nanotubos carboxilados con 4-azidoanilina de la siguiente manera: en un volumen de 3 ml de DMSO se disolvieron 5 mg Nanotubos, 5 mg de 4-azidoanilina y 5 mg de EDC por 4 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente se lavaron los nanotubos con solución amortiguadora 100 mM de fosfatos a un pH de 7, los lavados se realizaron centrifugando 3 veces a 9,000 rpm por 10 minutos en volúmenes de 13 ml. Finalmente se recuperó una emulsión de 2 ml de MWCNT-ANA.

3.- Para realizar la inmovilización se utilizaron 15 microlitros de AOx a una concentración de 38 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se homogenizó por medio de un vortex con 60 microlitros de MWCNT-ANA durante 15 minutos. El mismo proceso se realizó con un control con MWCNT sin derivatizar, incubando por 12 horas en ambos casos.

4.- Los 75 microlitros obtenidos en el punto 3, se mezclaron con 15 microlitros de Nafión 115 al 5% en alcoholes de cadena corta, se agitó hasta tener una emulsión homogénea de la cual se tomaron 22 microlitros para cada electrodo, se dejaron secar protegiéndolos de la luz. Una vez secos se guardaron en solución amortiguadora de fosfatos a 100 mM en pH 7.5 manteniéndolos a una temperatura de 4°C.

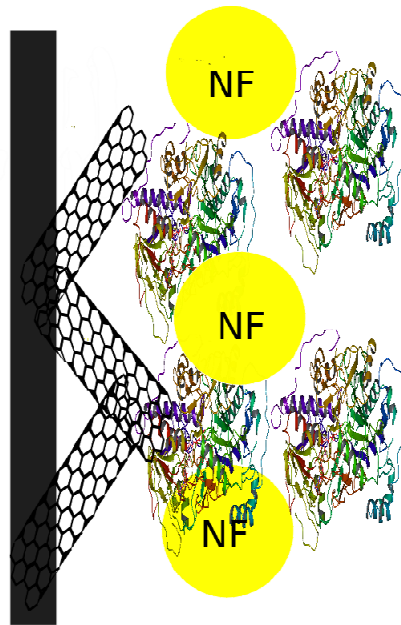


Figura 24. Representación del electrodo con AOx inmovilizada usando Nafión y MWCNT.

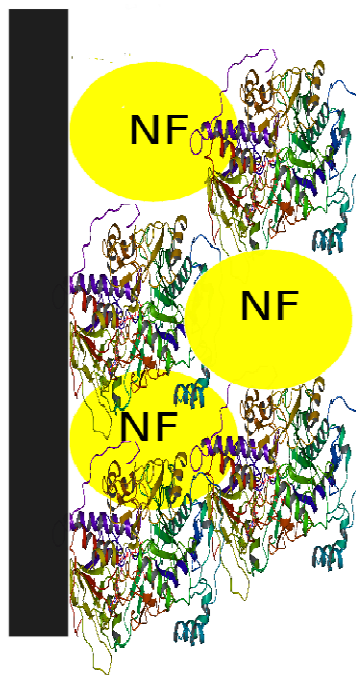


Figura 25. Representación del electrodo con AOx inmovilizada usando Nafión.

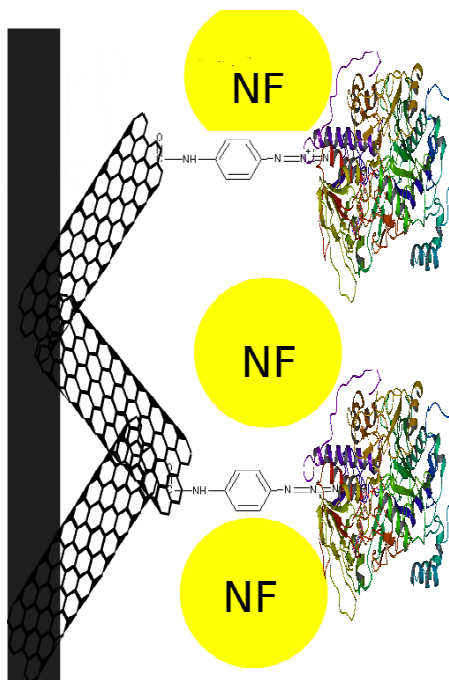


Figura 26. Representación del electrodo AOx inmovilizada usando Nafion y MWCNT derivatizados con 4-azidoanilina.

7.4.3 INMOVILIZACIÓN DE LACASA SOBRE GRAFITO.

Para el electrodo de lacasa se usó el procedimiento descrito por (Martínez-Ortiz *et al.*, 2011), disolviendo 180 mg de AEBA en 10 mL de hidróxido de sodio 0.2 M, con la finalidad de desproteger el grupo amino del AEBA. El AEBA se extrajo con 1.5 mL de tolueno y se añadió a 3 mL de THF. El electrodo de grafito 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 con 10 mL de metanol, acetona y THF absolutos, finalmente se lavan con agua destilada. Todo el proceso se realiza en atmósfera de nitrógeno. Una vez modificadas las láminas de grafito, se incubaron durante 4 horas en 1 mL de solución amortiguadora MES 50mM (pH 5) que contenía 10 µL de solución de lacasa (528 U/mg) y 5 mg/mL de EDC. Luego los electrodos se lavaron en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM (pH 6), almacenándose en esta solución a 4 °C hasta su uso.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

8.1 DESFLAVINIZACIÓN DE AOx CON β -MERCAPTOETANOL Y RECONSTITUCIÓN DE APO-AOx CON FAD.

Como se describió en las secciones anteriores de este trabajo, se busca obtener apo-AOx con la finalidad de realizar la reconstitución de la enzima en solución y posteriormente trasladarla al ensayo en un electrodo de grafito.

Para efectuar los ensayos de desflavinización de AOx, se realizaron incubaciones con distintas concentraciones de β -mercaptoetanol, usando una concentración constante de AOx (10 μ M). De esta forma se buscó encontrar un óptimo de concentración de β -mercaptoetanol, para realizar la desflavinización, y saber si había surtido efecto se realizaron mediciones de actividad residual después de los ensayos. Se determinó que a 1.47 M de β -mercaptoetanol (fig. 27) se había alcanzado un estado en el que la pérdida de actividad era independiente de la concentración de este compuesto. Probablemente las modificaciones en la capa de solvatación alrededor de la proteína han llegado a su límite, de manera que la desflavinización por efectos caotrópicos ya no es el mecanismo relevante. Lo cual ya se ha observado con otras enzimas como con la Triptófano sintasa (Ahmed *et al.*, 1996).

Para poder comparar los resultados se calculó el porcentaje de actividad con respecto a la actividad inicial de la AOx, de modo que sí el porcentaje de actividad baja la enzima se está desflavinizando. Debido a la alta actividad residual, aproximadamente de un 70%, a 2.3 M de β -mercaptoetanol, se decidió proceder con los ensayos de reconstitución partiendo de la premisa de que la apo-enzima producida sería más apropiada para reconstitución, de tal manera que sí el tratamiento funciona se espera aumentar el porcentaje de actividad residual de manera que se restaure las unidades originales de actividad.

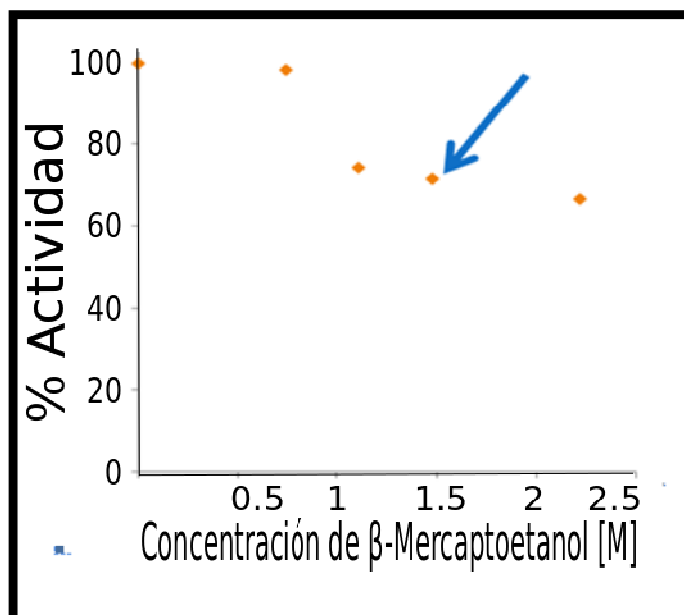


Figura 27. Actividad residual obtenida después de los ensayos de desflavinización con diferentes concentraciones de β -Mercaptoetanol.

Después de seleccionar la concentración de β -mercaptoetanol, se evaluaron distintas concentraciones de AOx: 10, 5 y 3 μ M (fig. 28), las concentraciones diluidas de enzima permiten evitar la agregación y esto podría servir para observar reactivación. Para poder comparar la reactivación, todo se calculó en función de la actividad específica. Posteriormente, se incubó la apo-AOx con 10 veces más FAD (100, 50 y 30 μ M).

Tomando en cuenta las desviaciones estándar encontradas con las concentraciones de 10, 5 y 3 μ M de AOx, se puede concluir que en ninguno de los casos se encontró evidencia de recuperación de actividad (fig. 28). Por lo cual, se sugiere que la inactivación fue independiente de la concentración de enzima. De forma que además la enzima inactivada fue incapaz de recuperar su actividad. Sin embargo no queda claro si la inactivación fue por desflavinización o por algún mecanismo de desactivación catalítica.

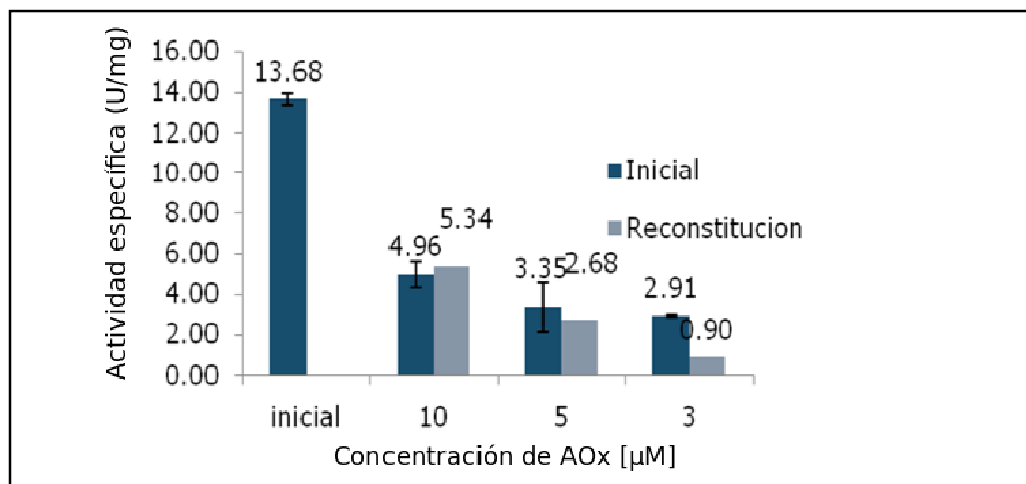


Figura 28. Actividad residual después del ensayo con β -mercaptoetanol, tratamientos de reconstitución con 10 veces más FAD y estabilizantes.

En la búsqueda de reactivar la apo-AOx producida se optó por utilizar estabilizantes o aditivos que favorecieran el replegamiento de la enzima, basados en los reportes de Azevedo, para evitar la desnaturalización por temperatura (Azevedo *et al.*, 2005).

Se probaron tres estabilizantes diferentes: PEG al 0.01%, lactosa 50 mM y sacarosa 500 mM (fig. 29). A pesar de probar distintos estabilizantes, no se observó reactivación. De hecho se vio pérdida de actividad después del paso de diálisis, ya que después de la diálisis la actividad específica era del 38% con respecto al inicial y después de las reconstituciones con aditivos estas decrecieron a aproximadamente el 22% para los tres tratamientos.

Ninguno de los aditivos tuvo un efecto positivo sobre la recuperación de actividad, en los tres se observó prácticamente el mismo valor de actividad específica, siendo en promedio 42% menor que el control (sólo dializado). Lo que indicaba una aparente irreversibilidad, debido al método de obtención de apo-enzima con β -mercaptoetanol, por lo que la reconstitución no es viable sin apo-enzima que permita ser reconstituida. Aparentemente el método debía funcionar, de acuerdo a lo reportado por Kumar y Goswami (2009). Es de resaltar que la AOx de *Aspergillus terreus* presenta una estructura multimérica y es también una lipo-proteína rodeada de ácidos grasos (Kumar y Goswami, 2008), en consecuencia el fenómeno de estabilización de la proteína puede ser diferente al de la AOx de *Pichia pastoris*.

Hasta el momento este ensayo solo ha resultado para la AOx de *Aspergillus terreus*.

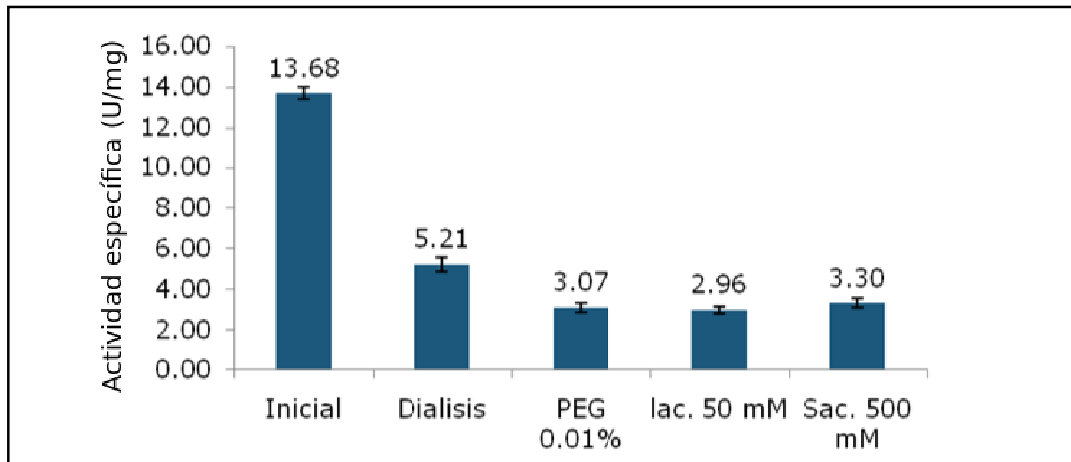


Figura 29. Ensayo de reconstitución con estabilizantes después de usar β -mercaptoetanol para reconstitución.

8.2 RESULTADOS DE DESFLAVINIZACIÓN/RECONSTITUCIÓN CON ENSAYO A pH ÁCIDO.

A partir de los resultados reportados en la sección anterior y tomando en cuenta las diferencias con la AOx de *P. pastoris* y la AOx de *A. terreus*. Se decidió buscar un ensayo con una enzima que tuviera más similitudes con la AOx de *P. pastoris*. Se optó por ensayar con la glucosa oxidasa (GOx) la cual comparte una similitud por secuencia de aminoácidos de un 40% con la AOx (Boteva, *et al.*, 2001). La GOx puede ser desflavinizada modificando el medio a un pH ácido, obteniendo apoenzima inactiva que puede ser reconstituida con FAD rápidamente de acuerdo a lo reportado por Swoboda (1969).

En este estudio se empleó FAD 2 mM contra 10 μ M de enzima, usando esta relación se observó recuperación de actividad. Se midió la actividad después de 15, 60 y 120 minutos, observándose en 120 minutos la mayor recuperación de actividad con un 1% (fig. 30).

Las proporciones de incubación de FAD/apo-AOx pudo haber sido un factor benéfico en el proceso de reconstitución, sin embargo el 1% de actividad recuperada fue muy bajo (fig. 30) además de que el tiempo de incubación fue muy largo si lo comparamos con las reconstituciones de GOx, lo cual indica que no es recomendado utilizar este sistema en un

electrodo. Es probable que el proceso de plegamiento de los monómeros de AOx sobre el FAD, sea un proceso que requiera el apoyo de otros factores (p. ej. proteínas chaperonas), que ayuden al replegamiento de la apo-enzima sobre el cofactor.

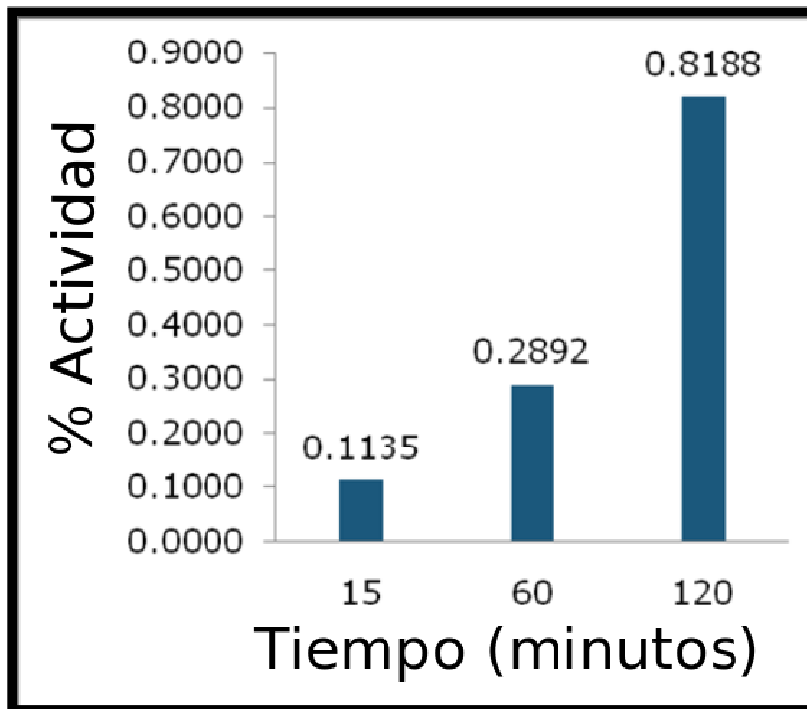


Figura 30. Ensayo de reconstitución con tratamiento en pH ácido, las incubaciones se realizaron con una proporción 1 mol de AOx por 200 de FAD monitoreando la actividad en 15, 60 y 120 minutos.

Después de varias pruebas en las que no se observaron reactivaciones por encima del 1%, se tomó la decisión de hacer un estudio de dicroísmo circular de la AOx, tomando en cuenta la información disponible para la GOx, la cual mantiene inalterada su estructura secundaria a pH 1.7. Esto hace que la desnaturalización en estas condiciones no sea severa (Khatun Haq *et al.*, 2003) y el plegamiento de la proteína se mantenga para su posterior reconstitución en solución o en electrodo.

Se realizó el estudio de dicroísmo circular (fig. 31), con el cual se confirmó que la estructura secundaria de la AOx se ve seriamente afectada, ya que se pierden algunas α hélices que puede ser importante para poder acoplarse a su cofactor. La holo-AOx en pH 7.5 en 30% de glicerol posee más estructura de α hélice, que la apo-AOx a pH 1.7 en 30% de glicerol.

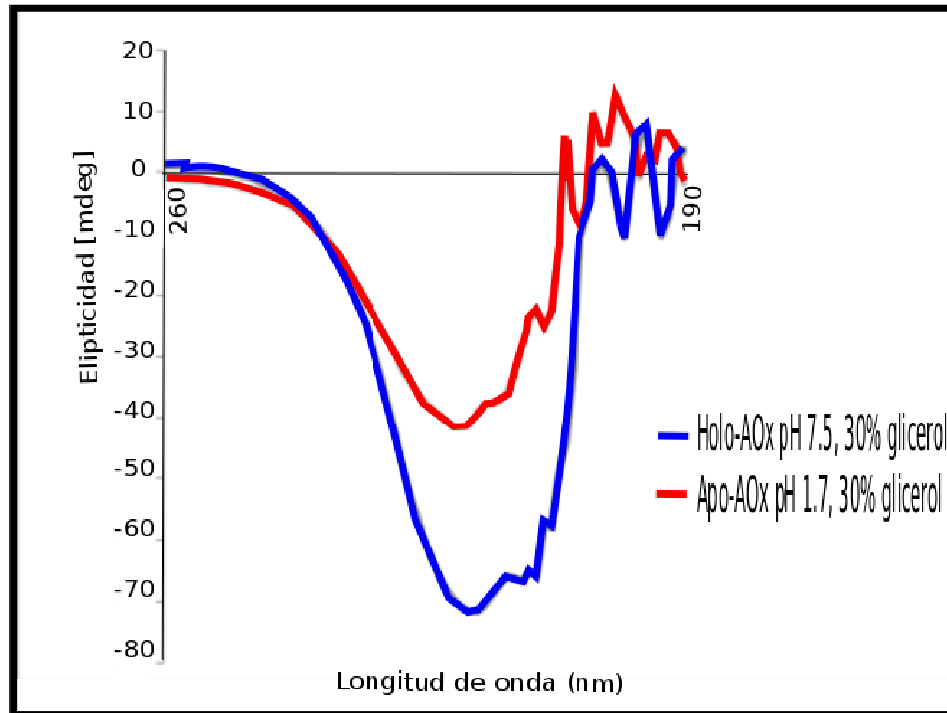
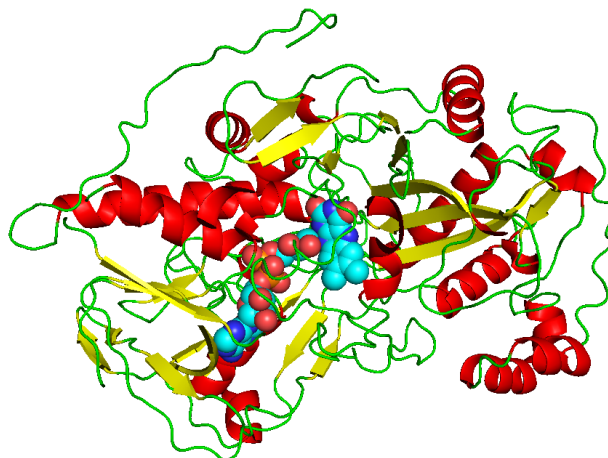


Figura 31. Dicroísmo circular de AOx a pH 7.5 y pH 1.7 en 30% glicerol.

Anteriormente, Zlateva *et al.* (2001) generaron un modelo de la AOx por homología con la GOx donde se determina que las α hélices son importantes para la unión del cofactor. De igual manera el modelo obtenido por I-TASSER muestra α hélices importantes para la unión del FAD.

Figura 32. Modelo de monómero de AOx con FAD embebido rodeado de α hélices que estabilizan la unión (el modelo fue obtenido por el software I-TASSER)



Se concluye que la reconstitución con la apo-enzima obtenida por medio del método de ensayo ácido no es viable, esto también indica que existen diferencias profundas entre esta enzima y las otras enzimas de la familia GMC.

8.3 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LOS MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE APO-AOx Y DE LOS ENSAYOS DE RECONSTITUCIÓN.

Se aplicaron distintos tratamientos para alcanzar la desflavinización de la AOx y posteriormente se buscó la reconstitución las apo-AOx obtenidas de cada ensayo. En la tabla 3 se muestran los tratamientos aplicados durante el desarrollo de esta tesis así como otros trabajos previos reportados en la literatura. Si bien los ensayos realizados con la AOx para obtener apo-AOx y lograr reconstituir su actividad han sido muchos, hasta el momento sólo el ensayo de Mincey (1980) parece haberlo logrado la obtención de apo-AOx reconstituible por medio de desnaturalización con KBr y urea.

En este trabajo, los ensayos con KBr y urea no permitieron obtener apo-AOx activa, además de que el método empleado no proporcionó mayor información, excepto que la enzima pierde prácticamente un 100% de la actividad, probablemente porque la desnaturalización es total. Esto difiere de lo reportado por Mincey *et al* en 1980 quien logró reconstituirla en columna usando 2 mM de FAD, en el caso del presente trabajo se intentó reconstituir la apo-AOx con relaciones 1/10 de AOx contra FAD, aún así no se observó reconstitución.

De igual manera los resultados (descritos anteriormente) con los ensayos en β -mercaptoetanol y 30% glicerol a pH 1.7, no permitieron la obtención de apo-AOx que posteriormente fuese reconstituida. Aparte de Mincey *et al* (1980), hasta el momento nadie más ha reportado la reconstitución de AOx.

Tabla 3. Comparación de diversos estudios realizados sobre la AOx para producción de apo-enzima y su subsecuente ensayo de reconstitución.

AGENTE CAOTRÓPICO	CONDICIONES DE RECONSTITUCIÓN (en amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.5)	OBSERVACIONES	REFERENCIA
KCN 6 mM con 80% glicerol	5 mM de FAD 47 µM de AOx AOx/FAD 1:100	Sin KCN los monómeros se oligomerizan espontáneamente	(Evers, <i>et al.</i> 1995)
Dimetil sulfoxido al 50%	6 µM de AOx pH 7.5 (No reportan relación de FAD)	Se observa pérdida de la estructura secundaria del monómero	(Visser, <i>et al.</i> 2007)
KCN 6 mM	No reportan	Disociación <i>in vivo</i> del FAD de los monómeros no se observa reasociación con el FAD	(Van Der Klei <i>et al.</i> 1991)
Urea 6M y KBr 3.5 M	2 mM FAD (en columna) 55 µM AOx AOx/FAD 1:36	50% actividad (no hay más evidencia que soporte el dato)	(Mincey <i>et al.</i> 1980)
β-mercaptoetanol 0.74M	100 µM FAD 10 µM AOx/FAD 1:10 pH 7.5	20%-50% AOx <i>Aspergillus terreus</i>	(Kumar y Goswami 2009)
β-mercaptoetanol 1.47 M	0.1 y 1 mM FAD 10 µM AOx AOx/FAD 1:10 AOx/FAD 1:100	No se observa recuperación de la actividad	En este estudio
pH 1.7 glicerol 30%	AOx/FAD 1:10 AOx/FAD 1:100 AOx/FAD 1:1000 pH 7.5	Se observa para la relación 1:1000 el 1% de actividad	En este estudio
Urea 6M y KBr 3.5 M	2 mM FAD (en columna) (100-500 µM AOx) AOx/FAD 1:20 pH 7.5	No se observa recuperación de la actividad	En este estudio

8.4 ESTUDIO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA AOx Y LA MOLÉCULA DE 4-AZIDOANILINA.

Se decidió realizar un estudio espectrofotométrico de la AOx con 4-azidoanilina para elucidar si la AOx tiene afinidad a esta molécula, de manera similar a la que presenta con la azida de sodio. Además, se decidió evaluar el grado de asociación del ligando 4-azidoanilina con la AOx.

El ensayo de afinidad se practicó con 5 μ M de AOx (calculó en base al monómero) utilizando concentraciones de 0 a 47 mM de 4-azidoanilina e incubándola con AOx por 12 horas. Los espectros de la fig 32.1 muestran el aumento de la absorbancia en la medida que se la AOx se incubó con mayores concentraciones de 4-azidoanilina. Se eligió la absorbancia a 450 nm para seguir la formación del complejo de la 4-azidoanilina con la AOx y a los espectros de la fig. 33.1 se les resto los espectros de la 4-azidoanilina sin AOx.

En la fig. 33.2, se presenta el gráfico con los valores de absorbancia a 450 nm, las absorbancias de la curva muestran un claro comportamiento asintótico con respecto a las concentraciones de 4-azidoanilina usadas en las incubaciones, se obtuvo una constante de disociación K_d de 17.3 ± 4.8 mM por medio de un ajuste tipo Michaelis, lo que sugiere que la afinidad por este ligando es baja, sin embargo este es valor es similar al que se calculó con los datos de Hopkins 1984, el cual correspondía a 47.5 mM. Estos valores son 17 y 47 veces más grandes que los correspondientes al metanol, por lo que la 4-azidoanilina y la azida no son sustratos de la AOx ya que la afinidad de la AOx por estos es muy baja, en todo caso estas moléculas son ligandos que se unen de forma no competitiva al sitio activo de la enzima.

Estos resultados sugieren que la 4-azidoanilina puede ser utilizada para orientar la AOx sin correr el riesgo de que desactive o inhiba su actividad, el ligando natural azida de sodio es un inhibidor de tipo no-competitivo de la enzima (Hopkins y Muller, 1987), esperamos que la baja afinidad observada sirva para orientar la enzima de cara al electrodo y aún permita la entrada del sustrato (metanol o etanol) al sitio activo para poder ser oxidado. La elucidación de la interacción de la 4-azidoanilina requerirá de más estudios como la cristalización de la enzima con el ligando para entender con que parte de la molécula del FAD interactúa.

Recientemente el grupo de Goswami desarrolló una estrategia similar, en su caso ellos desplegaron parcialmente con microondas a la AOx y e

inisteraron la molécula de Ferroceno. Esto les ha permitido aumentar en un 30% la actividad de la AOX con respecto a la AOX sin modificar y lo han usado para un sensor acoplado con peroxidasa de rábano (Chinnadayala, *et al.*, 2014).

De manera que el siguiente paso es probar el ligando 4-azdioanilina en un electrodo inmovilizando la AOX. Se busca ratificar que la AOX quedé orientada de cara al electrodo, oxide su sustrato (metanol, etanol o algún otro alcohol de cadena corta) y que la orientación permita una transferencia directa de electrones al electrodo.

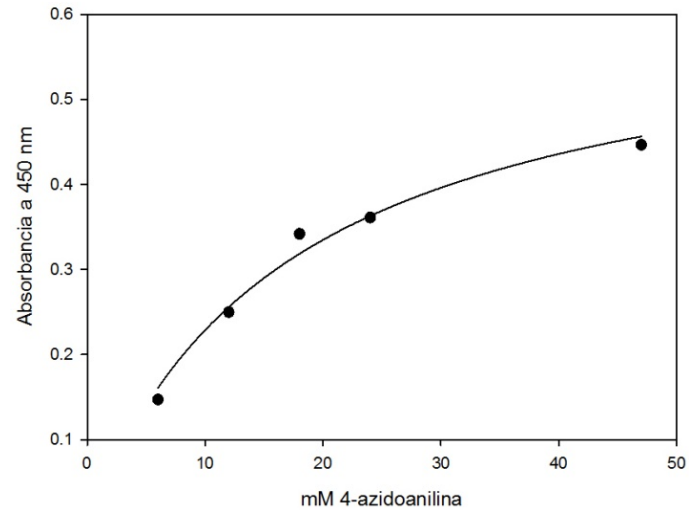
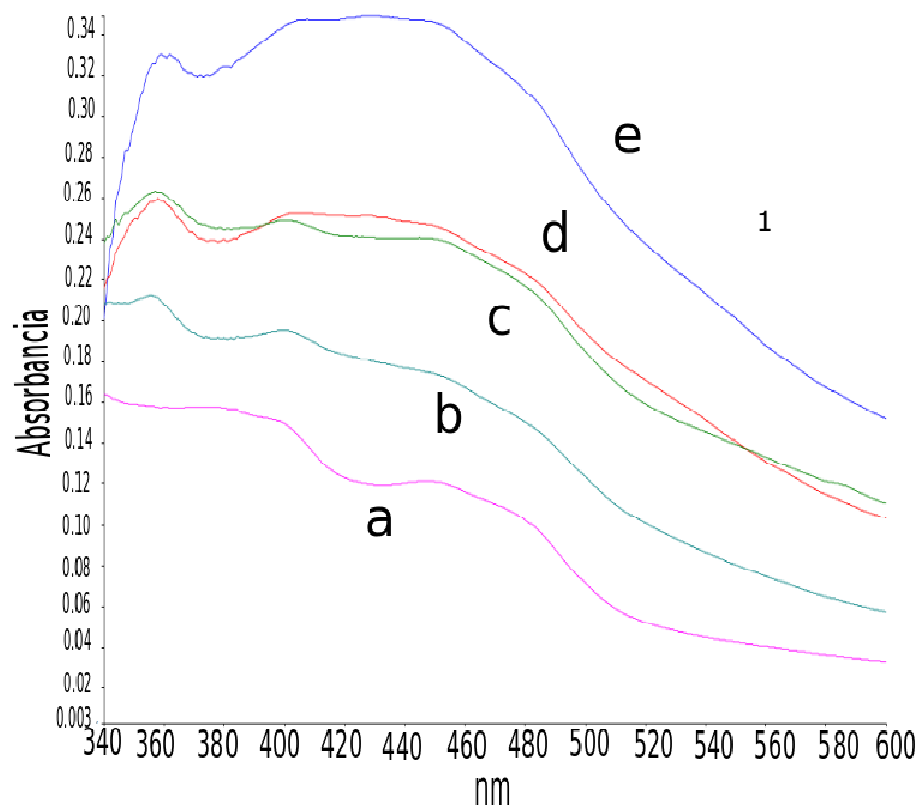


Figura 33.1. (A) Espectros de absorción de AOX con distintas concentraciones de 4-azidoanilina (mM): (a) 0, (b) 6, (c) 12, (d) 23 y (e) 47.

Figura 33.2. (B) Curva de ajuste tipo Michaelis-Menten para los datos de los espectros con 4-azidoanilina tomando la absorbancia a 450 nm.

8.5 CARACTERIZACIÓN DE 4-AZIDOANILINA POR VOLTAETRÍA CICLÍCA.

Se decidió inmovilizar covalentemente a la molécula de 4-azidoanilina a un electrodo de grafito, como se explicó en la sección de materiales y métodos. Para evaluar el electrodo funcionalizado se procedió con voltametrías cíclicas a 50 mV s^{-1} en amortiguador de fosfatos 100 mM a $\text{pH } 7.5$. Todo esto con la finalidad de saber si la molécula de 4-azidoanilina posee un pico redox distintivo.

Los resultados de las voltametrías revelaron un comportamiento que no fue estable, ya que hubo decaimiento de 15 mA/cm^2 (fig. 33 sección A) a 5 mA/cm^2 (fig. 33 sección b). Es probable que esto se haya debido a la fotosensibilidad de la molécula (Park *et al.*, 2013), lo que hace que el comportamiento de esta decaiga después de las mediciones. En la fig. 34 se observa que la molécula es poco estable en el electrodo, ya que varían las lecturas que se obtuvieron en distintas voltametrías, pero hay una activación que eleva las corrientes en el orden de mA/cm^2 . Se hicieron pruebas para corroborar la reactividad de esta molécula ante el etanol y metanol, pero no se encontró oxidación (estos gráficos no se muestran en este documento).

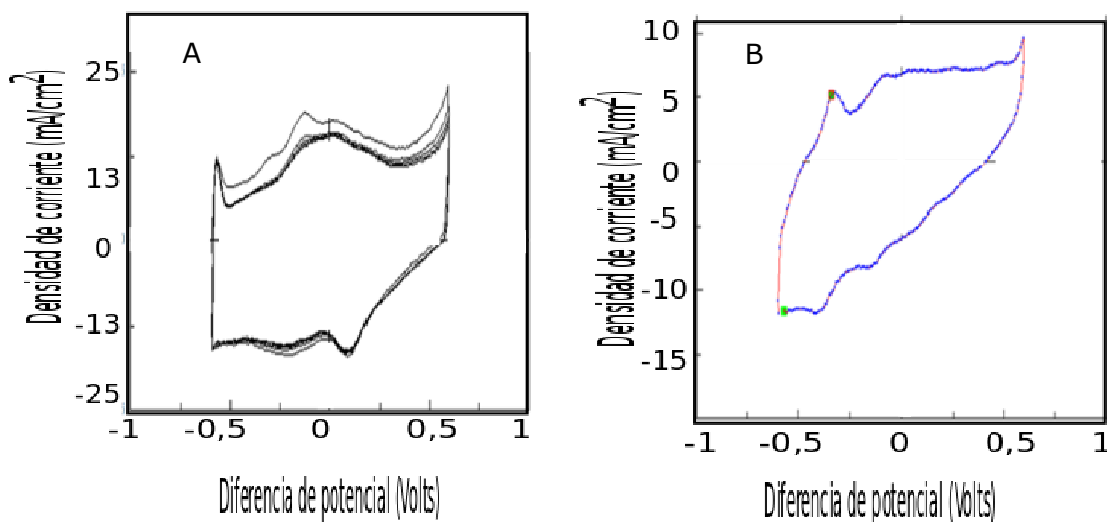


Figura 34. Voltametrías cíclicas con 4-azidoanilina. En la curva A el comportamiento de un electrodo después de 1 ciclo. Curva B después de 80 ciclos el comportamiento es similar pero ningún pico es perceptible al adicionar alcoholes de cadena corta.

En los electrodos de grafito no se observó reacción con el metanol ni con el etanol, el pico de oxidación de la 4-azidoanilina se caracterizó por ser un inestable, lo cual no es del todo raro debido a la reactividad de la molécula.

8.6 EVALUACIÓN DEL CONTATO ELÉCTRICO ENTRE LA AOx Y ELECTRODO CON 4-AZIDOANILINA POR MEDIO DE VOLTAMETRÍA CÍCLICA.

Después de haber evaluado la 4-azidoanilina por voltametría, se realizó la inmovilización de la AOx en los electrodos de grafito funcionalizados con 4-azidoanilina. En la fig. 34 se presentan los resultados que se obtuvieron al evaluar los electrodos con 4-azidoanilina+AOx (el procedimiento de inmovilización se indica en la sección de materiales y métodos), mediante voltametrías a 50 mVs^{-1} en solución amortiguadora de fosfatos, con $100 \mu\text{M}$ de metanol y en atmósfera de N_2 .

Se observó una respuesta debido al aumento de los picos de oxidación y reducción en presencia de $100 \mu\text{M}$ de metanol, el pico es distinguible a 100 mV vs. SCE , la existencia de el pico de oxidación-reducción indica un par reversible.

En la fig. 35 se muestra un aumento en la densidad de corriente de 10 mA/cm^2 en la curva en presencia de metanol $100 \mu\text{M}$ con respecto a la curva con amortiguador de fosfatos, esto indica que el electrodo es activo en presencia de metanol, el cual es el sustrato con el que la AOx es más activa. Es relevante señalar que estos experimentos se realizaron en atmósfera de N_2 , por lo que el aumento en las curvas es debido a una transferencia directa de electrones de la AOx al electrodo y no por la presencia de alguna otra especie oxidante producto de la actividad de la AOx inmovilizada.

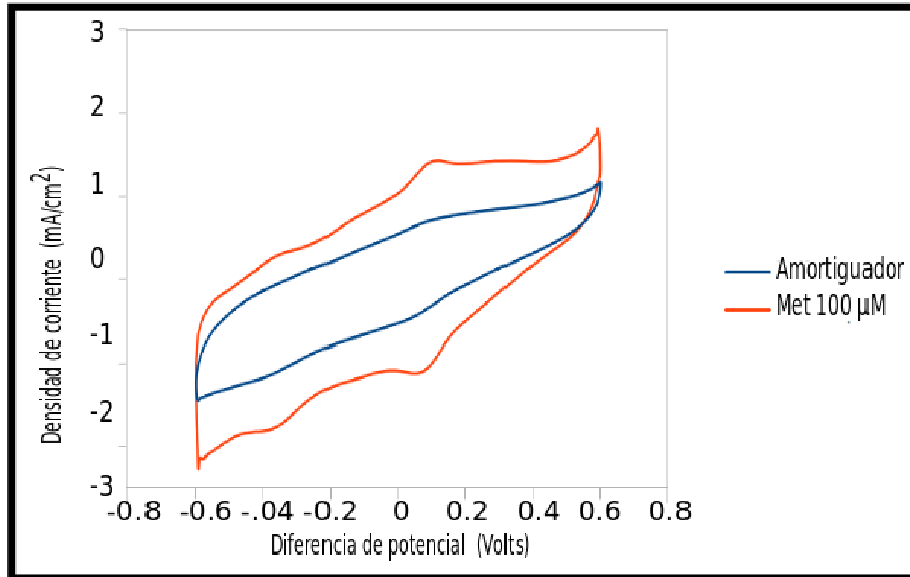


Figura 35. Gráfico de la Voltametría de un electrodo de AOX+4-azidoanilina, en amortiguador de fosfatos 100 mM a pH 7.5 y en presencia de 100 μ M de metanol.

Este efecto se ratificó utilizando distintas concentraciones de metanol y cuantificando el aumento en la corriente producida. Se usaron concentraciones de 0 a 1 mM de metanol, observándose nuevamente el aumento de corriente en la región de 0 a 100 mV vs. SCE. En este caso se observó que el aumento de la corriente no es proporcional con el incremento en la concentración de metanol. El efecto es más notorio, si se toma en cuenta la línea base (azul), sin metanol, hasta 1 mM de metanol (verde) (fig. 36).

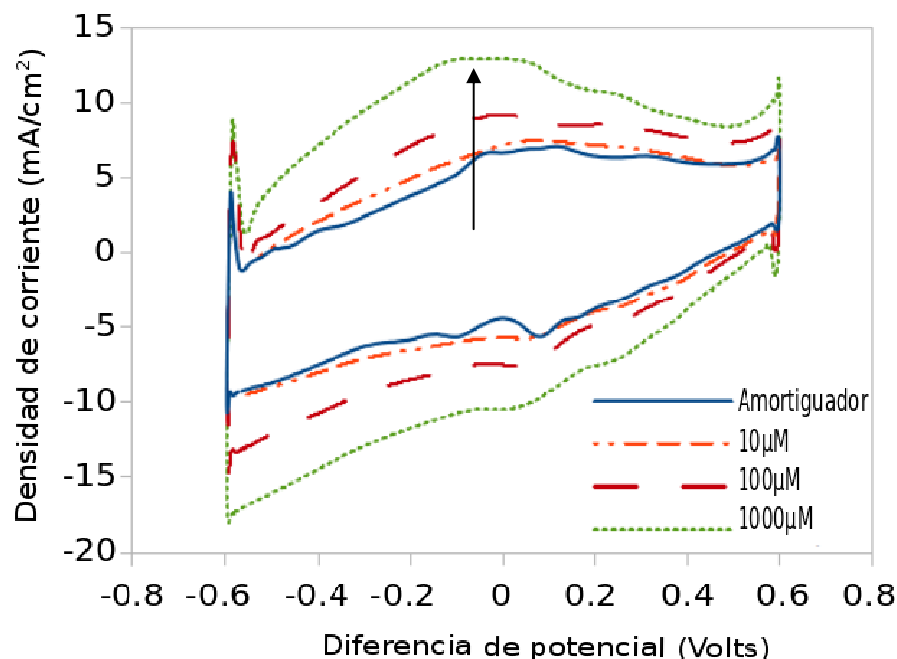


Figura 36. Gráfico de las voltametrías realizadas en el electrodo de AOx+4-azidoanilina con concentraciones crecientes de metanol.

El pico de óxido-reducción alrededor de los 100 mV vs. SCE era esperado, ya que la ADH-PQQ oxida los alcoholes de cadena corta en ese potencial (Aquino Neto *et al.*, 2013) y la AOx inmovilizada en nanotubos sobre un soporte de oro muestra un pico reversible a 200 mV vs. SCE (Das y Goswami, 2013). Sin embargo, no se pudo probar concentraciones mayores debido a que el electrodo no genera más corriente cuando se le agrega más metanol.

Uno de los problemas de esta estrategia de inmovilización es la incubación de la 4-azidoanilina, la cual se práctica directamente en el electrodo, lo cual puede dar lugar a una adsorción inespecífica, además de que no permite observar los picos de forma reproducible, por lo que se necesita controlar de otra manera la cantidad de ligando inmovilizado en la superficie. Los problemas de adsorción y poco control sobre la cantidad de ligando inmovilizado derivan en problemas en la transferencia de electrones entre la enzima y el electrodo, ya que lo que se buscaba es que la enzima reconociera al ligando y se orientara de cara al electrodo, pero esto no está ocurriendo de forma reproducible.

Además es probable que no todas las moléculas de 4-azidoanilina en el electrodo estén disponibles espacialmente para que la AOx reconozca al ligando, ya que es posible que el FAD se encuentre sumamente

embebido en la proteína como se mostró en el modelo del monómero de AOx obtenido por I-Tasser en la sección de antecedentes.

Los estudios electroquímicos previos a este trabajo validan el hecho de que se necesita contactar físicamente el FAD en la AOx con nanotubos de carbono (Das y Goswami, 2013).

La estrategia de inmovilizar la AOx en nanotubos de carbono multicapa (MWCNT) puede representar una alternativa que permita reproducir de forma constante los resultados mostrados anteriormente, ya que por sus propiedades conductivas pueden mejorar la transferencia de electrones. Además, si el material es derivatizado con la 4-azidoanilina la enzima puede reconocerlo y de esta manera se facilite la transferencia de electrones del sitio activo al electrodo.

8.7 TRANSFERENCIA DIRECTA DE LA AOx AL ELECTRODO CON NANOTUBOS MODIFICADOS CON 4-AZIDOANILINA.

En la fig. 37, se reportan los gráficos de las voltametrías correspondientes a: la AOx orientada sobre la 4-azidoanilina en MWCNT con nafión (AOx-MWCNT-ANA-Nf) (rojo), la AOx adsorbida sólo con nafión en el electrodo de grafito (AOx-Nf) (azul), la AOx con MWCNT y nafión (AOx-MWCNT-Nf) (negro) y de la 4-azidoanilina en los MWCNT con nafión (MWCNT-ANA-Nf) (verde). Todos los experimentos fueron realizados en solución amortiguadora de fosfatos 100 mM a pH 7.5. En los párrafos siguientes se describe la respuesta electroquímica de cada uno de los electrodos antes mencionados de acuerdo con lo observado en la fig. 37.

El electrodo AOx-Nf fue utilizado como control para observar los picos redox de la enzima. Este procedimiento se ha hecho antes para otros soportes de carbono (grafito pirolítico, o carbón reticulado) y con enzimas con centros redox más expuestos como la hidrogenasa y la lacasa obteniendo buenos resultados (Krishnan y Armstrong, 2012).

En las voltametrías del electrodo AOx-Nf, se observaron dos picos redox uno a -500 mV y otro a -250 mV vs. SCE, lo cual puede entenderse como dos transferencias de un sólo electrón, de forma típica se espera encontrar una doble transferencia a -500 mV vs. SCE ya que es lo reportado para el FAD libre y para el FAD embebido en enzimas como la GOx. La voltametría de AOx-Nf es similar a simulaciones del FAD en procesos de transferencia de un electrón con dos pares redox (Smith *et al.*, 2003) y a procesos de transferencia de un electrón observados en

semiquinonas estabilizadas por bacterias utilizando FMN como mediador (Okamoto *et al.*, 2013)

Un control más es el electrodo ANA-MWCNT-Nf, el cual tiene una capa de activación alta de hasta 0.009 A, en el acercamiento se distingue un pico de oxidación a -150 mV vs. SCE, el cual, como se mostrará y discutirá más adelante, fue sensible a los alcoholes.

El electrodo AOx-MWCNT-ANA-Nf que contiene la AOx orientada, mostró un pico redox desplazado con respecto al electrodo AOx-Nf a un potencial más positivo de -63 mV vs. SCE, lo que indica que hay un efecto por la presencia de la 4-azidoanilina. Este pico genera más corriente que todos los demás electrodos y es un indicador de que el proceso de orientación de la enzima no muestra tan claramente los dos picos a -250 y -500 mV vs. SCE.

Por otro lado, el electrodo AOx-MWCNT-Nf sin orientación molecular no muestra buena respuesta a la voltametría cíclica. La voltametría AOx-MWCNT-Nf, no alcanzan a mostrar bien su pico de óxido-reducción, esto difiere de lo reportado por Das y Goswami (2013), donde hay un par de redox a 220 mV vs. Ag/AgCl, sin embargo en su caso la matriz era de oro con nanotubos de carbono. La inmovilización reportada aquí se realizó después de que los nanotubos se incubarán por 12 horas con la AOx y es posible que la compatibilidad con estos no sea buena, por lo que no se acercan del todo al centro redox de la AOx.

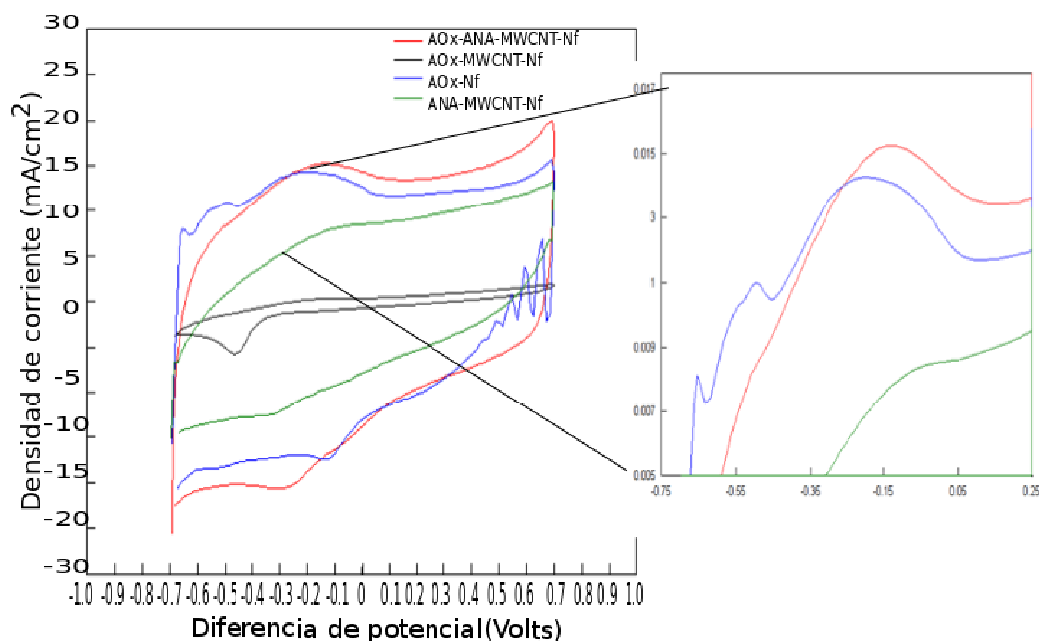


Figura 37. Voltametrías cíclicas de las distintas variantes de electrodos con acercamiento de los picos redox, amortiguador fosfatos 100 mM (pH 7.5) en atmósfera de N_2

Después de haber obtenido las voltametrías de los distintos electrodos, se procedió a agregar metanol a cada uno de los electrodos siguiendo la respuesta en los picos redox identificados previamente. En la fig. 38 se muestra la respuesta del electrodo AOx-MWCNT-Nf, el electrodo presentó poco aumento de corriente con el metanol alimentado, sin embargo hay generación de corriente conforme se aumenta las concentraciones de metanol de 0 a 213 mM de metanol. Es probable que el FAD en la AOx no fuera bien contactado por los nanotubos, debido a que no hay un pico característico, se optó por tomar el potencial de 78 mV vs. SCE como potencial de respuesta, pero se pudo haber usado algún otro pico por encima de 0 volts. Los resultados presentados en la fig. 37 sugieren que aún cuando no hay un par redox distintivo sí hubo oxidación de metanol por la actividad de la AOx, ya que sí hay aumento de la densidad de corriente, de manera que la generación de corriente pudo deberse a procesos de transferencia indirecta de la AOx hacia los nanotubos.

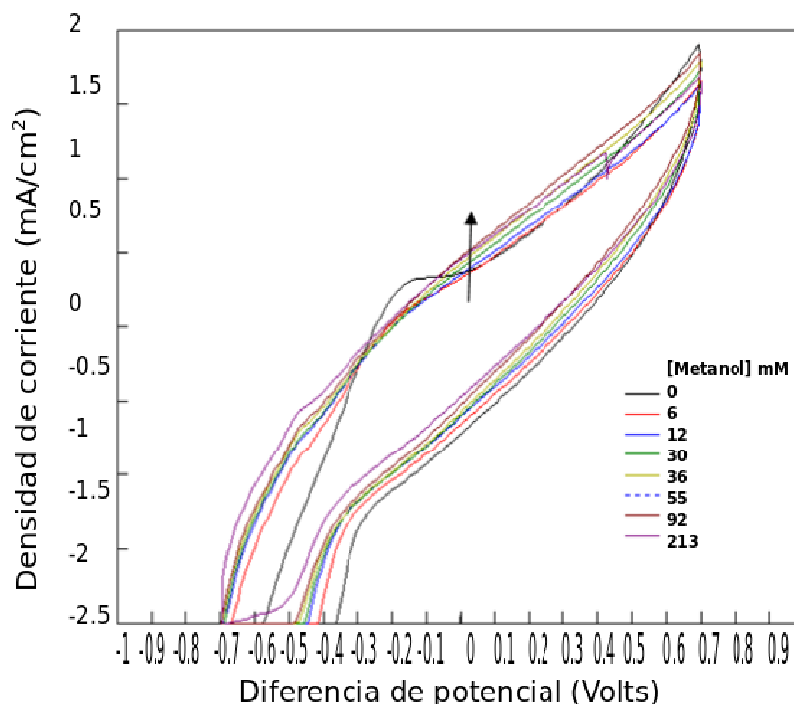


Figura 38. Voltametrías de AOx-MWCNT-Nf con distintas concentraciones de metanol, amortiguador de fosfatos 100 mM (pH 7.5) en atmósfera de N₂.

Para el caso del electrodo ANA-MWCNT-Nf se muestran las voltametrías en la fig. 38. Como puede apreciarse, hubo generación de corriente eléctrica cuando se agregó metanol de forma creciente. El electrodo

poseía un pico de oxidación a 100 mV vs. SCE y se utilizaron concentraciones de 0 a 213 mM de metanol para analizar la respuesta del electrodo.

Las razones detrás de la capacidad oxidativa de la 4-azidoanilina unida covalentemente a los nanotubos de carbono no quedan del todo claras. Sin embargo, es posible que hubiera un tipo de sinergia entre la reactividad de la 4-azidoanilina en los nanotubos donde el nafi3n pudo haber estabilizado a la molécula. Una vez que el electrodo fue polarizado pudieron presentarse mecanismos que permitieran la

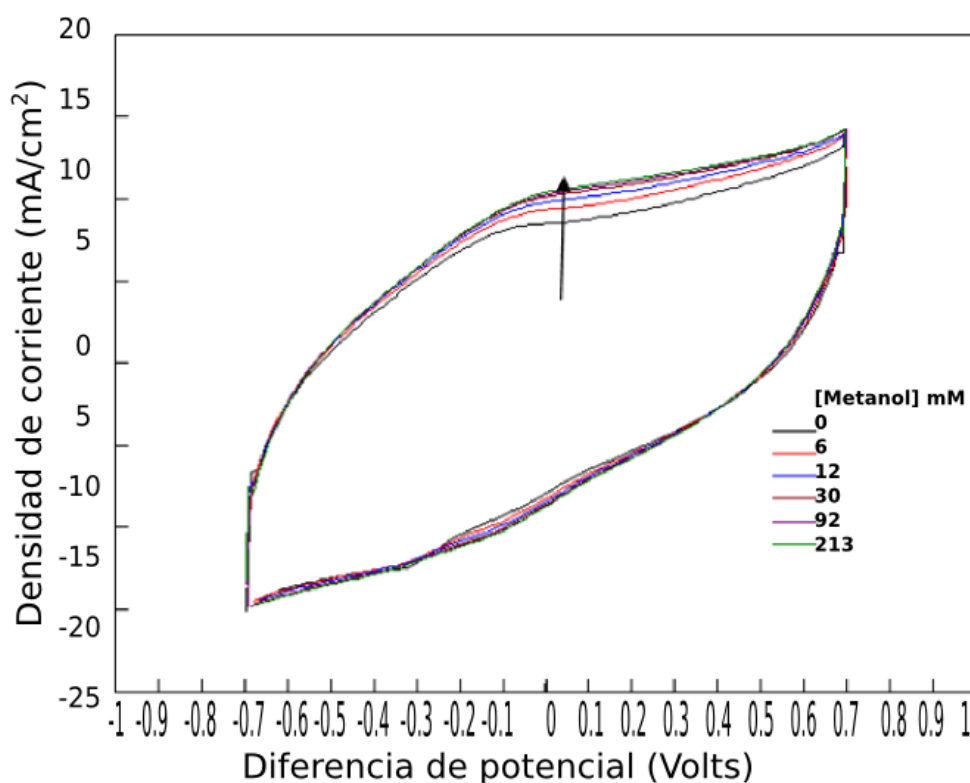


Figura 39. Voltametrías cíclicas de la ANA-MWCNT-Nf con distinta concentraciones de metanol, amortiguador fosfatos 100 mM m a pH 7.5 atmosfera N₂.

El comportamiento del electrodo AOx-MWCNT-ANA-Nf se reporta en la fig. 40. Este electrodo, el cual contiene la AOx orientada sobre la 4-azidoanilina, produjo las corrientes más altas. Se produjeron corrientes de hasta 20 mAcm⁻² y se observó de forma clara el aumento de corriente conforme se incrementó la concentración de metanol con una respuesta eléctrica alta y con un pico máximo a -63 mV vs. SCE. En el acercamiento

de la voltametría se muestra claramente el aumento del pico a -63 mV vs. SCE y un pequeño “hombro” a -550 mV vs. SCE.

A partir de las curvas de la fig. 40 se calculó la cantidad de proteína orientada, en función de la carga en Coulombs considerando una transferencia de 2 electrones en el pico máximo de -63 mV vs. SCE en la solución amortiguadora de fosfatos 100 mM a pH 7.5. Se estimó que la proteína inmovilizada en el electrodo equivale 2.8 nano moles, lo cual supera por 0.8 nano moles a la estimación de 2 nano moles inmovilizados (calculando que los monómeros de AOX son activos) determinados por Bradford de la solución de proteína.

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

Dividiendo la corriente máxima en el pico de -63 mV vs. SCE entre la carga en Coulombs de este pico se obtuvo una estimación de la constante de transferencia K_s que fue de $0.98 \pm 0.15 \text{ s}^{-1}$.

$$K_s = \frac{A_{max}}{Q}$$

Los resultados obtenidos partir de la carga en Coulombs, indican que toda la proteína está orientada sobre el electrodo cuando la matriz de nanotubos es funcionalizada con 4-azidoanilina. Los resultados de Das y Goswami (2013) revelaban que un 80% de la proteína utilizada estaba orientada y que su constante de transferencia de electrones K_s correspondía 1.69 s^{-1} . Por lo que hasta el momento la información obtenida es coherente, más aún si se toma en cuenta que se utilizó un soporte heterogéneo como el grafito SIGRACET. No existen más reportes en los que se calcule la transferencia para la AOX en electrodos por transferencia directa de electrones o la proteína orientada como en el trabajo del grupo de Goswami y el presentado en esta tesis.

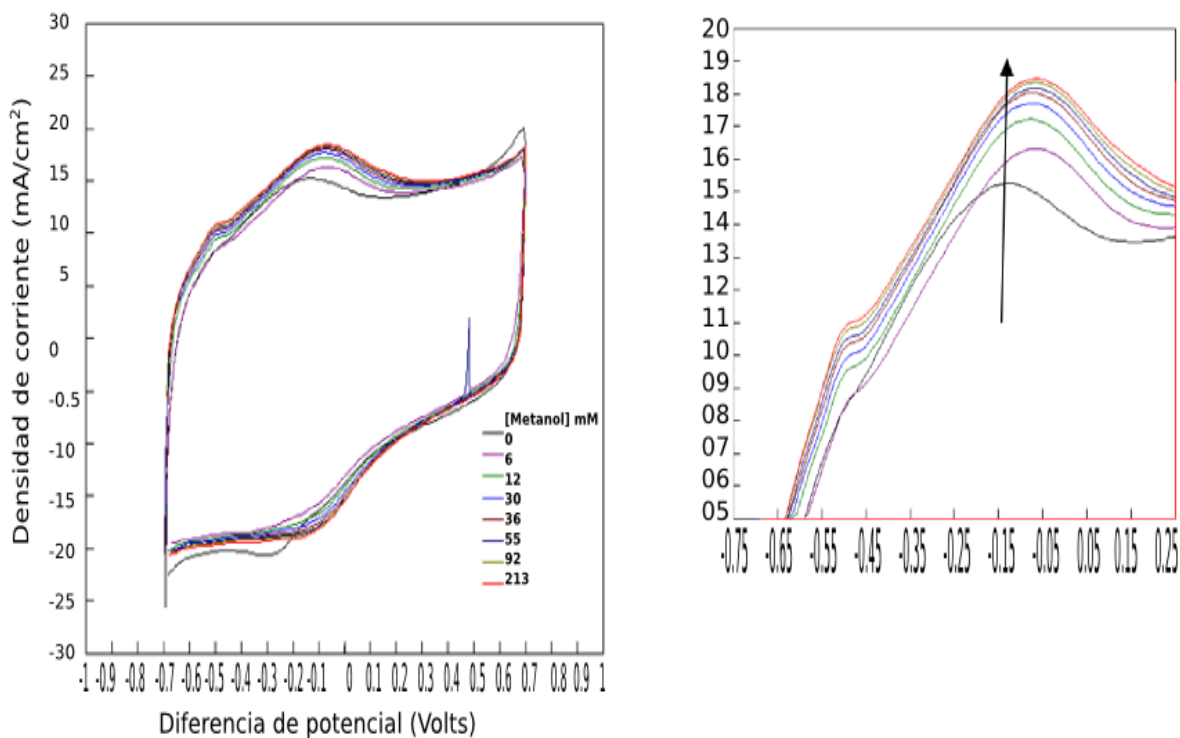


Figura 40. Voltametrías cíclicas de la AOx-ANA-MWCNT-Nf con distinta concentraciones de metanol, solución amortiguadora de fosfatos 100 mM a pH 7.5 atmósfera N₂.

De los resultados de las figs. 38 a 40, se generó la fig. 41, donde puede observarse que el electrodo de AOx-MWCNT-ANA-Nf (azul) es el que produce la mayor respuesta y corriente ante el metanol. Como se mencionó antes, el electrodo AOx-MWCNT-Nf (verde) no poseía un pico de oxidación distinguible, pero la enzima realizó transferencia en los nanotubos, tal como se observa en la figura 41. Por otro lado, la 4-azidoanilina en el electrodo ANA-MWCNT-Nf (rojo) de igual manera produce una respuesta pero no con la intensidad ni sensibilidad del electrodo orientado AOx-MWCNT-ANA-Nf. Las 3 curvas se obtuvieron al restar la corriente eléctrica de fondo producida por los electrodos en solución amortiguadora de fosfatos 100 mM a pH 7.5. De manera tal que la corriente en $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ graficada contra la concentración de metanol, es sólo producto de la actividad de los electrodos sobre el metanol.

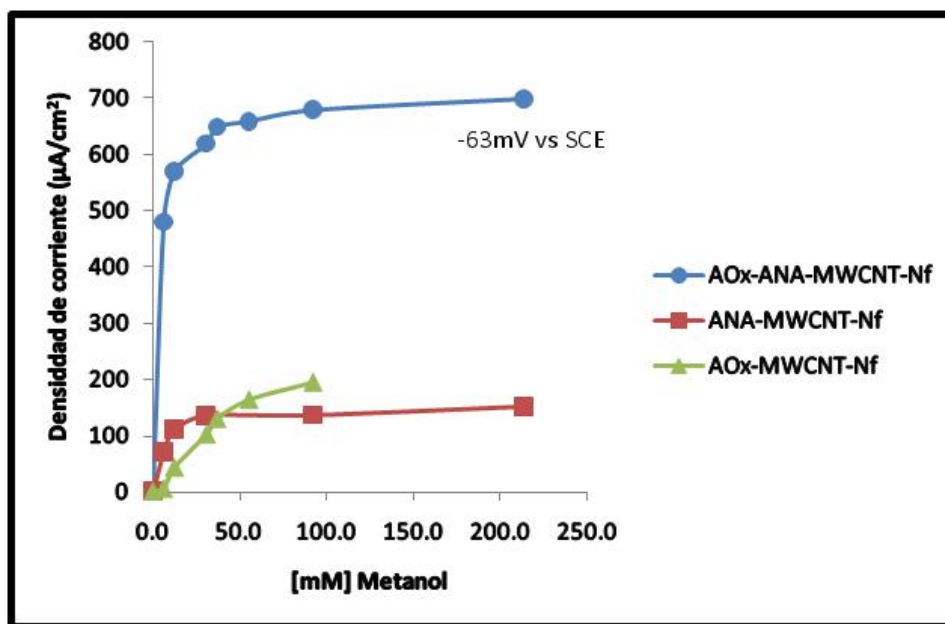


Figura 41. Curvas de saturación de electrodos con nanotubos. Dependiendo de donde se dio el pico redox para cada uno de ellos, a distintas concentraciones de metanol.

En la Tabla 4 se resumen las constantes obtenidas a partir de la figura 40. Se calculó la constante de disociación como K_d , la corriente máxima generada como A_{max} y la sensibilidad como la razón de K_d/A_{max} .

La afinidad del electrodo ANA-MWCNT-Nf por el metanol fue alta de 6 mM, pero la corriente máxima del electrodo fue baja siendo sólo de $150 \mu A cm^{-2}$. Esto contribuyó a que el electrodo tuviera una sensibilidad de $25 \mu A cm^{-2} mM^{-1}$. El electrodo AOx-MWCNT-Nf no es tan sensible al metanol con una K_d de 82.44 mM y una sensibilidad de $5 \mu A cm^{-2} mM^{-1}$, sin embargo el electrodo genera $384 \mu A cm^{-2}$, lo que es más corriente que la generada por el electrodo ANA-MWCNT-Nf (el cual contiene la 4-azidoanilina sin enzima). Por último, el electrodo AOx-MWCNT-ANA-Nf (AOx orientada), produjo la mayor A_{max} con aproximadamente $700 \mu A cm^{-2}$ y la mayor afinidad con 2.9 mM con respecto al metanol, por lo que también fue el más sensible, siendo 10 veces más sensible que ANA-MWCNT-Nf y 50 veces más sensible que AOx-MWCNT-Nf.

Es probable que AOx-MWCNT-Nf no tuviera tanta afinidad por el metanol, debido a la mala orientación de la AOx sobre los nanotubos y que ANA-MWCNT-Nf fuera sensible por la reactividad de la molécula, pero no capaz de generar más corriente debido a que no hay forma de que sostenga la actividad oxidativa sobre el metanol. Por lo que el

electrodo con AOx orientada AOx-MWCNT-ANA-Nf, generará mayor corriente producto de la orientación de la AOx sobre la 4-azidoanilina.

Tabla 4. Parámetros obtenidos de la fig. 31 para los tres electrodos.

	K_d (mM)	A_{max} ($\mu A\ cm^{-2}$)	Sensibilidad ($\mu A\ cm^{-2}\ mM^{-1}$)
AOx-MWCNT-ANA-Nf	2.9	698	243.7
AOx-MWCNT-Nf	82.4	384	4.7
ANA-MWCNT-Nf	6.0	150	25

8.8 CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE ALCOHOLES DE CADENA CORTA CON ELECTRODO DE AOx-4AZIDOANILINA.

A partir de los resultados obtenidos en las voltametrías anteriores, se decidió evaluar la actividad de la AOx en los electrodos del tipo AOx-MWCNT-ANA-Nf con metanol y etanol.

La curva de ajuste representativa de AOx-MWCNT-ANA-Nf (fig. 41) con etanol alimentado, en concentraciones crecientes. Los datos se obtuvieron por el pico de -63 mV vs. SCE en voltametrías a $50\ mVs^{-1}$.

A 60 mM de etanol el electrodo ya ha alcanzado la saturación con una corriente máxima de saturación de $897.5 \pm 60.9\ \mu A/cm^2$. La constante de disociación (K_d) calculada a partir del ajuste es de $6.6 \pm 1.8\ mM$.

Estos resultados son consistentes con el electrodo de AOx reportado por (Barsan y Brett, 2008), el cual se reporta una K_d de 2 mM para el etanol. Lo que indica que el electrodo reportado en esta tesis tiene una buena afinidad por el etanol y puede servir como bio-sensor, además de tener aplicaciones de generación de corriente eléctrica en una celda enzimática.

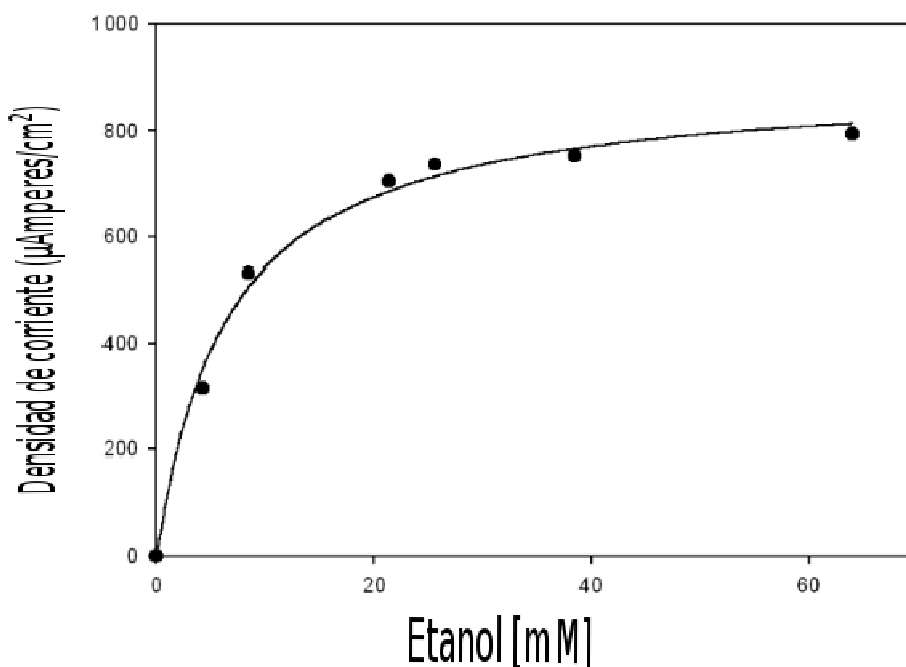


Figura 42. Ajuste de la respuesta de AOX-ANA-MWCNT-Nf con distintas concentraciones de etanol, solución amortiguadora de fosfatos 100 mM a pH 7.5 atmósfera N₂.

De la misma manera que para el etanol, se realizó el ajuste de las curvas de respuesta de los datos obtenidos por voltametría cíclica del electrodo AOX-ANA_MWCNT-Nf con metanol utilizando voltametrías a 50 mV s⁻¹. La fig. 43 corresponde al ajuste del electrodo AOX-ANA_MWCNT-Nf alimentado con metanol como sustrato en donde puede observarse que antes de 50 mM el electrodo comienza a saturarse. Las constantes obtenidas a partir del ajuste, es una constante de disociación K_d de 4.9 ±1.4 mM y una A_{max} de 667 ±32 µAmperes/cm².

No existen datos reportados para la AOX inmovilizada en un electrodo para convertir metanol a formaldehído. Sin embargo, el metanol y etanol en una aplicación como una celda no serían tan fácilmente indistinguibles para la enzima como sustratos, ya que el electrodo puede oxidar ambos sustrato.

Por otro lado, si la aplicación es desarrollar un sensor, las curvas son diferentes pero sería difícil distinguir entre una mezcla de ambos sustratos y evidencian la similitud que hay entre los dos sustratos, lo que indica que el electrodo puede ser usado indistintamente para oxidar metanol y/o etanol.

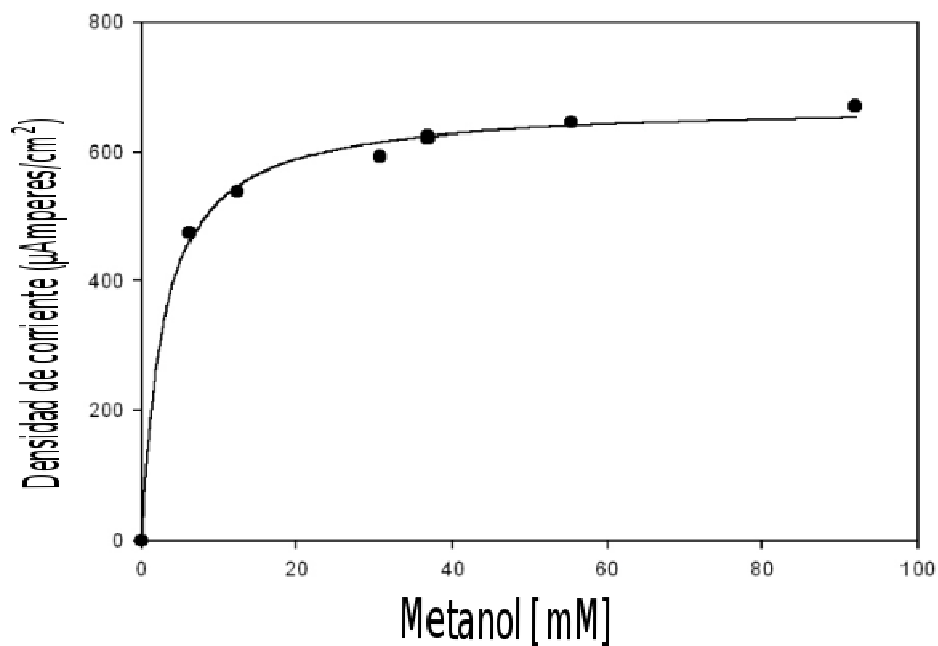


Figura 43 Ajuste de la respuesta de AOX-ANA-MWCNT-Nf con distintas concentraciones de metanol, solución amortiguadora de fosfatos 100 mM pH 7.5.

Es importante señalar que el electrodo podría ser miniaturizado para servir como un sensor de alcoholes de cadena corta en específico de etanol, ya que la sensibilidad de este es alta comparado con los electrodos que funcionan con determinación del peróxido producido por la enzima.

8.9 CELDA AO_x VS. PLATINO.

Para evaluar las diferencias en la generación de corriente y potencia se optó por realizar pruebas con un electrodo que no limitara ninguna de estas últimas, el electrodo consistió en un cátodo de platino de 2.5 x 3 cm conteniendo Pt al 75% en un soporte de carbón Vulcan. Las pruebas fueron realizadas después de la estabilización del circuito abierto de las celdas de manera que pudieran generar la máxima corriente y potencia posible. La cámara anódica fue burbujeada constantemente con N₂ y la cámara catódica con O₂. Los sistemas se evaluaron el mismo día y a la misma temperatura y las pruebas se realizaron en una concentración saturada de metanol 300 mM. Los diseños de celdas enzimáticas son

optimizables, ya que las configuraciones pueden variar mucho según sea el caso (Katz *et al.*, 1999).

En la figura 44.1 se reportan las curvas de voltaje contra corriente para los electrodos: AOx-MWCNT-Nf (azul), ANA-MWCNT-Nf (rojo), AOx-Nf (verde), AOx-ANA-MWCNT-Nf (morado), en una celda de combustible enzimática híbrida.

Como se muestra en la fig. 44.1, los electrodos de AOx: AOx-Nf y AOx-MWCNT-Nf generan corriente eléctrica, siendo el de mayor corriente en corto circuito el electrodo AOx-Nf con cerca de $500 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ y sólo $200 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ para el AOx-MWCNT-Nf. El electrodo con AOx orientada, AOx-ANA-MWCNT-Nf genera la mayor cantidad de corriente eléctrica a corto circuito con $700 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ y la corriente neta del sistema es de $500 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ a la potencia máxima. Sin embargo, ANA-MWCNT-Nf es capaz de oxidar el alcohol y producir $400 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ en cortocircuito. Los voltajes que alcanzan las celdas híbridas van desde 0.175 Volts para la AOx-MWCNT-NF vs. Pt hasta 0.22 Volts AOx-ANA-MWCNT-Nf vs. Pt.

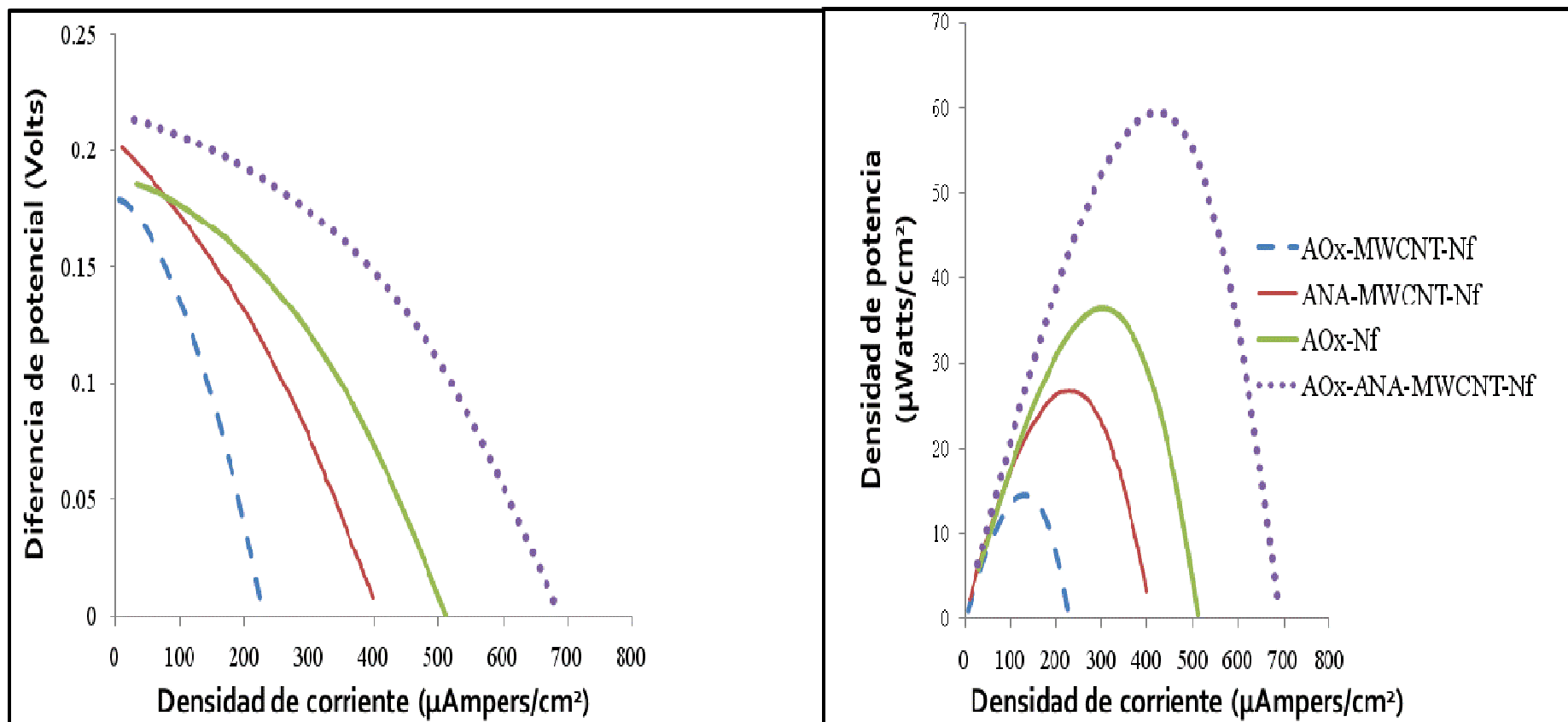
Para saber la potencia generada por los electrodos en la celda híbrida de platino contra AOx, se gráfica el producto del voltaje por la corriente, de forma que se obtiene la curvas de potencia. En la fig. 44.2 se reportan las curvas de potencia para los mismos electrodos que en la fig. 43.1. Es importante señalar que ANA-MWCNT-Nf es capaz de oxidar el alcohol a $20 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, esta potencia es tres veces menos de lo generado por AOx-ANA-MWCNT-Nf, el cual alcanza $60 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ siendo una potencia dos veces más alta que la AOx-Nf ($36 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) y 4 veces más que AOx-MWCNT-Nf ($14 \mu\text{W}/\text{cm}^2$).

Se demuestra que AOx-ANA-MWCNT-Nf genera la mayor cantidad de corriente en corto circuito ($700 \mu\text{A}/\text{cm}^2$), con una corriente máxima operativa de $500 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ a $60 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, lo cual es superior que la mayoría de las celdas reportadas en las que el ánodo o cátodo fue fabricado con nanotubos de carbono. Dichos sistemas alcanzan corrientes máximas de $200 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ y potencias de $30 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (Meredith *et al.*, 2011; Aquino Neto *et al.*, 2013). Sin embargo, nuestros resultados son inferiores a los reportados por Addo *et al.* (2010), quienes utilizaron ADH y alcanzan hasta $544 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ de corriente con $136 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ de potencia, en un sistema nafiión modificado y NAD^+ absorbido en electrodo de grafito.

Es importante mencionar que el electrodo sin enzima ANA-MWCNT-Nf es capaz de oxidar el alcohol y producir $200 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ a $20 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, si bien no se entiende las razones que puedan llevar a este sistema a oxidar el alcohol pudiera ser un mecanismo de auto-oxidación.

Es de notar también que la AOx-Nf genera corriente y potencia $500 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ a $30 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, esto es coherente con los reportes de enzimas absorbidas que realizan la transferencia de electrones al electrodo por distintos mecanismos (Kowalewska y Kulesza, 2012). Hasta aquí se demuestra que la AOx inmovilizada sobre la 4-azidoanilina en los nanotubos produce una mayor orientación y por ende se observa más potencia en el electrodo que en las demás variantes realizadas durante este trabajo.

Figura 44. (1) Curvas de polarización a 10 mVs^{-1} , (2) Curvas de potencia calculadas partir de las curvas, pruebas realizadas con 300 mM de metanol.



8.10 CELDA AOx VS. LACASA.

Como se ha visto hasta ahora, la enzima AOx es una enzima compleja para inmovilizar ya que los ensayos de reconstitución no han podido ser elaborados con éxito. En vista de lo anterior, la estrategia de unir covalentemente la 4-azidoanilina a los nanotubos permite la orientación de este ligando hacia el FAD embebido en la enzima. El electrodo de AOx orientada AOx-ANA-MWCNT-Nf fue evaluado contra un cátodo de platino, sin embargo el objetivo del presente trabajo es el diseño de una celda completamente enzimática, por lo que en esta sección se describe el trabajo realizado con la AOx orientada en el ánodo y lacasa orientada en el cátodo utilizando la inmovilización reportada por (Martinez-Ortiz *et al.*, 2011).

Para evaluar la celda en las mejores condiciones para las dos enzimas se utilizó la solución amortiguadora, en la que ambas presentan su máxima actividad; fosfatos pH 7.5 (100 mM) para la AOx y succinatos pH 4.5 para la lacasa (Martínez-Ortiz, *et al.*, 2013). Se evaluaron los dos sustratos de la AOx etanol y metanol por voltametrías y en la celda de combustible enzimática con cátodo de platino.

Como puede apreciarse en la fig. 45, la celda que genera más corriente y potencia es la celda que empleo metanol alcanzando los $60 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, esta potencia es similar a la obtenida con varios sistemas enzimáticos (Meredith, *et al.*, 2012). La celda obtuvo un OCP mayor que con el cátodo de platino, el OCP del sistema enzimático es de 550 mV lo que es coherente con la literatura (Sundmacher, 2010), aunque la corriente generada fue de $180 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, es decir una baja densidad de corriente con respecto al cátodo de platino 8.75 cm^2 , probablemente debido a que hay más sitios activos en el electrodo de platino, además de que era de mayor área que el electrodo de lacasa de 1 cm^2 .

Se obtuvieron las curvas de la celda enzimática de AOx-ANA-MWCNT-Nf vs. Lacasa, con metanol y etanol (fig. 45). Se muestran las líneas sólidas para el metanol como sustrato en la cámara anódica y las líneas punteadas corresponde al etanol como sustrato. Las curvas polarimétricas son para metanol (verde) y etanol (azul), las curvas de potencia son para el metanol (morado) y etanol (rojo). La celda alcanza 0.5 volts de circuito abierto, tanto en etanol como en metanol (curvas verde y azul). Sin embargo, la corriente a corto circuito difiere por cerca de $50 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, siendo la celda con metanol la que alcanza la mayor corriente a corto circuito: $250 \mu\text{A}/\text{cm}^2$.

En lo referente a potencia, el metanol es el mejor sustrato para la celda AOx-ANA-MWCNT-Nf vs. Lacasa, debido a que se supera los $60 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, esto es 50% más potencia con metanol que con etanol ($40 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). Para una celda completamente enzimática los resultados son prometedores ya que en el caso del metanol, la potencia es prácticamente la misma que con los experimentos realizados utilizando el cátodo de platino. Desafortunadamente la celda de AOx-ANA-MWCNT-Nf vs. lacasa, produce menos corriente que el sistema con cátodo de platino.

En el caso de ambos sustrato la celda AOx-ANA-MWCNT-Nf vs. lacasa, tiene una eficiencia del 40%. Esta eficiencia se calculó como se muestra en la fórmula siguiente:

$$eficiencia = \frac{P_{max}}{CCS * VCA}$$

Donde VCA es voltaje a circuito abierto, CCS es corriente a corto circuito y P_{max} es la potencia máxima obtenida experimentalmente.

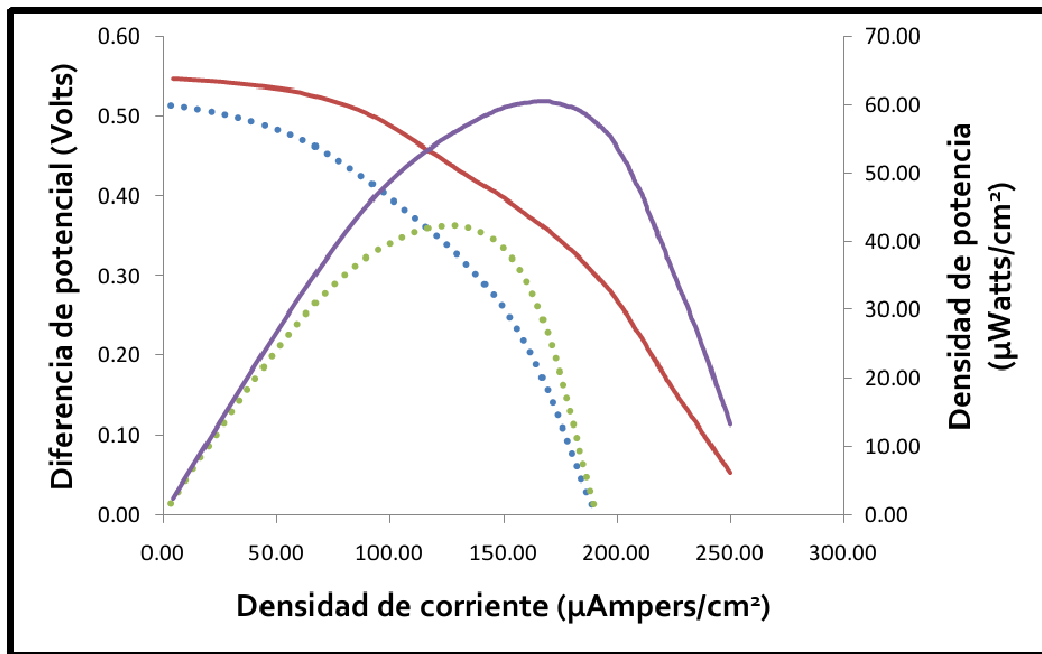


Figura 45. Celda AOx-ANA-MWCNT-Nf vs. lacasa, la línea punteada es metanol como sustrato y la línea sólida es etanol, la cámara anódica se encontraba en atmósfera de N_2 y la catódica en atmósfera de O_2 .

Los resultados obtenidos con esta celda enzimática son cercanos en términos de eficiencia a otras celdas, como el caso de la GOx vs. Microperoxidasa, con eficiencia del 25% (Katz *et al.*, 1999). Sin embargo,

en términos de corriente y potencia hay celdas que han alcanzando hasta 1 mA/cm^2 y $200 \text{ } \mu\text{W/cm}^2$ (Deng *et al.*, 2010). Probablemente la cantidad de proteína empleada para fabricar sus electrodos sea una ventaja, ya que más proteína orientada genera más corriente.

Por último, se determinó la estabilidad de la celda AOX-ANA-MWCNT-Nf vs. lacasa por medio de una resistencia de 450 Ohms conectada externamente al circuito. Para realizar un monitoreo de la caída de voltaje de la celda, de esta manera puede ser calculada la corriente por la ley de Ohm. En la fig. 46 se observa la estabilidad de la celda AOX-ANA-MWCNT-Nf vs. lacasa. El sistema comenzó con un máximo de corriente de $100 \text{ } \mu\text{A}$ y decayó hasta $20 \text{ } \mu\text{A}$ después de 50 minutos.

A pesar del corto tiempo que la celda enzimática AOX-ANA-MWCNT-Nf vs. lacasa, generó corriente de forma constante, es de sorprender la cantidad de corriente que la celda generó inicialmente.

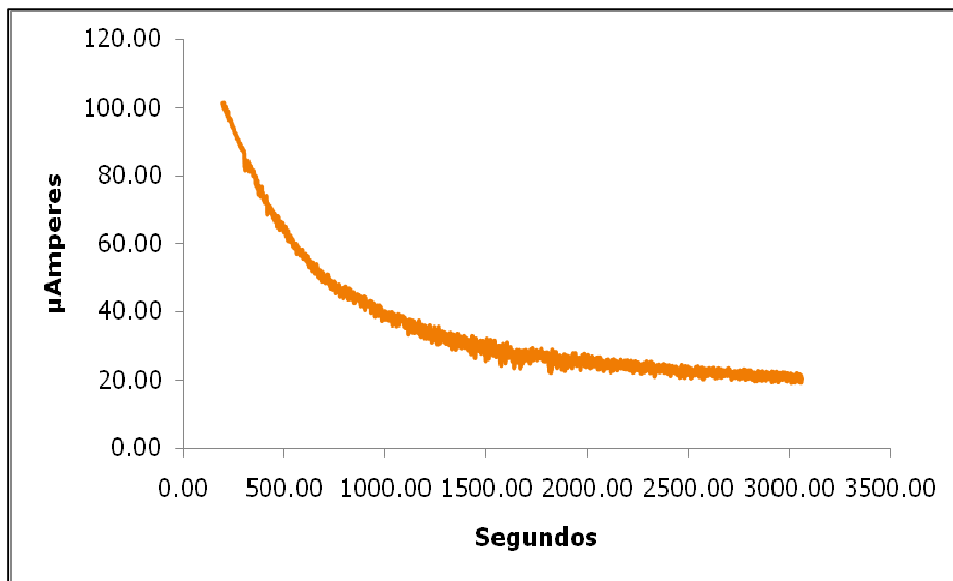


Figura 46. Celda AOX-ANA-MWCNT-Nf vs. lacasa (la cámara anódica se encontraba en atmósfera de N_2 y la catódica en atmósfera de O_2).

Las razones detrás del decaimiento de la generación de corriente y la falta de estabilidad del sistema son tema para estudios posteriores, pero se podría empezar por diseñar un dispositivo que permita disminuir las resistencias óhmicas, que mantenga más cerca a los electrodos de trabajo. Otra solución que puede ayudar es inmovilizar más AOX en el ánodo de manera que se genere más corriente durante más tiempo, ya que los trabajos con mayores cargas de enzima en los electrodos han demostrado tener duraciones más largas, las razones detrás de este fenómeno no están bien elucidadas pero es posible que

las moléculas de enzimas se desactiven de forma no simultanea o las moléculas de enzima se estabilicen entre ellas y se desestabilicen más lentamente. Ya que de acuerdo a los trabajos reportados de la lacasa, la enzima es muy estable en el cátodo y permite la reducción por periodos de hasta 8 horas perdiendo poco de su actividad original (Meredith y Minter, 2012; Martinez-Ortiz *et al.*, 2011).

9. CONCLUSIONES.

Se diseñó y se construyó una celda enzimática AOX-ANA-MWCNT-Nf vs. lacasa que presentó un 40% de eficiencia y pudo oxidar alcoholes por espacio de una hora, por lo que se concluye que la celda necesita más estudio ya que una hora, no se considera un tiempo de operación largo.

Se determinó que la 4-azidoanilina interactúa con el centro redox de la enzima, de manera similar al ligando “natural” azida de sodio, produciendo un aumento de absorbancia en el espectro del FAD embebido en la AOX, con una constante de disociación K_d de 17.3 mM. Aprovechando esta propiedad, se inmovilizó la AOX por medio del uso de 4-azidoanilina como orientador, lo que permitió el diseño de un electrodo sensible al metanol, con un pico de respuesta alrededor de 100 mV vs. SCE. Con el fin de alcanzar un diseño reproducible se optó por usar nanotubos de carbono funcionalizado con 4-azidoanilina. Fueron suficientes doce horas de incubación para orientar el sitio activo de la AOX hacia la 4-azidoanilina. De esta manera se visualizaron dos transferencias de electrones en la zona de -500 mV y -150 mV vs. SCE (en solución amortiguadora sin agregar alcoholes), con un potencial de oxidación en los -63 mV vs. SCE.

Los resultados de la carga en Coulombs indican que todas la AOX inmovilizadas en el electrodo ANA-MWCNT-Nf están orientadas. El electrodo molecularmente orientado de AOX mostró una constante de transferencia de electrones obtenidos de la carga en Coulombs del sistema es $0.98 \pm 0.15 \text{ s}^{-1}$ y está acorde con lo reportado por Das y Goswami en 2013 con AOX inmovilizada en nanotubos. El electrodo orientado AOX-ANA-MWCNT-Nf tuvo una densidad de corriente de $500/\mu\text{A cm}^2$ y una densidad de potencia de $60 \mu\text{W/cm}^2$ en metanol 300 mM. Este fue el electrodo con el mejor rendimiento, de manera que se demuestra que la orientación permite aumentar la generación de corriente y potencia.

10. PERSPECTIVAS.

Las variables a optimizar para obtener un mejor diseño son diversas y merecen un estudio detallado. Probablemente habría que confirmar por otros métodos la orientación de la enzima de cara al electrodo, para poder definir la relación de nanotubos derivatizados con 4-azidoanilina por moléculas de AOx (optimización de la carga de enzima en electrodo).

El diseño de una celda que permita reducir las pérdidas por resistencia óhmicas ayudaría a generar densidades de corriente y potencia más altas.

Para alcanzar una mayor estabilidad habría que elucidar cuáles son los mecanismos que hacen que el sistema decaiga en su funcionamiento, estudios en otro tipo de superficies que puedan ser llevadas a equipo de microscopio circular especiales para entender más acerca de las secuelas que deja en la enzima la operación constante sobre el electrodo.

Estudios de impedancia permitirían entender mejor los fenómenos de carga y resistivos en la superficie del electrodo, dando tal vez la pauta para entender las causas de la desactivación desde un punto de vista del mecanismo(s) y electroquímico.

Por otro lado, una observación relevante en este trabajo es lo que parece ser dos picos de transferencia de electrones que corresponderían a dos procesos acoplados de 1 electrón. Por lo tanto, se debería buscar más evidencia que apoye o rechace lo que podría ser un intermediario semiquinona, el cual no había sido visto por voltametría cíclica para esta enzima.

Probar inmovilizaciones en otros soportes menos heterogéneos podría ayudar a entender mejor los procesos de transferencia de la AOx y ayudar a mejorar los diseños de los electrodos.

11. REFERENCIAS.

1. Addo, P. K., R. L. Arechederra, et al. (2010). "Evaluating Enzyme Cascades for Methanol/Air Biofuel Cells Based on NAD⁺-Dependent Enzymes." Electroanalysis **22**(7-8): 807-812.
2. Addo, P. K., R. L. Arechederra, et al. (2011). "Towards a rechargeable alcohol biobattery." Journal of Power Sources **196**(7): 3448-3451.
3. Ahmed, S. A., P. McPhie, et al. (1996). "Mechanism of Activation of the Tryptophan Synthase $\alpha 2\beta 2$ Complex." Journal of Biological Chemistry **271**(46): 29100-29106.
4. Akers, N. L., C. M. Moore, et al. (2005). "Development of alcohol/O₂ biofuel cells using salt-extracted tetrabutylammonium bromide/Nafion membranes to immobilize dehydrogenase enzymes." Electrochimica Acta **50**(12): 2521-2525.
5. Aquino Neto, S., E. L. Suda, et al. (2013). "Direct electron transfer-based bioanodes for ethanol biofuel cells using PQQ-dependent alcohol and aldehyde dehydrogenases." Electrochimica Acta **87**(0): 323-329.
6. Astuti, Y., E. Topoglidis, et al. (2004). "Proton-Coupled Electron Transfer of Flavodoxin Immobilized on Nanostructured Tin Dioxide Electrodes: Thermodynamics versus Kinetics Control of Protein Redox Function." Journal of the American Chemical Society **126**(25): 8001-8009.
7. Averbakh A. Z. , P. N. D., V I Seredenko, A V Kulikov, R I Gvozdev, and I P Rudakova (1995). "Flavin-dependent alcohol oxidase from the yeast *Pichia pinus*. Spatial localization of the coenzyme FAD in the protein structure: hot-tritium bombardment and ESR experiments." Biochemical Journal: 601-604.
8. Azevedo, A. M., D. M. F. Prazeres, et al. (2005). "Ethanol biosensors based on alcohol oxidase." Biosensors and Bioelectronics **21**(2): 235-247.
9. Balta-Ozkan, N. and E. Baldwin (2013). "Spatial development of hydrogen economy in a low-carbon UK energy system." International Journal of Hydrogen Energy **38**(3): 1209-1224.
10. Bard, A. J. and L. R. Faulkner (1976). ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications, John Wiley & Sons.
11. Barsan, M. M. and C. M. A. Brett (2008). "An alcohol oxidase biosensor using PNR redox mediator at carbon film electrodes." Talanta **74**(5): 1505-1510.
12. Blanford, C. F., R. S. Heath, et al. (2007). "A stable electrode for high-potential, electrocatalytic O₂ reduction based on rational attachment of a blue copper oxidase to a graphite surface." Chemical Communications(17): 1710-1712.
13. Blonder, R., I. Willner, et al. (1998). "Reconstitution of Apo-Glucose Oxidase on Nitrospiropyran and FAD Mixed Monolayers on Gold Electrodes: Photostimulation of Bioelectrocatalytic Features of the Biocatalyst." Journal of the American Chemical Society **120**(36): 9335-9341.
14. Boteva, R., A. J. W. G. Visser, et al. (1999). "Conformational Transitions Accompanying Oligomerization of Yeast Alcohol Oxidase, a Peroxisomal Flavoenzyme[†]." Biochemistry **38**(16): 5034-5044.

15. Bringer, S., B. Sprey, et al. (1979). "Purification and Properties of Alcohol Oxidase from *Poria contigua*." European Journal of Biochemistry **101**(2): 563-570.
16. Chinnadayala S. R. Kakoti A., Santhosh M., Goswami P., 2014, A novel amperometric alcohol biosensor developed in a 3rd generation bioelectrode platform using peroxidase coupled ferrocene activated alcohol oxidase as biorecognition system, Biosensors and Bioelectronics, 55: 120-126.
17. Choi, M., C. Han, et al. (2011). "Electrochemical Characterization of Pt–Ru–Pd Catalysts for Methanol Oxidation Reaction in Direct Methanol Fuel Cells." Journal of Nanoscience and Nanotechnology **11**(1): 838-841.
18. Chum, H., A. Faaij, et al. (2011). Bioenergy. IPCC Special Report on Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation. O. Edenhofer, R. Pichs-Madruga, Y. Sokona et al. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, Cambridge University Press.
19. Das, M. and P. Goswami (2013). "Direct electrochemistry of alcohol oxidase using multiwalled carbon nanotube as electroactive matrix for biosensor application." Bioelectrochemistry **89**(0): 19-25.
20. Demin, S. and E. A. H. Hall (2009). "Breaking the barrier to fast electron transfer." Bioelectrochemistry **76**(1-2): 19-27.
21. Deng, L., L. Shang, et al. (2010). "A membraneless biofuel cell powered by ethanol and alcoholic beverage." Biosensors and Bioelectronics **26**(1): 70-73.
22. Evers, M. E., W. Harder, et al. (1995). "In vitro dissociation and re-assembly of peroxisomal alcohol oxidases of *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris*." FEBS Letters **368**(2): 293-296.
23. Ferreira, P., A. Hernandez-Ortega, et al. (2009). "Aryl-alcohol Oxidase Involved in Lignin Degradation: a mechanistic study based on steady and presteady state kinetics and primary and solvent isotope effects with two alcohol substrates". Journal of Biological Chemistry **284**(37): 24840-24847.
24. Fruk, L., C.-H. Kuo, et al. (2009). "Apoenzyme Reconstitution as a Chemical Tool for Structural Enzymology and Biotechnology." Angewandte Chemie International Edition **48**(9): 1550-1574.
25. Geissler, J., S. Ghisla, et al. (1986). "Flavin-dependent alcohol oxidase from yeast." European Journal of Biochemistry **160**(1): 93-100.
26. Gellett, W., M. Kesmez, et al. (2010). "Biofuel Cells for Portable Power." Electroanalysis **22**(7-8): 727-731.
27. Hassler, B. L., N. Kohli, et al. (2007). "Renewable Dehydrogenase-Based Interfaces for Bioelectronic Applications." Langmuir **23**(13): 7127-7133.
28. Hefti, M. H., J. Vervoort, et al. (2003). "Deflavination and reconstitution of flavoproteins." European Journal of Biochemistry **270**(21): 4227-4242.
29. Hopkis Thomas R., B., Okla (1984). Red absorbing combination of alcohol oxidase and an azide compound. U.S. Patent Documents. B. Philips Petroleum Company, Okla. United States of America: 9.

30. Hopkins, T. R. and F. Muller (1987). Biochemistry of Alcohol Oxidase. Microbial Growth on C1 Compounds. H. Verseveld and J. A. Duine, Springer Netherlands: 150-157.
31. Ivanov, I., T. Vidaković-Koch, et al. (2010). "Recent Advances in Enzymatic Fuel Cells: Experiments and Modeling." Energies **3**(4): 803-846.
32. Kamat, A., A. Huth, et al. (2010). "Chronoamperometric Investigations of the Electrode–Electrolyte Interface of a Commercial High Temperature PEM Fuel Cell." Fuel Cells **10**(6): 983-992.
33. Kato, N., Y. Omori, et al. (1976). "Alcohol Oxidases of *Kloeckera* sp. and *Hansenula polymorpha*." European Journal of Biochemistry **64**(2): 341-350.
34. Katz, E., A. F. Bückmann, et al. (2001). "Self-Powered Enzyme-Based Biosensors." Journal of the American Chemical Society **123**(43): 10752-10753.
35. Katz, E., B. Filanovsky, et al. (1999). "A biofuel cell based on two immiscible solvents and glucose oxidase and microperoxidase-11 monolayer-functionalized electrodes." New Journal of Chemistry **23**(5): 481-487.
36. Kemp, G.D., Dickinson, F.M., Ratledge, C., 1988. Appl. Microbiol. Biotechnol. **29**, 370-374
37. Khatun Haq, S., M. Faiz Ahmad, et al. (2003). "The acid-induced state of glucose oxidase exists as a compact folded intermediate." Biochemical and Biophysical Research Communications **303**(2): 685-692.
38. Kowalewska, B. and P. J. Kulesza (2012). "Development of an Integrated System for Immobilization and Mediating Charge to Alcohol Dehydrogenase During Bioelectrocatalytic Oxidation and Detection of Ethanol." Electroanalysis **24**(2): 254-263.
39. Krishnan, S. and F. A. Armstrong (2012). "Order-of-magnitude enhancement of an enzymatic hydrogen-air fuel cell based on pyrenyl carbon nanostructures." Chemical Science **3**(4): 1015-1023.
40. Ksenzhek, O. S. and S. A. Petrova (1983). "Electrochemical properties of flavins in aqueous solutions." Bioelectrochemistry and Bioenergetics **11**(2-3): 105-127.
41. Kumar, A. K. and P. Goswami (2008). "Purification and properties of a novel broad substrate specific alcohol oxidase from *Aspergillus terreus* MTCC 6324." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics **1784**(11): 1552-1559.
42. Kumar, A. K. and P. Goswami (2009). "Dissociation and Reconstitution Studies of a Broad Substrate Specific Multimeric Alcohol Oxidase Protein Produced by *Aspergillus terreus*." Journal of Biochemistry **145**(2): 259-265.
43. Lee, H.-J., S.-H. Park, et al. (2013). "Preparation of photoreactive azidophenyl hyaluronic acid derivative: Protein immobilization for medical applications." Macromolecular Research **21**(2): 216-220.
44. Léger, C. (2007-2013). "A tutorial on Protein Film Voltammetry (PFV)." Retrieved Marzo 2013, 2013, from <http://bip.cnrs-mrs.fr/bip06/protein-film-voltammetry.html>.
45. Leskovac, V., S. Trivić, et al. (2002). "The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*." FEMS Yeast Research **2**(4): 481-494.

46. Leskovac, V., S. Trivić, et al. (2005). "Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **37**(4): 731-750.
47. Limoges, B. t. and J.-M. Savéant (2003). "Cyclic voltammetry of immobilized redox enzymes. Interference of steady-state and non-steady-state Michaelis–Menten kinetics of the enzyme–redox cosubstrate system." Journal of Electroanalytical Chemistry **549**(0): 61-70.
48. Lockney, D. (2011). "Putting Fuel Cells to the Test." from http://spinoff.nasa.gov/spinoff2003/er_6.html.
49. Logan, B. E., B. Hamelers, et al. (2006). "Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology†." Environmental Science & Technology **40**(17): 5181-5192.
50. Martinez-Ortiz, J., R. Flores, et al. (2011). "Molecular design of laccase cathode for direct electron transfer in a biofuel cell." Biosensors and Bioelectronics **26**(5): 2626-2631.
51. Mauritz, K. A. and R. B. Moore (2004). "State of Understanding of Nafion." Chemical Reviews **104**(10): 4535-4586.
52. Meredith, M. T., M. Minson, et al. (2011). "Anthracene-Modified Multi-Walled Carbon Nanotubes as Direct Electron Transfer Scaffolds for Enzymatic Oxygen Reduction." ACS Catalysis **1**(12): 1683-1690.
53. Meredith, M. T. and S. D. Minteer (2012). "Biofuel Cells: Enhanced Enzymatic Bioelectrocatalysis." Annual Review of Analytical Chemistry **5**(1): 157-179.
54. Mincey, T., G. Tayrien, et al. (1980). "Presence of a flavin semiquinone in methanol oxidase." Proceedings of the National Academy of Sciences **77**(12): 7099-7101.
55. Miyawaki, O. and L. B. Wingard (1984). "Electrochemical and enzymatic activity of flavin adenine dinucleotide and glucose oxidase immobilized by adsorption on carbon." Biotechnology and Bioengineering **26**(11): 1364-1371.
56. Morris, D. L. and R. T. Buckler (1983). [32] Colorimetric immunoassays using flavin adenine dinucleotide as label. Methods in Enzymology. H. V. V. John J. Langone, Academic Press. **Volume 92**: 413-425.
57. Munteanu, F.-D., P. Ferreira, et al. (2008). "Bioelectrochemical investigations of aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus eryngii*." Journal of Electroanalytical Chemistry **618**(1–2): 83-86.
58. Nakamura, A., H. Takahashi, et al. (2011). "Performance of Fe-Co-Ni/C Anode Catalyst on Direct Ethanol Fuel Cell." ECS Transactions **41**(1): 2205-2209.
59. Okamoto, A., K. Hashimoto, et al. (2013). "Rate enhancement of bacterial extracellular electron transport involves bound flavin semiquinones." Proceedings of the National Academy of Sciences **110**(19): 7856-7861.
60. Osman, M. H., A. A. Shah, et al. (2010). "Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part II: Microbial." Biosensors and Bioelectronics **26**(3): 953-963.
61. Osman, M. H., A. A. Shah, et al. (2011). "Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part I: Enzymatic cells." Biosensors and Bioelectronics **26**(7): 3087-3102.

62. Ozimek, P., R. van Dijk, et al. (2003). "Pyruvate Carboxylase Is an Essential Protein in the Assembly of Yeast Peroxisomal Oligomeric Alcohol Oxidase." Molecular Biology of the Cell **14**(2): 786-797.
63. Ozimek, P., M. Veenhuis, et al. (2005). "Alcohol oxidase: A complex peroxisomal, oligomeric flavoprotein." FEMS Yeast Research **5**(11): 975-983.
64. Pauliukaite, R., M. Ghica, et al. (2007). "Characterisation of poly(neutral red) modified carbon film electrodes; application as a redox mediator for biosensors." Journal of Solid State Electrochemistry **11**(7): 899-908.
65. Ramanavicius, A. and A. Ramanaviciene (2009). "Hemoproteins in Design of Biofuel Cells." Fuel Cells **9**(1): 25-36.
66. Sakai, H., T. Nakagawa, et al. (2009). "A High-Power Glucose/Oxygen Biofuel Cell Operating Under Quiescent Conditions." Energy Environ. Sci. **2**(133).
67. Sherry, B. and R. H. Abeles (1985). "Mechanism of action of methanol oxidase, reconstitution of methanol oxidase with 5-deazaflavin, and inactivation of methanol oxidase by cyclopropanol." Biochemistry **24**(11): 2594-2605.
68. Sawyer D.T., Sobkowiak A., Roberts Jr. J.C., (1995), Electrochemistry for chemist, 2da, Wiley-Interscience
69. Shumakovich, G., S. Shleev, et al. (2007). "Oxygen can be replaced by artificial electron acceptors in reactions catalyzed by alcohol oxidase." Applied Biochemistry and Microbiology **43**(1): 15-20.
70. Smith, E. T., C. A. Davis, et al. (2003). "Voltammetric simulations of multiple electron transfer/proton transfer coupled reactions: flavin adenine dinucleotide as a model system." Analytical Biochemistry **323**(1): 114-121.
71. Soma Sekhar R. Chinnadayyala, M. S., Pranab Goswami (2012). "Microwave based reversible unfolding and refolding of alcohol oxidase protein probed by fluorescence and circular dichroism spectroscopy." Journal of Biophysical Chemistry **3**(4).
72. Sundmacher, K. (2010). "Fuel Cell Engineering: Toward the Design of Efficient Electrochemical Power Plants." Industrial & Engineering Chemistry Research **49**(21): 10159-10182.
73. Swoboda, B. E. P. (1969). "The mechanism of binding of flavin-adenine dinucleotide to the apoenzyme of glucose oxidase and evidence for the involvement of multiple bonds." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure **175**(2): 380-387.
74. Tkac, J., J. Svitel, et al. (2009). "Membrane-bound dehydrogenases from *Gluconobacter* sp.: Interfacial electrochemistry and direct bioelectrocatalysis." Bioelectrochemistry **76**(1-2): 53-62.
75. Van Der Klei, I. J., W. Harder, et al. (1991). "Biosynthesis and assembly of alcohol oxidase, a peroxisomal matrix protein in methylotrophic yeasts: A review." Yeast **7**(3): 195-209.
76. Vazquez-Duhalt, R. Aguila, S.A. Arrocha, A.A. Ayala, M. 2013. QM/MM Molecular Modeling and Marcus Theory in the Molecular Design of Electrodes for Enzymatic Fuel Cells ChemElectroChem,
77. Vidal-Limón, A., S. Águila, et al. (2013). "Peroxidase activity stabilization of cytochrome P450BM3 by rational analysis of intramolecular electron transfer." Journal of Inorganic Biochemistry **122**(0): 18-26.
78. Vidal, J.-C., J. Espuelas, et al. (2004). "Amperometric cholesterol biosensor based on in situ reconstituted cholesterol oxidase on an

- immobilized monolayer of flavin adenine dinucleotide cofactor." Analytical Biochemistry **333**(1): 88-98.
79. Visser, N. V., D. Wang, et al. (2007). "Octameric alcohol oxidase dissociates into stable, soluble monomers upon incubation with dimethylsulfoxide." Archives of Biochemistry and Biophysics **459**(2): 208-213.
80. Wang, J. (2006). Analytical Electrochemistry. New Jersey, John Wiley & Sons.
81. Williams, R. F., S. Shinkai, et al. (1975). "Radical Mechanisms for 1,5-dihydroflavin Reduction of Carbonyl Compounds." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **72**(5): 1763-1767.
82. Willner, I., E. Katz, et al. (1998). "Biofuel cell based on glucose oxidase and microperoxidase-11 monolayer-functionalized electrodes." Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2 **0**(8): 1817-1822.
83. Willner, I. and A. Riklin (1994). "Electrical Communication between Electrodes and NAD(P)⁺-Dependent Enzymes Using Pyrroloquinolinequinone-Enzyme Electrodes in a Self-Assembled Monolayer Configuration: Design of a New Class of Amperometric Biosensors." Analytical Chemistry **66**(9): 1535-1539.
84. Willner, I., B. Willner, et al. (2007). "Biomolecule-nanoparticle hybrid systems for bioelectronic applications." Bioelectrochemistry **70**(1): 2-11.
85. Willner, I., Y. M. Yan, et al. (2009). "Integrated Enzyme-Based Biofuel Cells-A Review." Fuel Cells **9**(1): 7-24.
86. Yahiro, A. T., S. M. Lee, et al. (1964). "Bioelectrochemistry: I. Enzyme utilizing bio-fuel cell studies." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Biophysical Subjects **88**(2): 375-383.
87. Yakushi, T. and K. Matsushita (2010). "Alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: structure, mode of action, and applications in biotechnology." Applied Microbiology and Biotechnology **86**(5): 1257-1265.
88. Zayats, M., E. Katz, et al. (2005). "Reconstitution of Apo-Glucose Dehydrogenase on Pyrroloquinoline Quinone-Functionalized Au Nanoparticles Yields an Electrically Contacted Biocatalyst." Journal of the American Chemical Society **127**(35): 12400-12406.
89. Zhang, X. L., Z. H. Jiang, et al. (2009). "Effects of scan rate on the potentiodynamic polarization curve obtained to determine the Tafel slopes and corrosion current density." Corrosion Science **51**(3): 581-587.
90. Zhang, Y. (2008). "I-TASSER server for protein 3D structure prediction." BMC Bioinformatics **9**(40).
91. Zlateva, T., R. Boteva, et al. (2001). "Deflavination of flavo-oxidases by nucleophilic reagents." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology **1548**(2): 213-219.