



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN INGENIERIA

FACULTAD DE QUIMICA

***Fabricación de electrodos catalíticos
mediante inmovilización de enzimas***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN INGENIERÍA

INGENIERÍA QUÍMICA – CORROSION

PRESENTA:

Alejandro López Guadarrama

Tutor:

Dr. Pedro Roquero Tejeda

Facultad de Química

Ciudad de México, junio de 2022



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.

Jurado asignado

Presidente: Dr. Miquel Gimeno Seco

Secretario: Dr. Francisco Javier Garfias Vásquez

1er Vocal: Dr. Pedro Roquero Tejeda

2do Vocal: Dr. Camiel Herman Cornelis Janssen

3er Vocal: Dr. Pandiyan Thangarasu

Lugar o lugares donde se realizó la tesis:

LABORATORIO 107. INGENIERÍA ELECTROQUÍMICA. EDIFICIO F, FACULTAD
DE QUIMICA, UNAM

TUTOR DE TESIS:

Dr. Pedro Roquero Tejeda



The image shows a handwritten signature in black ink. The signature is stylized and appears to read 'Pedro Roquero Tejeda'. Below the signature is a horizontal line.

Dedicado a Sandra, María Dolores y Alejandro

Mi equipo, mi familia

Agradecimientos

Es para mí un privilegio poder escribir estas palabras, este es un logro muy importante de mi proyecto de vida, agradezco primeramente a Dios por haberme puesto en el tiempo y lugar adecuados para poder alcanzar esta meta.

El llegar hasta aquí se debe al *Dr. Pedro Roquero Tejeda*, le agradezco por dirigir este trabajo, por apoyarme en los momentos clave, por transmitirme sus conocimientos, por apoyar mis ideas y propósitos, y por la confianza y amistad que me ha brindado.

Agradezco a mi compañero de trabajo, el *Dr. Jesús Díaz*, por su ayuda, aportación en ideas y consejos sobre este trabajo.

Agradezco a la *Facultad de Química*, por brindarme los conocimientos necesarios para mi formación profesional, por haberme prestado sus instalaciones y recursos para poder llevar a cabo la presente investigación, y al *CONACYT* por el apoyo económico que me brindo en forma de beca durante ese periodo de tiempo.

Finalmente, menciono que es un orgullo pertenecer a la *Universidad Nacional Autónoma de México*, mi segundo hogar.

INDICE

Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
2. Hipótesis y objetivos.....	4
3. Marco teórico.....	5
3.1. Electrodos enzimáticos.....	5
3.1.1. Generalidades.....	5
3.1.2. Inmovilización de enzimas.....	5
3.2. Glucosa oxidasa.....	8
3.2.1. Generalidades.....	8
3.2.2. El dinucleótido de flavina y adenina (FAD), la coenzima de glucosa oxidasa.....	9
3.2.3. Mecanismo de acción.....	10
3.3. Polianilina como soporte enzimático.....	12
3.3.1. Generalidades.....	12
3.3.2. Mecanismo de polimerización.....	13
3.3.3. Síntesis electroquímica.....	14
3.3.4. Emeraldina sal (PANI-ES).....	16
4. Metodología.....	18
4.1. Películas de polianilina.....	18
4.1.1. Condiciones experimentales.....	18
4.1.2. Síntesis electroquímica.....	18
4.2. Inmovilización de Glucosa oxidasa.....	18
4.2.1. Preparación de la enzima.....	18
4.2.2. Métodos de inmovilización.....	19
4.3. Caracterización.....	19
4.3.1. Potencial de circuito abierto y voltamperometría cíclica.....	19
4.3.2. Microscopia electrónica de barrido.....	21
5. Resultados y discusión.....	22
5.1. Síntesis de polianilina sobre ITO.....	22
5.1.1. Síntesis por aplicación de barridos cíclicos de potencial.....	22
5.1.2. Microscopia electrónica de barrido de electrodos PANI/ITO.....	26
5.1.3. Caracterización electroquímica de los electrodos PANI/ITO.....	27
5.1.3.1. Potencial de circuito abierto.....	27
5.1.3.2. Voltamperometría cíclica.....	28
5.2. Electrodos enzimáticos soportados en una película de polianilina.....	31
5.2.1. Microscopia electrónica de barrido de electrodos enzimáticos GOx/PANI/ITO.....	31
5.2.2. Caracterización electroquímica de electrodos enzimáticos GOx/PANI/ITO.....	36
5.2.2.1. Potencial de circuito abierto.....	36
5.2.2.2. voltamperometría cíclica.....	40
6. Conclusiones.....	46
7. Bibliografía.....	48
8. Anexo: todos los voltamperogramas obtenidos.....	54

8.1. 10 mg/ml de glucosa oxidasa.....	54
8.2. 20 mg/ml de glucosa oxidasa.....	58
8.3. 40 mg/ml de glucosa oxidasa.....	62

Índice de Figuras

Figura 3.1. Representación de los tres métodos de inmovilización enzimática más comunes: a) adsorción, b) atrapamiento y c) unión covalente.....	7
Figura 3.2. La glucosa oxidasa con sus dos subunidades representadas en azul oscuro y claro, mientras que las coenzimas FAD se representan en rosa.....	8
Figura 3.3. Estructura de las especies químicas de flavina.....	9
Figura 3.4. Estructura química de los estados de oxidación de la polianilina.....	12
Figura 3.5. Típico voltamperograma cíclico del crecimiento de una película PANI (oro como sustrato y solución acuosa de anilina y H_2SO_4).....	15
Figura 4.1 Isómeros de la molécula de glucosa.....	20
Figura 4.2 instalación eléctrica de la celda de tres electrodos.....	20
Figura 4.3. Voltamperograma cíclico típico.....	21
Figura 5.1. Voltamperogramas de la síntesis de película de polianilina de la muestra VC53....	22
Figura 5.2. Ciclos 1 a 10 de la síntesis de película en la muestra VC53.....	23
Figura 5.3. Diferentes formas de polianilina observadas durante la síntesis por voltamperometría cíclica. Leucoemeraldina (izquierda), emeraldina (centro), pernigranilina (derecha).....	25
Figura 5.4. Ciclos 11 a 30 de la síntesis de película en VC53.....	26
Figura 5.5. imágenes de electrones secundarios de la muestra VC51 con a) x500 aumentos y b) x2500 aumentos.....	27
Figura 5.6. Curvas de potencial de circuito abierto de los electrodos a) VC54 y b) VC103 en diferentes medios.....	28
Figura 5.7. Respuestas voltamperométricas del sistema PANI/ITO en medios de a) KCl 0.1 M y b) HCl 0.1 M.....	29
Figura 5.8. Respuesta voltamperométrica del electrodo PANI/ITO, a 30 mV/s, en medios HCl 0.1 M y KCl 0.1 M.....	29
Figura 5.9. Respuestas amperométricas con velocidades de barrido de 30, 100, 500 y 1000 mV/s, del electrodo VC103 en los medios de: a) KCl 0.1M, b) KCl 0.1M + glucosa 0.1M, c) KCl 0.1M + $K_3Fe(CN)_6$ 0.5M y d) KCl 0.1M + glucosa 0.1M + $K_3Fe(CN)_6$ 0.5M.....	30
Figura 5.10. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (izquierda: x500 aumentos, derecha: x5000 aumentos) de electrodos de PANI/ITO con glucosa oxidasa inmovilizada mediante el método 1: a) 40mg/ml (muestra VC110), b) 20 mg/ml (muestra VC104) y c) 10mg/ml (muestra VC42).....	32

Figura 5.11. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (izquierda: x500 aumentos, derecha: x5000 aumentos) de electrodos de PANI/ITO con glucosa oxidasa inmovilizada mediante el método 2: a) 40mg/ml (muestra VC112), b) 20 mg/ml (muestra VC107) y c) 10mg/ml (muestra VC116).....	33
Figura 5.12. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (izquierda: x500 aumentos, derecha: x5000 aumentos) de electrodos de PANI/ITO con glucosa oxidasa inmovilizada mediante el método 3: a) 40mg/ml (muestra VC114), b) 20 mg/ml (muestra VC107) y c) 10mg/ml (muestra VC118).....	35
Figura 5.13. Resultados de potencial de circuito abierto de electrodos con carga 10 mg, para los 3 métodos realizados. (a) KCl 0.1 M; (b) KCl 0.1 M, glucosa 0.1 M; (c) KCl 0.1 M, K ₃ Fe(CN) ₆ 0.5 M; (d) KCl 0.1 M, glucosa 0.1 M, K ₃ Fe(CN) ₆ 0.5 M.....	36
Figura 5.14. Resultados de potencial de circuito abierto de electrodos con carga 20 mg, para los 3 métodos realizados. (a) KCl 0.1 M; (b) KCl 0.1 M, glucosa 0.1 M; (c) KCl 0.1 M, K ₃ Fe(CN) ₆ 0.5 M; (d) KCl 0.1 M, glucosa 0.1 M, K ₃ Fe(CN) ₆ 0.5 M.....	37
Figura 5.15. Resultados de potencial de circuito abierto de electrodos con carga 40 mg, para los 3 métodos realizados. (a) KCl 0.1 M; (b) KCl 0.1 M, glucosa 0.1 M; (c) KCl 0.1 M, K ₃ Fe(CN) ₆ 0.5 M; (d) KCl 0.1 M, glucosa 0.1 M, K ₃ Fe(CN) ₆ 0.5 M.....	39
Figura 5.16. Resumen de resultados para el método 1 con distintas cargas de enzima. (a) en KCl 0.1 M; (b) en KCl 0.1 M, glucosa 0.1 M; (c) en KCl 0.1 M, K ₃ Fe(CN) ₆ 0.5 M; (d) en KCl 0.1 M, glucosa 0.1 M, K ₃ Fe(CN) ₆ 0.5 M.....	40
Figura 5.17. Resumen de resultados para el método 2 con distintas cargas de enzima. (a) en KCl 0.1 M; (b) en KCl 0.1 M, glucosa 0.1 M; (c) en KCl 0.1 M, K ₃ Fe(CN) ₆ 0.5 M; (d) en KCl 0.1 M, glucosa 0.1 M, K ₃ Fe(CN) ₆ 0.5 M.....	41
Figura 5.18. Resumen de resultados para el método 3 con distintas cargas de enzima. (a) en KCl 0.1 M; (b) en KCl 0.1 M, glucosa 0.1 M; (c) en KCl 0.1 M, K ₃ Fe(CN) ₆ 0.5 M; (d) en KCl 0.1 M, glucosa 0.1 M, K ₃ Fe(CN) ₆ 0.5 M.....	42
Figura 5.19. Voltamperogramas del electrodo VC119 en medios que contienen Fe(III), a diferentes rapideces de barrido.....	43
Figura 5.20. Voltamperogramas de la síntesis de polianilina para encapsular glucosa oxidasa.	45

Índice de Esquemas

Esquema 3.1. reacción catalizada por glucosa oxidasa.....	8
Esquema 3.2. Estados de oxidación de las flavinas.....	9
Esquema 3.3. Reacciones de reducción del dinucleótido de flavina y adenina (FAD).....	10
Esquema 3.4. Posible ciclo catalítico de la oxidación de glucosa por la enzima glucosa oxidasa.....	11
Esquema 3.5. Obtención de las diferentes formas de PANI.....	13
Esquema 3.6. Posible polimerización de anilina en medios neutros o alcalinos.....	14

Esquema 3.7. Mecanismo de formación de los dímeros oxidables (p-aminodifenilamina (arriba) y bencidina (abajo)) en la voltamperometría cíclica, evidenciados por los picos anódicos “B” y “C” respectivamente.....	16
Esquema 3.8. Posibles organizaciones de la emeraldina sal.....	17
Esquema 5.1. Oxidación inicial de la anilina.....	23
Esquema 5.2. Posibles dímeros formados por la recombinación de radicales anilinio.....	24
Esquema 5.3. conversión bencenoide – quinoide del dímero A_1A_3	24

Resumen

Se elaboraron electrodos glucosa-oxidasa/polianilina/óxido de indio (III) y estaño (IV) [GOx/PANI/ITO] para la oxidación de glucosa, con el objetivo de que sean empleados en celdas de combustible con base de dicho carbohidrato.

El electrodo consiste en la síntesis electroquímica de una matriz porosa de polianilina dopada con cloruro sobre una superficie de óxido de indio (III) y estaño (IV), como soporte que provee conductividad eléctrica, para después aplicar e inmovilizar distintas cargas de la enzima glucosa oxidasa sobre dicha matriz. En el presente trabajo se busca inmovilizar eficientemente la enzima mediante tres métodos propuestos, cuidando que la actividad enzimática no se vea deteriorada y que exista una conductividad eléctrica aceptable a través de los componentes del electrodo.

La matriz de polianilina se sintetizó empleando como electrodo de trabajo, una superficie de ITO en una celda electroquímica donde el electrolito es una solución acuosa de HCl 0.5M y anilina 0.5M, aplicando ciclos consecutivos de barrido del potencial eléctrico. Los electrodos de polianilina fueron caracterizados en los mismos medios que los electrodos enzimáticos.

Sobre electrodos PANI/ITO se depositaron $40 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ de una suspensión acuosa de enzima cuya concentración fue variada (40 mg/mL, 20 mg/mL y 10 mg/mL) para después aplicar los métodos de inmovilización propuestos: 1) adsorción física de Glucosa Oxidasa sobre la matriz, 2) encapsulamiento de Glucosa oxidasa mediante una película de polianilina sintetizada por aplicación de una nueva serie de barridos cíclicos de potencial, y 3) encapsulamiento de Glucosa oxidasa mediante una película de polianilina sintetizada por la propia enzima. El resultado de estas dos variables: concentración de enzima y método de inmovilización, generó un conjunto de electrodos con una configuración distinta entre sí. Cada electrodo se hizo por duplicado,

El electrodo sin enzima (blanco para realizar los análisis) y aquellos resultantes del proceso de inmovilización, son caracterizados mediante microscopía electrónica de barrido, medición del potencial de circuito abierto (OCP, por sus iniciales en inglés) y voltamperometría cíclica. Para las técnicas electroquímicas mencionadas, se emplearon electrolitos distintos: a) KCl 0.1M, b) KCl 0.1M + glucosa 0.1M, c) KCl 0.1M + $K_3Fe(CN)_6$ 0.5M, d) KCl 0.1M + glucosa 0.1M + $K_3Fe(CN)_6$ 0.5M, y e) HCl 0.1M (solo para el electrodo sin enzima) y se empleó un método comparativo para los resultados generados. Todos los electrodos enzimáticos tienen respuestas distintas que la de PANI/ITO. Todos los electrodos presentaron características diferentes ante las perturbaciones voltamperométricas en los distintos electrolitos estudiados.

Se determinó que la concentración de enzima más adecuada dentro del intervalo de las estudiadas es 10 mg/ml, mientras que el método 3: encapsulamiento de Glucosa oxidasa mediante una película de polianilina sintetizada por la propia enzima, arrojó los resultados más deseables.

Las mejores configuraciones de concentración de enzima y método de inmovilización indicaron la posible oxidación enzimática de glucosa y transferencia de los electrones generados en la enzima a la matriz de polianilina mediante iones $Fe(CN)_6^{3-}$, lo cual indica que este tipo de electrodos tiene una prometedora aplicación en celdas de combustible después de su debido perfeccionamiento.

1. Introducción

En los últimos 30 años se ha desarrollado un número importante de nuevos materiales que ha dado origen a nuevas tecnologías. La aparición de polímeros electro-conductores, nanotubos de carbón, materiales grafenoides, nuevos electrolitos sólidos y líquidos iónicos, ha permitido que podamos explorar nuevas alternativas para abordar problemas tecnológicos de nuestro tiempo [1-3].

En particular, en lo que toca a sistemas electroquímicos, hemos visto la aparición de baterías secundarias cada vez más eficientes, pequeñas y ligeras [4]. La investigación en sistemas de celdas de combustible ha sido un motor importante para optimizar y orientar la evolución de estos nuevos materiales [5]. El campo de los sensores electroquímicos ha crecido constantemente, ofreciendo dispositivos cada vez más selectivos y de alta sensibilidad [6].

Muchos de estos desarrollos han estado inspirados en sistemas encontrados en la naturaleza. Es el caso de los diferentes proyectos involucrados en el campo de la fotosíntesis artificial, o el desarrollo de catalizadores inspirados en moléculas biológicas [7,8]. Siguiendo este principio, las tecnologías enzimáticas han tenido un auge importante que inició a mediados del siglo pasado y ha conducido, en la actualidad, al uso de sistemas enzimáticos en una gran variedad de procesos, en las industrias de alimentos, en química fina, farmacéutica, producción de papel, textiles o detergentes, en sistemas de conversión de energía, en la producción de biocombustibles, en medicina y en minería [9].

En este trabajo hemos abordado el tema de fabricar electrodos enzimáticos, que tengan actividades catalítica y electroquímica, a partir de la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa sobre matrices de polianilina, un polímero conductor de la electricidad. Para esto se proponen diferentes estrategias de inmovilización y de caracterización de los electrodos obtenidos.

Este trabajo se inscribe dentro de un proyecto más amplio de desarrollo de celdas de combustible enzimáticas microfluídicas. Estos dispositivos consisten de un canal de algunas decenas de micras de ancho, a través del cual se hacen fluir, de forma paralela, dos fluidos que estarán en contacto, cada uno, con un electrodo.

Se investiga el posible uso de glucosa como combustible, es entonces que se fija la atención en los biocatalizadores empleados para su oxidación en los seres vivos: las enzimas. Se trata de macromoléculas de naturaleza proteica, que poseen una gran actividad a temperatura ambiente y presión atmosférica, pueden tener una gran selectividad con los reactivos y producen residuos poco o nada contaminantes, lo cual puede ser una excelente solución si se logra desarrollar esta alternativa [10].

En el caso de la oxidación de la glucosa, la enzima que ofrece esta función es la glucosa oxidasa, sin embargo, las celdas de combustible son sistemas de flujo y las enzimas son difíciles de separar del medio de reacción para su posterior reutilización, además de ser frágiles pues cambios en la temperatura y pH pueden inactivarlas irreversiblemente.

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida en el electrodo, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente.

Para una eficiente inmovilización de estas, es necesario emplear como soporte un material que brinde adherencia, sin embargo, para un óptimo funcionamiento de la celda de combustible, es necesario mantener una buena conductividad eléctrica en todo el sistema. Una película de

polianilina es un material con conductividad eléctrica que puede brindar adherencia para las enzimas.

Una superficie de polianilina fue sintetizada sobre ITO, por vía electroquímica, activando la oxidación de anilina mediante la aplicación de barridos cíclicos de potencial. En este trabajo se proponen tres métodos diferentes para inmovilizar glucosa-oxidasa sobre un sustrato de polianilina. El primero es la impregnación de un electrodo con una suspensión de enzima que se deja secar a temperatura ambiente. En el segundo método se aplica la suspensión de enzima y se aplica una nueva serie de barridos cíclicos de potencial, pensando en *tejer* una nueva red de polímero alrededor de las moléculas de enzima. En el tercero se aplica la suspensión de enzima y se agrega el monómero, anilina, pues se ha reportado que la glucosa-oxidasa es capaz de oxidar anilina e iniciar su polimerización. Así se espera también poder entretejer la enzima en una red de polímero.

Para cada método se probaron tres cargas de enzima. La tabla 1.1 recopila las designaciones de nueve electrodos fabricados, cuyos resultados son objeto de este trabajo. Las letras VC se refieren a la técnica empleada (voltamperometría cíclica) y el número corresponde al electrodo fabricado. Se repitieron experimentos varias veces, y se seleccionaron los que se presentan en la tabla como representativos de cada método y carga.

Todos los electrodos (nueve tipos de electrodos enzimáticos y el sistema PANI/ITO) fueron caracterizados mediante microscopía electrónica de barrido, y mediante dos técnicas electroquímicas (medición de potencial de circuito abierto y voltamperometría cíclica) en cuatro medios electrolíticos diferentes que contienen combinaciones de KCl, glucosa y hexacianoferrato de potasio.

Carga de enzima (mg/ μ L)	Método			
		1	2	3
Sin enzima	VC53, VC54, VC103	-----	-----	-----
10	-----	VC42, VC120	VC116, VC117	VC118, VC119
20	-----	VC104, VC105	VC106, VC107	VC108, VC109
40	-----	VC110, VC111	VC112, VC113	VC114, VC115

Tabla 1.1. electrodos fabricados sin enzima y con enzima mediante tres métodos diferentes con tres cargas de glucosa-oxidasa.

De esta manera, en este trabajo se propusieron e implementaron las técnicas para elaborar este tipo de electrodo, así como los procedimientos de caracterización electroquímica.

2. Hipótesis y objetivos

Hipótesis

Es posible inmovilizar enzimas glucosa oxidasa sobre matrices de polianilina mediante la formación de un recubrimiento de polianilina por la aplicación de barridos cíclicos de potencial eléctrico o mediante la actividad oxidativa de la propia enzima, manteniendo una conductividad eléctrica aceptable a través del electrodo construido

Objetivos generales

- Lograr una eficiente inmovilización de glucosa oxidasa en las superficies de polianilina dopada con cloruro de electrodos PANI/ITO.
- Obtener una adecuada conductividad eléctrica en el sistema Enzima-PANI-ITO (electrodo)
- Conservar la actividad catalítica de Glucosa oxidasa, una vez que ha sido inmovilizada.

Objetivos particulares

- Proponer tres métodos accesibles y sencillos de inmovilización de enzimas, y determinar cual de ellos arroja mejores resultados de acuerdo con los objetivos generales planteados.
- Determinar mediante una primera aproximación, la concentración de enzima glucosa oxidasa sobre la superficie del electrodo más adecuada para el funcionamiento de estos.
- Lograr la reproducibilidad de cada etapa de construcción del electrodo
- Obtener un electrodo y/o información, que sea útil como base para una investigación posterior

3. Marco teórico

3.1. Electroodos enzimáticos

En esta sección se presentan los aspectos generales de los electroodos enzimáticos, así como los métodos de inmovilización de enzimas que pueden ser utilizados para su preparación.

3.1.1. Generalidades

Una de las demandas actuales de las industrias biotecnológicas del mundo para obtener productos y procesos con mayor rentabilidad, son la mejora de la productividad de las enzimas y el desarrollo de técnicas novedosas para aumentar su vida útil.

En el campo de la electroquímica, un electrodo cubierto de enzimas redox es una alternativa viable para el aprovechamiento de estas en dispositivos como celdas de combustible o sensores electroquímicos. Para tal fin, es importante que la enzima no pierda actividad catalítica, esté bien adherida al electrodo y que exista una buena capacidad de transferencia de electrones entre la enzima y la superficie del electrodo. Este último punto representa un reto, pues el sitio activo de la enzima a menudo se encuentra cubierto y el resto de los aminoácidos de la enzima dificultan las transferencias electrónicas [11].

Un tipo de materiales que promete cumplir con estos requisitos son los polímeros conductores eléctricos, como es el caso de la polianilina, la cual puede sintetizarse directamente sobre un electrodo por vía electroquímica, formando una película con buena adherencia al electrodo, y prometiendo ser un excelente soporte y medio de transferencia de electrones para la enzima redox.

3.1.2. Inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas consiste en el confinamiento de esta a una matriz o soporte diferente de la de los sustratos y productos, siendo valiosa porque ha permitido que las enzimas se reutilicen fácilmente varias veces para la misma reacción con vidas medias más largas y menos degradación, y ha proporcionado un método sencillo para controlar la rapidez de reacción, así como el tiempo de inicio y finalización de la reacción.

Existe una variedad de métodos utilizados para inmovilizar enzimas, tres de los más comunes son la a) adsorción, b) el atrapamiento y c) la reticulación o unión covalente a un soporte (figura 3.1) [12].

a) Adsorción

El método de adsorción implica que la enzima se adsorba físicamente sobre el material de soporte, que a menudo es una matriz de polímero. Esta técnica es relativamente simple, porque típicamente implica bañar el soporte en una solución de la enzima, permitiendo que esta se seque en la superficie, para finalmente enjuagarla para eliminar la enzima que no se adsorbe.

La inmovilización ocurre por la formación de enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals o interacciones hidrofóbicas entre la enzima y la superficie soporte. De todos los métodos, este

es el que mas favorece el transporte de materia entre la enzima y el medio de reacción, además de ser el que aporta la mayor libertad de movimiento estructural a las enzimas [13].

Desafortunadamente, este método es problemático, porque permite la lixiviación de la enzima mientras reacciona, contaminando así el sustrato, además de que este método puede desnaturalizar la enzima si la química de la superficie del material soporte no es adecuada [12].

b) Atrapamiento

El método de atrapamiento implica atrapar la enzima en la estructura reticular de un material. Comúnmente se emplean polimerizaciones para este fin, tal como la polimerización electroquímica, que consiste en la aplicación de un potencial apropiado o una corriente a una solución que contiene tanto la enzima y moléculas de un monómero, generando radicales que se acoplan y forman un polímero; o la fotopolimerización, que consiste en el empleo de la aplicación de una solución de enzimas y monómeros de una resina curable con radiación. [13]

Esto generalmente minimiza la lixiviación de la enzima y mejora la estabilización, además de que permite adaptar el material de encapsulación para proporcionar el microambiente óptimo para la enzima, es decir, igualar el entorno fisicoquímico de la enzima y el material de inmovilización. Sin embargo, frecuentemente da como resultado limitaciones de transporte de sustrato / analito al sitio activo de la enzima [12].

c) Unión covalente

Consiste en la formación de enlaces químicos entre la enzima y el soporte, lo cual se puede lograr por la activación de grupos carboxílicos y grupos amina mediante el empleo de carbodiimidas, lo cual permite la formación de los deseados enlaces peptídicos en condiciones de presión y temperatura suaves, fundamentales para evitar la destrucción de la enzima[13].

De entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina y el ácido aspártico y glutámico. El resto de los aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, y no pueden intervenir en la unión covalente [14].

La técnica es efectiva para inmovilizar enzimas, permitiendo el transporte de materia entre la enzima y el medio de reacción, además de dar una mayor resistencia a la desactivación por el efecto de la temperatura, de los disolventes orgánicos o del pH, al tener estabilizada su estructura terciaria. Sin embargo, se tiene el problema de que normalmente disminuye el grado de movimiento de la enzima, lo que puede reducir drásticamente su actividad [12].

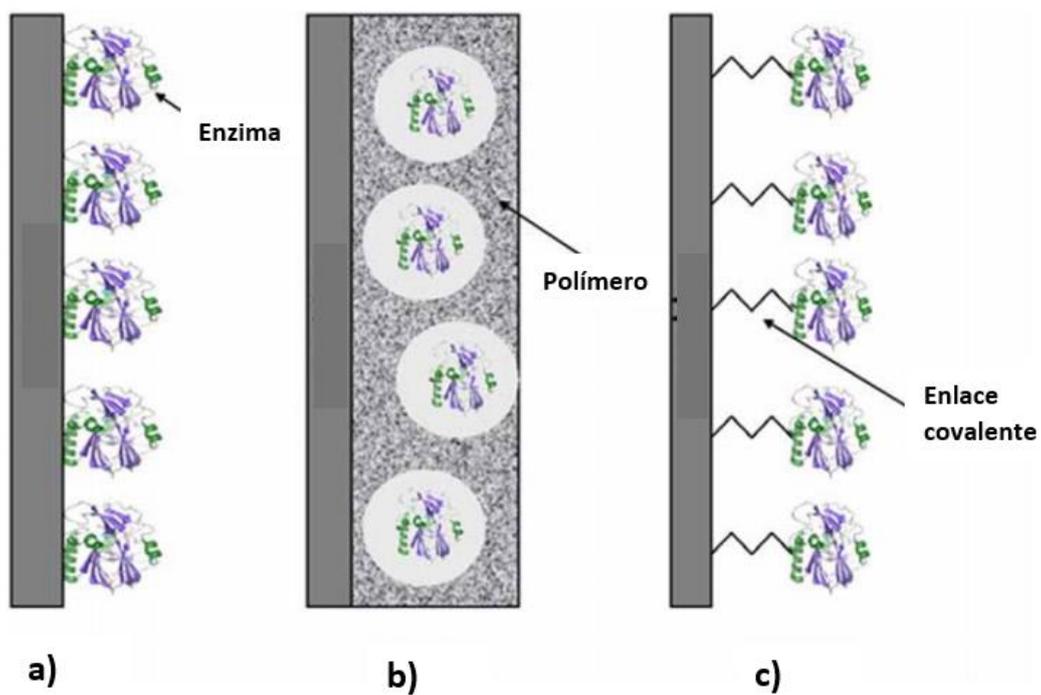


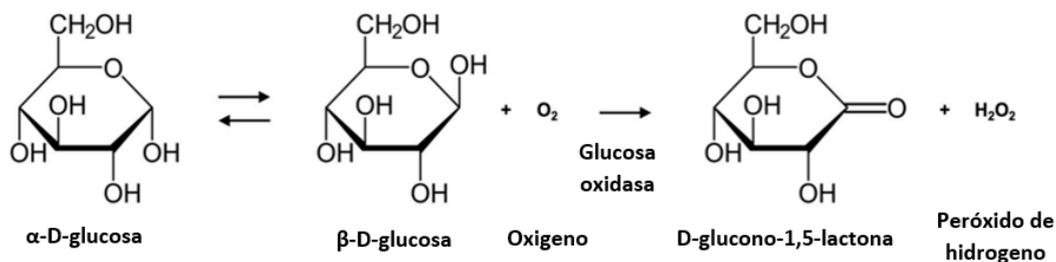
Figura 3.1. Representación de los tres métodos de inmovilización enzimática más comunes: a) adsorción, b) atrapamiento y c) unión covalente [12].

3.2. Glucosa oxidasa

En esta sección se presentan los aspectos generales de la enzima glucosa oxidasa, información sobre el dinucleótido de flavina y adenina (sitio catalítico de la enzima), así como el mecanismo de acción de la enzima.

3.2.1. Generalidades

Aislada por primera vez por Detlev Müller en 1925 de *Aspergillus niger* [15], la glucosa oxidasa es una enzima oxidoreductasa que cataliza la oxidación de glucosa en peróxido de hidrógeno y D-glucono-1,5-lactona (esquema 3.1).



Esquema 3.1. reacción catalizada por glucosa oxidasa [16]

La enzima es producida naturalmente por hongos e insectos, donde su función principal es actuar como agente antibacteriano y antifúngico debido a la producción de peróxido de hidrógeno [17].

Estructuralmente, como se muestra en la Figura 3.2, la glucosa oxidasa es un homodímero formado por dos subunidades idénticas de 80 kDa, unidas por dos puentes disulfuro y dos dinucleótidos de flavina y adenina (FAD), unidos de forma no covalente, que actúan como coenzimas portadoras de electrones durante la catálisis. El sitio activo donde se une la glucosa está en un bolsillo profundo. La enzima, como muchas proteínas que actúan fuera de las células, está cubierta de cadenas de carbohidratos ramificados, estos no participan en la catálisis, sin embargo, proporcionan estabilidad a la enzima (Figura 3.2) [18].

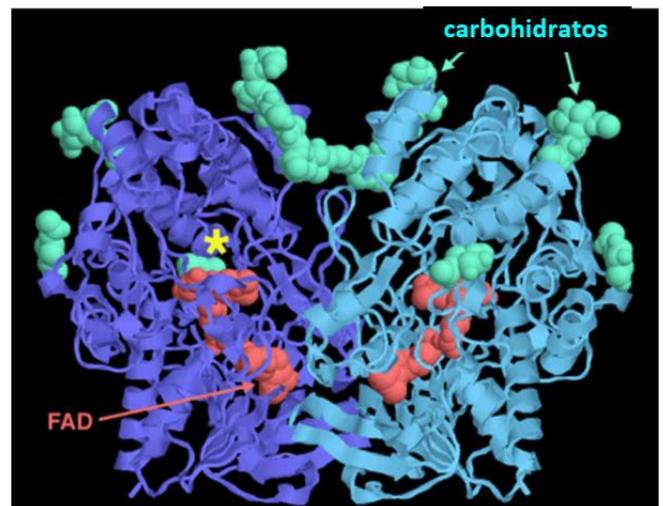


Figura 3.2. La glucosa oxidasa con sus dos subunidades representadas en azul oscuro y claro, mientras que las coenzimas FAD se representan en rosa [18].

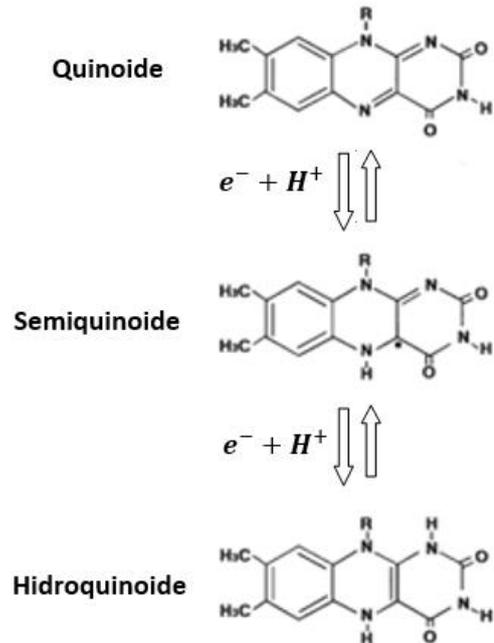
Además de la glucosa, la glucosa oxidasa es capaz de oxidar otros monosacáridos, así como nitroalcanos y compuestos hidroxílicos [19], sin embargo, las actividades son generalmente bajas en comparación con la de oxidación de glucosa [20]. Mientras tanto, además del oxígeno, la glucosa oxidasa es capaz de reducir a las quinonas, sin embargo, generalmente las reacciones donde se involucran a estas tienen menor rapidez de reacción en comparación con el oxígeno [21].

Puede ser inhibida completamente por cantidades micromolares de metales pesados como mercurio, plomo y plata, e inhibida de forma parcial por cantidades milimolares de hidrazina,

hidroxilamina, fenilhidrazina, 8-hidroxiquinolina, semicarbazida y nitrato de sodio. Además de esto, los iones haluro la inhiben a pH bajo, por ejemplo, a pH 3 se inhibe completamente con cloruro de potasio 0,1 M [19].

3.2.2. El dinucleótido de flavina y adenina (FAD), la coenzima de glucosa oxidasa

Las flavinas (7,8-dimetil-isoaloxazina) son un conjunto de bases nitrogenadas que tienen en común una estructura heterocíclica de tres anillos y dos grupos oxo, conocida como isoaloxazina. Son extremadamente versátiles para catalizar reacciones químicas, como se manifiesta en la amplia gama de reacciones catalizadas por flavoenzimas, como es el caso de la glucosa oxidasa. Como es mostrado en el esquema 3.2, pueden existir en tres estados de oxidación: quinoide (completamente oxidada), semiquinoide (parcialmente reducida) e hidroquinoide (completamente reducida), y dependiendo del pH, se pueden obtener en forma catiónica, neutra o aniónica. Las principales especies químicas que pertenecen a este conjunto son: dinucleótido de flavina y adenina (FAD), mononucleótido de flavina (FMN), riboflavina (vitamina B2), lumiflavina, lumicromo e isoaloxazina, las cuales son mostradas en la figura 3.3 [22].



Esquema 3.2. Estados de oxidación de las flavinas [22]

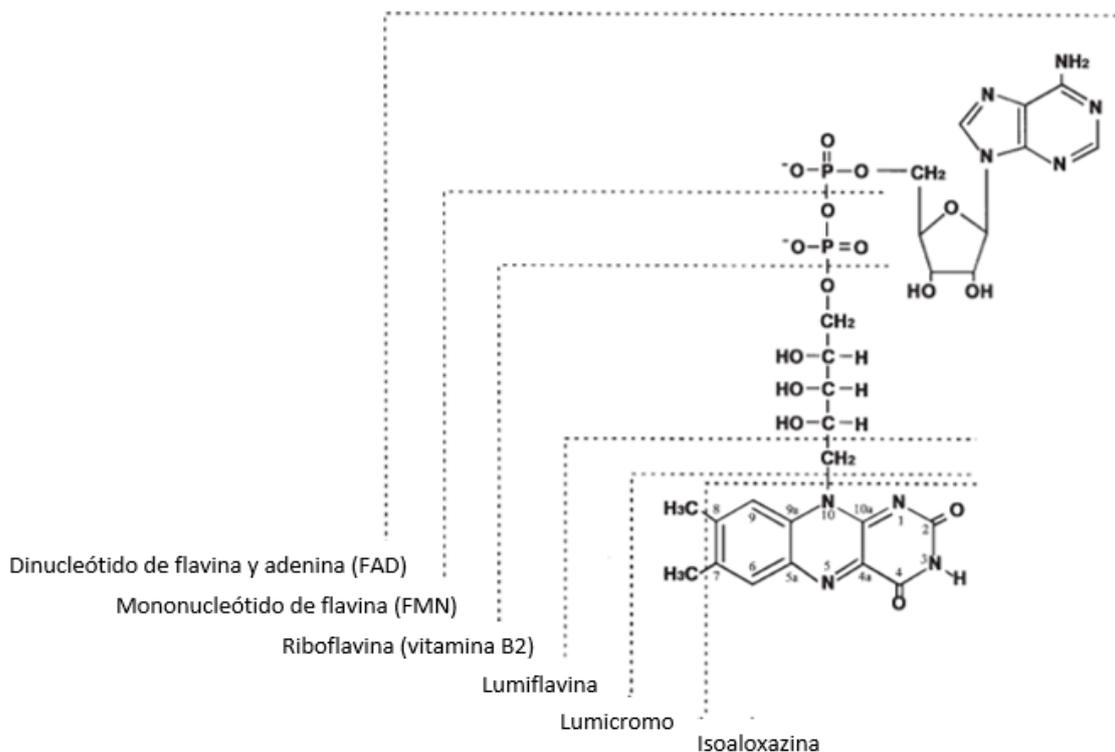
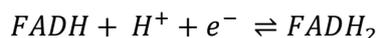
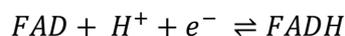


Figura 3.3. Estructura de las especies químicas de flavina [22]

Estructuralmente (*figura 3.3*), el dinucleótido de flavina y adenina (FAD) consta de un monofosfato de adenosina y un mononucleótido de flavina (FMN) unidos a través de sus grupos fosfato. Como toda flavina, el FAD puede existir en los tres estados de oxidación anteriormente descritos, representados en el esquema 3, donde FAD representa la forma quinoide, FADH la forma semiquinoide y $FADH_2$ la forma hidroquinoide.



Esquema 3.3. Reacciones de reducción del dinucleótido de flavina y adenina (FAD)

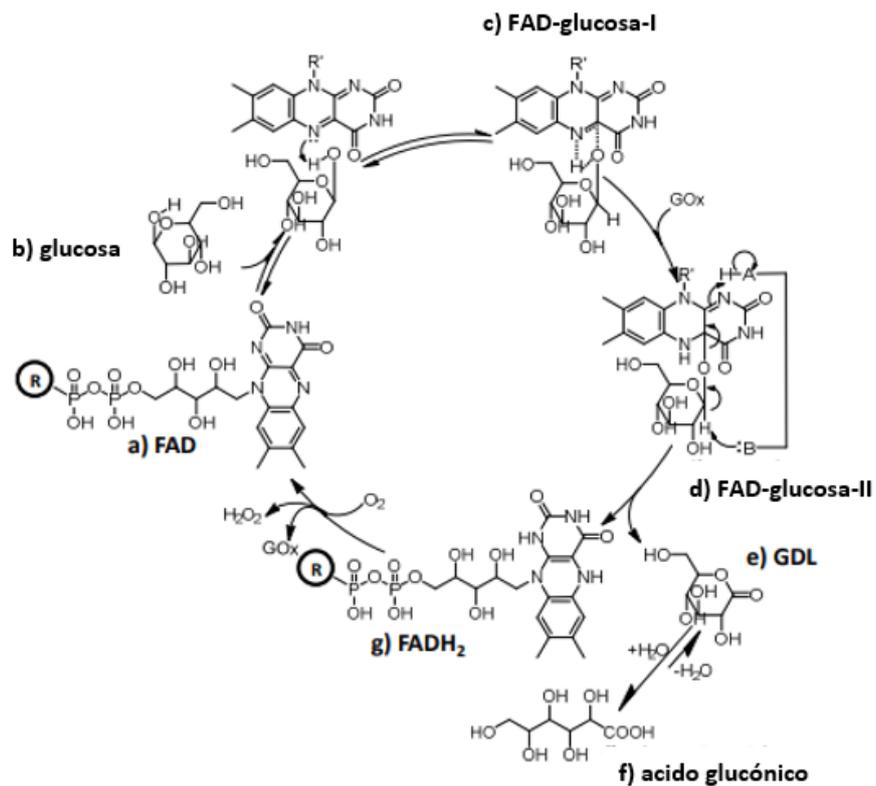
En su forma quinoide es un agente oxidante muy poderoso, puede oxidar grupos funcionales amina a iminas, como es el caso de las enzimas monoamino oxidasas [23], grupos alcohol a cetonas, situación de la ya mencionada glucosa oxidasa, o la oxidación de alcanos a alquenos (deshidrogenación), propio de la succinato deshidrogenasa que participa en el ciclo de Krebs [24].

3.2.3. Mecanismo de acción

Las Investigaciones cristalográficas han demostrado que el sitio activo que contiene la coenzima FAD está oculto en un bolsillo profundo [20], la molécula de glucosa ingresa a este bolsillo y al aproximarse a la coenzima, el par de electrones libres del nitrógeno portador del doble enlace en el anillo central, ataca al hidrogeno del grupo funcional hidroxilo enlazado al carbono C1 de la glucosa, a su vez, el par de electrones de dicho grupo hidroxilo ataca al carbono que comparte el doble enlace con el nitrógeno primeramente descrito de la coenzima, dando como resultado la posible formación de un intermediario en estado de transición denominado FAD-glucosa-I (Figura 3.4) [25].

Posteriormente, el estado de transición se rompe, transfiriendo definitivamente el átomo de hidrogeno del hidroxilo del carbono C1 al nitrógeno portador del doble enlace, este doble enlace se rompe regenerando el par de electrones libre del nitrógeno que fue ocupado para enlazar el hidrogeno del hidroxilo, dejando al carbono que compartía este doble enlace como catión, entonces el par de electrones del hidroxilo que ya interactuaba con el, lo enlaza formalmente, dando lugar al intermediario estable FAD-glucosa-II.

Luego de esto, el intermediario FAD-glucosa-II se rompe cuando un aminoácido de la enzima actúa como base extrayendo un protón del carbono C1 de la glucosa dejando un par de electrones libres que inmediatamente se enlazan con el oxígeno "puente" entre la glucosa y la coenzima. Este oxígeno al tener un exceso de electrones rompe su enlace con la coenzima, donándole a esta los electrones de dicho enlace. Los electrones donados se desplazan al nitrógeno portador de un doble enlace que quedaba sin reaccionar mediante resonancia [20], atacando y extrayendo a un protón libre de algún aminoácido ácido, dando como resultado la formación de la molécula $FADH_2$ y una molécula gluconolactona, esta última mencionada se hidroliza rápidamente para generar ácido glucónico.



Esquema 3.4. Posible ciclo catalítico de la oxidación de glucosa por la enzima glucosa oxidasa [25]

Finalmente, el $FADH_2$ es oxidado por O_2 generando H_2O_2 y nuevamente el FAD, el cual queda disponible para volver a participar en el proceso [25].

3.3. Polianilina como soporte enzimático

En esta sección, se presentan los aspectos generales de la polianilina, mecanismo de polimerización, así como el método de síntesis electroquímica, e información de su estado con mayor conductividad eléctrica: la emeraldina sal.

3.3.1. Generalidades

La polianilina (PANI) es un material polimérico orgánico descubierto en el siglo XIX, inicialmente era llamada “anilina negra” y se conocía por ser muy estable y barata, por lo que era utilizada para la elaboración de colorantes. Sin embargo, recientemente se volvió de gran interés debido a que se descubrió que posee conductividad eléctrica, permitiendo numerosas potenciales aplicaciones tecnológicas [26].

Se sintetiza habitualmente mediante la oxidación de anilina en medio acuoso ácido utilizando peroxodisulfato de amonio [27-29], aunque también se han probado otros oxidantes como cloruro de hierro (III) [30], sulfato de cerio (IV) [31], dicromato de potasio [32], yodato de potasio [33], ácido peryódico [34], clorito de sodio [35], óxido de manganeso (IV) [36], ácido vanádico [37], nitrato de plata [38], peróxido de dibenzoilo [39] y p-benzoquinona [40].

También puede prepararse mediante la oxidación anódica de anilina igualmente en medio ácido sobre electrodos inertes, usualmente se emplea platino [41-43, 49], sin embargo, también se han realizado estudios usando hierro [45], cobre [46], aluminio [47], carbón vitreo [44], grafito pirolítico [48]. semiconductores como silicio, calcogenuros de cadmio, arseniuro y fosfuro de galio [49].

La PANI presenta tres diferentes estados de oxidación (Figura 3.4), dando entonces tres variedades diferentes que son nombradas como leucoemeraldina, emeraldina y pernigranilina. La leucoemeraldina es la forma completamente reducida; la emeraldina es la forma parcialmente oxidada, conteniendo un anillo quinoide en vez de uno aromático por cada unidad de repetición de cuatro anillos; y la pernigranilina es la forma completamente oxidada con dos anillos quinoides presentes por cada unidad de repetición de cuatro anillos [50].

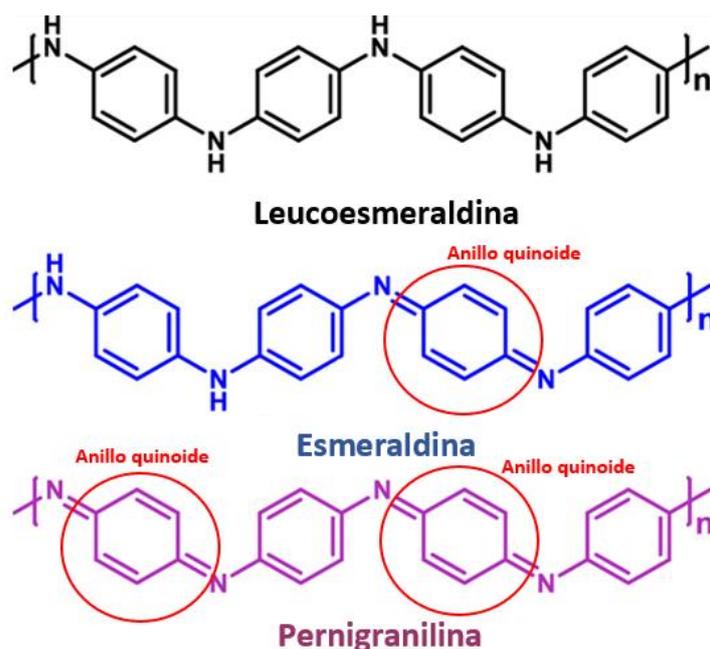
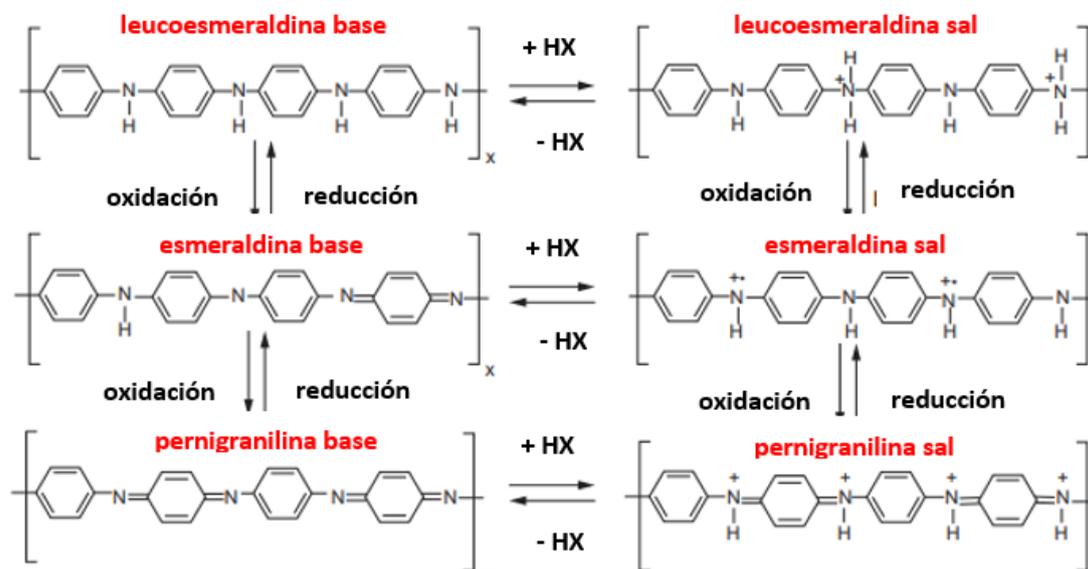


Figura 3.4. Estructura química de los estados de oxidación de la polianilina [50]

Estas tres variedades de PANI al tener en su estructura átomos de nitrógeno con pares de electrones libres, pueden comportarse como base de Lewis, reaccionando con ácidos y generando sales. A este proceso se le conoce como dopado y puede ser reversible (Esquema 3.5) [51].



Esquema 3.5. Obtención de las diferentes formas de PANI [51].

En total existen seis formas de polianilina: leucoemeraldina base, leucoemeraldina sal, emeraldina base, emeraldina sal, pernigranilina base, pernigranilina sal. De todas ellas, solo la emeraldina sal es altamente conductora, siendo esta forma la responsable del interés que se tiene por este material [52].

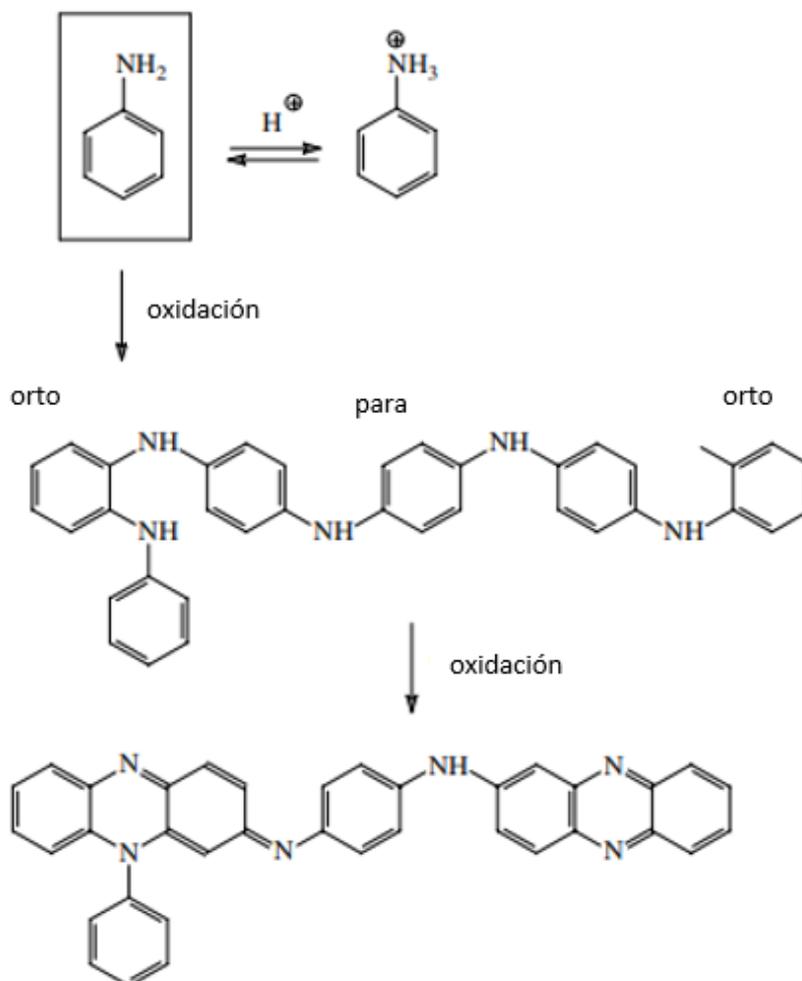
3.3.2. Mecanismo de polimerización

La comprensión del mecanismo de oxidación de la anilina proporciona una base para el control exitoso de la síntesis de la PANI, es decir, los procesos moleculares que determinan la estructura de los productos de oxidación establecen también algunas propiedades físicas y químicas de los materiales obtenidos y la naturaleza de su estructura supramolecular. Se sabe que la acidez de la mezcla de reacción, su pH, tiene una fuerte influencia en la oxidación de la anilina [53].

En medios fuertemente ácidos, los grupos amino presentes se encuentran protonados, convirtiéndose en grupos electro atractores en el anillo aromático de la anilina, dificultando su oxidación. Esto solo permite ataques a la molécula en la posición “para”, generando un crecimiento de cadenas lineales con deslocalización de enlaces π de extremo a extremo, obteniéndose así un polímero conductor [53].

Mientras que, en medios neutros o alcalinos, la mayoría de los grupos amino se encuentran desprotonados, dejando una mayor densidad electrónica en el anillo aromático de la anilina, haciéndola más susceptible a oxidarse. Esto permite ataques en posiciones “orto” y “para”. Bajo estas condiciones, los anillos aromáticos de las cadenas formadas sufren ataques

adicionales, provocando que ya no sea posible la deslocalización de enlaces π de extremo a extremo, obteniéndose así un polímero no conductor (Esquema 3.6) [53].



Esquema 3.6. Posible polimerización de anilina en medios neutros o alcalinos [53].

3.3.3. Síntesis electroquímica

Debido que los métodos químicos no proporcionan un control sobre el polímero [54] y que la emeraldina base solo es soluble en ácidos concentrados, además de que no puede ser fundida, se tienen inconvenientes para aplicar el polímero como película sobre una superficie por estas vías. Sin embargo, cuando la polimerización se realiza sobre un electrodo inerte que actúa como oxidante, el polímero queda adherido a este.

Existen métodos potenciodinámicos (ciclos de potencial), potencioestáticos y galvanostáticos para llevar a cabo esto, sin embargo, el método potenciodinámico produce películas con propiedades ópticas, de adherencia y suavidad superiores [55].

Mediante un voltamperograma típico de un proceso de crecimiento de película, se pueden observar nueve picos de corriente a lo largo de un barrido de potencial eléctrico de -0.2 V a 1.2 V con respecto al electrodo de Ag/AgCl , de los cuales cinco de ellos identificados en la Figura

3.5 como A, B, C, D y E, son carácter anódico, y los restantes identificados como A', B', C' y D', son de carácter catódico.

El pico anódico E puede observarse durante el primer ciclo de potencial aproximadamente en 1.1 V vs AgCl, este corresponde a la oxidación de la anilina para formar radicales catión, los cuales polimerizan. Conforme avanza el ciclado, este pico disminuye y finalmente desaparece [54].

En el segundo ciclo ya pueden apreciarse los 2 pares de picos grandes A/A' y D/D' y también los dos pares de picos menores intermedios B/B' y C/C'.

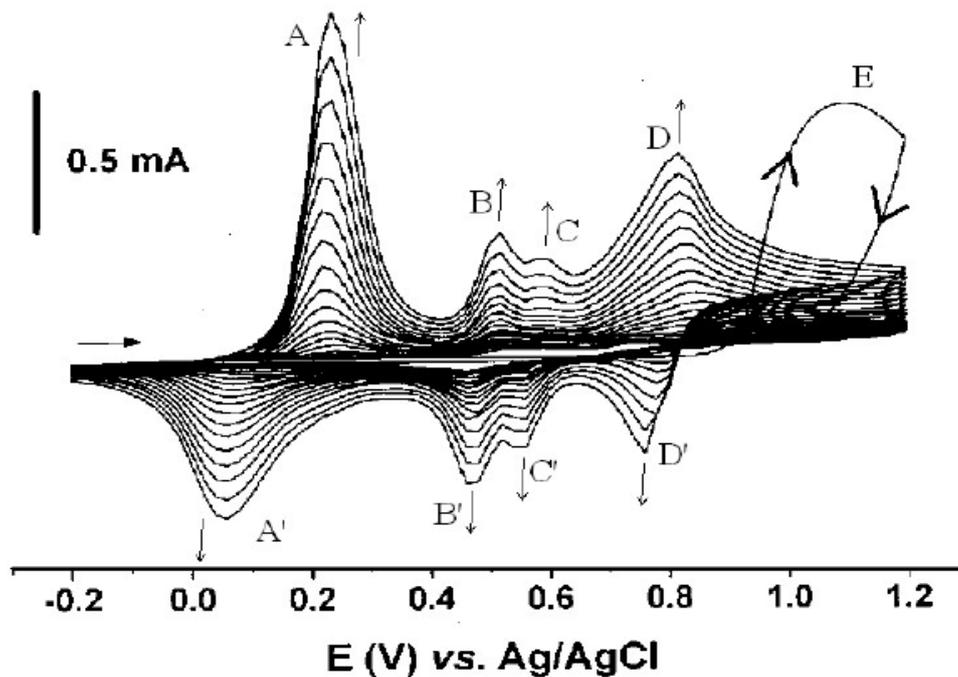


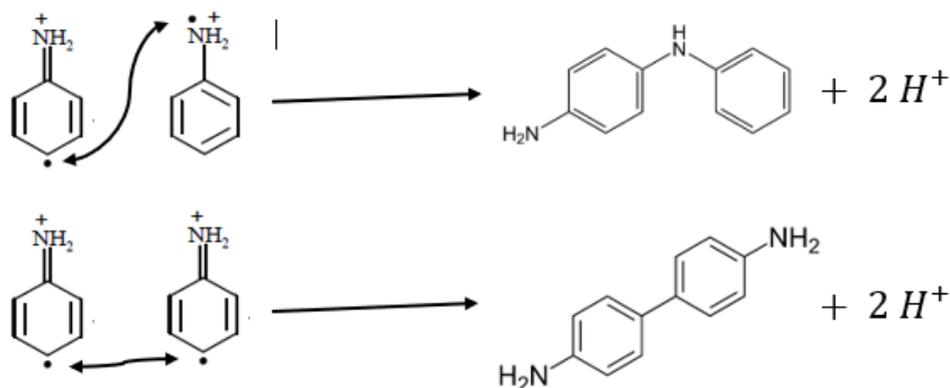
Figura 3.5. Típico voltamperograma cíclico del crecimiento de una película PANI (oro como sustrato y solución acuosa de anilina y H_2SO_4 [56].

El pico anódico "A" posicionado aproximadamente en 0.25 V vs AgCl, es asignado al paso de leucoemeraldina a emeraldina con la formación de polarones. Mientras tanto, la organización por bipolarones no es posible verla en un voltamperograma porque no involucra transferencia de carga [57]. El pico anódico "D" posicionado aproximadamente en 0.85 V vs AgCl, corresponde al paso de emeraldina a pernigranilina [57], aunque también se cree que en esta zona se encuentra la formación del bipolarón [58].

Mientras tanto, los pares de picos B/B' y C/C' localizados entre los dos pares principales corresponden a productos secundarios formados durante la electrosíntesis. Estos productos mencionados son formados por acomplamientos indeseados de radicales anilino y no contribuyen al crecimiento del polímero.

El pico anódico "B" posicionado aproximadamente en 0.5 V vs AgCl corresponde a la oxidación de p-aminodifenilamina, y el pico anódico "C" posicionado aproximadamente en 0.6 V vs AgCl corresponde a la oxidación de bencidina, ambas especies dimericas presentes en la reacción de polimerización de la anilina en medio ácido (Esquema 3.7) [59].

Es importante mencionar que en general, la forma y la posición de los picos depende de diferentes variables experimentales como las condiciones de preparación, rapidez de barrido de potencial, la composición del electrolito soporte, entre otras cosas [60].



Esquema 3.7. Mecanismo de formación de los dímeros oxidables (*p*-aminodifenilamina (arriba) y bencidina (abajo)) en la voltamperometría cíclica, evidenciados por los picos anódicos "B" y "C" respectivamente.

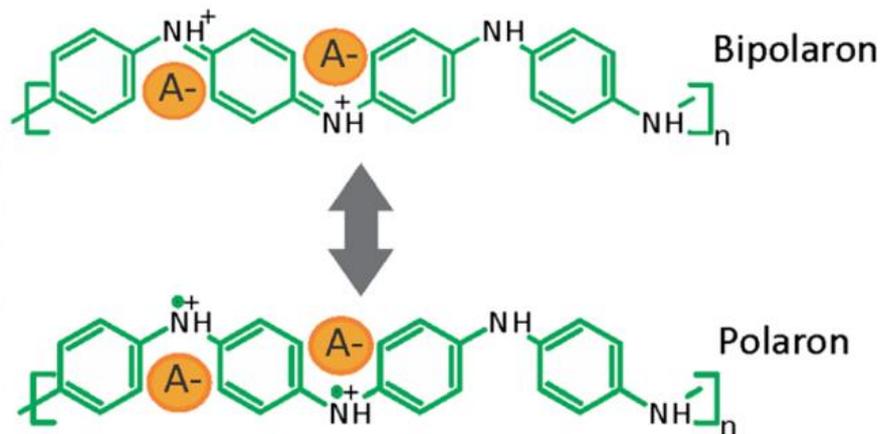
3.3.4. Emeraldina Sal (PANI-ES)

Esta forma de PANI es muy estable a temperatura ambiente y puede ser identificada visualmente por su color verde. Es fácilmente obtenida por la protonación de la emeraldina base o por la oxidación de la leucoemeraldina base [61], lo que se puede conseguir por la exposición a ácidos o por dopado oxidativo, respectivamente [62].

Al oxidar el polímero se pueden formar radicales catión o bien dicaciones, por lo que la emeraldina sal puede presentar dos posibles organizaciones como polarón o como bipolarón respectivamente (Esquema 3.8) [63].

En la organización de polarón, un radical catiónico de nitrógeno actúa como un agujero electrónico, que puede transferir una carga positiva elemental. Un electrón del nitrógeno adyacente (neutro) salta a este agujero y se vuelve eléctricamente neutro iniciando el movimiento de los agujeros a través de un proceso de resonancia. Por lo tanto, se tiene una conductividad de tipo p [64].

La predominancia de una u otra de las posibles organizaciones mencionadas, está determinada por el grado de oxidación, siendo la formación de bipolarones favorecida cuando el polímero presenta mayor grado de oxidación.



Esquema 3.8. Posibles organizaciones de la emeraldina sal

El contraión puede ser desde un ion inorgánico simple, hasta moléculas orgánicas de tamaño considerable. Este influye de forma importante en las propiedades del polímero, observándose que se conseguía mayor conductividad cuando el contraión es más pequeño, pues su movilidad es un factor decisivo [65].

Existe el problema de que la emeraldina sal es infusible e insoluble en la mayoría de los disolventes por lo que se dificulta su procesamiento. Se afirma que solo es soluble en ácidos concentrados como el ácido sulfúrico, el ácido metanosulfónico, los ácidos fórmico y acético. mientras que la emeraldina base es soluble en una amplia variedad de disolventes tales como N-metil pirrolidona, dimetilformamida, dimetilsulfóxido y similares [66]. Se ha encontrado que empleando ácidos protónicos funcionalizados en lugar de dopar con ácidos inorgánicos comunes se mejora la solubilidad en solventes orgánicos y la miscibilidad con diferentes polímeros dieléctricos de la sal PANI [67], sin embargo, esto no garantiza una conductividad eléctrica aceptable.

4. METODOLOGIA

4.1. Películas de polianilina

En esta sección se presentan las condiciones experimentales y el proceso de síntesis electroquímica para las películas de polianilina que funcionaran como soporte para la enzima.

4.1.1. Condiciones experimentales

La celda electroquímica consta de un vaso de precipitados de 50 ml como recipiente contenedor, un tapón horadado con tres orificios equidistantes como soporte de los electrodos, y cables con caimán como circuito eléctrico.

Como electrodos de trabajo se emplearon superficies de 0.5 cm x 0.5 cm (0.25 cm^2) de tiras de tereftalato de polietileno (PET) recubiertas de óxido de indio y estaño (ITO) con resistividad de $60 \Omega/\text{cm}^2$, marca Aldrich; y como electrodo auxiliar se empleó una barra cilíndrica de grafito de 6.0 cm de largo y 0.8 cm de diámetro. Ambos electrodos, tanto el de trabajo como el auxiliar, se les puso una capucha de cinta adhesiva de cobre (marca TED PELLA) de 0.5 cm de largo para mejorar la conductividad eléctrica en el contacto caimán-electrodo. Como electrodo de referencia se empleó un electrodo de calomel saturado comercial (marca Radiometer Analytical). Como dispositivo de control de la celda electroquímica se empleó un potencióstato VoltaLab PST050.

Para la preparación del electrolito de la celda de síntesis se empleó anilina (99%, grado reactivo, Sigma-Aldrich) como monómero, HCl al 37% (marca Reproquifin) como agente dopante y precursor del medio iónico, y agua desionizada como disolvente.

4.1.2. Síntesis electroquímica

Tomando como referencia el trabajo experimental previo realizado en el laboratorio, se tomó como punto de partida emplear un electrolito acuoso de anilina 0.5M y HCl 0.5M. La síntesis se lleva a cabo mediante la aplicación de barridos cíclicos de potencial entre -300 mV y +1200 mV con respecto a la referencia de calomel saturado, hasta completar 30 ciclos, con una velocidad de barrido de 30 mV/s. Esto corresponde a un tiempo de síntesis de 50 min (3000 s) para todos los experimentos. Al terminar la síntesis, las películas son dejadas secar a temperatura ambiente en un desecador.

4.2. Inmovilización de glucosa oxidasa

En esta sección se presentan los detalles sobre la preparación de la enzima, y los métodos de inmovilización empleados en este trabajo.

4.2.1. preparación de la enzima

Se preparan tres suspensiones de enzima glucosa oxidasa (marca Sigma, polvo liofilizado con 100000-250000 unidades/g) en agua desionizada de a) 40mg/ml, b) 20 mg/ml y c) 10 mg/ml.

El polvo de Glucosa oxidasa empleado siempre debe estar almacenado a 0°C, mientras que las suspensiones elaboradas con él a 4°C para evitar una pérdida de actividad acelerada.

Cada suspensión de diferente concentración elaborada será empleada por cada método de inmovilización planteado.

4.2.2. Métodos de inmovilización

Método 1: Adsorción de Glucosa Oxidasa sobre una película de polianilina.

Empleando una micropipeta, se aplican 10 μ l de suspensión de Glucosa oxidasa sobre la película de polianilina (40 μ l/cm²), cuidando que esta aplicación sea lo más uniforme posible. Posteriormente los electrodos se dejan secar a 4°C durante al menos un día para poder utilizarlos.

Método 2: Encapsulamiento de Glucosa oxidasa mediante una película de polianilina sintetizada por voltamperometría cíclica.

Se aplican de manera uniforme, 10 μ l de suspensión de Glucosa oxidasa empleando una micropipeta sobre la película de polianilina del electrodo (40 μ l/cm²), y se dejan secar a 4°C durante al menos un día. Posteriormente el electrodo se sumerge en un electrolito acuoso de anilina 0.5M y HCl 0.5M, y se aplican 10 ciclos de barrido de potencial entre -300 mV y +1200mV y una velocidad de barrido de 30 mV/s para sintetizar una nueva capa de polianilina sobre la capa de enzima, y de este modo, encapsularla. Finalmente, los electrodos son enjuagados con agua desionizada y de nuevo almacenados a 4°C al término de la voltamperometría.

Método 3. Encapsulamiento de Glucosa oxidasa mediante una película de polianilina sintetizada por glucosa oxidasa.

Mediante el uso de una micropipeta, se aplican sobre la película de polianilina del electrodo, 10 μ l de suspensión de Glucosa oxidasa (40 μ l/cm²), cuidando que esta aplicación sea lo más uniforme posible y se dejan secar a 4°C durante al menos un día. Posteriormente se aplican 10 μ l de una solución de Anilina 0.5M y glucosa 0.1M sobre la superficie del electrodo con el objetivo de crear una capa de polianilina. Esto se pretende lograr aprovechando el peróxido liberado en la reacción de oxidación de glucosa con oxígeno, catalizada por la glucosa oxidasa, que permite oxidar moléculas de anilina a radicales anilinio, que pueden polimerizar. Este polímero no necesita ser conductor eléctrico, pues su única función es retener a la glucosa oxidasa que sirvió para sintetizarlo, en la superficie del electrodo. Finalmente, los electrodos se almacenan a 4°C al término del procedimiento.

4.3. Caracterización

En esta sección se describen los métodos de caracterización empleados: Potencial de circuito abierto, voltamperometría cíclica y microscopia electrónica de barrido.

4.3.1. Potencial de circuito abierto y voltamperometría cíclica

Los diferentes electrodos obtenidos por los tres métodos planteados son caracterizados electroquímicamente empleando electrolitos de a) KCl 0.1M, b) KCl 0.1M + glucosa 0.1M, c) KCl 0.1M + $K_3Fe(CN)_6$ 0.5M y d) KCl 0.1M + glucosa 0.1M + $K_3Fe(CN)_6$ 0.5M.

La función de los diferentes componentes de los electrolitos es la siguiente:

- KCl es empleado como electrolito soporte
- Glucosa es el sustrato de la enzima (Combustible para la celda), la cual presenta dos isómeros: α y β , cuya diferencia es la orientación del grupo hidroxilo unido al primer átomo de carbono (figura 4.1).

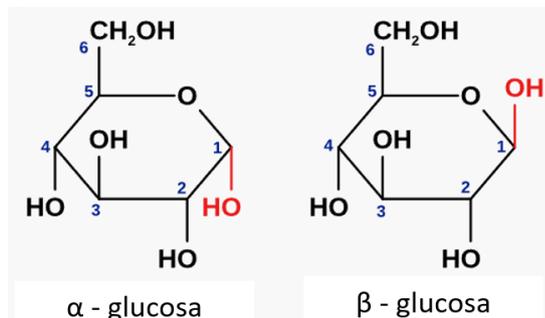


Figura 4.1 Isómeros de la molécula de glucosa [19]

Estos dos isómeros se encuentran en equilibrio mediante la mutarrotación en solución acuosa [68], donde el isómero β es el más estable de los dos y es el que puede ser utilizado por la enzima [19].

- $K_3Fe(CN)_6$ es empleado como mediador (acarreador de electrones) entre la enzima reducida y la matriz de polianilina. La elección de iones $Fe(CN)_6^{3-}$ se debe a que presentan un potencial de reducción de 0.12 V vs ECS, mientras que el potencial de reducción de las enzimas glucosa oxidasa es de -0.34 V vs ECS, haciendo termodinámicamente posible la oxidación de las enzimas con este mediador. Además de este punto, se eligió este intermediario porque su reducción se da por la transferencia de un solo electrón con una cinética rápida, dando señales claras en voltamperogramas [69]

Se utiliza una celda que consta de un electrodo de trabajo, un electrodo auxiliar y un electrodo de referencia, donde el electrolito no tiene agitación (Figura 4.2)

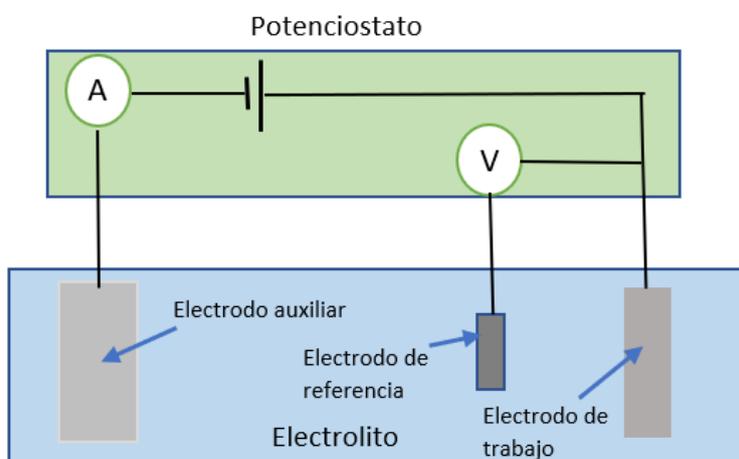


Figura 4.2 instalación eléctrica de la celda de tres electrodos

Las técnicas electroquímicas son:

- **Potencial de circuito abierto:** Se trata del potencial establecido entre el electrodo de trabajo y el medio ambiente, con respecto a un electrodo de referencia cuando la corriente eléctrica tiende a 0 A. La medición se realiza mediante 4 minutos, construyendo un gráfico t vs E .
- **Voltamperometría cíclica:** Consiste en la variación cíclica del potencial eléctrico impuesto al electrodo de trabajo en función del tiempo, midiendo la respuesta de corriente eléctrica generada. Los datos obtenidos construyen un gráfico E vs I llamado voltamperograma (Figura 4.3) [70]

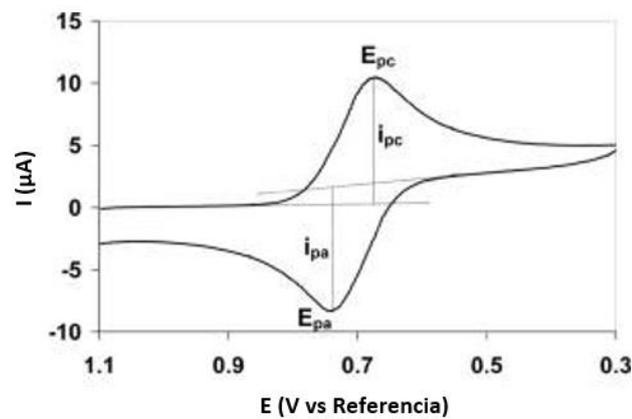


Figura 4.3. Voltamperograma cíclico típico [65]

Las mediciones se realizan para los electrodos construidos aplicando barridos cíclicos de potencial con velocidades de 30, 100, 500 y 1000 mV/s.

4.3.2. Microscopia electrónica de barrido

La superficie de los electrodos obtenidos fue estudiada por un microscopio electrónico de barrido modelo JEOL JSM-5900-LV, con un voltaje de aceleración de 0.3 a 3 kV (pasos de 100V), 3 a 30 kV (pasos de 1kV) y una capacidad de amplificación de 18X a 300,000X.

5. Resultados y discusión

A continuación se presenta la nomenclatura del conjunto de electrodos estudiado y discutido a profundidad en las secciones de este capítulo, en una tabla, para una mejor comprensión por parte del lector.

Carga de enzima (mg/ μ L)	Método			
		1	2	3
Sin enzima	VC53, VC54, VC103	-----	-----	-----
10	-----	VC42, VC120	VC116, VC117	VC118, VC119
20	-----	VC104, VC105	VC106, VC107	VC108, VC109
40	-----	VC110, VC111	VC112, VC113	VC114, VC115

Tabla 1.2. electrodos fabricados sin enzima y con enzima mediante tres métodos diferentes con tres cargas de glucosa-oxidasa.

5.1. Síntesis de películas de polianilina sobre ITO

En esta sección, se presentan los resultados y su discusión de la síntesis de películas de polianilina sobre ITO por aplicación de barridos cíclicos de potencial, así como su caracterización por microscopia electrónica de barrido y técnicas electroquímicas como potencial de circuito abierto y volтамperometría cíclica.

5.1.1. Síntesis por aplicación de barridos cíclicos de potencial

En la figura 5.1 se presentan los voltamperogramas de la síntesis de polímero en la muestra VC53.

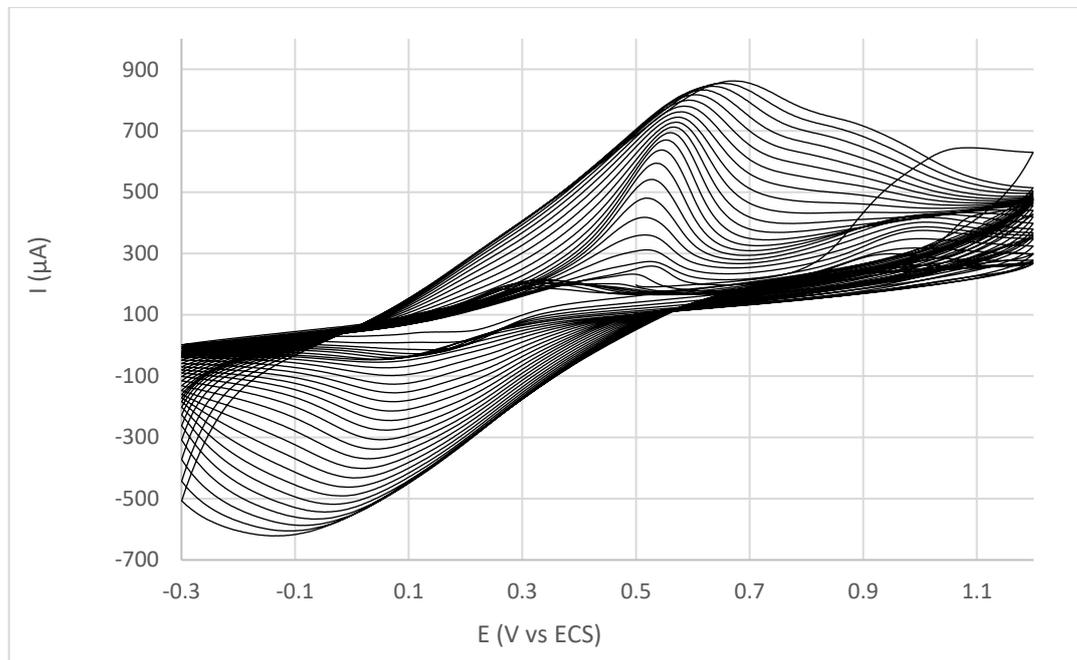
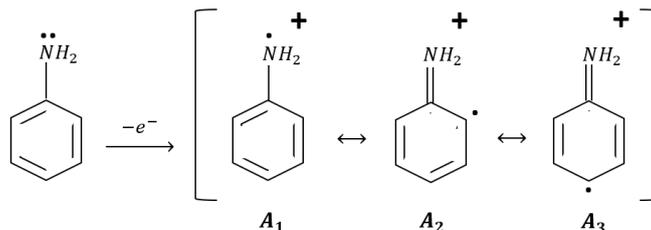


Figura 5.1. Voltamperogramas de la síntesis de película de polianilina de la muestra VC53

Para un mejor análisis, los voltamperogramas se dividirán en dos bloques en el siguiente modo: En la figura 5.2 se presentan los ciclos 1 a 10, que corresponden a las etapas iniciales de síntesis de la PANI: Oxidación del monómero, nucleación y crecimiento de la película. En la figura 5.5 se reportan los ciclos 11 a 30, correspondientes al crecimiento y transformación de la película.

El pico anódico identificado como "I", tiene un potencial de 1.07 V vs ECS, con un valor máximo en el primer ciclo. Posteriormente, este pico va decreciendo y desplazándose ligeramente a potenciales más positivos con cada ciclo transcurrido, mostrando que es cada vez más difícil extraer electrones del electrodo de trabajo. En la observación de las muestras, se percibe la aparición de un color azul intenso en el electrodo, desde la primera formación de este pico en los voltamperogramas.

Este pico I puede atribuirse a una contribución de dos procesos simultáneos; el primero consiste en la oxidación de moléculas de anilina para formar radicales anilino, los cuales pueden tener alguna de las tres formas resonantes presentadas en el esquema 5.1.



Esquema 5.1. Oxidación inicial de la anilina [71].

Las formas resonantes A_1 , A_2 y A_3 formadas en la superficie del electrodo, pueden reaccionar entre sí formando dímeros (Esquema 5.2.) y liberando dos equivalentes de iones H^+ en el proceso [71].

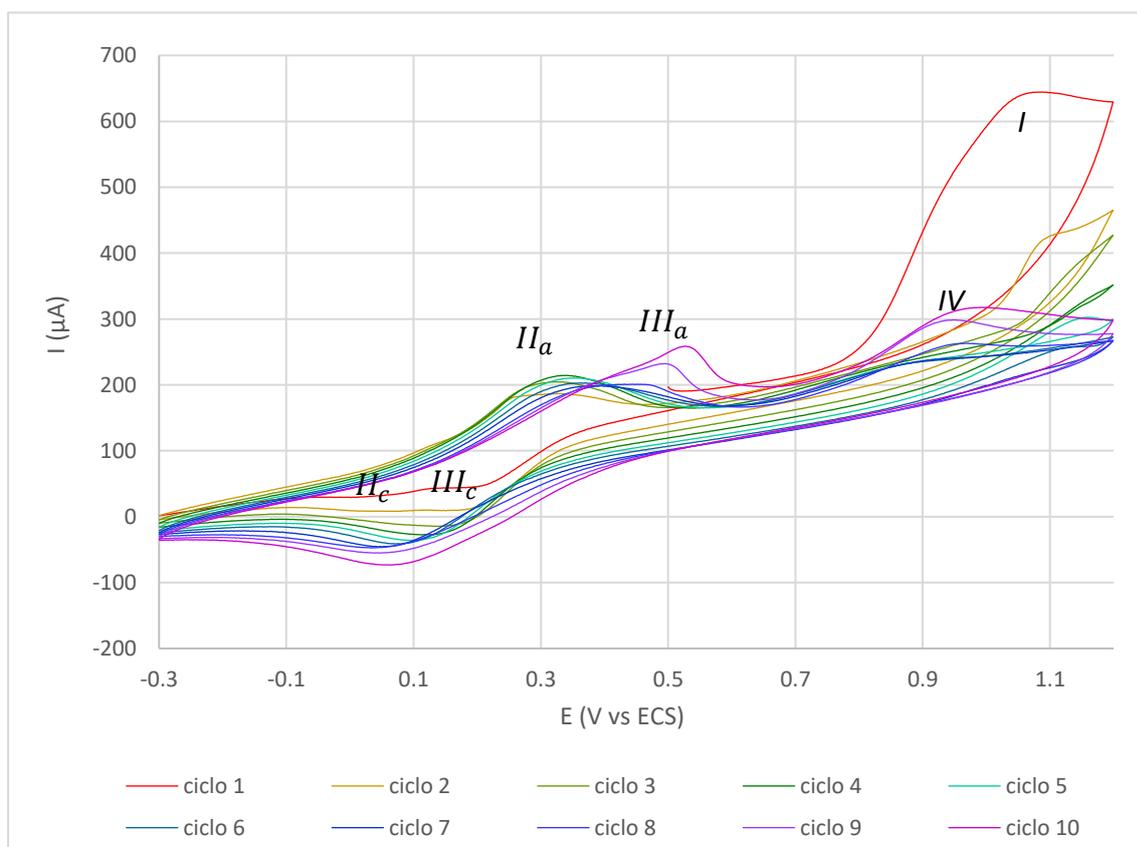
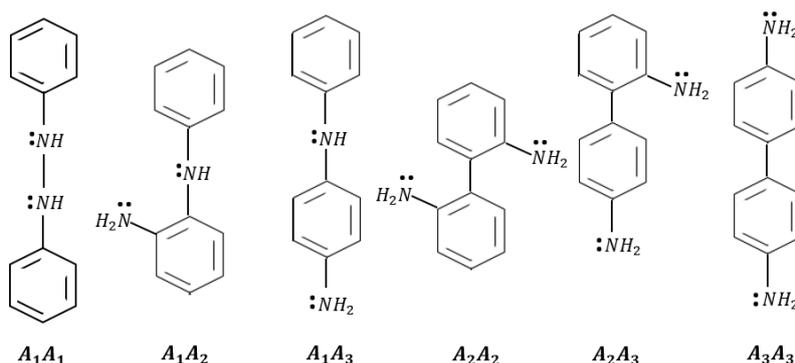


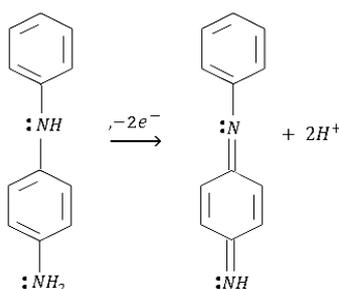
Figura 5.2. Ciclos 1 a 10 de la síntesis de película en la muestra VC53



Esquema 5.2. Posibles dímeros formados por la recombinación de radicales anilino. [72]

La segunda contribución consiste en que estos dímeros, que poseen un estado hidroquinoido cuando están recién formados, pueden oxidarse a un estado quinoide dado que el potencial es lo suficientemente positivo en el momento de su formación, aportando una corriente anódica adicional.

Por ejemplo, el dímero A_1A_3 puede sufrir esta oxidación dando lugar a una media unidad polimérica de pernigranilina, como se muestra en el esquema 5.3.



Esquema 5.3. conversión bencenoide – quinoide del dímero A_1A_3 . [71]

El pico anódico " II_a " aparece, a partir del segundo ciclo, alrededor de 0.30 V vs ECS. Durante el barrido en este intervalo de potencial se percibe que el electrodo cambia de color, de amarillo pálido a verde intenso, por lo que se le atribuye la oxidación de leucoemeraldina a emeraldina. A partir del ciclo 4 la corriente de este pico decrece y su máximo se desplaza hacia potenciales más positivos, al tiempo que aparece el pico IIIa, cuya corriente aumenta con el paso de los ciclos subsiguientes. Después del ciclo 7, los picos IIa y IIIa quedan englobados en uno solo.

Mientras tanto, el pico anódico identificado como " III_a " aparece a partir del ciclo 7, en aproximadamente 0.45 V vs ECS, creciendo y teniendo un desplazamiento a potenciales más positivos con cada ciclo aplicado. Observando las muestras durante la formación de este pico, se percibe un cambio de color de verde intenso a azul intenso, lo cual se puede atribuir a la oxidación de emeraldina en pernigranilina. El crecimiento de la corriente con cada ciclo aplicado se debe al aumento del área superficial del electrodo por el crecimiento de la nueva fase de polianilina. La diferencia de potencial del pico entre ambas muestras puede deberse a que el polímero adquiere morfologías o constituciones diferentes en los primeros ciclos, lo cual impone diferentes conductividades.

Los picos IIa y IIIa tienen sus correspondientes picos catódicos IIc y IIIc, que se pueden apreciar con claridad en los primeros ciclos, mientras que después de varios ciclos estos dos picos quedan englobados en una sola onda catódica.

La asignación de las reacciones correspondientes a cada pico se puede hacer, en las etapas iniciales, de acuerdo con el cambio de color del electrodo, pues está reportado que la leucoemeraldina es amarilla, la emeraldina verde y la pernigranilina azul [50]. En la figura 5.3 se presenta un ejemplo de estos cambios de color.



Figura 5.3. Diferentes formas de polianilina observadas durante la síntesis por voltamperometría cíclica. Leucoemeraldina (izquierda), emeraldina (centro), pernigranilina (derecha)

El pico catódico identificado como " III_c ", aparece alrededor de 0.22 V vs ECS, creciendo con cada ciclo aplicado. Puede apreciarse que el pico va desplazándose a potenciales más negativos con cada ciclo, mostrando que es cada vez más difícil inyectar electrones al electrodo de trabajo. En la observación de las muestras durante la formación de este pico, se percibe un cambio de color azul intenso a verde intenso y esto puede atribuirse a la reducción de pernigranilina a emeraldina.

El pico catódico " II_c ", aparece alrededor de 0.05 V vs ECS y también crece con cada ciclo aplicado. Observando las muestras durante la formación de este pico, se percibe un cambio de color verde intenso a amarillo pálido y esto puede atribuirse a la reducción de emeraldina a leucoemeraldina. El crecimiento de este pico es pequeño con cada ciclo aplicado, lo que origina un traslape con el pico III_c desde el ciclo 4.

Finalmente, cuando el pico " I " desaparece, puede observarse el pico anódico identificado como " IV " en aproximadamente 0.95 V, creciendo con cada ciclo aplicado. Observando las muestras durante la formación de este pico no se perciben cambios, siendo la muestra de color azul intenso todo el tiempo. Este pico anódico no tiene un pico catódico asociado, mostrando que la reacción química llevada a cabo no es reversible en las condiciones investigadas.

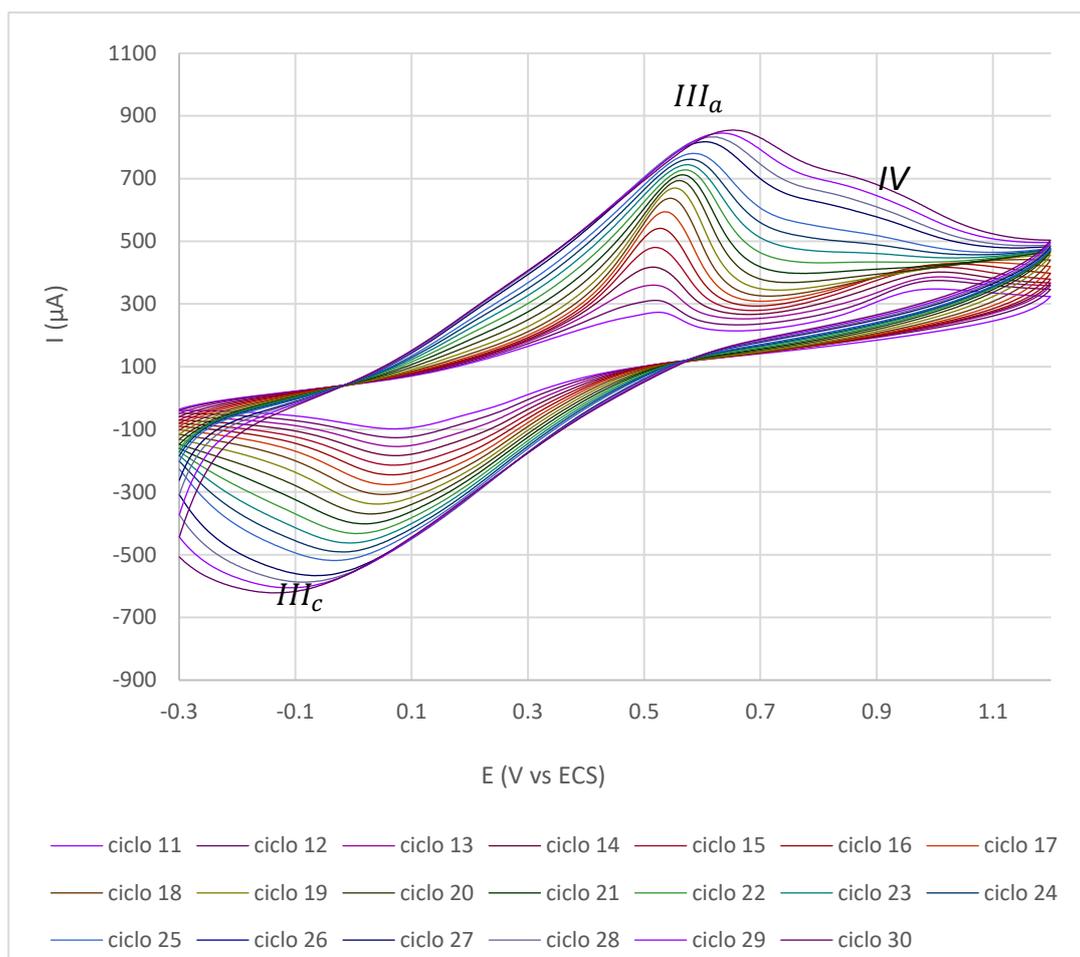


Figura 5.4. Ciclos 11 a 30 de la síntesis de película en VC53

Tanto el pico anódico " III_a " como el pico catódico " III_c ", desde el ciclo 11 hasta el ciclo 26, tienen un crecimiento constante con un ligero desplazamiento a potenciales más positivos y negativos, respectivamente (figura 5.4). A partir del ciclo 27 en adelante, el crecimiento se vuelve lento y se observan grandes desplazamientos de potencial (positivos para III_a y negativos para III_c) indicando posiblemente que el polímero ha dejado de crecer.

El pico anódico identificado como " IV " continúa creciendo discretamente de forma constante sin desplazamientos de potencial hasta el ciclo 20, posteriormente, en los ciclos siguientes ya no puede observarse.

5.1.2. Microscopía electrónica de barrido del electrodo PANI/ITO

A continuación, se presentan imágenes obtenidas de la muestra VC51 que es representativa de este método:

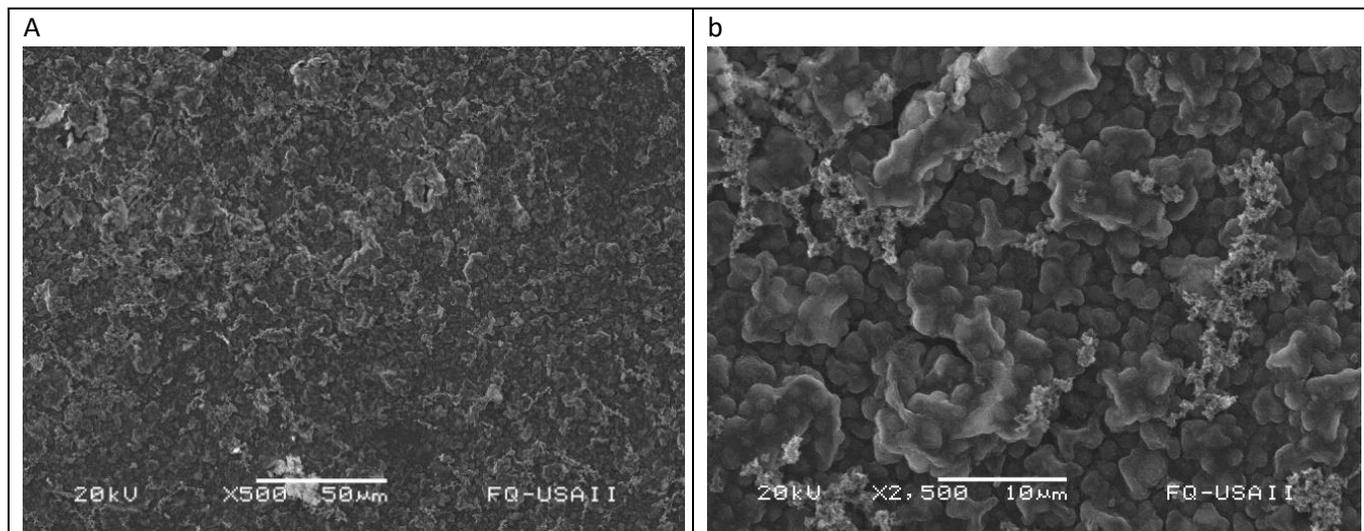


Figura 5.5. imágenes de electrones secundarios de la muestra VC51 con a) x500 aumentos y b) x2500 aumentos.

En la imagen con x2500 aumentos de la figura 5.5 se puede observar que el polímero que se forma sobre la superficie de ITO presenta estructuras globulares de diferentes tamaños que se fusionan formando algo parecido a pétalos apilados, de forma que se obtienen superficies con distintas profundidades. Mientras que en la imagen con x500 aumentos, se observa uniformidad en la morfología descrita sobre amplias áreas del electrodo.

5.1.3. Caracterización electroquímica de los electrodos PANI/ITO

A continuación se presentan los resultados de potencial de circuito abierto y voltamperometría cíclica de los electrodos VC54 y VC103, los cuales son representativos del sistema PANI/ITO.

El electrodo VC54 fue probado en los medios KCl 0.1M y HCl 0.1M, mientras que el electrodo VC103 en medios KCl 0.1M; KCl 0.1M + glucosa 0.1M; KCl 0.1M + $K_3Fe(CN)_6$ 0.5M y KCl 0.1M + glucosa 0.1M + $K_3Fe(CN)_6$ 0.5M.

5.1.3.1. Potencial de circuito abierto

En la figura 5.6a, se presentan las curvas de potencial de circuito abierto del electrodo VC54 en los medios de KCl 0.1M y HCl 0.1M. Ambas curvas son estables y presentan una disminución de potencial con el paso del tiempo. Se observa que el electrodo en un medio de KCl 0.1M, con un OCP de 0.121 V vs ECS al min 4, tendría tendencia a aceptar electrones, y en un medio de HCl (OCP de -0.205 V vs ECS al min 4) tiene tendencia a donar electrones.

Por otra parte, en la figura 5.6b se presentan las curvas del electrodo VC103, se observa que tres de las curvas de potencial de circuito abierto de los medios evaluados (KCl 0.1M, KCl 0.1M + $K_3Fe(CN)_6$ 0.5M y KCl 0.1M + glucosa 0.1M + $K_3Fe(CN)_6$ 0.5M) son estables y presentan valores de potencial positivos en contra del electrodo de calomel saturado, indicando que el electrodo de trabajo estaría aumentando su tendencia a aceptar electrones.

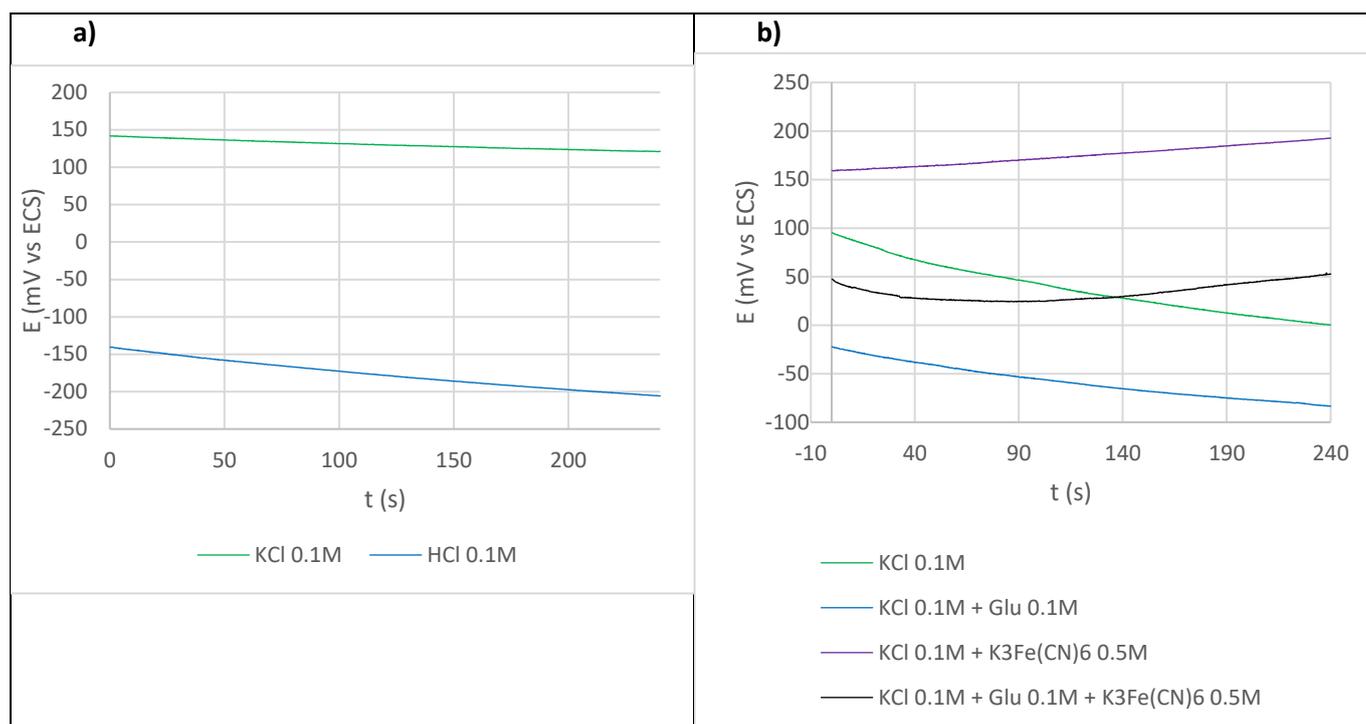


Figura 5.6. Curvas de potencial de circuito abierto de los electrodos a) VC54 y b) VC103 en diferentes medios

De dichas curvas, la obtenida del medio de KCl 0.1M tiene una disminución de potencial con el paso del tiempo, la del medio de KCl 0.1M + $K_3Fe(CN)_6$ 0.5M presenta un aumento, y la del medio de KCl 0.1M + glucosa 0.1M + $K_3Fe(CN)_6$ 0.5M presenta una disminución en los primeros segundos para posteriormente aumentar. Al llegar a los 4 min de inmersión, el electrodo tiene una mayor tendencia para aceptar electrones del circuito eléctrico, sumergido en el medio de KCl 0.1M + $K_3Fe(CN)_6$ 0.5M (0.192 V vs ECS), seguido por el medio de KCl 0.1M + glucosa 0.1M + $K_3Fe(CN)_6$ 0.5M (0.052 V vs ECS) y finalmente por el medio de KCl (0.000 V vs ECS).

Mientras tanto, la curva de potencial de circuito abierto del medio de KCl 0.1M + glucosa 0.1M presenta un comportamiento estable y catódico con una disminución de potencial con el paso del tiempo (-0.083 V vs ECS en el min 4).

5.1.3.2. Voltamperometría cíclica

En la figura 5.7 se presentan los voltamperogramas con velocidades de barrido de 30 mV/s, 100 mV/s, 500 mV/s y 1000 mV/s del electrodo VC54 en los medios de KCl 0.1M y HCl 0.1M.

El apartado a) de dicha figura corresponde al medio de KCl 0.1M, en él se observa que la corriente eléctrica aumenta con la rapidez de barrido. Sólo a 30 mV/s se aprecia un pico catódico que coincide con el intervalo de potencial y las características del pico IIIc observado durante la síntesis (transición emeraldina a leucoemeraldina). En los barridos a 100, 500 y 1000 mV/s, de manera general, la respuesta del electrodo presenta dos zonas con distinta pendiente: una entre -0.3 y 0.15 V vs ECS, con corriente catódica, y otra entre 0.15 y 1.2 V vs. ECS, donde se observan corrientes anódicas y tiene una pendiente menor que la primera.

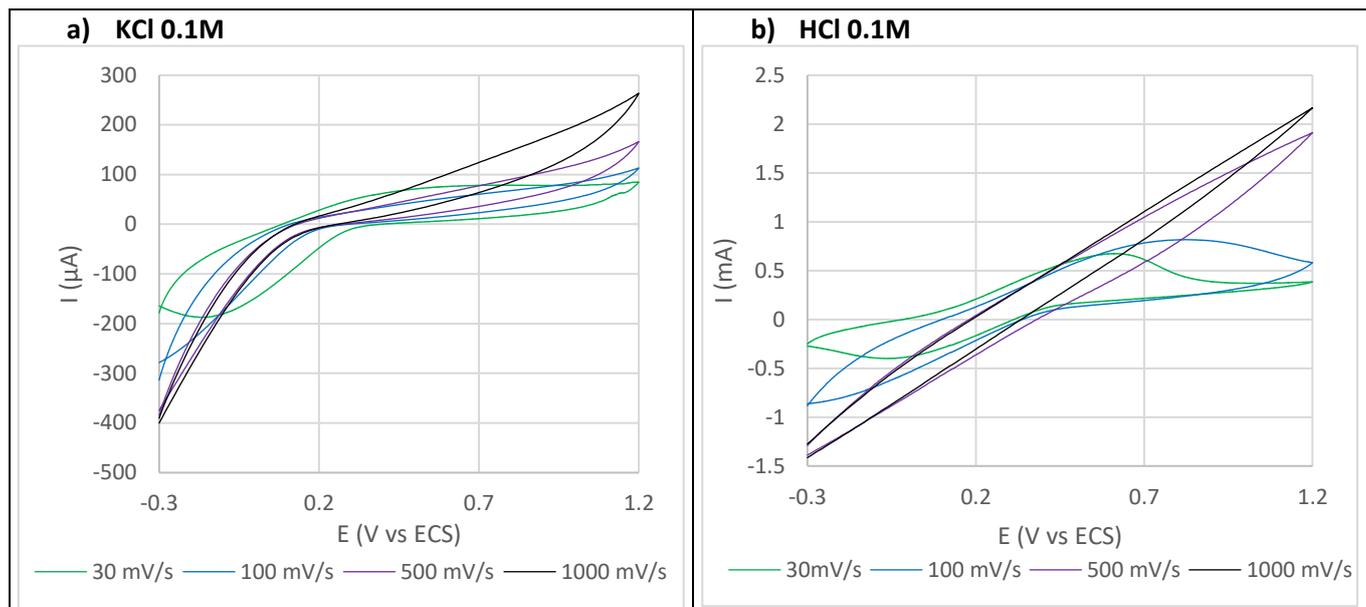


Figura 5.7. Respuestas voltamperométricas del sistema PANI/ITO en medios de a) KCl 0.1 M y b) HCl 0.1 M.

Mientras tanto, el apartado b) corresponde al medio de HCl 0.1M, aquí se muestran algunas similitudes con la respuesta en el electrolito de KCl, pero también hay diferencias importantes: se observa una clara onda anódica está presente en los barridos hacia potenciales positivos, a 30 y 100 mV/s. En los barridos más rápidos hay una respuesta lineal de la corriente en función del potencial, correspondiente a la ley de Ohm, con una histéresis debida a la capacitancia en el conjunto de interfaces en la celda.

En cambio, en la figura 5.8 se comparan las respuestas en HCl y en KCl, a 30 mV/s. Lo que se observa en ácido clorhídrico es un sistema redox convencional, con una onda anódica y una catódica de aproximadamente las mismas dimensiones. La razón de estas diferencias es la

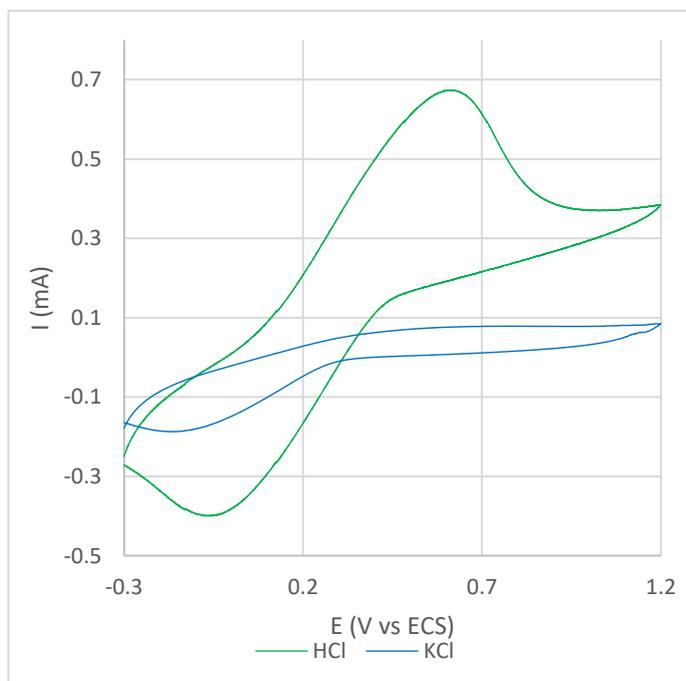


Figura 5.8. Respuesta voltamperométrica del electrodo PANI/ITO, a 30 mV/s, en medios HCl 0.1 M y KCl 0.1 M

diferente rapidez de intercambio iónico en cada medio: en barrido hacia potenciales positivos, los cationes son expulsados de la matriz porosa del polímero, al tiempo que iones cloruro se incorporan a la polianilina, que se transforma en sus estados más oxidados. En el barrido hacia potenciales negativos el electrodo se reduce y se incorporan cationes en su estructura. Dado que los protones tienen una movilidad mucho mayor que el ion potasio, las corrientes y la carga eléctrica en el medio HCl son también mucho mayores.

Las ondas anódica y catódica presentes en la respuesta en HCl coinciden bastante bien con los potenciales de los picos IIIa y IIIc observados en la síntesis y, como se mencionó antes, aparentemente cada uno engloba un proceso redox de 4 electrones.

Por otra parte, en la figura 5.9 se presentan las respuestas voltamperométricas del electrodo VC103 inmerso en los medios de KCl 0.1M, KCl 0.1M + glucosa 0.1M, KCl 0.1M + $K_3Fe(CN)_6$ 0.5M, y KCl 0.1M + glucosa 0.1M + $K_3Fe(CN)_6$ 0.5M.

Para los medios de KCl 0.1M (figura 5.9a) y KCl 0.1M + glucosa 0.1M (figura 5.9b), se observa que la corriente aumenta con la velocidad de barrido. Encontramos únicamente a la velocidad de barrido de 30mV/s, un pico catódico que coincide en localización y características con el pico III_c observado durante la síntesis, el cual se le atribuye la transición de emeraldina a leucoemeraldina. Para velocidades de barrido superiores (100, 500 y 1000 mV/s), se observan dos zonas con distinta pendiente: una entre -0.3 y 0.15 V vs ECS, con corriente catódica, y otra entre 0.15 y 1.2 V vs. ECS, donde se observan corrientes anódicas con pendientes ligeramente menores que la observada en la primera zona.

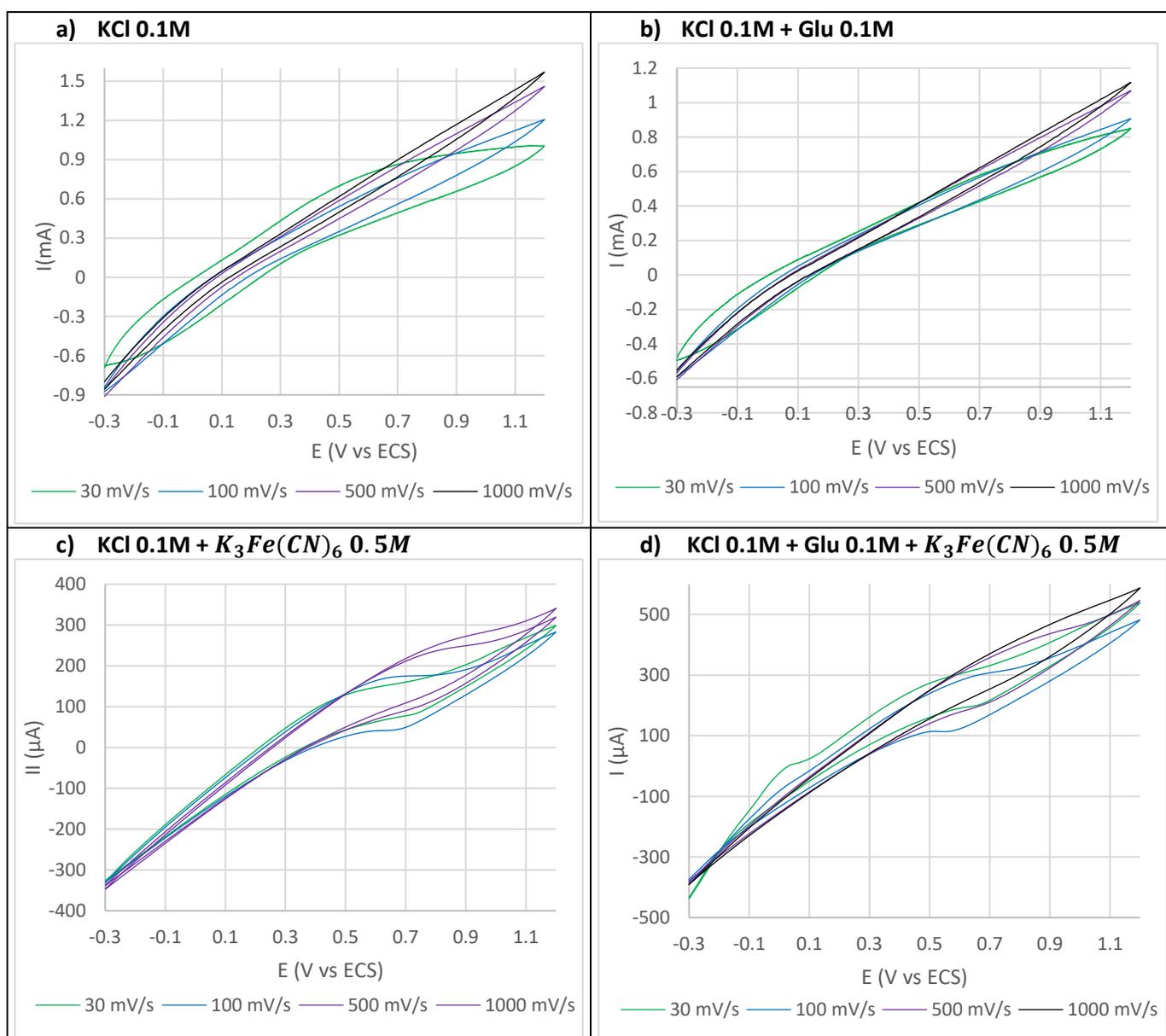


Figura 5.9. Respuestas amperométricas con velocidades de barrido de 30, 100, 500 y 1000 mV/s, del electrodo VC103 en los medios de: a) KCl 0.1M, b) KCl 0.1M + glucosa 0.1M, c) KCl 0.1M + $K_3Fe(CN)_6$ 0.5M y d) KCl 0.1M + glucosa 0.1M + $K_3Fe(CN)_6$ 0.5M.

Mientras tanto, para los medios de KCl 0.1M + $K_3Fe(CN)_6$ 0.5M (figura 5.9c), y KCl 0.1M + glucosa 0.1M + $K_3Fe(CN)_6$ 0.5M (figura 5.9d), no es observable el pico catódico de transición de emeraldina a leucoemeraldina, posiblemente por una ocupación de iones $Fe(CN)_6^{3-}$ en la interfase de la polianilina, que bloquea la migración de iones necesaria para las transiciones de estado de oxidación del polímero. En cambio, se observa una onda catódica y una onda anódica, ambas de las mismas dimensiones, localizadas alrededor de 0.7 V vs ECS. Ambas crecen en valores de corriente con el aumento de la velocidad de barrido, teniendo la onda catódica un desplazamiento a potenciales más negativos, y la onda anódica a potenciales más positivos durante este fenómeno descrito. Estas ondas pueden ser atribuidas a la transición reversible de iones $Fe(CN)_6^{3-}$ a iones $Fe(CN)_6^{4-}$ presentes en el sistema.

5.2. Electrodo enzimáticos soportados en una película de polianilina

En esta sección se presentan los resultados y su discusión obtenidos de las imágenes de microscopía electrónica de barrido y de las técnicas electroquímicas de los electrodos enzimáticos con soporte de polianilina.

5.2.1. Microscopía electrónica de barrido de electrodos enzimáticos GOx/PANI/ITO

En la figura 5.10, se presentan imágenes obtenidas de las muestras donde se inmovilizaron 10 μ l de suspensión de Glucosa oxidasa (40 μ l/cm²) con concentraciones de a) 40 mg/ml (electrodo VC110), b) 20 mg/ml (electrodo 104) y c) 10 mg/ml (electrodo VC42), mediante el método 1.

Para el electrodo con enzima inmovilizada a partir de una suspensión de 40 mg/ml (figura 5.10a), se observa en la imagen a 500 aumentos que la superficie de este consta de una capa gruesa de enzima fragmentada en bloques planos y lisos con forma poligonal irregular con tamaños del orden de 100 μ m. Mientras tanto, en la imagen a 5000 aumentos se observa que las separaciones entre estos bloques de enzima son del orden de 5 μ m, visualizándose en el fondo se estas brechas, formas globulares correspondientes al soporte de polímero anilina.

Mientras tanto en el electrodo con enzima inmovilizada a partir de una suspensión de 20 mg/ml (figura 5.10b), se observa en la imagen a 500 aumentos que la superficie de este consta de una capa delgada de enzima fragmentada en bloques con pequeños relieves en su superficie, con forma irregular con tamaños del orden de 100 μ m. En cambio, en la imagen a 5000 aumentos se puede ver que los relieves de estos bloques son formados por escalones de la propia enzima, exhibiendo pequeños poros dispersos.

Finalmente, en el electrodo con enzima inmovilizada a partir de una suspensión de 10 mg/ml (figura 5.10c), se observa en la imagen a 500 aumentos que la superficie está cubierta por abundantes glóbulos de enzima dispersos por toda la película de polianilina soporte, además de visualizarse algunos cráteres con diámetros del orden de 20 μ m, probablemente formados por burbujas de aire presentes en la suspensión de enzima aplicada que desaparecieron en el proceso de secado. Mientras tanto, en la imagen a 5000 aumentos se observa que estos glóbulos poseen diámetros entre 0.5 μ m y 2 μ m, siendo aquellos con tamaños superiores a 0.5 μ m, aglomerados de los más pequeños, los cuales posiblemente sean unidades de enzima.

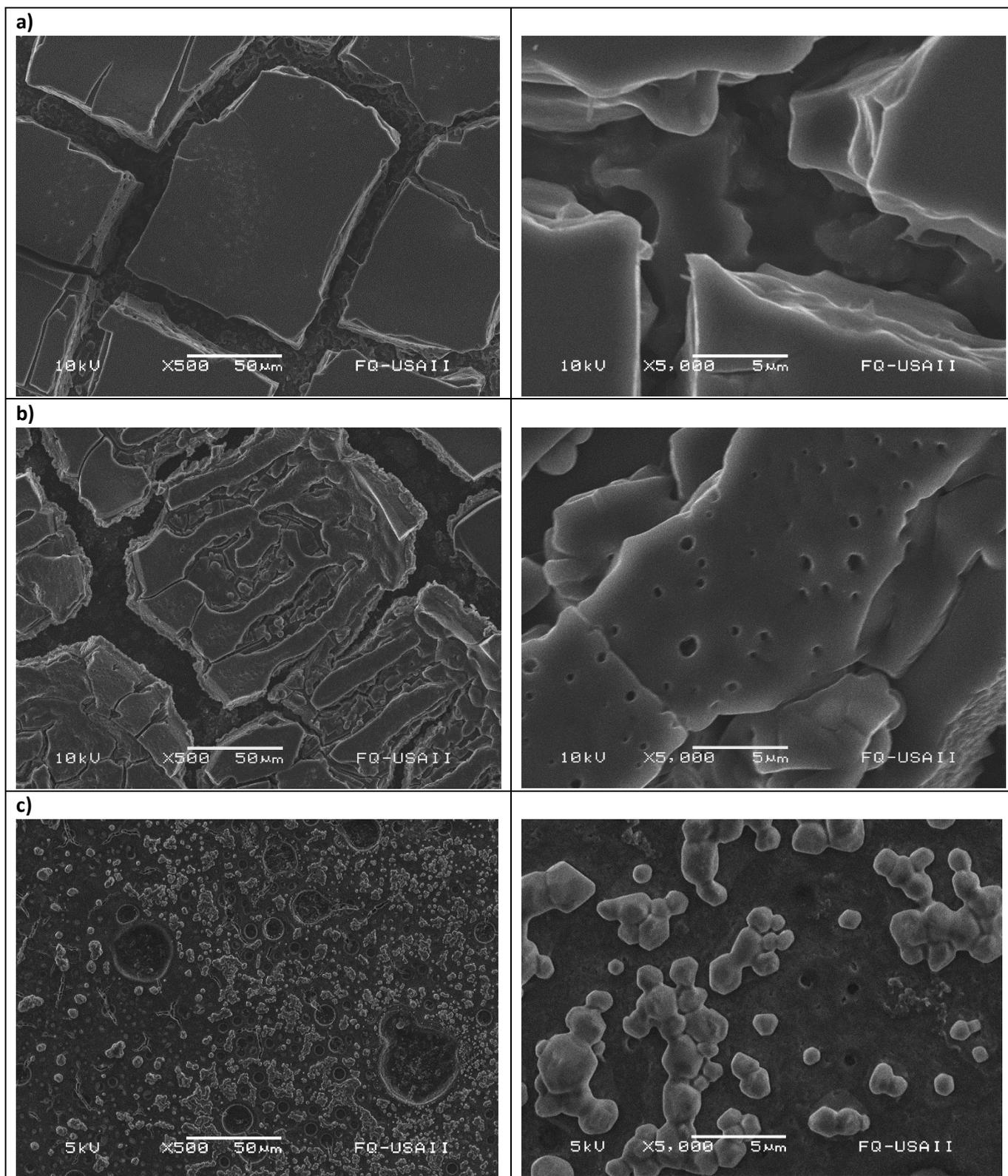


Figura 5.10. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (izquierda: x500 aumentos, derecha: x5000 aumentos) de electrodos de PANI/ITO con glucosa oxidasa inmovilizada mediante el método 1: a) 40mg/ml (muestra VC110), b) 20 mg/ml (muestra VC104) y c) 10mg/ml (muestra VC42)

A continuación, en la figura 5.11 se presentan imágenes obtenidas de las muestras donde se inmovilizaron 10µl de suspensión de Glucosa oxidasa ($40 \mu\text{l}/\text{cm}^2$) con concentraciones de a) 40

mg/ml (electrodo 112), b) 20 mg/ml (electrodo 107) y c) 10 mg/ml (electrodo VC116), mediante el método 2.

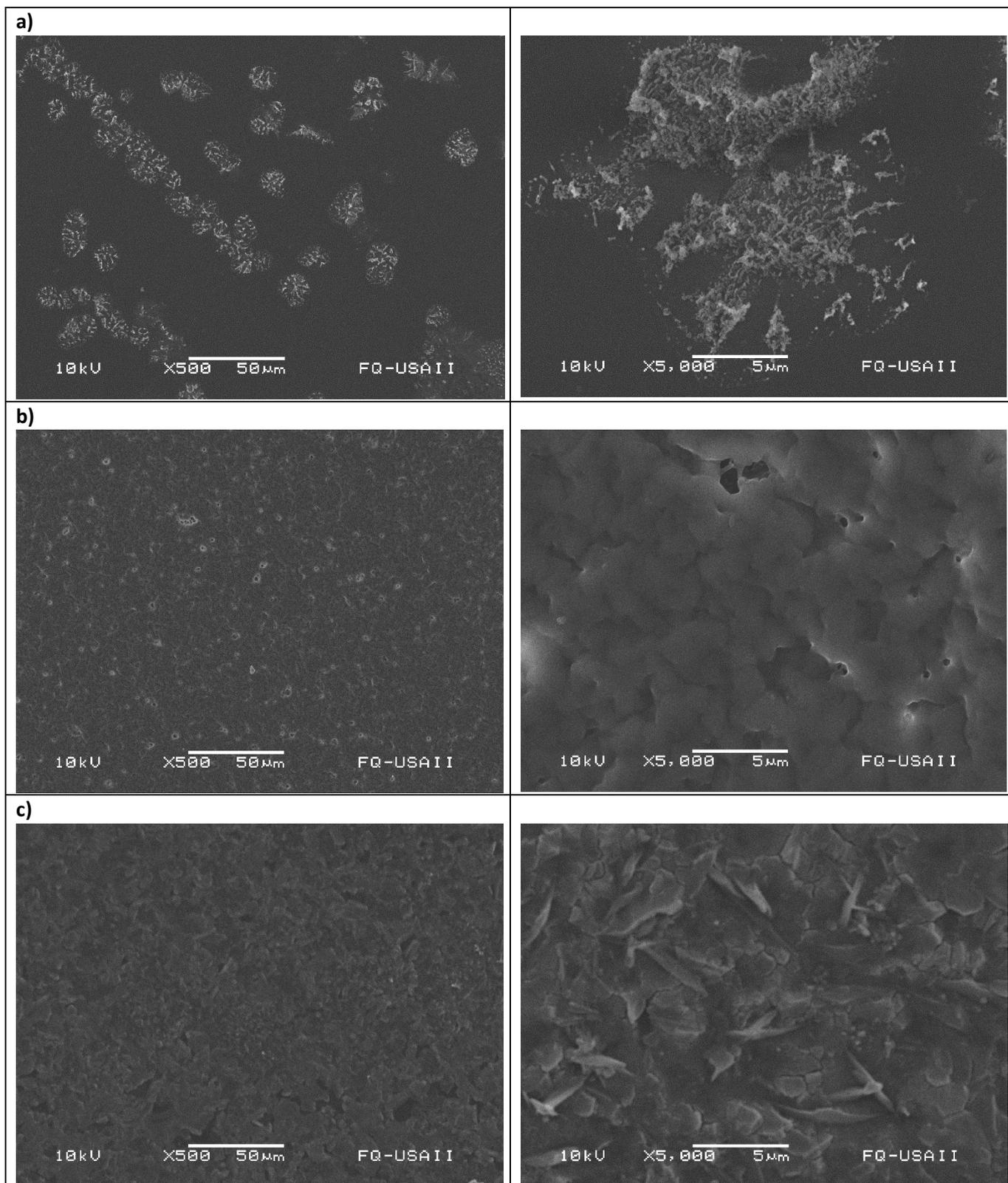


Figura 5.11. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (izquierda: x500 aumentos, derecha: x5000 aumentos) de electrodos de PANI/ITO con glucosa oxidasa inmovilizada mediante el método 2: a) 40mg/ml (muestra VC112), b) 20 mg/ml (muestra VC107) y c) 10mg/ml (muestra VC116)

Para el electrodo con enzima inmovilizada a partir de una suspensión de 40 mg/ml (figura 5.11a), se observa, en la imagen a 500 aumentos, unas estructuras con formas redondeadas distribuidas por toda la superficie de polianilina, las cuales pueden estar compuestas por enzima. Mientras tanto, en la imagen a 5000 aumentos se observa que dichas estructuras son agrupaciones de filamentos con diámetros del orden de 15 μm , y que la polianilina que las rodea carece de glóbulos u otra morfología apreciable.

Mientras que en el electrodo con enzima inmovilizada a partir de una suspensión de 20 mg/ml (figura 5.11b), se observa en la imagen a 500 aumentos que la superficie está prácticamente cubierta de glóbulos de polianilina con la presencia de pequeñas manchas dispersas de otro componente. En cambio, en la imagen a 5000 aumentos se puede ver que las manchas parecen de agujeros con contornos irregulares con no más de 3 μm de ancho, presentando enzima en los bordes.

Finalmente, en el electrodo con enzima inmovilizada a partir de una suspensión de 10 mg/ml (figura 5.11c), se observa en la imagen a 500 aumentos que la superficie está cubierta por glóbulos de polianilina. Mientras tanto, en la imagen a 5000 aumentos se observa que hay pequeñas cantidades de material enzimático dispersa entre los glóbulos en forma de agujas de no más de 1 μm de largo.

La existencia de rastros de enzima en la superficie de los tres electrodos observados puede tener dos causas distintas: 1) mediante esta técnica parece que se logró exitosamente encapsular la enzima debajo de una nueva capa de polianilina, observándose la enzima que no logró ser encapsulada, o 2) la enzima se lavó de la superficie al momento de introducir el electrodo en la celda electroquímica empleada para producir el polímero encapsulante, observándose los rastros sobrevivientes de la enzima.

A continuación, en la figura 5.12 se presentan imágenes obtenidas de los electrodos preparados con la inmovilización de 10 μl de suspensión de Glucosa oxidasa ($40 \mu\text{l}/\text{cm}^2$) con concentraciones de a) 40 mg/ml (electrodo VC114), b) 20 mg/ml (electrodo VC108) y c) 10 mg/ml (electrodo VC118), mediante el método 3.

Para el electrodo con enzima inmovilizada a partir de una suspensión de 40 mg/ml (figura 5.12a), se observa en la imagen a 500 aumentos que la superficie de este consta de una capa gruesa de enzima fragmentada en bloques planos con formas poligonales irregulares y cubiertos de polianilina. La existencia de estos bloques posiblemente se debe a un exceso de material enzimático, en la superficie, que en el proceso de secado se contrajo, fragmentando la superficie. Mientras tanto, en la imagen a 5000 aumentos se observa que los bloques de enzima poseen agujeros con diámetros no mayores a 1 μm , visualizándose además que la polianilina formada encima de los bloques, no presenta glóbulos ni otra morfología, formando entonces una superficie lisa.

Mientras que en el electrodo con enzima inmovilizada a partir de una suspensión de 20 mg/ml (figura 5.12b), se observa en la imagen a 500 aumentos que la superficie está cubierta de polianilina con la presencia de pequeñas y tenues manchas alargadas, con longitudes no mayores a los 20 μm . En cambio, en la imagen a 5000 aumentos se puede ver que las manchas poseen una estructura de pequeños glóbulos de enzima dispersos. Probablemente esto es visible porque no hubo un recubrimiento completo por parte del polímero encapsulante.

Finalmente, en el electrodo con enzima inmovilizada a partir de una suspensión de 10 mg/ml (figura 5.12c), se observa en la imagen a 500 aumentos que la superficie está cubierta en su totalidad por polianilina. Mientras tanto, en la imagen a 5000 aumentos se observa que la

polianilina formada forma una “sábana” que cubre la morfología globular de la enzima que yace debajo.

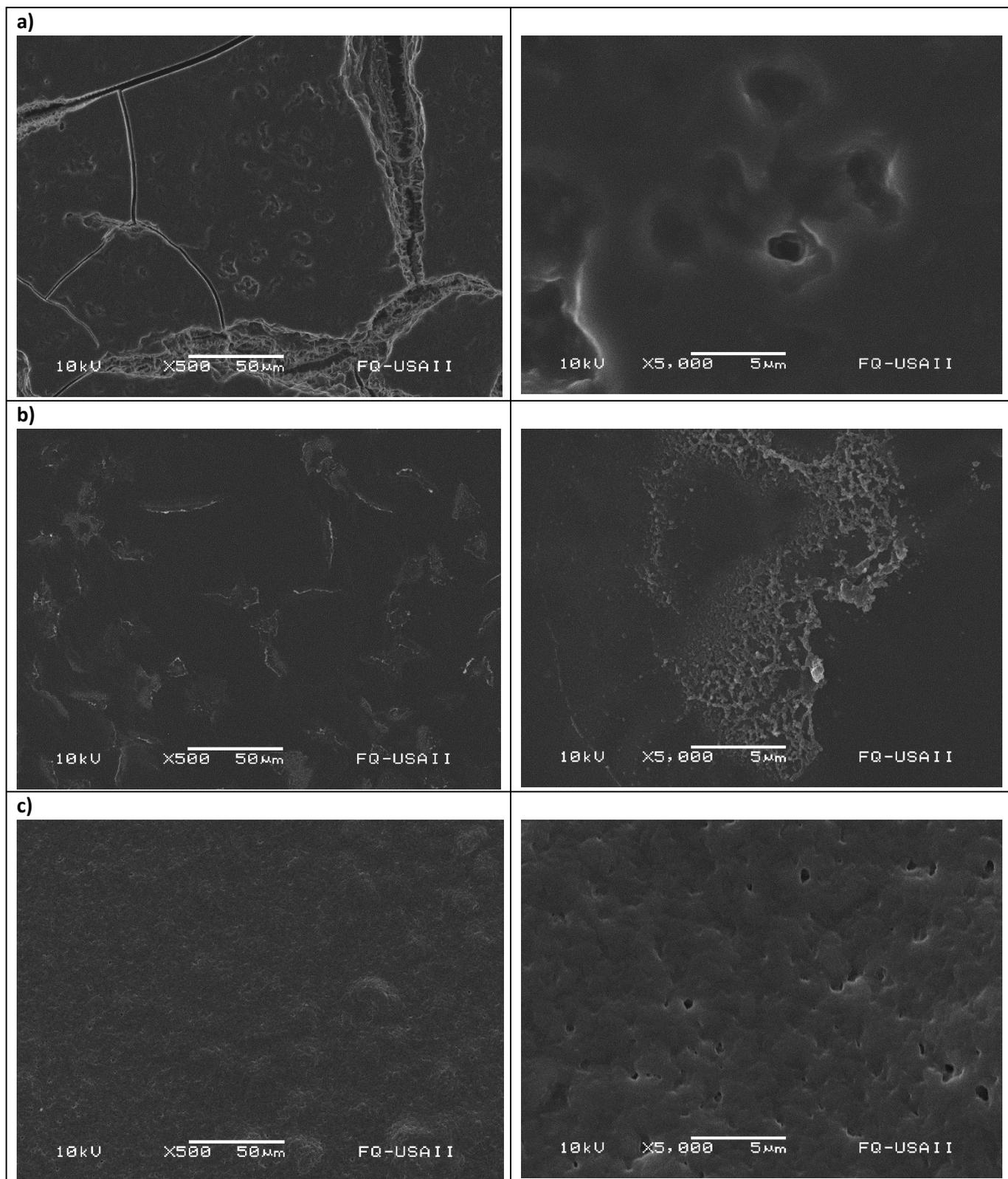


Figura 5.12. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (izquierda: x500 aumentos, derecha: x5000 aumentos) de electrodos de PANI/ITO con glucosa oxidasa inmovilizada mediante el método 3: a) 40 mg/ml (muestra VC114), b) 20 mg/ml (muestra VC107) y c) 10 mg/ml (muestra VC118)

5.2.2. Caracterización electroquímica de electrodos enzimáticos GOx/PANI/ITO

5.2.2.1. Potencial de Circuito Abierto (OCP)

En las figuras 5.13, 5.14 y 5.15 se presentan los resultados de potencial de circuito abierto (OCP) de los electrodos enzimáticos, con las cargas de enzima 10, 20 y 40 mg/ml, respectivamente, en los distintos medios estudiados. Se presentan también, en cada gráfica, los resultados del electrodo PANI/ITO para comparación.

La respuesta del electrodo PANI/ITO a la adición de glucosa es un cambio de OCP hacia valores menores (Figura 5.13 a y b), mientras que la tendencia de los electrodos con GOx es una respuesta hacia valores mayores de OCP, con excepción de VC119 (met 3, 10 mg/ml) (Figura 5.13 a y b) que presenta una ligera disminución.

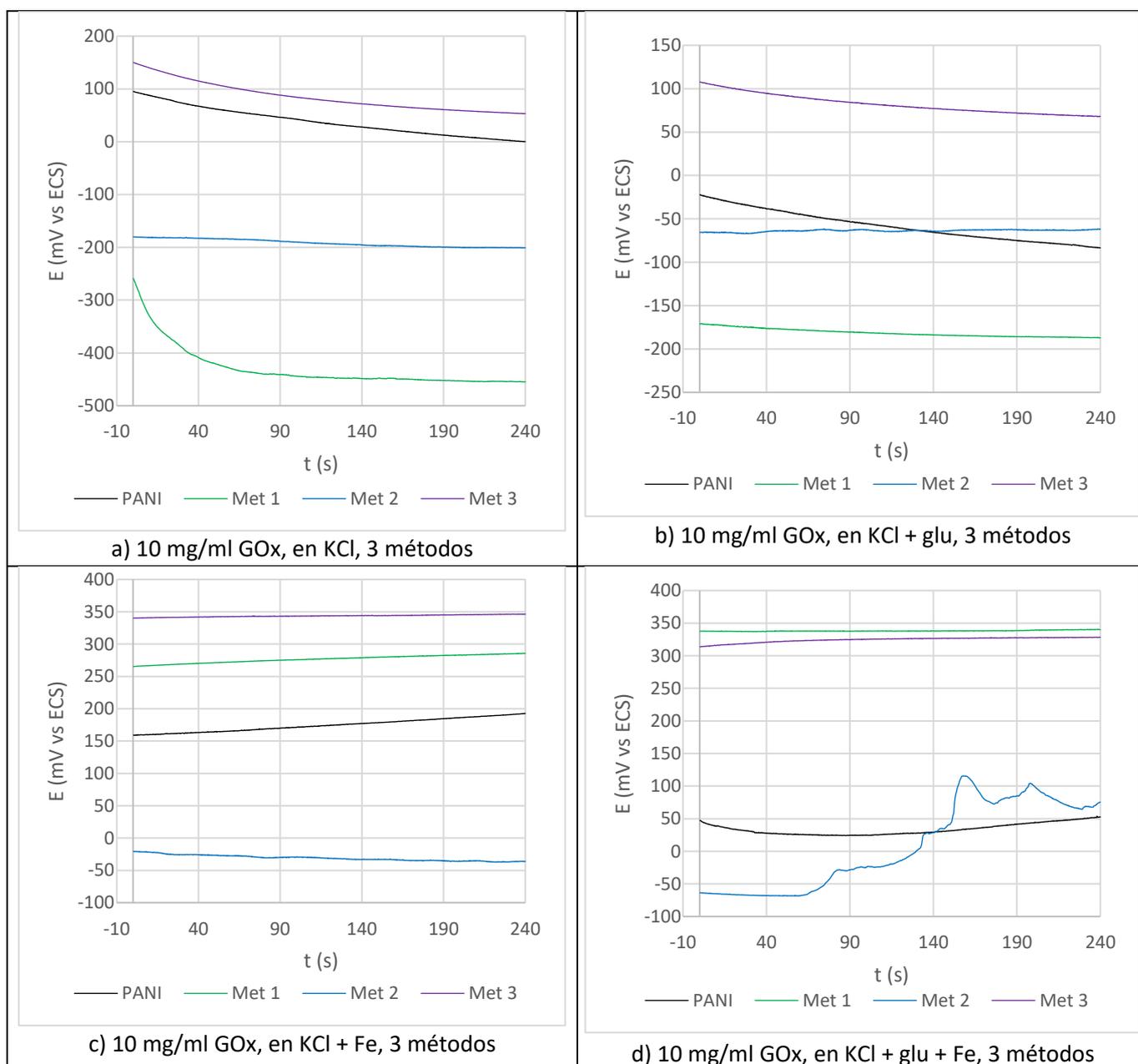


Figura 5.13. Resultados de potencial de circuito abierto de electrodos con carga 10 mg/ml, para los 3 métodos realizados. (a) KCl 0.1 M; (b) KCl 0.1 M, glucosa 0.1 M; (c) KCl 0.1 M, $K_3Fe(CN)_6$ 0.5 M; (d) KCl 0.1 M, glucosa 0.1 M, $K_3Fe(CN)_6$ 0.5 M.

Las curvas en medios KCl y KCl + glucosa (figura 5.13 a y b) presentan decaimiento, excepto para VC117 (met 2, 10 mg/ml), que tiene un pequeño incremento en OCP. Este electrodo es el que el OCP presenta el comportamiento más estable.

Las mediciones en KCl + Fe(III) muestran que todos los electrodos incrementan su valor de OCP con respecto del medio con solo KCl (figura 5.13 a y c). Todos los electrodos presentan un comportamiento muy estable, con un moderado incremento en el tiempo, con excepción de VC117 (met 2, 10 mg/ml).

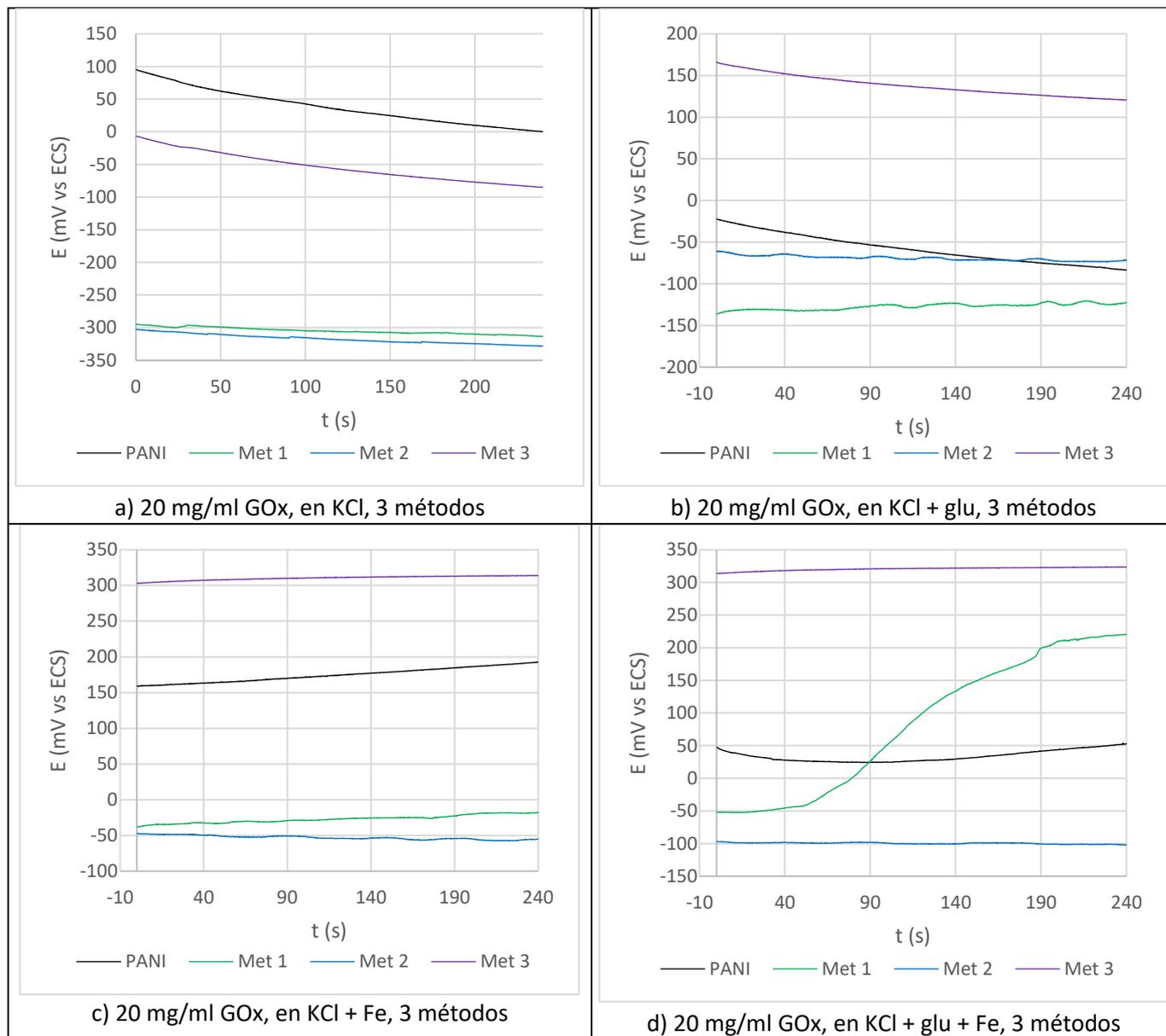


Figura 5.14. Resultados de potencial de circuito abierto de electrodos con carga 20 mg, para los 3 métodos realizados. (a) KCl 0.1 M; (b) KCl 0.1 M, glucosa 0.1 M; (c) KCl 0.1 M, $K_3Fe(CN)_6$ 0.5 M; (d) KCl 0.1 M, glucosa 0.1 M, $K_3Fe(CN)_6$ 0.5 M.

Al adicionar glucosa al medio con Fe(III) el electrodo del método 3 (VC119) no presenta prácticamente cambio. El electrodo por método 1 (VC120) incrementa su valor de OCP y se mantiene estable. Para VC117 (met 2, 10 mg/ml) se observa una perturbación importante con cambio hacia valores mayores de OCP. El electrodo PANI/ITO responde primero con decaimiento y luego comienza a incrementarse el valor de OCP, como una transición del comportamiento KCl hacia el comportamiento Fe(III).

Para la serie con 20 mg/ml, el electrodo del método 3 presenta el más alto OCP en todos los casos. Para este electrodo, la adición de glucosa conduce a un aumento de 150 mV en el OCP (figura 5.14 b) con respecto del medio con solo KCl (figura 5.14 a) y en ambos casos presenta un decaimiento similar. En presencia de Fe(III) (figura 5.14 c y d), el OCP aumenta en 150 mV adicionales, con respecto de KCl + glucosa (figura 5.14 b) y se mantiene estable, con un muy pequeño incremento en el tiempo en que se hizo la medición.

Los electrodos obtenidos por los métodos 1 y 2 presentaron un comportamiento estable en casi todos los medios, con valores negativos de potencial. Todos los electrodos respondieron a la adición de glucosa con un incremento en el OCP, de cerca de 150 mV para el método 1 y de más de 200 mV para el método 2. Este último, en el medio KCl + glucosa + Fe(III), presenta un incremento importante que se estabiliza hacia el final. Esto puede deberse a una adsorción lenta de especies de hierro, o a la degradación del electrodo, posiblemente por redisolución de la enzima, dado que en el método 1 no se aplica ninguna acción para retener a la enzima, más allá de interacciones electrostáticas.

Los electrodos con 40 mg/ml tienen, en general, un comportamiento muy diferente del de los que tienen cargas enzimáticas de 10 y 20 mg/ml. Las diferencias en OCP entre ellos son menores que para las otras cargas. El único valor positivo del OCP se obtiene para VC111 (met 2, 40 mg/ml).

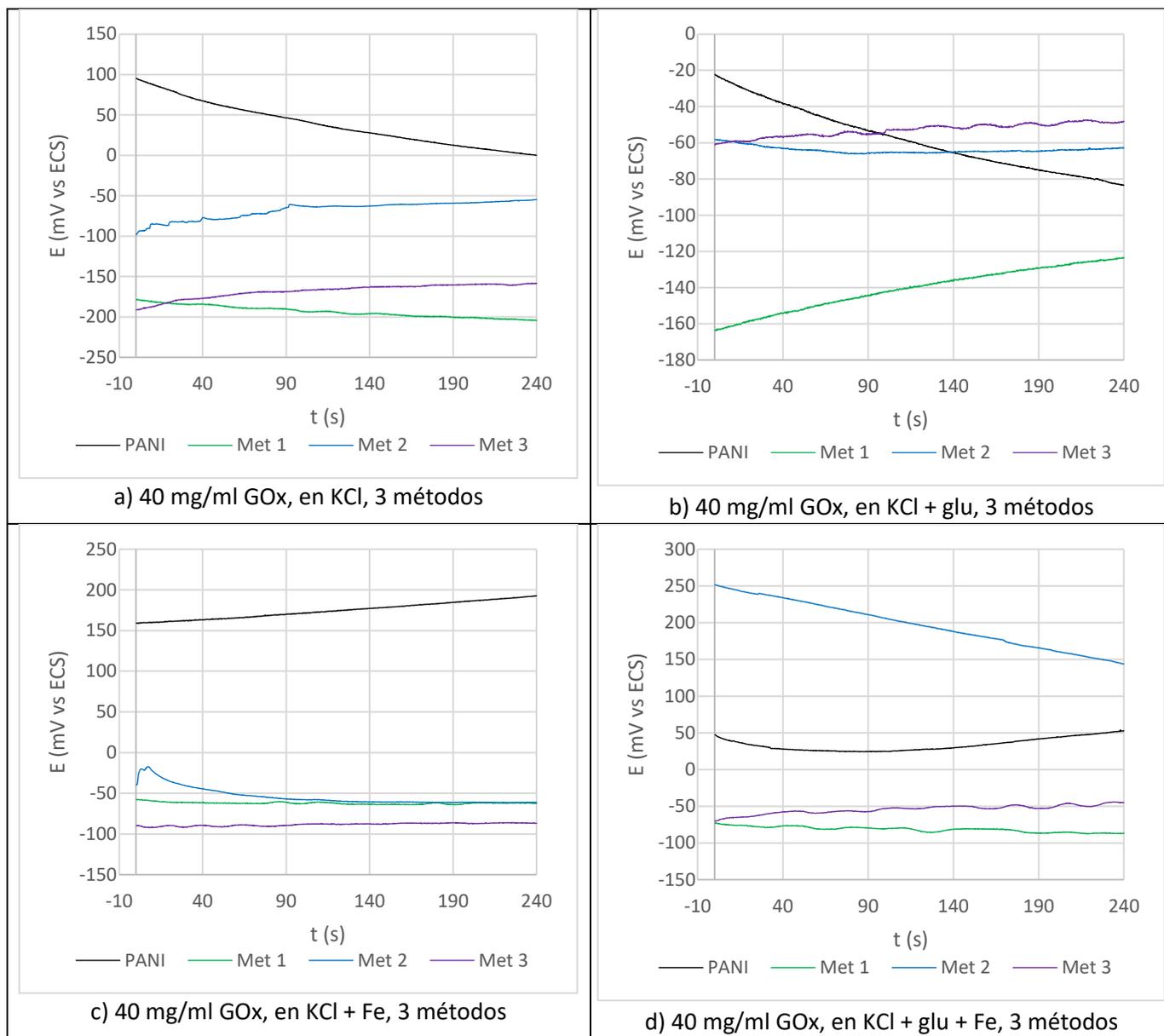


Figura 5.15. Resultados de potencial de circuito abierto de electrodos con carga 40 mg/ml, para los 3 métodos realizados. (a) KCl 0.1 M; (b) KCl 0.1 M, glucosa 0.1 M; (c) KCl 0.1 M, $K_3Fe(CN)_6$ 0.5 M; (d) KCl 0.1 M, glucosa 0.1 M, $K_3Fe(CN)_6$ 0.5 M.

5.2.2.1 Voltamperometría cíclica

Los resultados completos de voltamperometría cíclica se presentan en el Anexo I. En esta sección se presentan y comentan los resultados más relevantes y las comparaciones de desempeño de los distintos electrodos.

Comparación de carga de enzima. Método 1.

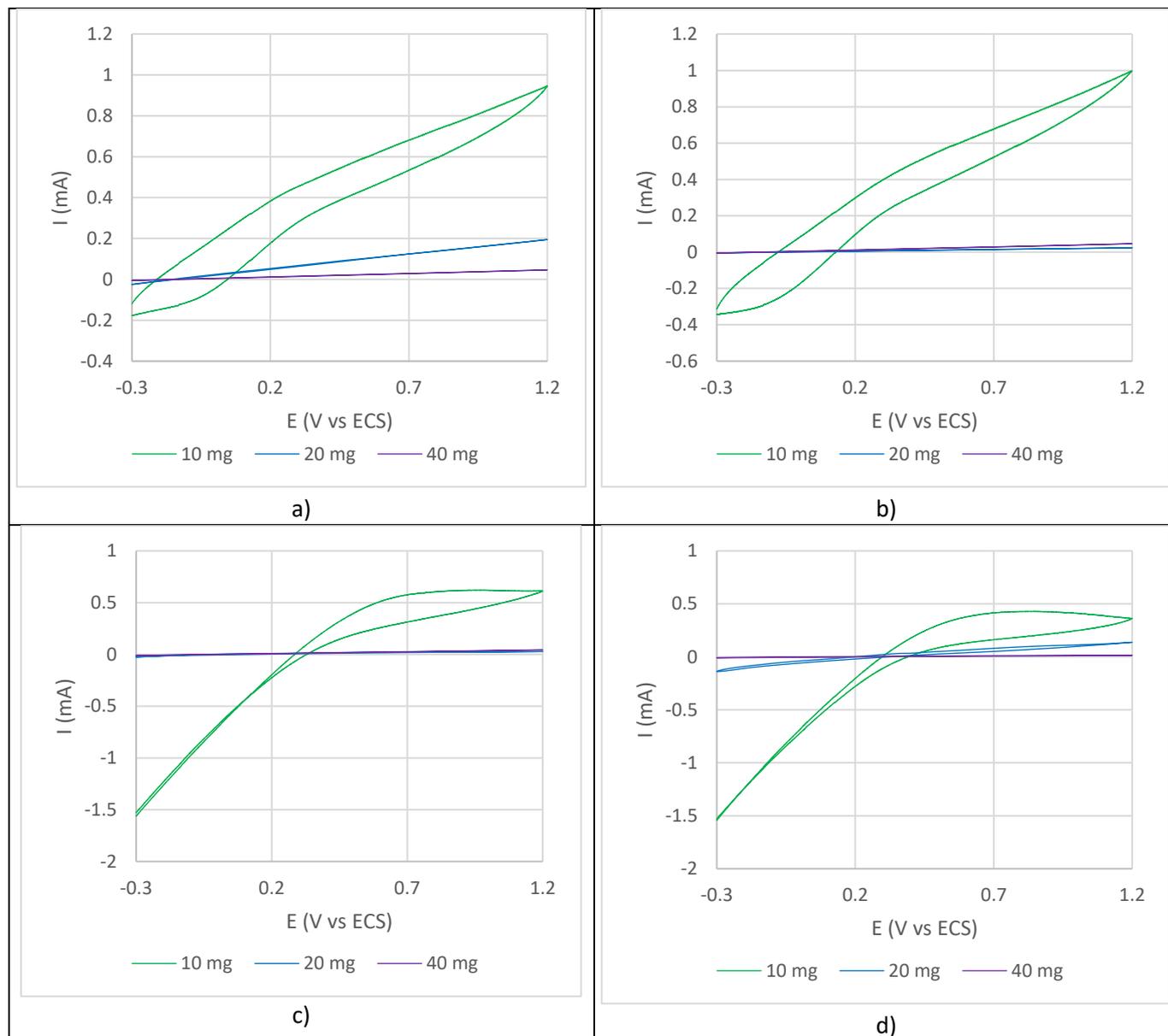


Figura 5.16. Resumen de resultados para el método 1 con distintas cargas de enzima. (a) en KCl 0.1 M; (b) en KCl 0.1 M, glucosa 0.1 M; (c) en KCl 0.1 M, $K_3Fe(CN)_6$ 0.5 M; (d) en KCl 0.1 M, glucosa 0.1 M, $K_3Fe(CN)_6$ 0.5 M.

Del análisis de la figura 5.16 se puede ver que la corriente decrece con el aumento de carga de enzima en todos los medios electrolíticos. La respuesta de 10 mg/ml (VC120) presenta la mayor actividad. La muestra de 40 mg/ml (VC111) parece completamente pasivada. Las curvas de 10 mg/ml (VC120) en presencia de Fe(III) (fig. 5.16 c, d) presentan un cambio de pendiente alrededor de 0.5 V vs. ECS. Esta caída de corriente con respecto de la respuesta en los medios KCl y glucosa (fig. 5.16. a,b) puede deberse a que en este intervalo de potencial las especies de hierro, que se encuentran en exceso, estarían ya en su más alto estado de oxidación posible.

Comparación de carga de enzima. Método 2.

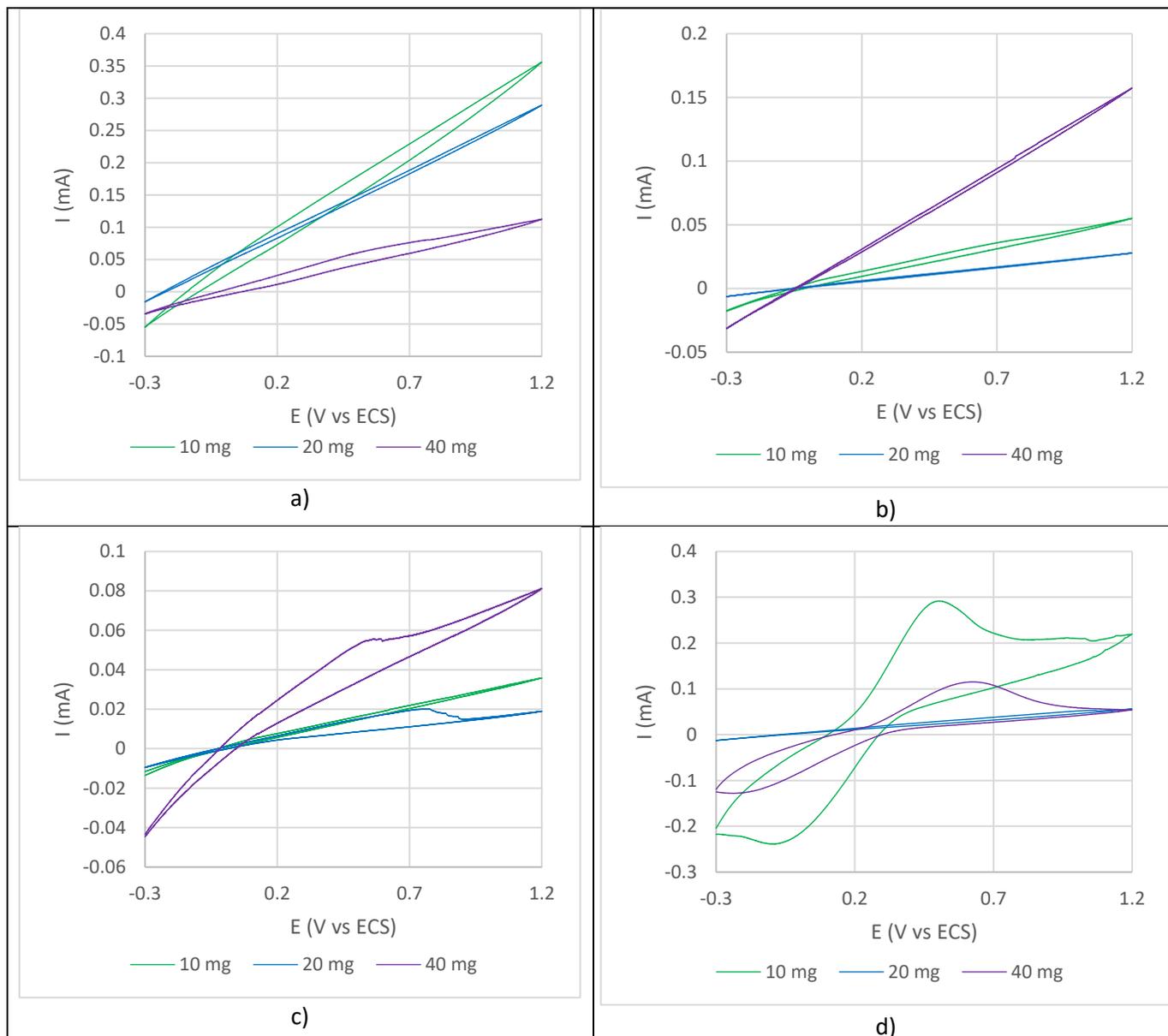


Figura 5.17. Resumen de resultados para el método 2 con distintas cargas de enzima. (a) en KCl 0.1 M; (b) en KCl 0.1 M, glucosa 0.1 M; (c) en KCl 0.1 M, $K_3Fe(CN)_6$ 0.5 M; (d) en KCl 0.1 M, glucosa 0.1 M, $K_3Fe(CN)_6$ 0.5 M.

En el caso del método 2 (figura 5.17.) los electrodos en KCl siguen la misma tendencia observada en el método 1 (Figura 5.16.) aunque la corriente es menor. El electrodo con la mayor actividad en glucosa (fig. 5.17.b) fue el que tiene una carga de 40 mg/ml (VC113)

El método 2 permite observar la respuesta redox del sistema Fe(III)/Fe(II), con un pico anódico en 0.5 V vs. ECS y uno catódico en aproximadamente -0.96 V vs. ECS (fig. 5.17.d). Este sistema redox se observa claramente en el medio KCl + glucosa + Fe(III) (d) y sólo como una meseta anódica en el medio KCl + Fe(III) (c).

Comparación de carga de enzima. Método 3.

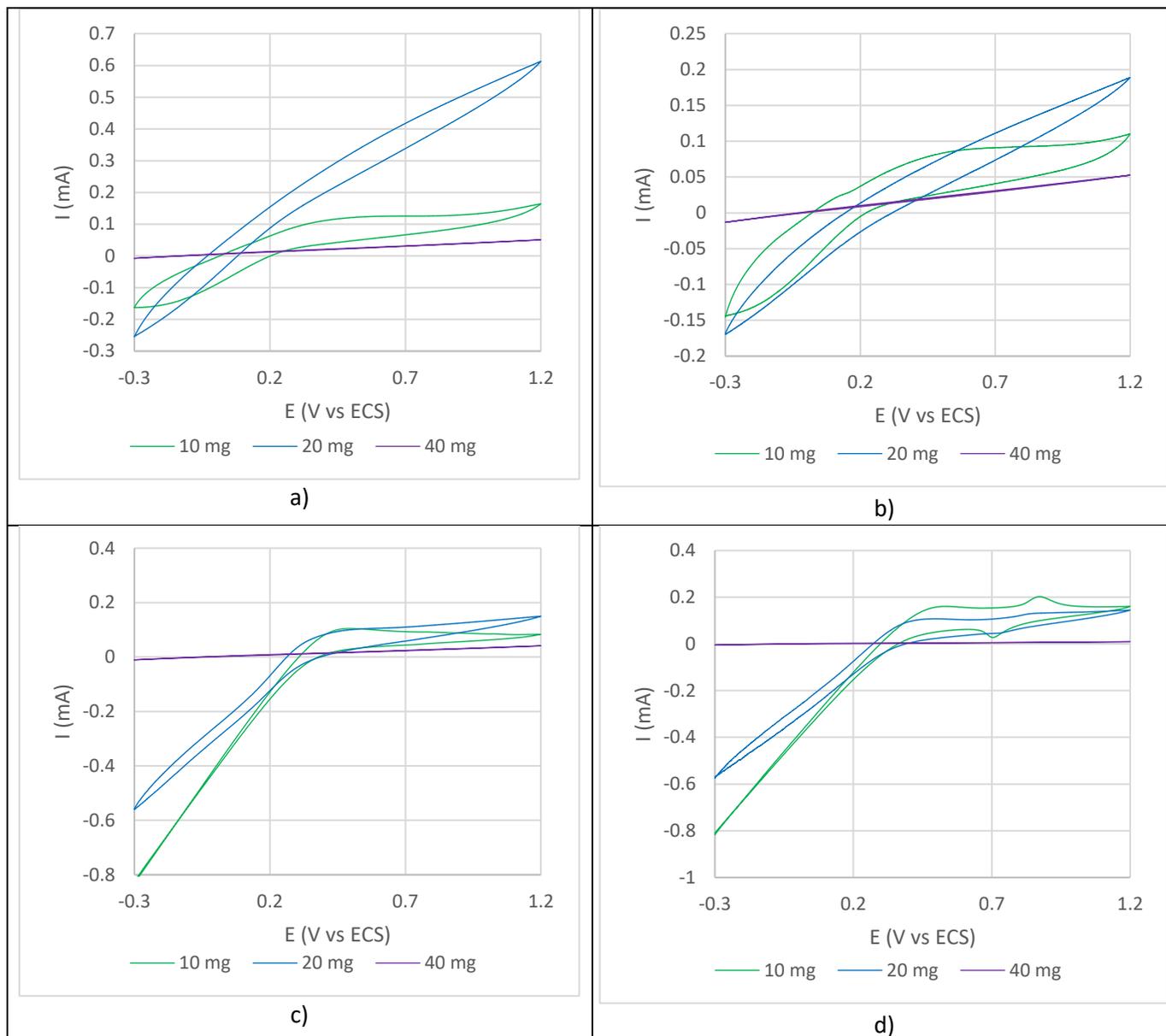
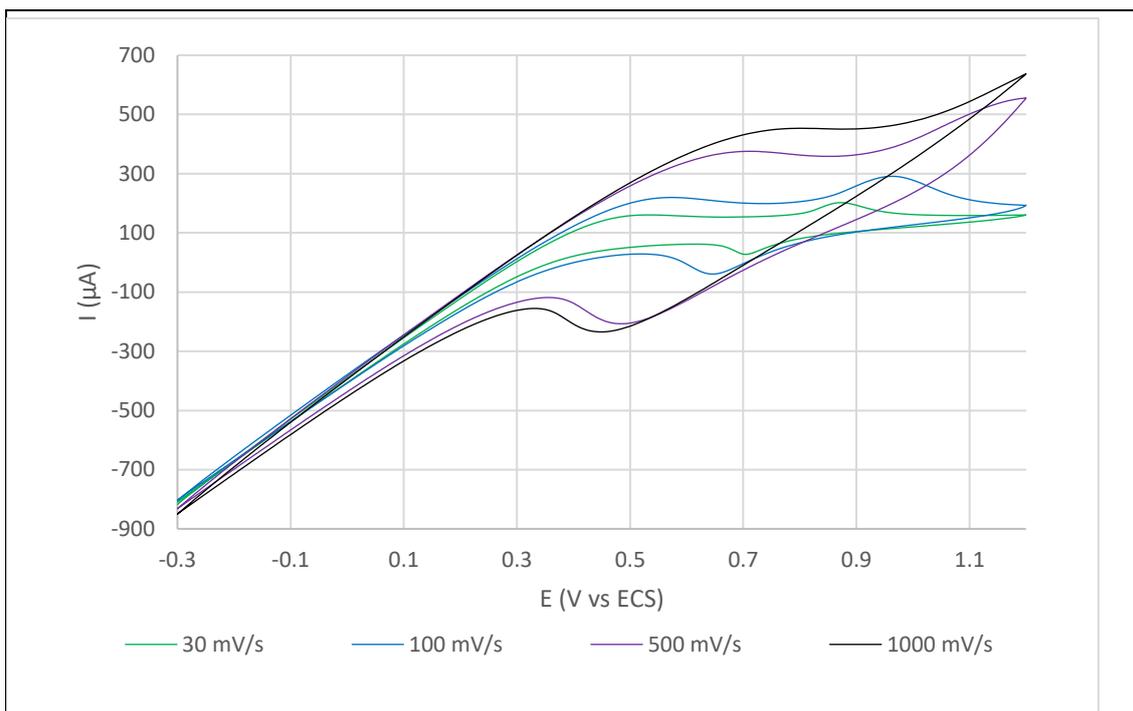


Figura 5.18. Resumen de resultados para el método 3 con distintas cargas de enzima. (a) en KCl 0.1 M; (b) en KCl 0.1 M, glucosa 0.1 M; (c) en KCl 0.1 M, $K_3Fe(CN)_6$ 0.5 M; (d) en KCl 0.1 M, glucosa 0.1 M, $K_3Fe(CN)_6$ 0.5 M.

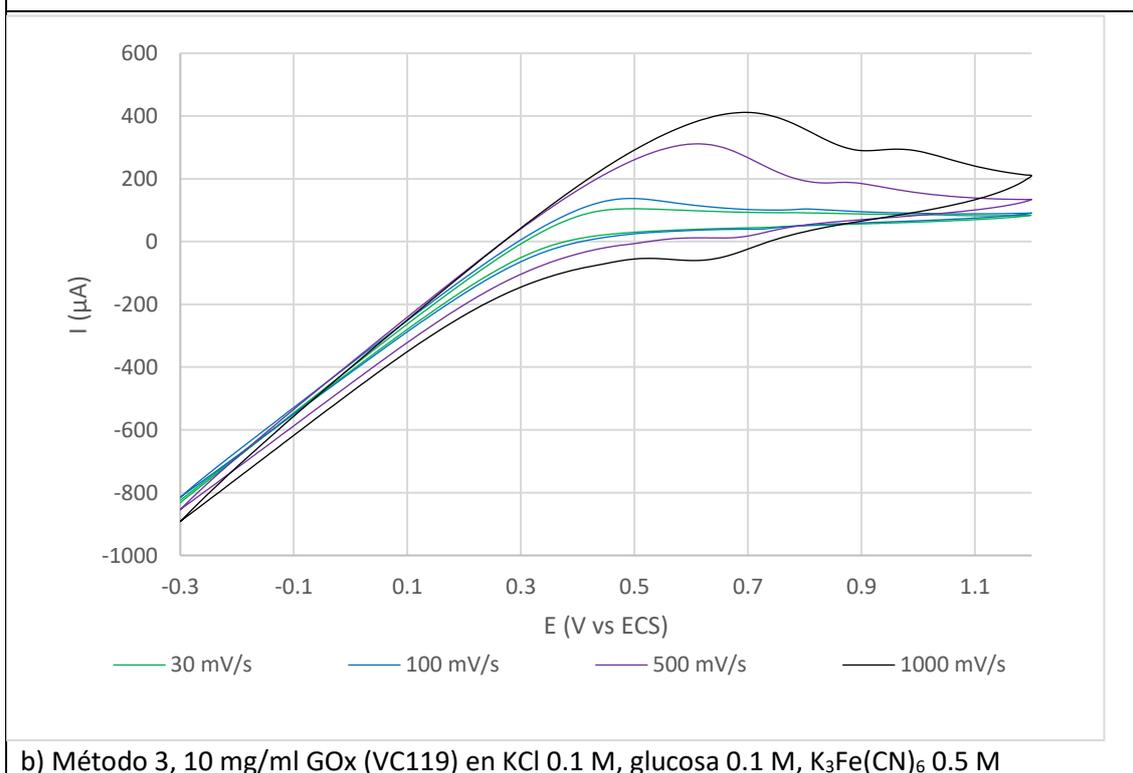
Con el método 3 (Figura 5.18.) es la muestra con 20 mg/ml (VC109) la que presenta la mayor actividad en glucosa (fig. 5.18.b). El sistema redox $Fe(III)/Fe(II)$ se puede ver claramente en las curvas de los electrodos con 10 y 20 mg/ml (fig 5.18.d). La muestra con 40 mg/ml nuevamente ofrece la respuesta de un electrodo pasivado, como se observó para el método 1.

En general se observa que a todas las velocidades de barrido aplicadas en los medios de KCl 0.1M; KCl 0.1M + glucosa 0.1M, y KCl 0.1M + $K_3Fe(CN)_6$ 0.5M, hay una respuesta lineal en toda la ventana de potencial correspondiente a la ley de ohm, presentándose un fenómeno de histéresis debida a la capacitancia del conjunto de interfases de la celda.

En la figura 5.19 se presentan algunos de los resultados obtenidos en medios con $K_3Fe(CN)_6$, a diferentes velocidades de barrido.



a) Método 3, 10 mg/ml GOx (VC119) en KCl 0.1 M, $K_3Fe(CN)_6$ 0.5 M



b) Método 3, 10 mg/ml GOx (VC119) en KCl 0.1 M, glucosa 0.1 M, $K_3Fe(CN)_6$ 0.5 M

Figura 5.19. Voltamperogramas del electrodo VC119 en medios que contienen Fe(III), a diferentes rapideces de barrido.

Los voltamperogramas de la figura 5.19 presentan resultados similares a los obtenidos con otros electrodos. Se puede ver en ellos un comportamiento similar al conocido del par redox Fe(III)/Fe(II). Por ejemplo, en la figura 5.19.a, en la curva de 30 mV/s, se observa la oxidación $Fe(II) \rightarrow Fe(III) + 1e^-$, en un potencial de 0.85 V vs. ECS y el correspondiente pico de reducción en 0.7 V vs. ECS. Sin embargo, este comportamiento redox, que se esperaría fuera el de un sistema

reversible, no parece serlo: al aumentar la rapidez de barrido, los picos se separan. Por otra parte, este mismo sistema, en presencia de glucosa, se comporta de forma diferente (fig. 5.19.b) pues se puede apreciar, además de la respuesta del sistema redox Fe(III)/Fe(II), un sistema redox adicional con un pico de oxidación que se desplaza de 0.45 V a 0.7 V vs. ECS, al aumentar la rapidez de barrido. Este sistema redox está presente en el medio sin glucosa, pero su corriente aumenta de forma importante en presencia de glucosa.

Estas dos observaciones muestran que en el medio más complejo (KCl, glucosa, $K_3Fe(CN)_6$) ocurren interacciones no conocidas entre las especies químicas presentes. El comportamiento observado podría deberse a la oxidación de glucosa en el electrodo enzimático. Sin embargo, estos voltamperogramas no son suficiente evidencia para afirmarlo con seguridad.

C) Método 2: Encapsulamiento de Glucosa oxidasa mediante una película de polianilina sintetizada por aplicación de barridos cíclicos de potencial.

En el método 2 se busca hacer el encapsulamiento de glucosa-oxidasa mediante la aplicación al electrodo PANI/ITO de la enzima en suspensión, en presencia de anilina. Esta última se busca hacer polimerizar al aplicar una serie de ciclos de potencial, esperando que las unidades enzimáticas queden atrapadas en el nuevo tejido de polímero.

En la figura 5.20 se presentan los voltamperogramas resultado de este procedimiento para las tres cargas de enzima. En los voltamperogramas correspondientes a los ciclos de barrido de potencial, empleados para formar el encapsulamiento propuesto por este método, se observa en todos un pico anódico ancho de carácter creciente con cada ciclo aplicado, en aproximadamente 0.5V vs ECS y un pico catódico igualmente ancho y creciente, en aproximadamente a -0.1V vs ECS.

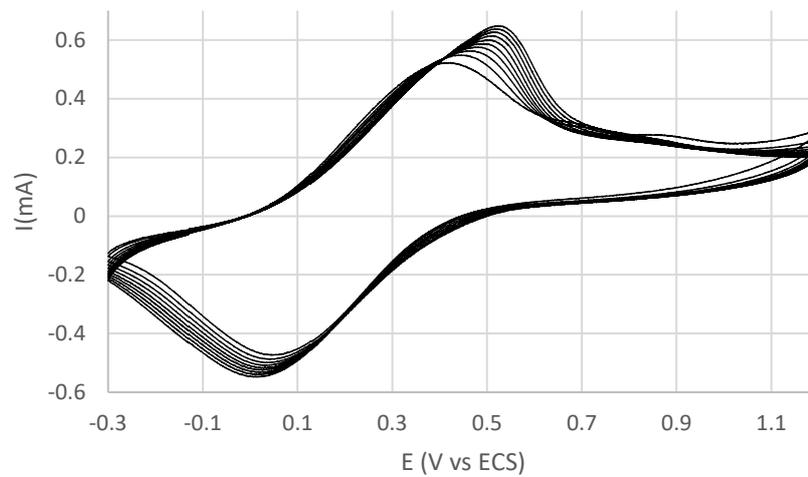
De acuerdo con el análisis de resultados realizado sobre la síntesis de películas de polianilina sobre ITO, se deduce que estos picos anchos están compuestos por las señales traslapadas producidas por las conversiones reversibles de leucoemeraldina a emeraldina y de emeraldina a pernigranilina, lo cual indica la formación de un polímero con características electroquímicas muy similares al que esta debajo de la película de enzima.

Para el último ciclo, el pico anódico alcanza valores de corriente entre 0.6 mA y 0.8 mA, mientras que el pico catódico entre -0.6 mA y -0.8 mA, observándose que la intensidad de estos picos no tiene relación con la concentración de enzima aplicada.

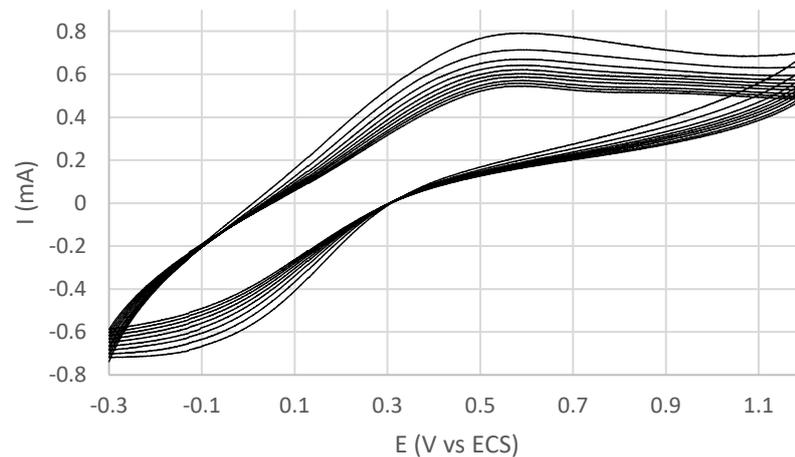
Sin embargo, se observa que estos picos son más delgados y definidos en el electrodo con enzima inmovilizada a partir de la suspensión de 10 mg/ml, en comparación con las otras concentraciones estudiadas.

La forma de los voltamperogramas es consistente con la de un electrodo que ha sido cubierto de polianilina, con las dimensiones de área superficial que se emplearon. En todos los casos la corriente eléctrica aumenta de un ciclo a otro. Esto indica que está ocurriendo la polimerización de anilina sobre la superficie.

c) 10 mg/ml (VC117)



b) 20 mg/ml (VC106)



c) 40 mg/ml (VC113)

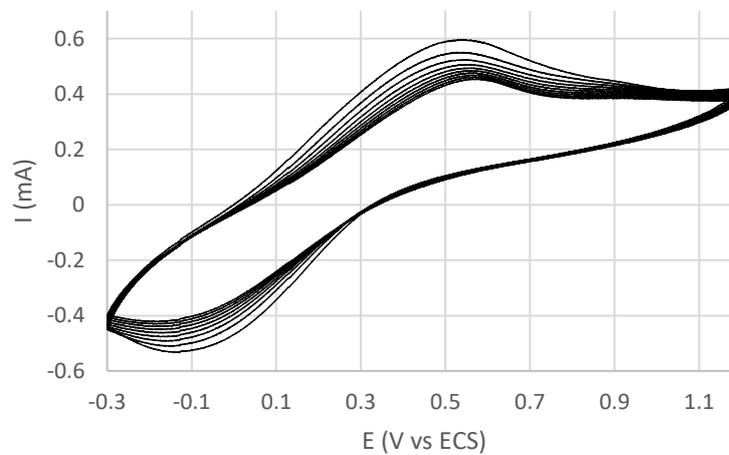


Figura 5.20. Voltamperogramas de la síntesis de polianilina para encapsular glucosa oxidasa.

6. Conclusiones

En el presente trabajo se propusieron tres métodos posibles para inmovilizar la enzima glucosa oxidasa sobre una matriz de polianilina dopada con cloruro, electro-sintetizada sobre una hoja de tereftalato de polietileno recubierta de óxido de indio (III) y estaño (IV) (ITO/PET). También se propusieron tres concentraciones de enzima distintas, construyendo un conjunto de electrodos con configuraciones diferentes según las variables mencionadas e investigando el desempeño de cada configuración, con el propósito de una posible aplicación de este tipo de electrodos en el desarrollo de celdas de combustible a base de glucosa.

Los nueve electrodos fabricados presentaron respuestas diferentes ante los métodos de caracterización de corriente directa. Se observó un comportamiento peculiar del conjunto estudiado: el electrodo de polianilina responde a la glucosa con una disminución importante del potencial de circuito abierto (OCP), mientras que todos los electrodos enzimáticos responden con aumento del OCP a la misma perturbación. La presencia de la enzima se manifiesta en todos los electrodos. La presencia de especies de hierro (Fe(II) y Fe(III)), que debe actuar como mediador para transferir electrones entre enzima y polianilina, se manifiesta de forma más importante en los electrodos obtenidos mediante el método 3.

El método 1, el cual consiste en la adsorción física de Glucosa Oxidasa sobre una matriz de polianilina, proporciona la mayor cantidad de unidades de enzima disponibles para la oxidación del combustible, así como también permite la mayor libertad para el movimiento estructural de las unidades, necesario para su óptimo funcionamiento catalítico. Sin embargo, de acuerdo con los estudios electroquímicos realizados, se encontró un posible proceso de desorción bastante pronunciado de las unidades cuando el electrodo se ponía en contacto con electrolitos acuosos. Por lo tanto, este método planteado bajo las condiciones que han sido descritas en el presente texto no es útil para los objetivos señalados, pero permitió llevar a cabo un estudio preliminar importante como referencia para los otros métodos.

El método 2, el cual consiste en el encapsulamiento de Glucosa oxidasa mediante una película de polianilina sintetizada por aplicación de barridos cíclicos de potencial, fue exitoso inmovilizando la enzima, mostrando un posible flujo de electrones proveniente de la oxidación de glucosa mediante glucosa oxidasa durante las pruebas electroquímicas. Sin embargo, se observó un grave deterioro de los electrodos en forma de cuarteaduras y desprendimientos de las películas compuestas de enzima y polianilina en el proceso de caracterización mencionado, señalando como posible causa los ciclos de potencial aplicado para encapsular la enzima. Por lo tanto, este método requiere mayor estudio para mejorar la resistencia de las matrices de polianilina dopadas con cloruro y establecer las mejores condiciones para este procedimiento.

El método 3, que consiste en el encapsulamiento de Glucosa oxidasa mediante una película de polianilina sintetizada por glucosa oxidasa, fue exitoso inmovilizando la enzima, manteniendo una buena conductividad eléctrica y mostrando un posible flujo de electrones proveniente de la oxidación de glucosa mediante glucosa oxidasa durante las caracterizaciones con cuando las concentraciones de enzima depositada en la matriz son adecuadas. Además de esto, los electrodos no se deterioraron en su uso para las caracterizaciones electroquímicas. Por lo tanto, el método es útil para los objetivos señalados.

Con respecto a las concentraciones de enzima mencionadas, es evidente que, con una mayor concentración de enzima en la superficie de electrodo, se obtiene una mayor velocidad de oxidación de glucosa. Sin embargo, las enzimas son esencialmente un aislante eléctrico al estar constituidas en casi su totalidad por aminoácidos, ocurriendo un bloqueo para las transferencias

electrónicas cuando estas cubren completamente la superficie o peor aún, si se encuentran en exceso formando una gruesa capa sobre esta. De acuerdo con las variaciones de concentración de enzimas manejadas, se determinó que la más adecuada corresponde al valor mínimo empleado: 10 mg/ml, cuando se aplican $40 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ de suspensión (superficie mojada al 100%).

Se puede mejorar este trabajo realizando estudios de durabilidad del electrodo; se puede utilizar un soporte diferente a óxido de indio (III) y estaño (IV) como grafito; se pueden probar distintas marcas comerciales de glucosa oxidasa; aplicar aditivos a la suspensión de glucosa oxidasa; emplear otro tipo de enzimas capaces de oxidar glucosa; o incluso emplear únicamente los grupos funcionales de la enzima responsables de la oxidación, eliminando la estructura de aminoácidos que limitan la conductividad eléctrica. La inmovilización de enzimas sobre electrodos es una alternativa con gran potencial que puede dar como producto celdas de combustible más ecológicas con altas eficiencias.

7. Bibliografía

- [1] Philip Wong H.S., Akinwande D. (2011). *Carbon Nanotube and Graphene Device Physics*. Cambridge University Press.
- [2] Bobacka J., Ivaska A.(2010). en *Electropolymerization: Concepts, Materials and Applications*, S. Cosnier, A. Karyakin, editores. WILEY-VCH Verlag & Co.
- [3] Adams D.J., Dyson P.J., Tavener S.J. (2004). *Chemistry In Alternative Reaction Media*. Wiley.
- [4] Fuller T.F., Harb J.N. (2018). *Electrochemical Engineering*. Wiley.
- [5] Gooding J.J., Lai L.M.H., Goon I.Y. (2009). En *Advances in Electrochemical Science and Engineering. Vol 11: Chemically Modified Electrodes*. Alkire R.C., Kolb D.M., Lipkowski J., Ross P.N. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.
- [6] Miura N., Elumalai P., Plashnitsa V.V., Ueda T., Wama R., Utiyama M. (2009). En *Solid State Gas Sensing*. Comini E., Faglia G., Sberveglieri G., editores. Springer.
- [7] Brinkert K. (2018). *Energy Conversion in Natural and Artificial Photosynthesis*. Springer.
- [8] Lamy C., Léger J.M. (2003). En *Catalysis and Electrocatalysis at nanoparticle surfaces*. Wieckowski A., Savinova E.R, Vayenas C. editores. Marcel Dekker..
- [9] Sanchez S., Demain A.L. (2017). en *Biotechnology of Microbial Enzymes*, Brahmachari G., Demain A.L., Adrio J.L., editores. Academic Press.
- [10] Xu, S., & Minteer, S. D. (2011). Enzymatic Biofuel Cell for Oxidation of Glucose to CO₂. *ACS Catalysis*, 2(1), 91–94. doi:10.1021/cs200523s
- [11] Pinyou, P., Blay, V., Muresan, L., & Noguier, T. (2019). Enzyme-modified Electrodes for Biosensors and Biofuel Cells. *Materials Horizons*. doi:10.1039/c9mh00013e
- [12] Spahn, C., & Minteer, S. (2008). Enzyme Immobilization in Biotechnology. *Recent Patents on Engineering*, 2(3), 195–200. doi:10.2174/187221208786306333
- [13] H.H. Nguyena, M. Kim. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Applied Science and Convergence Technology*, Volume 26 Issue 6, 2017.
- [14] Arroyo M. Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications. *Ars Pharmaceutica*, 39:2; 23-39, 1998
- [15] Muller, D. Kgl. Veterinaer. og Landbohojskole Aarskrift (Copenhagen) 1925, 329–331
- [16] Suzuki, Lee, Loew, Takahashi-Inose, Okuda-Shimazaki, Kojima, ... Sode. (2020). Engineered Glucose Oxidase Capable of Quasi-Direct Electron Transfer after a Quick-and-Easy Modification with a Mediator. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 1137. doi:10.3390/ijms21031137
- [17] Wong, C. M., Wong, K. H., & Chen, X. D. (2008). Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(6), 927–938. doi:10.1007/s00253-008-1407-4
- [18] Goodsell DS (2006) Glucose oxidase. Molecule of the month: PCSB Protein Data Bank.

- [19] Wilson, R., & Turner, A. P. F. (1992). Glucose oxidase: an ideal enzyme. *Biosensors and Bioelectronics*, 7(3), 165–185. doi:10.1016/0956-5663(92)87013-f
- [20] Leskovac, V., Trivić, S., Wohlfahrt, G., Kandrač, J., & Peričin, D. (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. doi:10.1016/j.biocel.2004.10.014
- [21] Wohlfahrt, G., Trivić, S., Zeremski, J., Peričin, D., & Leskovac, V. (2004). The chemical mechanism of action of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 260(1), 69–83. doi:10.1023/b:mcbi.0000026056.75937.98
- [22] Miura, R. (2001). Versatility and specificity in flavoenzymes: Control mechanisms of flavin reactivity. *The Chemical Record*, 1(3), 183–194. doi:10.1002/tcr.1007
- [23] Edmondson, D. E., Mattevi, A., Binda, C., Li, M., & Hubalek, F. (2004). Structure and Mechanism of Monoamine Oxidase. *Current Medicinal Chemistry*, 11(15), 1983–1993. doi:10.2174/0929867043364784
- [24] Oyedotun, K. S., & Lemire, B. D. (2003). The Quaternary Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* Succinate Dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(10), 9424–9431. doi:10.1074/jbc.m311876200
- [25] Wang, Y., Sun, M., Qiao, J., Ouyang, J., & Na, N. (2018). FAD roles in glucose catalytic oxidation studied by multiphase flow of extractive electrospray ionization (MF-EESI) mass spectrometry. *Chemical Science*, 9(3), 594–599. doi:10.1039/c7sc04259k
- [26] Geniès, E. M., Boyle, A., Lapkowski, M., & Tsintavis, C. (1990). *Polyaniline: A historical survey*. *Synthetic Metals*, 36(2), 139–182. doi:10.1016/0379-6779(90)90050-u
- [27] Armes, S. ., & Miller, J. . (1988). Optimum reaction conditions for the polymerization of aniline in aqueous solution by ammonium persulphate. *Synthetic Metals*, 22(4), 385–393. doi:10.1016/0379-6779(88)90109-9
- [28] Fu, Y., & Elsenbaumer, R. L. (1994). Thermochemistry and Kinetics of Chemical Polymerization of Aniline Determined by Solution Calorimetry. *Chemistry of Materials*, 6(5), 671–677. doi:10.1021/cm00041a018
- [29] Gu, H., Huang, Y., Zhang, X., Wang, Q., Zhu, J., Shao, L., ... Guo, Z. (2012). Magneto-resistive polyaniline-magnetite nanocomposites with negative dielectrical properties. *Polymer*, 53(3), 801–809. doi:10.1016/j.polymer.2011.12.033

- [30] Zhang, L., Wan, M., & Wei, Y. (2006). Nanoscaled Polyaniline Fibers Prepared by Ferric Chloride as an Oxidant. *Macromolecular Rapid Communications*, 27(5), 366–371. doi:10.1002/marc.200500760
- [31] Yan, H., & Toshima, N. (1995). Chemical preparation of polyaniline and its derivatives by using cerium(IV) sulfate. *Synthetic Metals*, 69(1-3), 151–152. doi:10.1016/0379-6779(94)02398-i
- [32] Mažeikienė, R., & Malinauskas, A. (2000). Deposition of polyaniline on glass and platinum by autocatalytic oxidation of aniline with dichromate. *Synthetic Metals*, 108(1), 9–14. doi:10.1016/s0379-6779(99)00172-1
- [33] Armes, S. ., & Aldissi, M. (1991). Potassium iodate oxidation route to polyaniline: an optimization study. *Polymer*, 32(11), 2043–2048. doi:10.1016/0032-3861(91)90170-n
- [34] Can, M., Uzun, S., & Pekmez, N. Ö. (2009). Chemical polymerization of aniline using periodic acid in acetonitrile. *Synthetic Metals*, 159(14), 1486–1490. doi:10.1016/j.synthmet.2009.04.005
- [35] Li, X., & Li, X. (2007). Oxidative polymerization of aniline using NaClO₂ as an oxidant. *Materials Letters*, 61(10), 2011–2014. doi:10.1016/j.matlet.2006.08.004
- [36] Jaidev, Jafri, R. I., Mishra, A. K., & Ramaprabhu, S. (2011). Polyaniline–MnO₂ nanotube hybrid nanocomposite as supercapacitor electrode material in acidic electrolyte. *Journal of Materials Chemistry*, 21(44), 17601. doi:10.1039/c1jm13191e
- [37] Li, G., Jiang, L., & Peng, H. (2007). One-Dimensional Polyaniline Nanostructures with Controllable Surfaces and Diameters Using Vanadic Acid as the Oxidant. *Macromolecules*, 40(22), 7890–7894. doi:10.1021/ma070650o
- [38] Blinova, N. V., Bober, P., Hromádková, J., Trchová, M., Stejskal, J., & Prokeš, J. (2010). Polyaniline-silver composites prepared by the oxidation of aniline with silver nitrate in acetic acid solutions. *Polymer International*, 59(4), 437–446. doi:10.1002/pi.2718
- [39] Moon, D.-K., Maruyama, T., Osakada, K., & Yamamoto, T. (1991). Chemical Oxidation of Polyaniline by Radical Generating Reagents, O₂, H₂O₂–FeCl₃Catalyst, and Dibenzoyl Peroxide. *Chemistry Letters*, 20(9), 1633–1636. doi:10.1246/cl.1991.1633
- [40] Mrlik, M., Sedlacik, M., Pavlinek, V., Bober, P., Trchová, M., Stejskal, J., & Saha, P. (2013). Electrorheology of aniline oligomers. *Colloid and Polymer Science*, 291(9), 2079–2086. doi:10.1007/s00396-013-2947-4

- [41] Kitani, A., Izumi, J., Yano, J., Hiromoto, Y., & Sasaki, K. (1984). Basic Behaviors and Properties of the Electrodeposited Polyaniline. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 57(8), 2254–2257. doi:10.1246/bcsj.57.2254
- [42] Jurevičiūtė, I., Brazdžiuvienė, K., Bernotaitė, L., Šalkus, B., & Malinauskas, A. (2005). Polyaniline-modified electrode as an amperometric ascorbate sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 107(2), 716–721. doi:10.1016/j.snb.2004.11.075
- [43] Kozlovskaja, S., Baltrūnas, G., & Malinauskas, A. (2009). Response of hydrogen peroxide, ascorbic acid, and paracetamol at a platinum electrode coated with microfilms of polyaniline. *Microchimica Acta*, 166(3-4), 229–234. doi:10.1007/s00604-009-0185-8
- [44] Dong, Y., Ding, Y., Zhou, Y., Chen, J., & Wang, C. (2014). Differential pulse anodic stripping voltammetric determination of Pb ion at a montmorillonites/polyaniline nanocomposite modified glassy carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 717-718, 206–212. doi:10.1016/j.jelechem.2014.01.014
- [45] Mengoli, G., Munari, M. T., Bianco, P., & Musiani, M. M. (1981). Anodic synthesis of polyaniline coatings onto Fe sheets. *Journal of Applied Polymer Science*, 26(12), 4247–4257. doi:10.1002/app.1981.070261224
- [46] Özyılmaz, A. T., Tüken, T., Yazıcı, B., & Erbil, M. (2005). The electrochemical synthesis and corrosion performance of polyaniline on copper. *Progress in Organic Coatings*, 52(2), 92–97. doi:10.1016/j.porgcoat.2004.09.003
- [47] Conroy, K. G., & Breslin, C. B. (2003). The electrochemical deposition of polyaniline at pure aluminium: electrochemical activity and corrosion protection properties. *Electrochimica Acta*, 48(6), 721–732. doi:10.1016/s0013-4686(02)00741-7
- [48] LI, N., LEI, T., LIU, Y., HE, Y., & ZHANG, Y. (2010). Electrochemical preparation and characterization of gold-polyaniline core-shell nanocomposites on highly oriented pyrolytic graphite. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 20(12), 2314–2319. doi:10.1016/s1003-6326(10)60647-4
- [49] Noufi, R. (1982). Enhanced Stability of Photoelectrodes with Electrogenerated Polyaniline Films. *Journal of The Electrochemical Society*, 129(10), 2261. doi:10.1149/1.2123487
- [50] S.C. Rasmussen (2017) The Early History of Polyaniline: Discovery and Origins. *Substantia* 1(2): 99-109. doi: 10.13128/substantia-30
- [51] Chauhan, N. P. S., Milan, P. B., Kargozar, S., & Mozafari, M. (2019). Synthetic route of PANI (III): Ultrasound-assisted polymerization. *Fundamentals and Emerging Applications of Polyaniline*, 67–89. doi:10.1016/b978-0-12-817915-4.00004-x
- [52] H. Mark (2003), in *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. 3a. Vol 6., USA, Wiley Interscience, pp. 103-105.

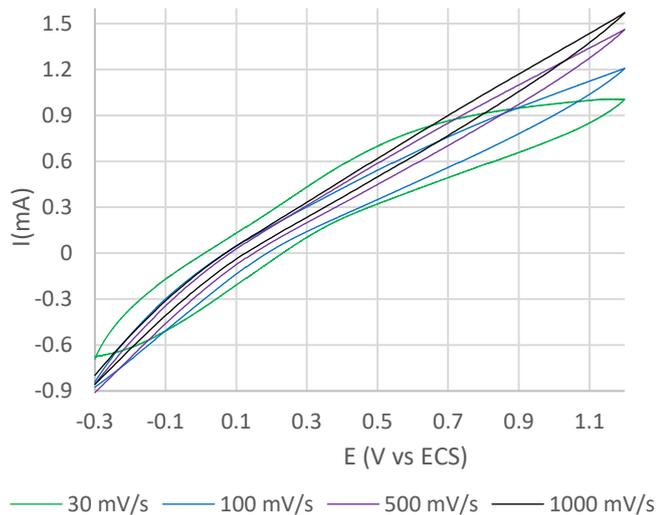
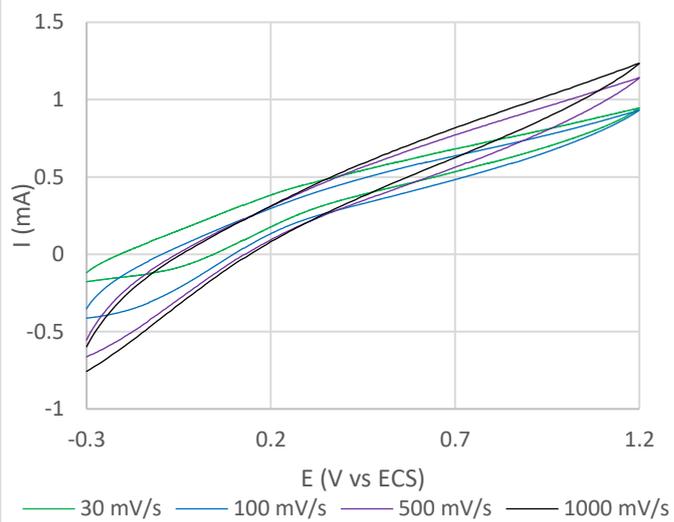
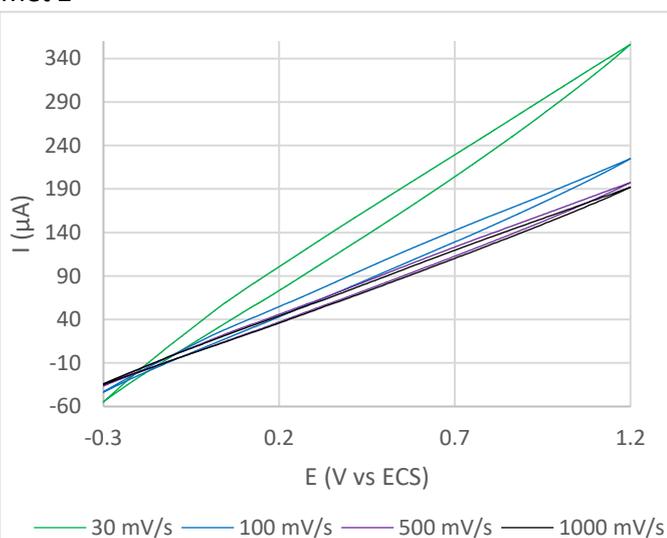
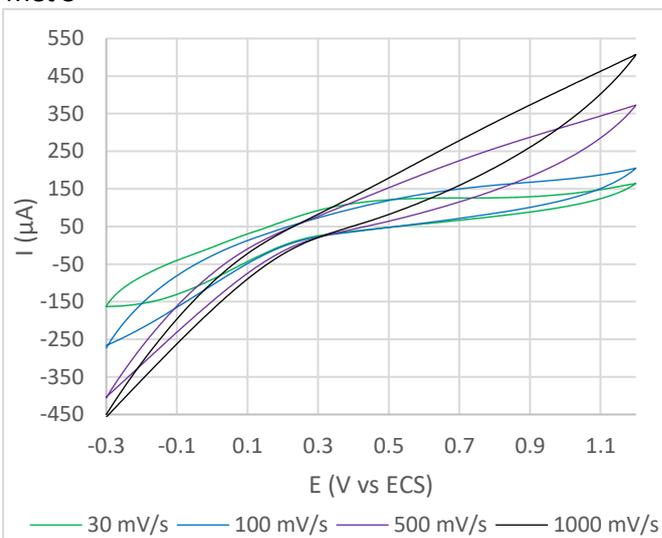
- [53] Sapurina, I., & Stejskal, J. (2008). The mechanism of the oxidative polymerization of aniline and the formation of supramolecular polyaniline structures. *Polymer International*, 57(12), 1295–1325. doi:10.1002/pi.2476
- [54] Stilwell, D. E. (1988). Electrochemistry of Conductive Polymers. *Journal of The Electrochemical Society*, 135(9), 2254. doi:10.1149/1.2096248
- [55] Carlin, C. M. (1985). Polymer Films on Electrodes. *Journal of The Electrochemical Society*, 132(2), 353. doi:10.1149/1.2113837
- [56] Choi, S.-J., & Park, S.-M. (2002). Electrochemistry of Conductive Polymers. XXVI. Effects of Electrolytes and Growth Methods on Polyaniline Morphology. *Journal of The Electrochemical Society*, 149(2), E26. doi:10.1149/1.1432675
- [57] Bernard, M.-C., Cordoba de Torresi, S., & Goff, A. H.-L. (1999). In situ Raman study of sulfonate-doped polyaniline. *Electrochimica Acta*, 44(12), 1989–1997. doi:10.1016/s0013-4686(98)00308-9
- [58] Yang, H., & Bard, A. J. (1992). The application of fast scan cyclic voltammetry. Mechanistic study of the initial stage of electropolymerization of aniline in aqueous solutions. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 339(1-2), 423–449. doi:10.1016/0022-0728(92)80466-h
- [59] Kessler, T., & Castro Luna, A. M. (2002). *Journal of Applied Electrochemistry*, 32(7), 825–830. doi:10.1023/a:1020179803778
- [60] H. Lund, O. Hammerich (2001), *Organic Electrochemistry*, Marcel Dekker, Inc., 4a Ed, 2001, 1309 pág.
- [61] Can, M., Özçiçek Pekmez, N., & Yildiz, A. (2003). Theoretical investigation of the proton effect on electropolymerization of aniline. *Polymer*, 44(8), 2585–2588. doi:10.1016/s0032-3861(03)00117-4
- [62] Campos, M., & Bello, B. (1997). Mechanism of conduction in doped polyaniline. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 30(10), 1531–1535. doi:10.1088/0022-3727/30/10/021
- [63] Bernard, M. C., Joiret, S., Goff, A. H.-L., & Phong, P. V. (2001). Protection of Iron Against Corrosion Using a Polyaniline Layer: I. Polyaniline Electrodeposit. *Journal of The Electrochemical Society*, 148(1), B12. doi:10.1149/1.1344527
- [64] Bhowmik, K. L., Deb, K., Bera, A., Nath, R. K., & Saha, B. (2016). Charge Transport through Polyaniline Incorporated Electrically Conducting Functional Paper. *The Journal of Physical Chemistry C*, 120(11), 5855–5860. doi:10.1021/acs.jpcc.5b08650

- [65] Abd-Elwahed, A., & Holze, R. (2002). Ion size and size memory effects with electropolymerized polyaniline. *Synthetic Metals*, 131(1-3), 61–70. doi:10.1016/s0379-6779(02)00153-4
- [66] Aldissi, M. (Ed.). (1993). *Intrinsically Conducting Polymers: An Emerging Technology*. doi:10.1007/978-94-017-1952-0
- [67] Echeverria, R. Miras, M.C. Barbero, C. (2003), *Jornadas SAM/ CONAMET/ SIMPOSIO MATERIA*, 10-14
- [68] McMurry, John E. (1988), *Química orgánica (2.ª ed.)*, Brooks/Cole, p. 866, ISBN 0534079687.
- [69] Zebda, A., Renaud, L., Cretin, M., Innocent, C., Ferrigno, R., & Tingry, S. (2010). Membraneless microchannel glucose biofuel cell with improved electrical performances. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 149(1), 44–50. doi:10.1016/j.snb.2010.06.032
- [70] Skoog, D. A. et al. (2002) *Principios de Análisis Instrumental*. Mc Graw Hill, Madrid
- [71] Korent, A., Žagar Soderžnik, K., Šturm, S., & Žužek Rožman, K. (2020). A Correlative Study of Polyaniline Electropolymerization and its Electrochromic Behavior. *Journal of The Electrochemical Society*, 167(10), 106504. doi:10.1149/1945-7111/ab9929
- [72] Sapurina, I. Y., & Shishov, M. A. (2012). Oxidative Polymerization of Aniline: Molecular Synthesis of Polyaniline and the Formation of Supramolecular Structures. *New Polymers for Special Applications*. doi:10.5772/48758

8. Anexo: Todos los voltamperogramas obtenidos

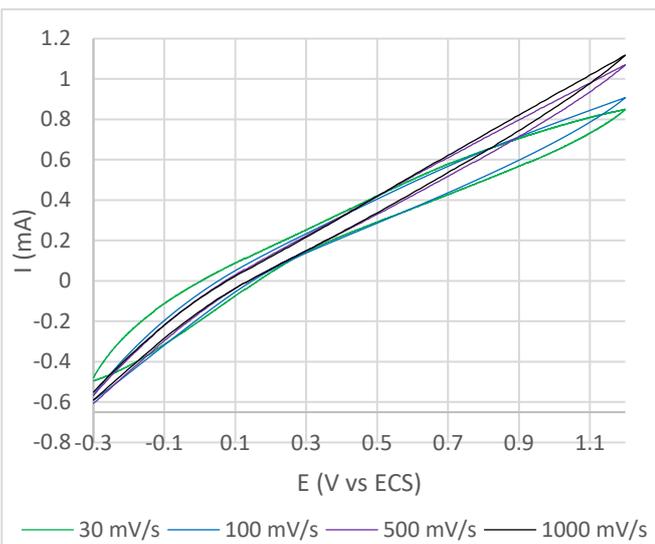
8.1. 10 mg/ml de Glucosa oxidasa

- KCl

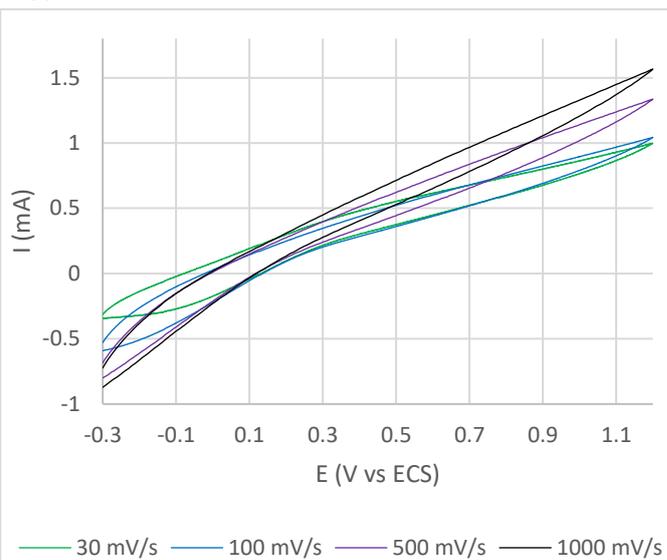
PANI**Met 1****Met 2****Met 3**

- KCl + glucosa

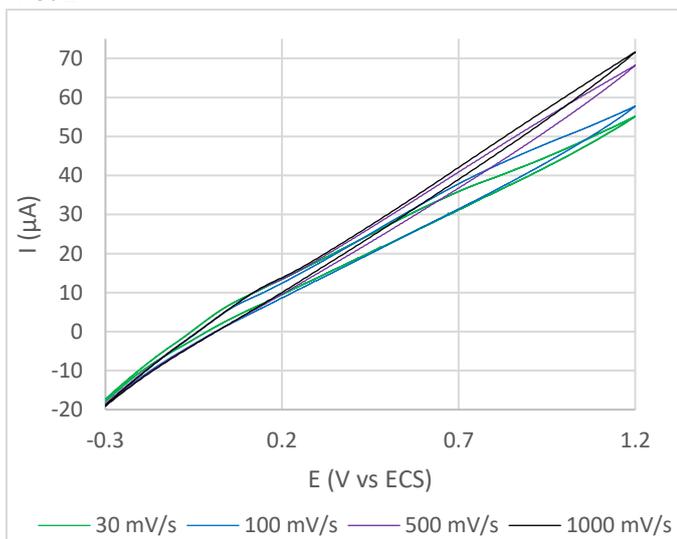
PANI



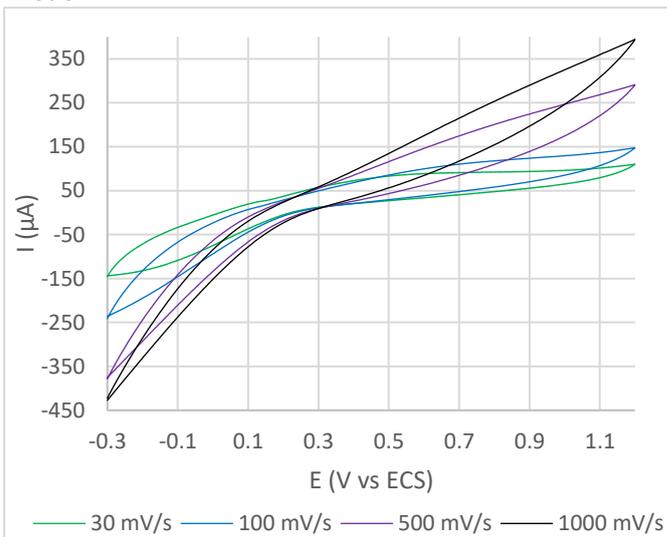
Met 1



Met 2

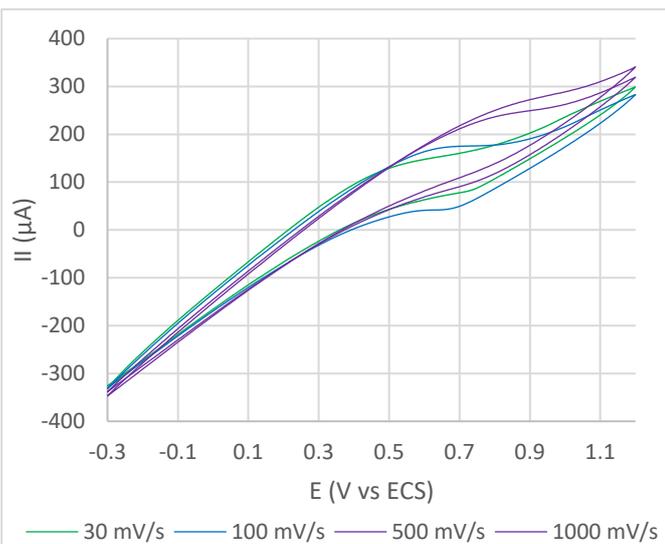


Met 3

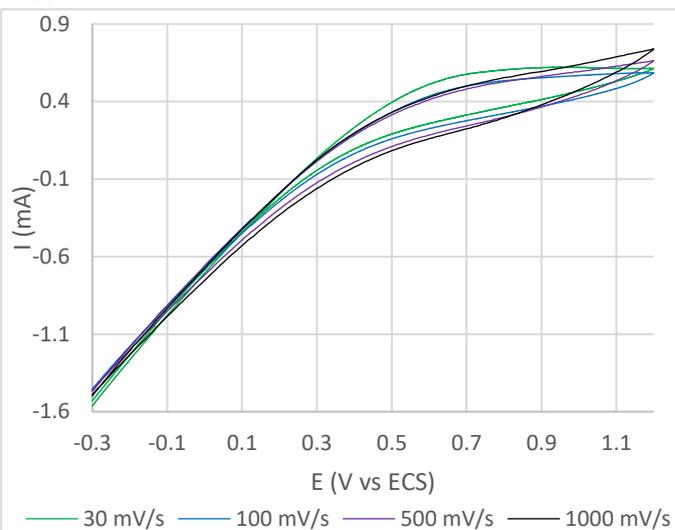


- $KCl + K_3Fe(CN)_6$

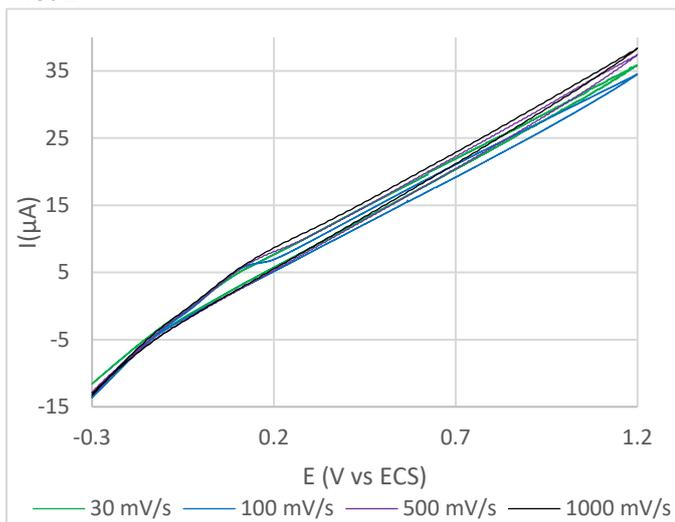
PANI



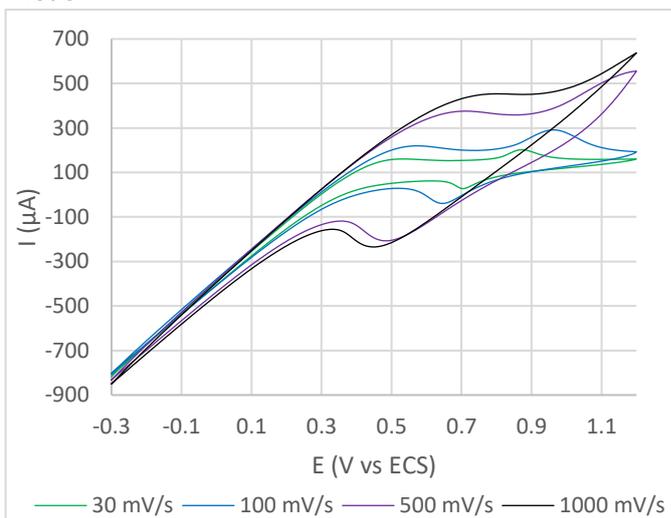
Met 1



Met 2

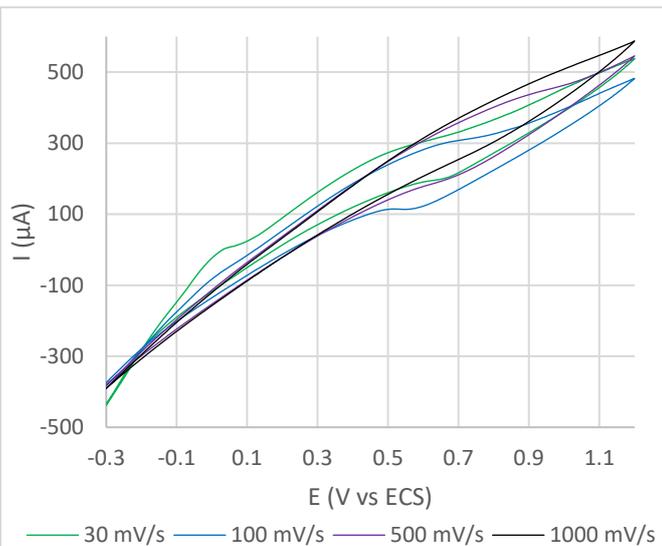


Met 3

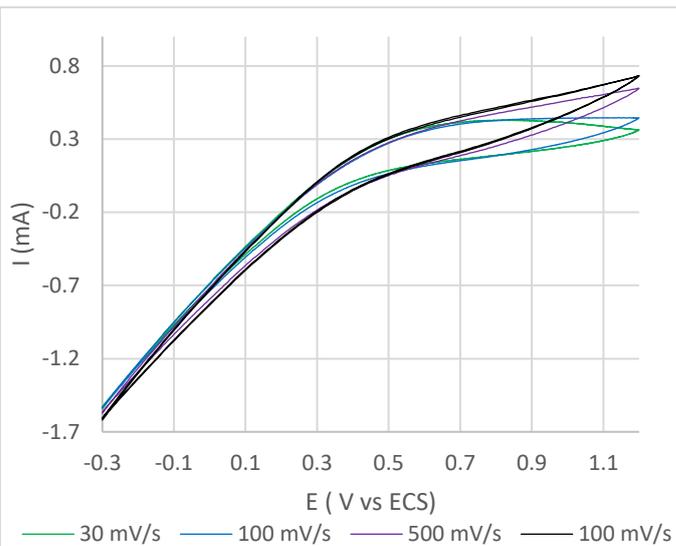


- KCl + glucosa + $K_3Fe(CN)_6$

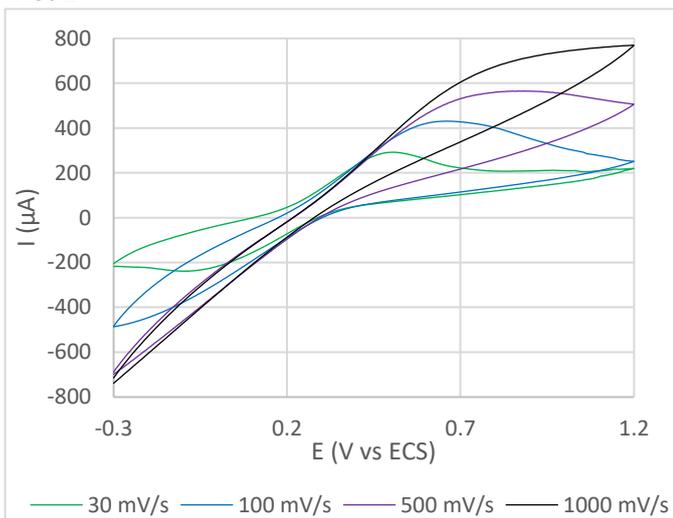
PANI



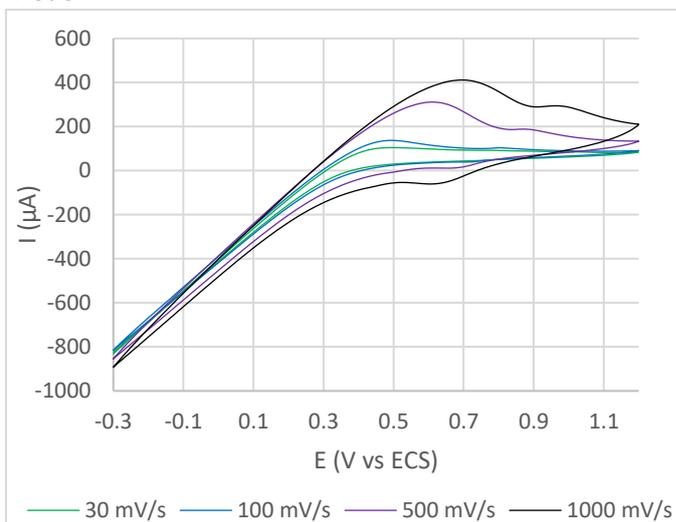
Met 1



Met 2



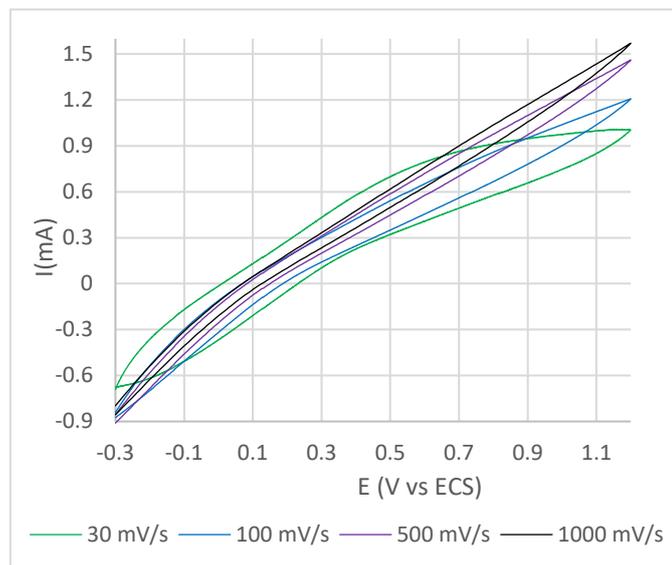
Met 3



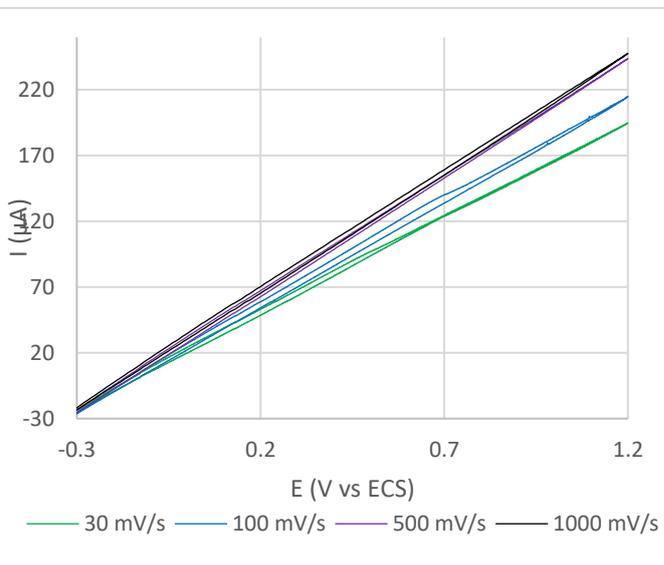
8.2. 20 mg/ml de Glucosa oxidasa

- KCl

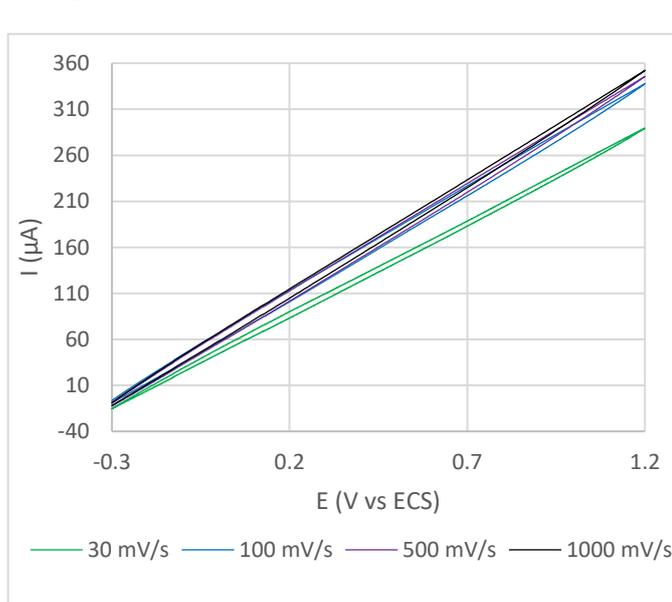
PANI



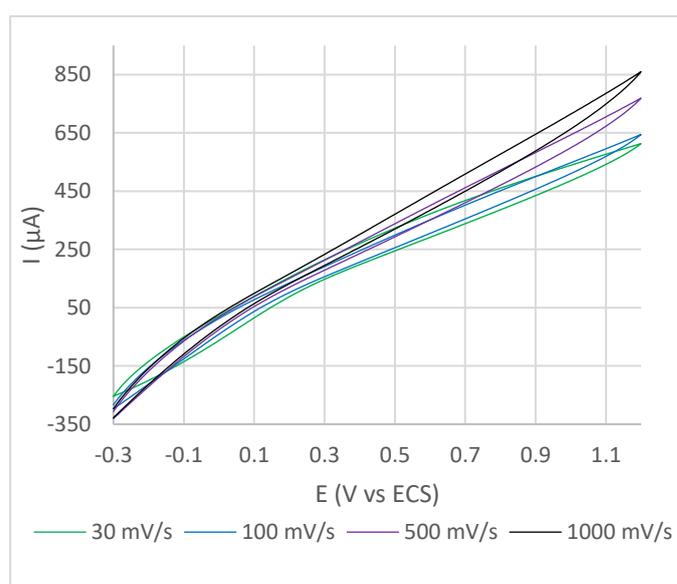
Met 1



Met 2

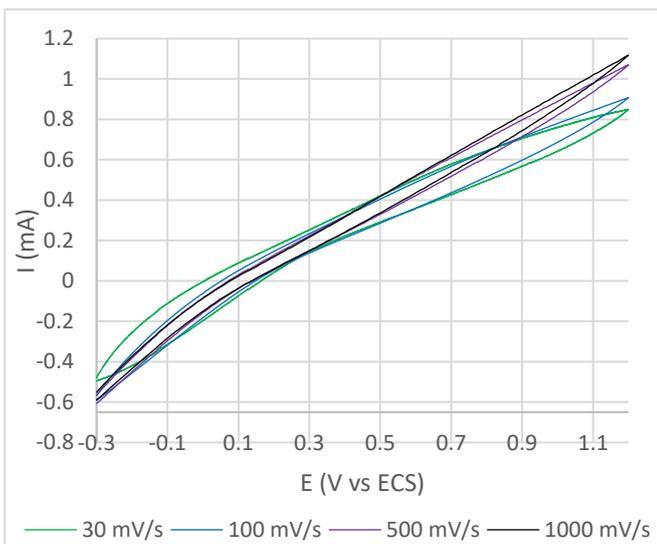


Met 3

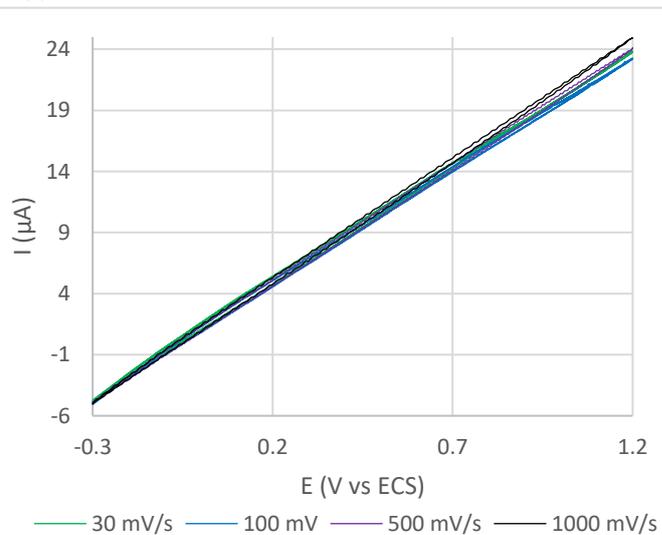


- KCl + glucosa

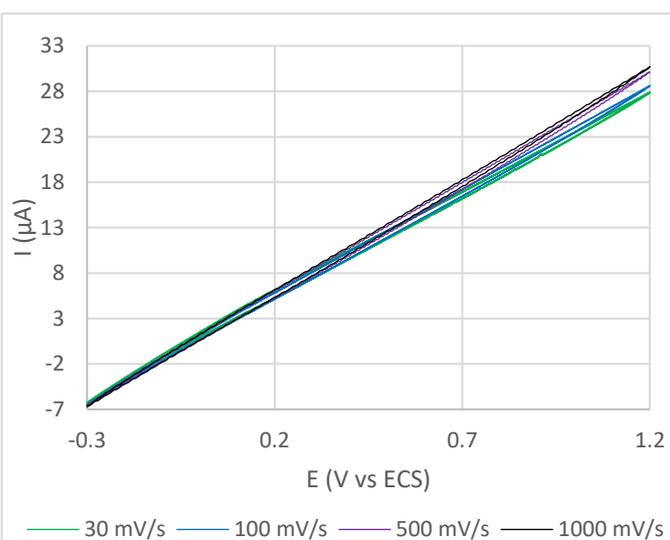
PANI



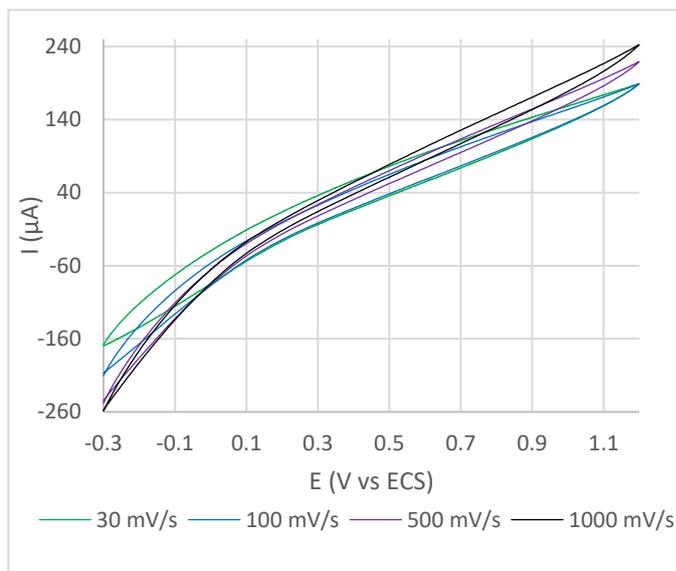
Met 1



Met 2

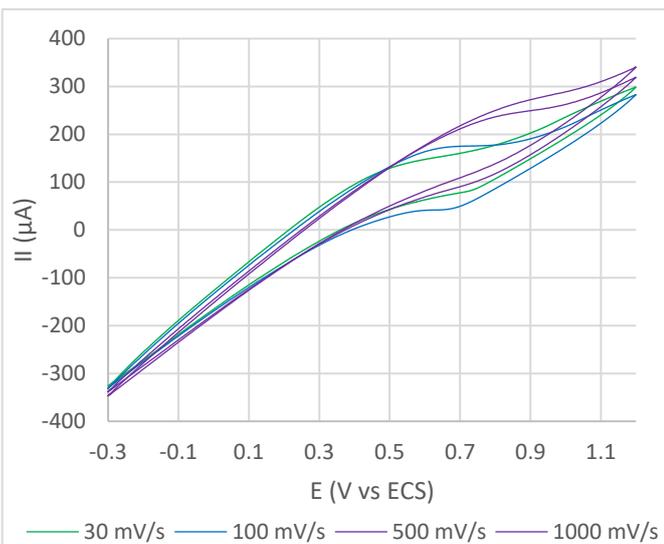


Met 3

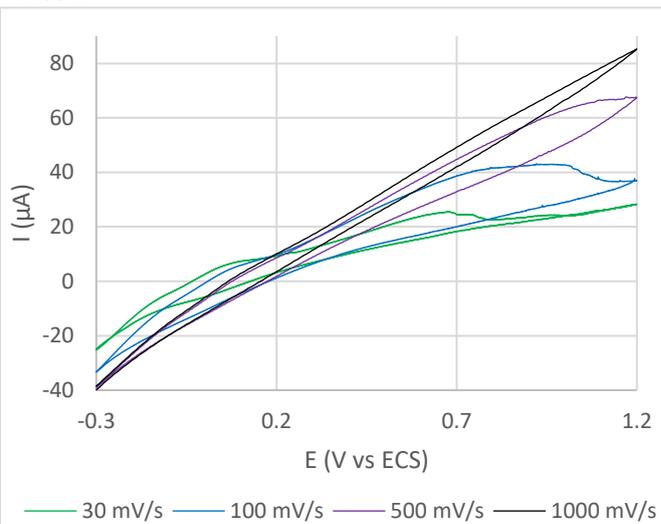


- $KCl + K_3Fe(CN)_6$

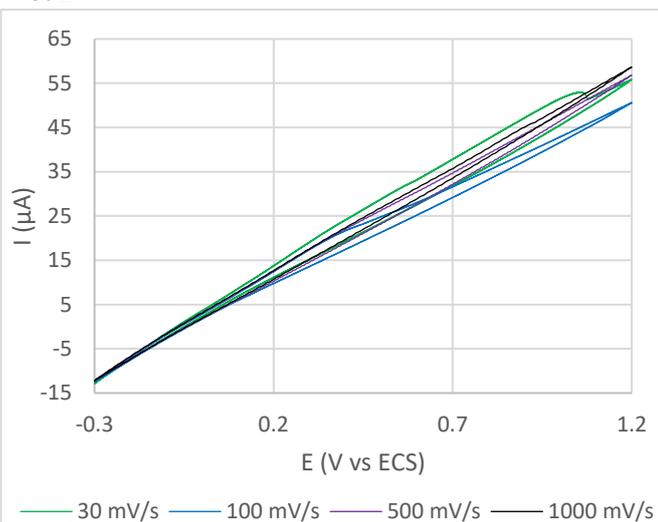
PANI



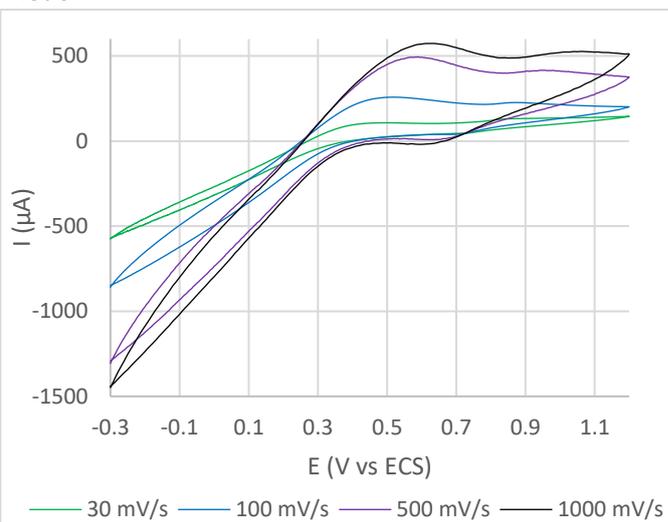
Met 1



Met 2

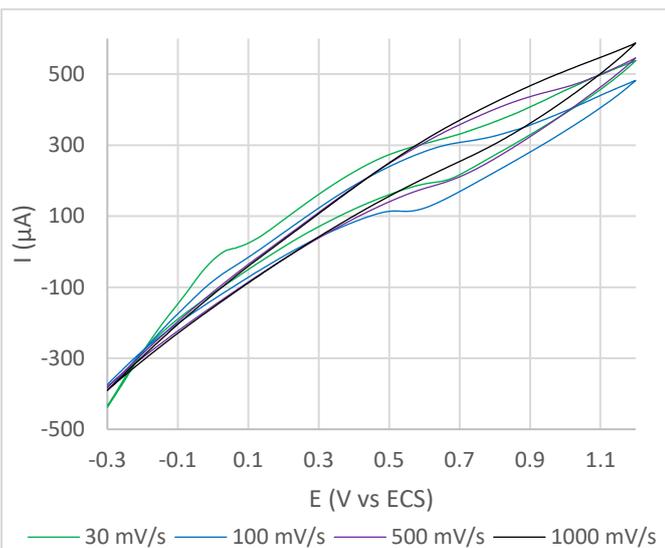


Met 3

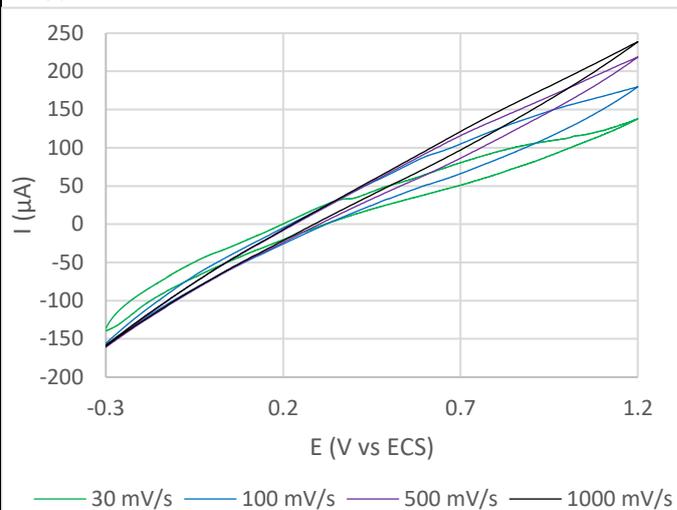


- KCl + glucosa + $K_3Fe(CN)_6$

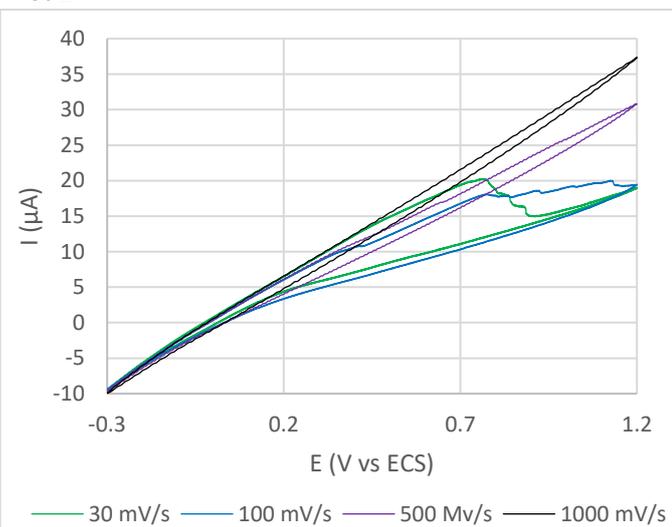
PANI



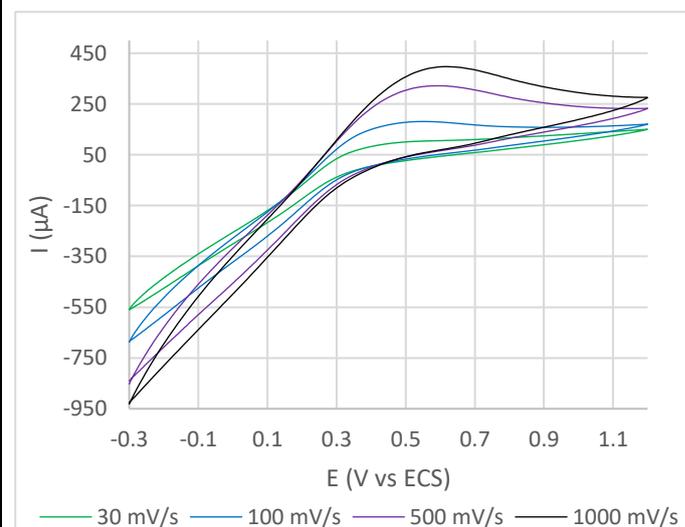
Met 1



Met 2



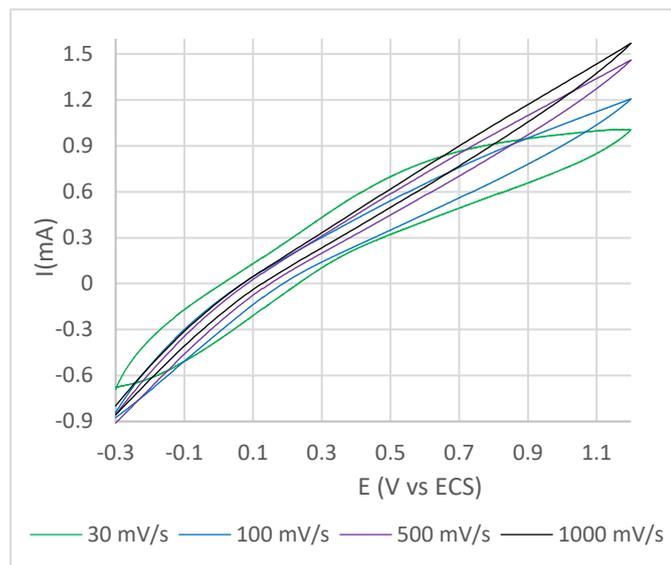
Met 3



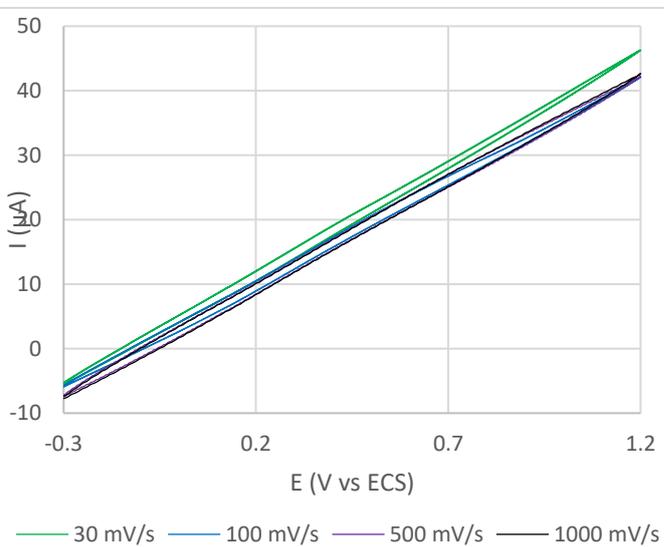
8.3. 40 mg/ml de Glucosa oxidasa

- KCl

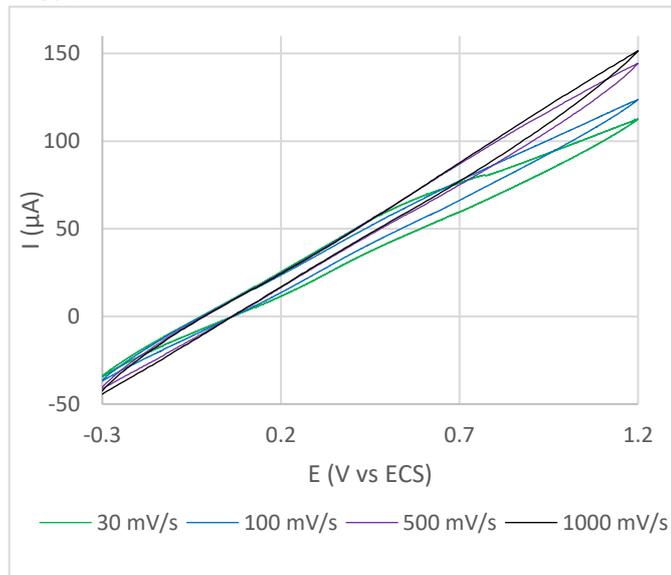
PANI



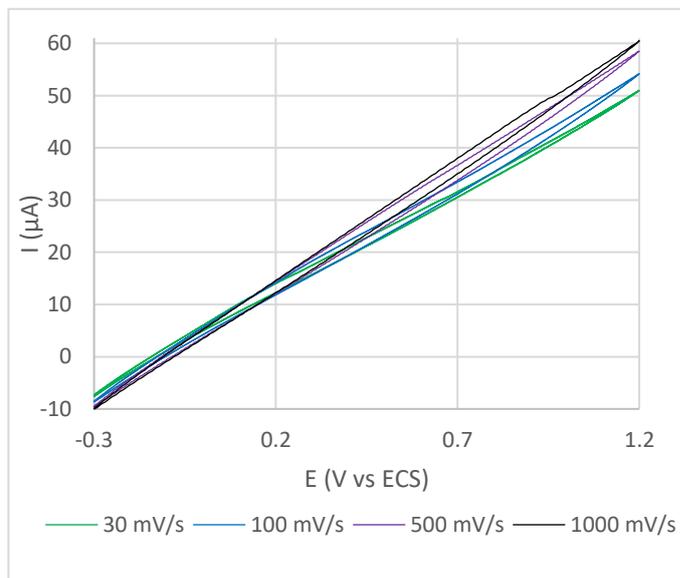
Met 1



Met 2

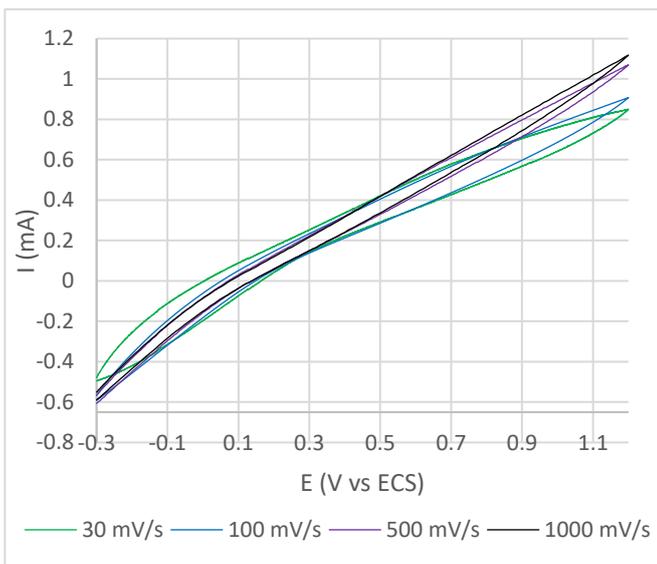


Met 3

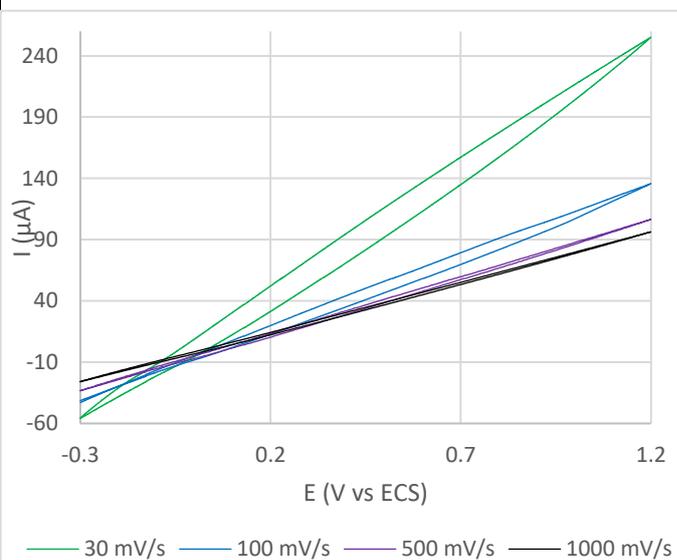


- KCl + glucosa

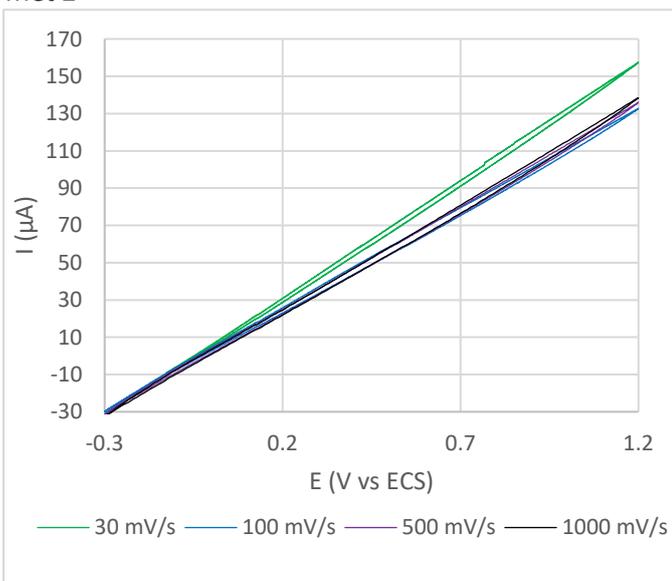
PANI



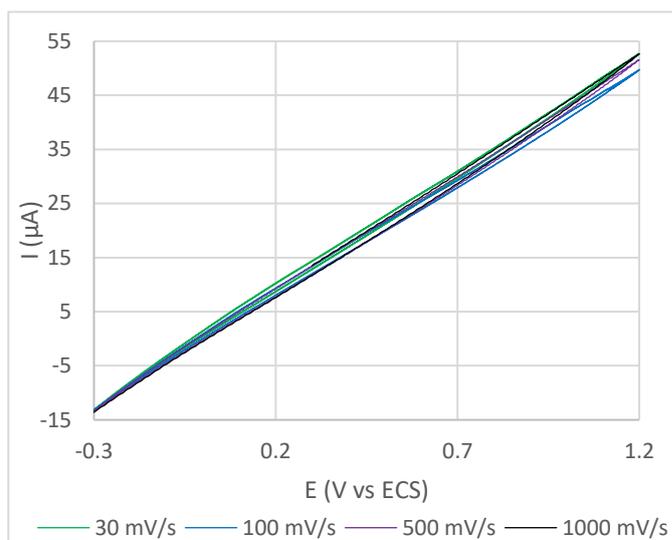
Met 1



Met 2

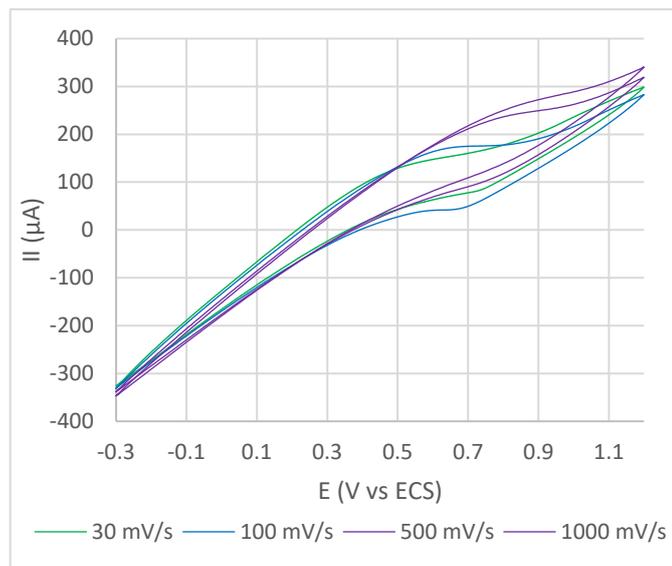


Met 3

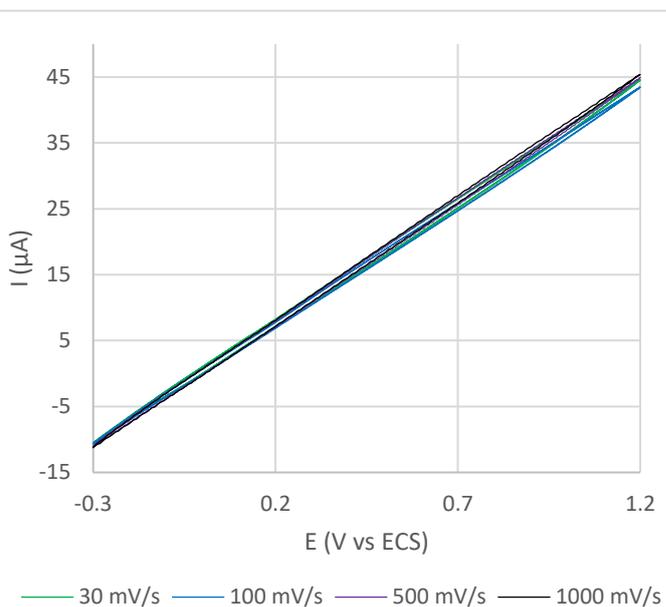


- $KCl + K_3Fe(CN)_6$

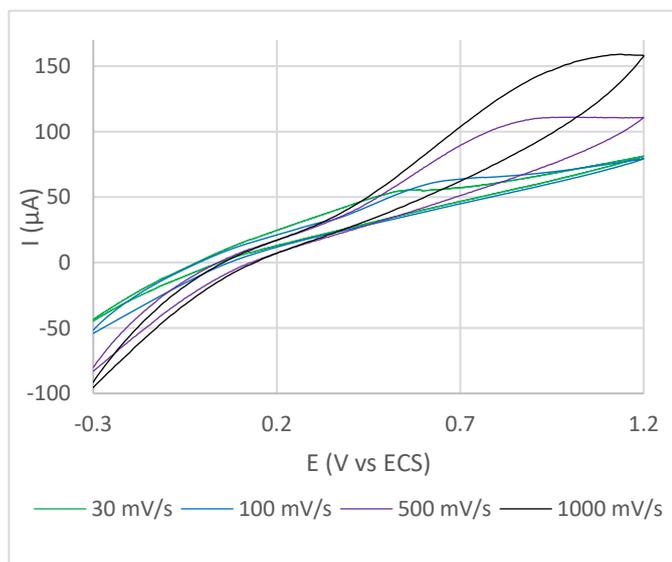
PANI



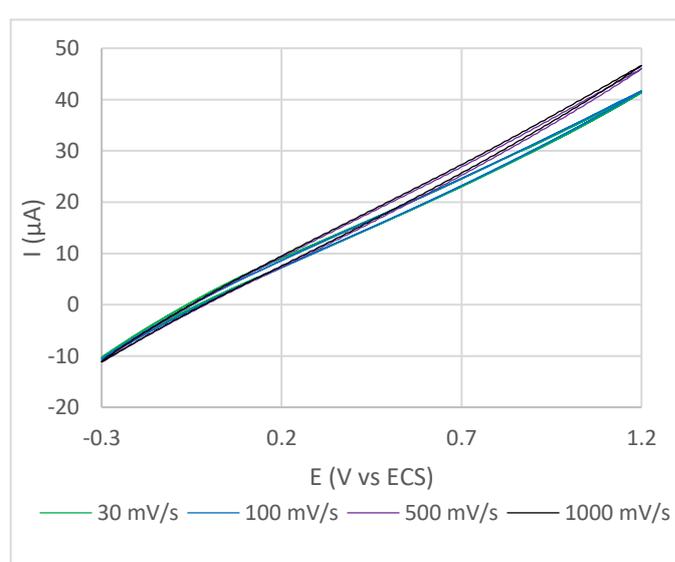
Met 1



Met 2

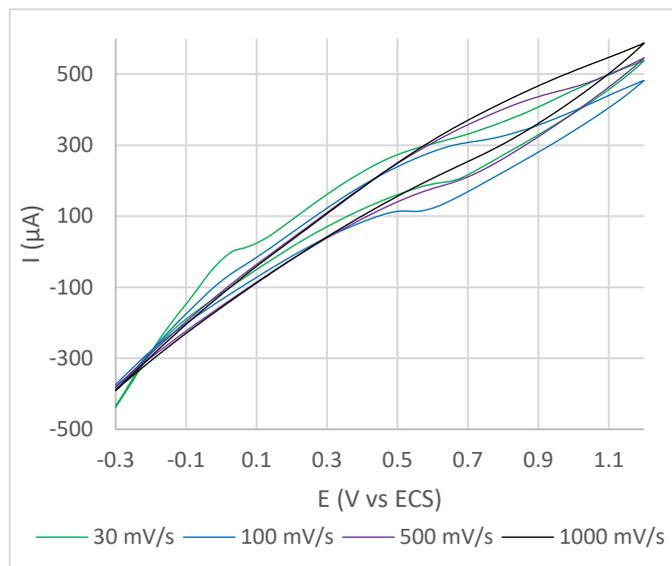


Met 3

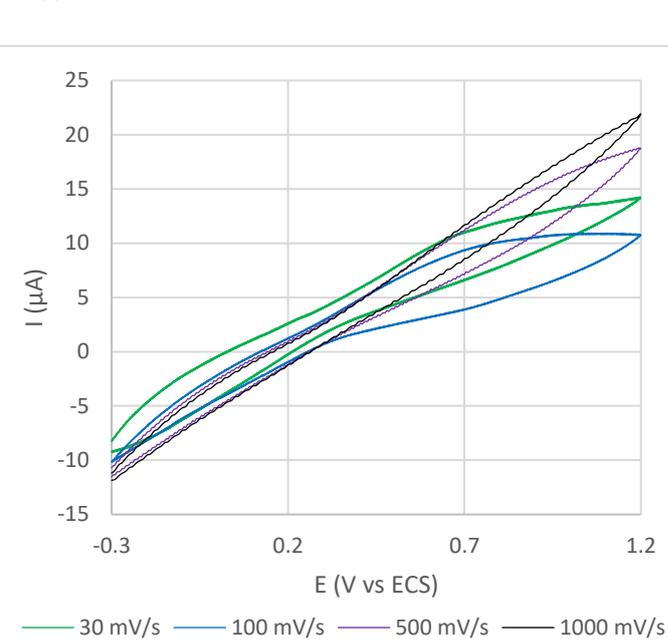


- KCl + glucosa + $K_3Fe(CN)_6$

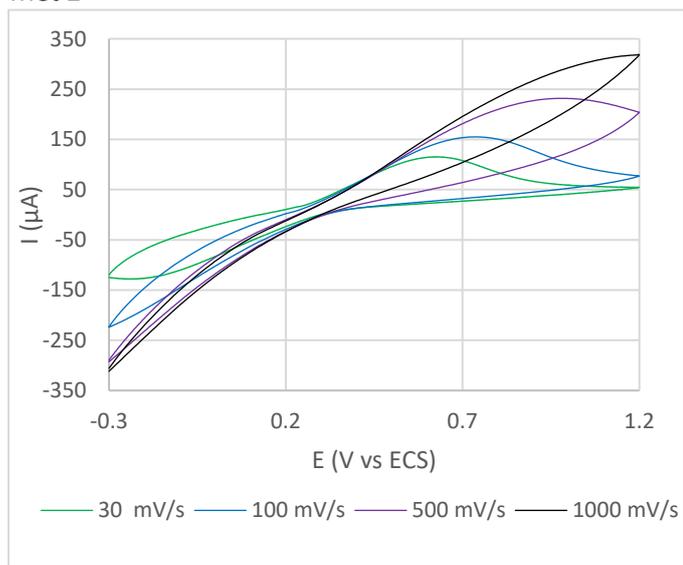
PANI



Met 1



Met 2



Met 3

