

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias en Ciencias de la Vida con
Orientación en Biotecnología Marina**

**Diseño de una celda de combustible enzimática con
bioelectrodos molecularmente orientados**

TESIS

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Luis Angel Bojórquez Vázquez

Ensenada, Baja California, México

2017

Tesis defendida por
Luis Angel Bojórquez Vázquez
y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Director de tesis

Miembros del comité

Dr. Ulises Cano Castillo

Dr. Rubén Darío Cadena Nava

Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Luis Angel Bojórquez Vázquez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Diseño de una celda de combustible enzimática con bioelectrodos molecularmente orientados

Resumen aprobado por:

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Director de tesis

La demanda de fuentes de energía ambientalmente amigables ha motivado la investigación y el desarrollo de tecnologías para la obtención de energía a partir de compuestos orgánicos. Una estrategia empleada para la producción de energía mediante sistemas bioelectroquímicos son las celdas de combustible enzimáticas, las cuales tienen como potencial aplicación el abastecer de energía a dispositivos médicos no invasivos o implantables. El presente trabajo propone la construcción de una celda de combustible enzimática compuesta por un bioelectrodo anódico Au-Glucosa oxidasa o Au-Glucosa deshidrogenasa y un bioelectrodo catiónico Au-Lacasa. Se propone la unión racional de las enzimas con los electrodos por medio de inmovilización molecularmente orientada para la eficiente transferencia directa de electrones. La celda de combustible fabricada presentó un voltaje de circuito abierto de 0.55 V y generó una densidad de potencia máxima de 0.328 mW/cm² a 0.26 V.

Palabras clave: Celda de combustible enzimática, bioelectrodo, inmovilización molecularmente orientada, transferencia directa de electrones.

Abstract of the thesis presented by **Luis Angel Bojórquez Vázquez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology.

Desing of an enzymatic fuel cell with molecular oriented bioelectrodos

Abstract aproved by:

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Thesis Director

The demand of new and environmentally friendly energy sources has induced the research and development of technologies for the energy generation from organic compounds. Among the strategies for the production of energy by bioelectrochemical systems there are the enzymatic fuel cells, which have several potential applications including as energy suppliers for non-invasive and implantable medical devises. The present work proposes the construction of an enzymatic fuel cell composed of an anodic bioelectrode containing Au-glucose oxidase or Au-glucose dehydrogenase and a cathodic Au-Lacasa bioelectrode. It is proposed the rational attachment of the enzymes on the electrodes surfaces by molecularly oriented immobilization for the efficient direct electron transfer. The manufactured fuel cell showed an open circuit voltage of 0.55 V and generated a maximum power density of 0.328 mW/cm² at 0.26 V.

Keywords: Enzymatic fuel cell, bioelectrode, molecularly oriented immobilization, direct electron transfer.

Dedicatoria

Dedico este trabajo a Beatriz Adriana Echeagaray Patron.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de maestría (No. de registro: 589036) que me fue otorgada para realizar mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por brindarme las facilidades necesarias para formar parte del posgrado en Ciencias de la Vida y apoyarme durante el desarrollo y culminación de mis estudios.

Al Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM (CNyN-UNAM) por ser mi casa durante la etapa experimental de mi tesis.

Agradezco a mi asesor, el Dr. Rafael Vázquez Duhalt, por permitirme formar parte del Departamento de Bionanotecnología del CNyN, por no escatimar en lo que fuera necesario para el desarrollo de mi proyecto y mi formación, y por la seriedad y ética con la que dirigió mi proyecto de tesis.

A los doctores Rubén Cadena Nava y Carlos Brizuela Hernández por su atento seguimiento de mi proyecto como miembros del comité evaluador.

Al Dr. Ulises Cano Castillo por formar parte de mi comité de evaluación, por recibirme en el Instituto de Nacional de Electricidad y Energías Limpias (INEEL) y asesorarme en los aspectos técnicos de mí proyecto.

A los miembros del Departamento de Bionanotecnología por ser científicos y amigos dispuestas a compartir sus conocimientos y tiempo incondicionalmente.

A mis compañeros y amigos de generación del posgrado por hacer más amena la etapa de cursos.

Agradezco especialmente a Adriana Echeagaray Patron. Gracias por tu cariño, apoyo, comprensión y paciencia en esta importante etapa para los dos.

Agradezco a mis padres José e Isabel y a mis hermanas Stephanie y Andrea por su amor incondicional.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas	xii
Lista de abreviaciones, símbolos y unidades.....	xiii
Lista de anexos	xvi
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Historia	1
1.2 Antecedentes	4
1.2.1 Bases teóricas de las celdas de combustible.....	4
1.2.2 Celdas de combustible enzimáticas	5
1.2.3 Transferencia directa de electrones.....	7
1.2.4 Glucosa oxidasa.....	15
1.2.5 Glucosa deshidrogenasa.....	19
1.2.6 Lacasa	22
1.3 Justificación.....	26
1.4 Hipótesis.....	26
1.5 Objetivo general.....	27
1.5.1 Objetivos específicos.....	27
Capítulo 2. Materiales y métodos	28
2.1 Sistema electroquímico.....	28
2.2 Electrodo de oro.....	28
2.2.1 Limpieza.....	28
2.2.2 Evaluación en buffer.....	29
2.3. Electrodo anódico	29
2.3.1 Producción de la apo-glucosa oxidasa	29
2.3.3 Ensayo de actividad de la glucosa oxidasa	30
2.3.4 Inmovilización molecularmente orientada	30
2.3.5 Inmovilización aleatoria	31

2.4 Electrodo cátodo-lacasa	32
2.4.1 Interacción de la lacasa 4AMB	32
2.4.2 Inmovilización molecularmente orientada de la lacasa	32
2.5 Evaluación electroquímica	32
2.6. Construcción y caracterización de la celda de combustible	33
Capítulo 3. Resultados y discusión	34
3.1 Evaluación de los electrodos de oro	34
3.1.1 Limpieza.....	34
3.1.2 Comportamiento de los electrodos de oro	35
3.2 Desflavinación de glucosa oxidasa	36
3.3 Reconstitución de la glucosa oxidasa	37
3.4 Electrodo anódico de glucosa oxidasa	38
3.4.1 Unión de FAD y reconstitución de glucosa oxidasa	38
3.4.2 Adsorción electrostática de glucosa oxidasa	58
3.4.3 Adsorción de glucosa oxidasa en CNTs	63
3.4.4 Transferencia mediada de electrones.....	65
3.5 Electrodo anódico de glucosa deshidrogenasa	68
3.5.1 Unión de PQQ y reconstitución de glucosa oxidasa.....	68
3.6 Electrodo catódico de lacasa.....	72
3.6.1 Interacción de la lacasa con el 4AMB.....	72
3.6.2 Unión orientada de lacasa.....	74
3.6.2 Adsorción de lacasa en CNTs.....	77
3.7 Celda de combustible enzimática	78
Capítulo 4. Conclusiones.....	83
Literatura citada	84
Anexos	91

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Esquema general de una celda de combustible enzimática.....	1
Figura 2. Esquema general de la transferencia mediada de electrones.....	6
Figura 3. Estrategias de inmovilización de enzimas para favorecer la DET.	7
Figura 4. Proceso de desflavinación y reconstitución de glucosa oxidasa sobre electrodos.....	10
Figura 5. Ciclovoltagramas del ánodo-alcohol deshidrogenasa y ciclovoltagramas del cátodo-bilirrubina oxidasa.....	11
Figura 6. Ciclovoltagramas del ánodo-glucosa deshidrogenasa con y sin glucosa, y ciclovoltagramas del cátodo-lacasa con O ₂ y N ₂	13
Figura 7. Ciclovoltagramas del ánodo-glucosa deshidrogenasa en presencia de glucosa, ciclovoltagramas del cátodo-bilirrubina oxidasa con N ₂ y O ₂ , y curva de polarización y en presencia de glucosa	14
Figura 8. Estructuras de FAD en sus diferentes estados de oxidación	15
Figura 9. Región de la isoaloxazina de FAD en presencia de H ₂ O, glucosa y O ₂	16
Figura 10. N6-(2-Aminoetil)-FAD y N6-(6-Aminohehexil)-FAD.	17
Figura 11. Esquema de los componentes del electrodo anódico y ciclovoltagramas del electrodo en presencia de glucosa, y relación corriente-concentración de glucosa.	17
Figura 12. Esquema de los componentes del electrodo anódico, ciclovoltagramas del electrodo en presencia de glucosa y relación corriente-concentración de glucosa	18
Figura 13. Estructuras de PQQ en sus diferentes estados de oxidación.....	19
Figura 14. Esquema de los componentes del electrodo anódico, ciclovoltagramas del electrodo en presencia de glucosa y relación corriente-concentración de glucosa	20
Figura 15. Esquema de los componentes del electrodo anódico, ciclovoltagramas del electrodo en presencia de glucosa y relación corriente-concentración de glucosa	21
Figura 16. Esquema de la estructura cristalográfica de la lacasa y flujo de electrones, y relación estequiométrica genérica del ciclo catalítico de las lacasas.	23
Figura 17. Ciclovoltagramas de varios electrodos enzimáticos compuestos por lacasas de diferentes hongos adsorbidas en electrodos de grafito pirolítico mostrando DET en respuesta a saturación de N ₂ y O ₂	24
Figura 18. Esquema de la unión del grafito pirolítico modificado con antraceno y ciclovoltagramas de electrodos al ser sumergidos en una solución con y sin lacasa	25
Figura 19. Sistema electroquímico de tres electrodos contenidos en un recipiente de vidrio con electrolito.	28
Figura 20. Proceso de producción de apo-glucosa oxidasa y su posterior reconstitución para la formación de holo-glucosa oxidasa.....	29

Figura 21. Relación estequiométrica en la reacción para la cuantificación de la actividad de la glucosa oxidasa.	30
Figura 22. Proceso de producción de electrodos con glucosa oxidasa molecularmente orientada.	31
Figura 23. Proceso de producción de electrodos con glucosa oxidasa unida aleatoriamente.....	32
Figura 24. Esquema técnico de la celda construida para el arreglo de electrodos enzimáticos.	33
Figura 25. Ciclovoltograma de un electrodo de oro posterior al tratamiento de limpieza mecánica con alúmina.....	34
Figura 26. Ciclovoltograma de un electrodo de oro en presencia de buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3.....	35
Figura 27. Actividad específica de la glucosa oxidasa en diferentes buffers.....	36
Figura 28. Perfil de absorbancia la glucosa oxidasa nativa, apo-glucosa oxidasa y el sobrenadante que contenía el FAD extraído, y perfil de absorbancia de FAD.....	37
Figura 29. Ciclovoltograma de electrodo de oro funcionalizado con FAD.....	39
Figura 30. Ciclovoltogramas de electrodos de oro funcionalizados con FAD evaluados inmediatamente después del proceso de funcionalización y después de 3 h a 4°C sumergidos en buffer de fosfatos de sodio.....	40
Figura 31. Ciclovoltogramas de electrodos de oro con glucosa oxidasa orientada molecularmente en ausencia y presencia de glucosa	40
Figura 32. Ciclovoltogramas de electrodos de oro funcionalizados con glucosa oxidasa orientada molecularmente después de ser evaluado en presencia de glucosa.....	41
Figura 33. Ciclovoltogramas de electrodos funcionalizados con FAD evaluados inmediatamente después de la funcionalización y después de 3 h a 4°C	42
Figura 34. Ciclovoltogramas de electrodos con glucosa oxidasa orientada molecularmente en ausencia y presencia de glucosa	43
Figura 35. Ciclovoltogramas de electrodos funcionalizados con FAD evaluados inmediatamente después de la funcionalización y después de 12 h a 4°C	44
Figura 36. Ciclovoltogramas de electrodos de oro con glucosa oxidasa orientada molecularmente en ausencia y presencia de glucosa	45
Figura 37. Ciclovoltograma de electrodos funcionalizados con FAD después de la reconstitución de la glucosa oxidasa.....	45
Figura 38. Estructura tridimensional del monómero de la glucosa oxidasa asociado a FAD modificado con bifenil-4',4' ácido carboxílico y 4ATP.....	46
Figura 39. Ciclovoltogramas de electrodos de oro con glucosa oxidasa orientada molecularmente en ausencia y presencia de glucosa	47
Figura 40. Ciclovoltograma de electrodos funcionalizados con FAD después de la reconstitución de la glucosa oxidasa.....	47
Figura 41. Ciclovoltogramas de electrodos de oro con glucosa oxidasa orientada molecularmente en ausencia y presencia de glucosa	48

Figura 42. Estructura tridimensional del monómero de la glucosa oxidasa asociado a FAD modificado con bifenil-4',4' ácido carboxílico, 4,4'-diaminobifenil y 4AMB	49
Figura 43. Ciclovoltograma de electrodos funcionalizados con FAD	49
Figura 44. Ciclovoltogramas de electrodos de oro con glucosa oxidasa orientada molecularmente en ausencia y presencia de glucosa	50
Figura 45. Ciclovoltograma de electrodos funcionalizados con FAD	51
Figura 46. Ciclovoltogramas de electrodos de oro con glucosa oxidasa orientada molecularmente en ausencia y presencia de glucosa	51
Figura 47. Ciclovoltogramas de electrodos de oro funcionalizados con PQQ y FAD	53
Figura 48. Ciclovoltogramas de electrodos de oro funcionalizados con PQQ y FAD con glucosa oxidasa orientada molecularmente en ausencia y presencia de glucosa	54
Figura 49. Ciclovoltograma de electrodos funcionalizados con C-MWCNTs y FAD	55
Figura 50. Ciclovoltogramas de electrodos de oro con glucosa oxidasa orientada molecularmente en ausencia y presencia de glucosa	55
Figura 51. Estructura tridimensional del monómero de la glucosa oxidasa asociado a FAD.	56
Figura 52. Ciclovoltogramas de electrodos de oro funcionalizados con FAD	57
Figura 53. Ciclovoltogramas de electrodos de oro funcionalizados con FAD con glucosa oxidasa orientada molecularmente en ausencia y presencia de glucosa	58
Figura 54. Proceso de fabricación del electrodo anódico con glucosa oxidasa unida por adsorción electrostática.....	59
Figura 55. Ciclovoltogramas correspondientes a la oxidación de la glucosa por el electrodo con glucosa oxidasa adsorbida, curva de calibración para diferentes concentraciones de glucosa y respuesta del electrodo en concentraciones fisiológicas humanas de glucosa.....	60
Figura 56. Ciclovoltogramas de electrodos de oro con glucosa oxidasa adsorbida en ausencia y presencia de glucosa	61
Figura 57. Ciclovoltogramas de un ánodo de platino sin y con glucosa oxidada adsorbida en presencia de glucosa.....	62
Figura 58. Ciclovoltograma de electrodos de oro con un depósito de SWCNTs y glucosa oxidasa adsorbida.....	63
Figura 59. Ciclovoltogramas de electrodos de oro con un depósito de SWCNTs y glucosa oxidasa adsorbida en ausencia y presencia de glucosa	64
Figura 60. Esquema del rango de transferencia de electrones por efecto túnel en la lacasa y la glucosa oxidasa.	65
Figura 61. Ciclovoltogramas de electrodos de oro con un depósito de SWCNTs, glucosa oxidasa y mediador en ausencia y presencia de glucosa.....	66
Figura 62. Voltogramas de barrido lineal correspondientes a la oxidación de glucosa por el electrodo con SWCNTs, glucosa oxidasa e hidroquinona.....	67
Figura 63. Ciclovoltograma de electrodos funcionalizados con PQQ	68

Figura 64. Ciclovoltograma de electrodos funcionalizados con PQQ.	69
Figura 65. Ciclovoltogramas de electrodos de oro con glucosa deshidrogenasa molecularmente orientada	69
Figura 66. Ciclovoltograma de electrodos funcionalizados con PQQ	70
Figura 67. Ciclovoltogramas de electrodos de oro con glucosa deshidrogenasa molecularmente orientada	71
Figura 68. Estructura tridimensional del dímero de la glucosa deshidrogenasa asociada a PQQ.....	71
Figura 69. Perfil de absorbancia de la lacasa en ausencia y presencia de 4AMB	72
Figura 70. Perfil de absorbancia de la lacasa en presencia de concentraciones ascendentes de 4AMB.....	73
Figura 71. Diferencia entre el espectro de absorbancia de la lacasa en interacción con concentraciones ascendentes de 4AMB	74
Figura 72. Cinética de interacción del 4AMB con la lacasa	74
Figura 73. Ciclovoltogramas de electrodos con lacasa orientada molecularmente en condiciones de saturación de N ₂ y O ₂	75
Figura 74. Ciclovoltogramas de electrodos con lacasa orientada molecularmente en condiciones de saturación de N ₂ y O ₂	76
Figura 75. Ciclovoltogramas de electrodos funcionalizados con lacasa orientada molecularmente en condiciones de saturación de N ₂ y O ₂	76
Figura 76. Ciclovoltogramas de electrodos con depósito de SWCNTs y lacasa adsorbida en ambiente saturado con N ₂ y saturado con O ₂	77
Figura 77. Esquema de la estructura en capas que conforman a los electrodos ánodo y cátodo utilizados en la celda de combustible enzimática.....	78
Figura 78. Esquema de la celda de combustible enzimática con las reacciones redox reacciones redox llevadas a cabo en los electrodos.	79
Figura 79. Cronopotenciograma de la celda de combustible enzimática ánodo-glucosa oxidasa cátodo-lacasa	80
Figura 80. Curva de polarización y curva de potencia de la celda de combustible ánodo-glucosa oxidasa cátodo-lacasa	81
Figura 81. Cronoamperometria de la celda de combustible ánodo-glucosa oxidasa cátodo-lacasa durante 4 d.....	81

Lista de tablas

	Página
Tabla 1. Características de las celdas de combustible enzimáticas.	3
Tabla 2. Enzimas comúnmente utilizadas en la fabricación de electrodos enzimáticos.	6
Tabla 3. Celdas de biocombustible reportadas que utilizan electrodos con enzimas inmovilizadas por confinamiento.	9
Tabla 4. Celdas de combustible construidas con electrodos enzimáticos que presentan DET.	12
Tabla 5. Sustrato y buffer utilizados en las evaluaciones electroenzimática.	33
Tabla 6. Actividad de la glucosa oxidasa en diferentes buffer.....	36
Tabla 7. Actividad de la glucosa oxidasa tras el proceso de desflavinación y reconstitución.	38
Tabla 8. Actividad de la glucosa oxidasa tras reconstitución con FAD nativo y FAD modificado.	52
Tabla 9. Controles implementados para el electrodo anódico con glucosa oxidasa adsorbida en electrodos de oro.....	61
Tabla 10. Controles implementados para el electrodo anódico con glucosa oxidasa adsorbida en electrodos de oro.....	67

Lista de abreviaciones, símbolos y unidades

4ATP	4-aminotiofenol
4AMB	4-ácido mercaptobenzoico
Ag/AgCl	Electrodo de referencia de plata/cloruro de plata
BSA	Albúmina de suero bovino
CNTs	Nanotubos de carbono
C-MWCNTs	Nanotubos de carbono de multipared carboxilados
DET	Transferencia directa de electrones
DMSO	Dimetilsufóxido
EDC	N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida hidrociorado
FAD	Adenina dinucleótido de flavina
GOx	Glucosa oxidasa
HEPES	Ácido etanosulfónico 4,2-hidroxietyl piperazina
H ₂ O _d	Agua destilada
MET	Transferencia mediada de electrones
MES	Ácido 2-morfolino etano sulfónico
MWCNTs	Nanotubos de carbono de multipared
NAD	Adenina dinucleótido de nicotinamida
NADP	Adenina dinucleótido de nicotinamida fosfato
NHE	Electrodo de referencia normal de hidrogeno
NHS	N-hidroxisuccinimida
OCV	Voltaje a circuito abierto
ox	Oxidado
PQQ	Quinona pirroloquinolina
red	Reducido
SAM	Monocapa autoensamblable
SCE	Electrodo de referencia de calomel
SHE	Electrodo de referencia estándar de hidrogeno
SWCNTs	Nanotubos de carbono de pared simple

A	Área/Amperio
A_g	Área geométrica
A_r	Área real o área superficial electroactiva
Å	Angstrom
%A	Porcentaje de área de cobertura
C	Coulomb/Contraelectrodo
cm	Centímetro
d	día
ΔG	Cambio en la energía libre de Gibbs
ΔH	Cambio en la entalpía
ΔS	Cambio en la entropía
E	Potencial
E°	Potencial formal de reducción
F	Constante de Faraday
F_r	Factor de rugosidad
g	Gramo
Γ	Moles de especies electroactivas
°C	Grados centígrados
h	hora
I	Corriente
K_A	Constante de asociación
K_m	Constante de Michaelis-Menten
l	Litro
λ	Longitud de onda
M	Concentración molar
m	Mili/Metro
min	Minuto
μ	Micro
n	Nano/Moles
p	Pico
pH	Potencial hidrogeno
Q	Carga coulométrica/Cociente de reacción
Q_{exp}	Carga coulométrica experimental
Q_{teo}	Carga coulométrica teórica

R	Constante universal de los gases/Electrodo de referencia
®	Marca registrada
s	Segundo
T	Temperatura
U	Unidades enzimáticas
V	Voltios
v	Velocidad
vs	En referencia a
W	Watts/Electrodo de trabajo
w	Trabajo

Lista de anexos

	Página
Anexo 1. Ciclovoltagrama de electrodos funcionalizados con FAD después de la reconstitución de la glucosa oxidasa	91
Anexo 2. Ciclovoltagrama de electrodos funcionalizados con FAD después de la reconstitución de la glucosa oxidasa	91
Anexo 3. Ciclovoltagramas de electrodos de oro con glucosa oxidasa orientada molecularmente en ausencia y presencia de glucosa	92
Anexo 4. Ciclovoltagramas de electrodos de oro funcionalizados con PQQ y FAD después del proceso de reconstitución de glucosa oxidasa	92
Anexo 5. Ciclovoltagrama de electrodos funcionalizados con FAD después de la reconstitución de la glucosa oxidasa	92
Anexo 6. Diagrama de Pourbaix para un sistema Au–H ₂ O a 25°C.....	92
Anexo 7. Esquema de la celda de combustible híbrida ánodo-oro cátodo-lacasa con SWCNTs, fotografía de la celda de combustible construida, cronopotenciometría de la celda combustible y curva de polarización	92
Anexo 8. Ciclovoltagramas de electrodos de oro con SWCNTs, glucosa oxidasa e hidroquinona en ausencia y presencia de glucosa	92
Anexo 9. Ciclovoltagramas de electrodos funcionalizados con PQQ después del proceso de reconstitución de la glucosa deshidrogenasa.....	92

Capítulo 1. Introducción

El desarrollo de celdas de combustible, sensores y circuitos que emplean componentes electrónicos y moléculas biológicas es un área de investigación multidisciplinaria que ha progresado rápidamente en las últimas décadas (Willner, 2002; Rasmussen et al., 2016). Aunado a esto, la búsqueda de nuevas fuentes de energía que sean ambientalmente amigables ha incentivado la creación de nuevas tecnologías para la obtención de energía a partir de compuestos orgánicos como glucosa, fructosa, sacarosa, etanol, metanol, lactato, piruvato, glicerol, entre otros (Sokic-Lazic et al., 2010).

Una novedosa estrategia para la producción de energía mediante sistemas bioquímicos y que además es ambientalmente compatible son las celdas de combustible enzimáticas. En comparación con las celdas de combustible que comúnmente utilizan catalizadores inorgánicos, las celdas de combustible enzimáticas emplean enzimas para catalizar la oxidación o reducción de moléculas orgánicas cediendo los electrones involucrados en la reacción redox a un arreglo de celda de electroquímica (Figura 1).

1.1 Historia

La primera celda de combustible tiene su origen en 1839 y fue desarrollada por William Grove. Esta celda electroquímica empleaba H_2 como combustible y O_2 como aceptor final de electrones, transformando la energía de la reacción química en energía eléctrica por medio de electrodos de platino como catalizadores. La reacción química producida en este tipo de celda produce agua, calor y trabajo eléctrico como productos finales.

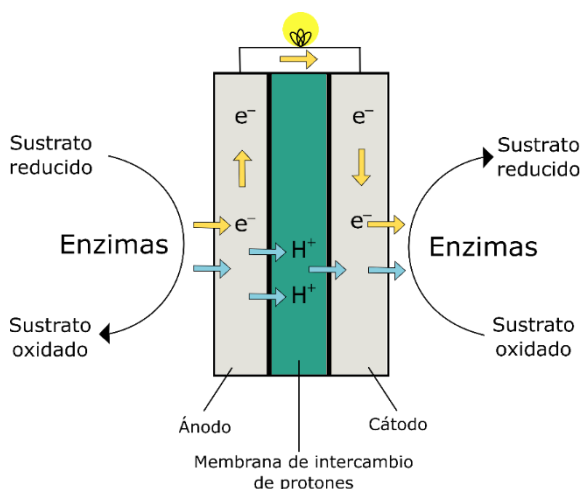


Figura 1. Esquema general de una celda de combustible enzimática.

Desde que Grove sentó las bases para el desarrollo de esta nueva tecnología de producción de energía eléctrica, por lo que fue nombrado el padre de las celdas de combustible, el número de prototipos y dispositivos comerciales basados en celdas de combustible ha crecido exponencialmente, incluyendo el aumento en su eficiencia y potencia en comparación con baterías secas y motores de combustión interna (Sharaf y Orhan, 2014). Tan solo entre los años 2008 y 2011 las ventas de celdas de combustible a nivel mundial aumentaron 248% y se estima que el mercado global de esta industria gane 19,200 millones de dólares para el 2020, siendo Estados Unidos, Japón, Alemania, Corea del Sur y Canadá los principales desarrolladores y comercializadores (Sharaf y Orhan, 2014).

Michael Potter y Barnett Cohen fueron los pioneros en el desarrollo de celdas de combustible que utilizan compuestos orgánicos para generar energía eléctrica. Ambos, en 1910 y 1931 respectivamente, fabricaron las primeras celdas de combustible microbianas, donde microorganismos se encargan de la oxidación de moléculas orgánicas y la liberación de los electrones resultantes al electrodo anódico. Este tipo de celdas de biocombustible emplean los componentes básicos de una celda de combustible, solo que en el caso de la cámara anódica, además de contener el electrodo anódico, contiene los microorganismos en crecimiento. En cambio, la cámara catódica alberga el electrodo catódico que suele ser un catalizador metálico, es por esto que las celdas de combustible microbianas son consideradas celdas de combustible híbridas. Las mayores potencias eléctricas generadas por celdas de combustible microbianas reportadas en la literatura hasta el momento han sido 760 y 6,000 mW/m^2 , en las que se empleó la bacteria *Escherichia coli* y lodos de aguas residuales como fuente de alimento (Schröder et al., 2003; Zhang et al., 2007), por lo cual se considera que este tipo de celdas son una buena opción para la generación de energía eléctrica barata.

Otro tipo de celda de biocombustible que ha sido estudiada desde hace 30 años son las celdas de combustible enzimáticas (Rasmussen et al., 2016). En comparación con las celdas de combustible químicas inorgánicas y microbianas, las celdas de combustible enzimáticas presentan grandes ventajas que las sitúan como excelentes candidatos en la búsqueda de generación de energía eléctrica limpia y barata con diferentes aplicaciones (Tabla 1).

La primera celda de combustible enzimática fue reportada en 1964, estaba compuesta por una cámara anódica que contenía a la enzima glucosa oxidasa y un electrodo catódico de platino (Yahiro et al., 1964). En la década de los sesentas la investigación en celdas de combustible enzimáticas centró su atención en la búsqueda de enzimas oxidoreductasas y moléculas con capacidad redox que funcionaran como mediadores entre las enzimas y los electrodos, a este sistema se le llamó transferencia

Tabla 1. Características de las celdas de combustible enzimáticas.

Componentes	Característica	Ventaja
Catalizadores	Enzimas	Especificidad de sustrato, bajo costo de producción y compatibilidad biológica.
Electrodos	Metales/Grafito/CNTs*	Bajo costo.
Fuentes de energía	Moléculas orgánicas	Fuentes de energía renovables, bajo costo y compatibilidad biológica.
Parámetros de eficiencia		
Transferencia de electrones	Alta	Mayor generación de energía eléctrica por cantidad de sustrato.
Tamaño de celdas	Pequeñas	Empleo en aplicaciones biomédicas.
Generación de compuestos tóxicos	Mínimos	Compatibilidad biológica y ambientalmente amigables.

*CNTs= Nanotubos de carbono.

mediada de electrones (Yahiro et al., 1964). En la siguiente década el desarrollo de electrodos cambió de enfoque teniendo mayor atención la transferencia directa de electrones (DET) donde no es necesario un mediador, esto simplificó el proceso de construcción de bioelectrodos enzimáticos y aumentó su eficiencia (Berezin et al., 1978).

Dentro de los múltiples trabajos publicados, han sido fabricadas tanto celdas de combustible enzimáticas híbridas que emplean preferentemente cátodos no enzimáticos, como también celdas completas que emplean enzimas inmovilizadas en los dos electrodos (Meredith y Minteer, 2012; Rasmussen et al., 2016).

La demanda por desarrollar mejores celdas de combustible enzimáticas se debe a su potencial aplicación como abastecedores de energía de dispositivos médicos no invasivos o implantables (Bandodkar y Wang, 2016). Ante la necesidad de generar fuentes de energía más eficientes, duraderas, ambientalmente amigables y biocompatibles, una alternativa atractiva es el diseño, desarrollo y evaluación de nuevas celdas de combustible enzimáticas para la obtención de energía de manera eficiente a partir de compuestos orgánicos.

1.2 Antecedentes

1.2.1 Bases teóricas de las celdas de combustible

Las celdas de combustible son un tipo de celda electroquímica galvánica o voltaica que requieren un continuo aporte de combustible para su funcionamiento. El trabajo útil de una celda electroquímica está definido por el cambio de energía libre (ΔG). Este depende, por un lado, de la energía total liberada por las reacciones de oxidorreducción separadas por los electrodos (ΔH), definida como la diferencia entre la entalpía de formación de los productos y la de los reactivos; por otro lado, ΔG también depende del cambio de entropía (ΔS) del sistema (i.e., calor irradiado). De esta manera, la energía libre se define por la ecuación

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S, \quad (1)$$

donde T es la temperatura del sistema (Luz et al. 2014).

El trabajo eléctrico máximo de una celda de combustible depende de su potencial máximo (E) y del número de cargas que pasan por la celda, por tanto, está definido por la ecuación

$$W_{ele} = -nFE, \quad (2)$$

donde F es la carga constante de un mol de electrones ($9.647 \times 10^4 \text{ C/mol de } e^-$), conocida como constante de Faraday y n es el número de moles de electrones involucrados en la reacción redox. Por definición, ΔG es el trabajo máximo, por tanto

$$\Delta G = -nFE, \quad (3)$$

que en condiciones estándar (1 M a 1 atm) sería

$$\Delta G^\circ = -nFE^\circ. \quad (4)$$

Como el cambio de la energía libre estándar es también representado como

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT(\ln Q), \quad (5)$$

donde R es la constante de los gases ideales, T es la temperatura absoluta y Q el cociente de reacción o constante de equilibrio, entonces

$$-nFE = -nFE^\circ + RT(\ln Q), \quad (6)$$

lo cual es igual a

$$E = E^\circ - (RT/nF)\ln Q, \quad (7)$$

conocida como ecuación de Nernst, con la que se puede calcular teóricamente el potencial de la celda de combustible (Chang, 2010). El potencial de la celda también puede ser calculado al medir la diferencia de potenciales de los dos electrodos incluyendo la resistencia de los materiales, la disminución de combustible y la energía de activación.

Experimentalmente, los potenciales de un electrodo se miden en relación a electrodos de referencia, los cuales mantienen un potencial constante. El electrodo de referencia por excelencia es el electrodo estándar de hidrógeno (SHE). Sin embargo, el electrodo calomel (SCE) y el electrodo Ag/AgCl (Ag/AgCl) son los electrodos de referencia mayormente empleados en sistemas bioelectroquímicos por su estabilidad en electrolitos compatibles con enzimas y moléculas orgánicas.

Las técnicas analíticas electroquímicas más usadas para la evaluación de electrodos y celdas de combustible son la voltametría cíclica, la cronoamperometría y las curvas de polarización.

La voltametría cíclica es una técnica que consiste en la variación de potencial sobre un electrodo obteniendo una corriente asociada a cada potencial evaluado, lo que nos permite identificar el potencial de oxidación y reducción de electrodos, moléculas unidas a él y moléculas en solución. Al evaluar enzimas, esta técnica nos muestra los potenciales de los componentes redox de oxidoreductasas y de su proceso catalítico. Estos datos son de gran utilidad al momento de fijar un potencial y evaluar la corriente asociada a diferentes concentraciones del sustrato de las enzimas. Los sensores amperométricos enzimáticos como los de glucosa, alcohol y lactato se basan en este principio (Das y Goswami, 2013; Şenel et al., 2013; Wang et al., 2016).

Las características más relevantes de una celda de combustible son el potencial, densidad de corriente máxima, densidad de potencia máxima y estabilidad operacional. El potencial máximo de una celda de combustible se conoce al evaluar el voltaje a circuito abierto (OCV), de esta manera no hay corriente por lo que no hay disminución en el voltaje. La polarización de los electrodos es la técnica más común para conocer la potencia máxima, esta consiste en evaluar los electrodos por medio de voltametrías lineales partiendo del OCV hasta corto circuito a velocidades menores a 1 mV/s. Otra forma de obtener este parámetro es por medio de la variación de la resistencia a partir del OCV. Por último, la evaluación de la estabilidad de la celda se realiza por medio de cronoamperometría y cronopotenciometría que permiten evaluar la evolución de la corriente y el potencial, respectivamente, con respecto al tiempo.

1.2.2 Celdas de combustible enzimáticas

El uso de enzimas oxidoreductasas como catalizadores en celdas de combustible tuvo origen en los años sesentas. La celda de combustible enzimática que fabricó Yahiro utilizaba placas de platino como electrodos, la cámara anódica contenía la enzima glucosa oxidasa dependiente de adenina dinucleótido de flavina (FAD) y un componente férrico como agente de transferencia de electrones, en cambio la cámara catódica contenía solo el electrodo de platino que se encargaba de la reducción de O₂

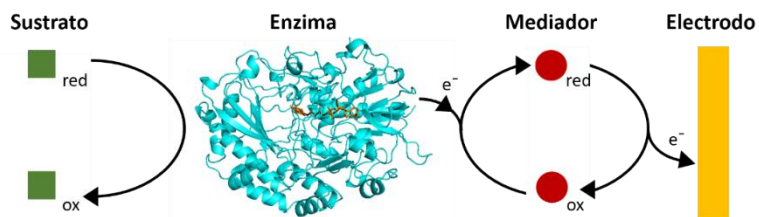


Figura 2. Esquema general de la transferencia mediada de electrones.

(Yahiro et al., 1964). La celda de Yahiro logró alcanzar un voltaje de 0.75 V y una densidad de corriente de $18 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, demostrando que las enzimas pueden ser utilizadas en celdas de combustible híbridas empleando un mediador para el transporte de electrones.

Con este descubrimiento, el desarrollo de bioelectrodos, biosensores y celdas de combustible enzimáticas con transferencia mediada de electrones comenzó a progresar (Figura 2). El uso de compuestos férricos, quinonas y osmio asociados a polímeros conductores ayudó a aumentar la eficiencia de la transferencia de electrones entre las enzimas y los electrodos (Meredith y Minteer, 2012). Se han fabricado celdas de combustible enzimáticas compuestas por electrodos anódicos recubiertos con polímeros asociados a osmio y glucosa oxidasa que alcanzan una densidad de potencia de hasta $400 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ a un voltaje de 0.88 V (Soukharev et al., 2004). De igual manera, con polímeros asociados a ferroceno y glucosa oxidasa, se han fabricado electrodos que generan una densidad de corriente de $2 \text{mA}/\text{cm}^2$ y una densidad de potencia máxima de $146 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ a un voltaje de 0.16 V al acoplarse a una celda (Meredith et al., 2011). Los electrodos catódicos utilizados en celdas de combustible enzimáticas completas utilizan comúnmente a las enzimas lacasa y bilirrubina oxidasa. En la Tabla 2 se enlistan las enzimas más comunes usadas para la fabricación de bioelectrodos enzimáticos.

Tabla 2. Enzimas comúnmente utilizadas en la fabricación de electrodos enzimáticos.

Ánodo		
Enzimas	Cofactor	Sustrato
Glucosa oxidasa	FAD	Glucosa
Glucosa deshidrogenasa	NAD/NADP	Glucosa
Glucosa deshidrogenasa	PQQ	Glucosa
Alcohol oxidasa	FAD	Alcoholes de cadena corta
Colesterol oxidasa	FAD	Colesterol
Lactato deshidrogenasa	NAD	Lactato
Cátodo		
Enzimas	Actividad redox/sitio redox	Sustrato
Lacasa	Dependiente de cobre	O_2
Bilirrubina oxidasa	Dependiente de cobre	O_2

1.2.3 Transferencia directa de electrones

Desde inicio de los setentas se tiene registro de la fabricación de electrodos enzimáticos que no requieren de mediadores, demostrando que algunas enzimas pueden transferir directamente los electrones a los electrodos. Este enfoque de diseño de electrodos enzimáticos resulta de gran interés ya que el proceso de fabricación se simplifica y el sistema electroquímico emplea menos componentes redox. Existen diversas estrategias para la construcción de electrodos enzimáticos que propician la DET, de las cuales destacan las siguientes (Figura 3):

1. Confinamiento de las enzimas en electrodos por medio de tintas conductoras, grafito o nanotubos de carbono.
2. Unión covalente aleatoria de las enzimas con la superficie del electrodo.
3. Unión covalente orientada de las enzimas con la superficie del electrodo.

La mayor densidad de potencia reportada para una celda construida con electrodos fabricados siguiendo la primera estrategia ha sido 1.3 mW/cm^2 a un voltaje de 0.6 V , la cual tuvo un tiempo de vida de 30 días manteniendo la misma potencia en condiciones fisiológicas humanas (Zebda et al., 2011). Esta celda se componía por pastillas generadas por compresión mecánica de una mezcla de nanotubos de carbono multipared con glucosa oxidasa y lacasa como electrodos anódico y catódico, respectivamente. Además, los electrodos fueron cubiertos con gel de agarosa para evitar la pérdida de enzimas por difusión. A pesar de utilizar una técnica de fabricación de bioelectrodos sumamente sencilla, este trabajo presenta uno de los mejores resultados reportados hasta el momento, probando que este método es una opción viable para la construcción de celdas de combustible enzimáticas que puedan abastecer de energía a

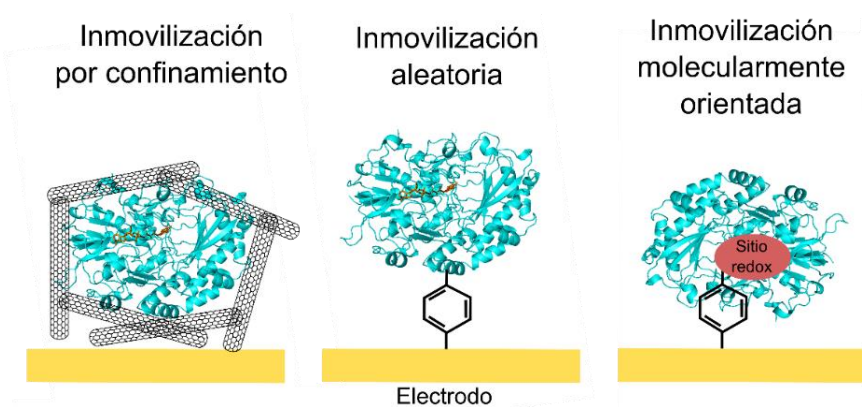


Figura 3. Estrategias de inmovilización de enzimas para favorecer la DET.

componentes electrónicos pequeños con aplicación médica, ya que han sido evaluados prototipos implantados en ratones mostrando resultados similares a los prototipos evaluados *in vitro* (Cinquin et al., 2010; Zebda et al., 2013) (Tabla 3).

La segunda estrategia con la que se puede obtener DET es la unión de las enzimas a los electrodos de manera aleatoria. En esta estrategia se utilizan moléculas conductoras que funcionen como cables moleculares y que contengan grupos reactivos adecuados para su unión a la superficie de los electrodos y a las enzimas, como moléculas fenólicas con grupos sulfhidrilo, carboxilo, amino, nitro, metilo, etc. Utilizando esta estrategia, Chen y colaboradores (2015) fabricaron una celda de combustible enzimática que generó 1.9 mW/cm^2 a un voltaje de 1.16 V . Cabe resaltar que este ha sido el mejor resultado reportado en la literatura hasta el momento. Esta celda constaba de electrodos de oro recubierto por una capa de grafeno funcionalizado con nanopartículas de oro a su vez funcionalizadas con grupos carboxilo, los cuales son excelentes blancos para la unión covalente. Las enzimas unidas a los electrodos anódico y catódico fueron la glucosa oxidasa y lacasa, respectivamente, por medio de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida hidroclicorado (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) con los que se forma un enlace amida con grupos carboxilo y grupos amino primarios (Fischer, 2010).

Sin embargo, otros reportes de celdas de combustible que emplean la inmovilización aleatoria de enzimas, a diferencia de lo reportado por Chen, no rebasan los $100 \text{ } \mu\text{W/cm}^2$ (Castorena-Gonzalez et al., 2013; Güven et al., 2016; MacVittie et al., 2015; Slaughter y Tanmay, 2015; Wang et al., 2016).

Actualmente, la principal estrategia para optimizar la DET es el diseño racional de la unión entre la superficie del electrodo y el sitio redox de la enzima (Vazquez-Duhalt et al., 2014). Un claro ejemplo es la inmovilización molecularmente orientada de las enzimas sobre los electrodos. La glucosa oxidasa dependiente del cofactor FAD y la glucosa deshidrogenasa dependiente del cofactor quinona pirroloquinolina (PQQ) son las principales enzimas utilizadas para explorar esta estrategia, esto porque los cofactores redox que las componen pueden ser extraídos de la proteína y unidos fácilmente a electrodos.

El grupo de Itamar Willner es el pionero en la fabricación de electrodos con enzimas orientadas. Desarrollaron un método exitoso basado en la generación y reconstitución de apoenzimas sobre electrodos empleando los cofactores (Willner et al., 2009). Particularmente, la glucosa oxidasa es inmovilizada por su cofactor FAD, necesario para el proceso de oxidación de la glucosa. La estrategia que mejores resultados ha tenido es la desflavinación de la enzima, la unión de FAD al electrodo y la posterior

Tabla 3. Celdas de biocombustible reportadas que utilizan electrodos con enzimas inmovilizadas por confinamiento.

Ánodo	Cátodo	Combustible/ Aceptor de electrones	Densidad de potencia máxima	Tiempo de vida	Referencia
Glucosa oxidasa comprimida en una pastilla de nanotubos de carbono multipared (Catalasa para la degradación de H ₂ O ₂).	Lacasa comprimida en una pastilla de nanotubos de carbono multipared.	Glucosa/O ₂ .	1.3 mW/cm ² a 0.6 V.	30 días.	(Zebda et al., 2011).
Fructosa deshidrogenasa absorbida en electrodos de carbón impregnados con partículas de negro carbón.	Lacasa absorbida en electrodos de carbón impregnados con partículas de negro carbón.	Fructosa/O ₂ .	850 μW/cm ² a 0.41 V.	60 días.	(Kamitaka et al., 2007).
Glucosa oxidasa comprimida en una pastilla de grafito y ferroceno.	Lacasa comprimida en una pastilla de grafito y ferroceno.	Glucosa/O ₂ .	207 μW/cm ² a 0.18 V.	30 días.	(Zebda et al., 2012).
Glucosa oxidasa comprimida en una pastilla de nanotubos de carbono multipared (Catalasa para la degradación de H ₂ O ₂).	Lacasa comprimida en una pastilla de nanotubos de carbono multipared.	Glucosa/ O ₂ . <i>Celda implantada.</i>	193 μW/cm ² (se desconoce el potencial).	9 días.	(Zebda et al., 2013).
Glucosa oxidasa comprimida en una pastilla de nanotubos de carbono multipared y naftoquinona (Catalasa para la degradación de H ₂ O ₂).	Lacasa comprimida en una pastilla de nanotubos de carbono multipared y naftoquinona.	Glucosa/O ₂ .	160 μW/cm ² a 0.43 V.	11 meses.	(Reuillard et al., 2015).
Glucosa oxidasa comprimida en una pastilla de grafito (Catalasa para la degradación de H ₂ O ₂).	Lacasa comprimida en una pastilla de grafito.	Glucosa/O ₂ . <i>Celda implantada</i>	24.4 μW/cm ² a 0.13 V.	40 días.	(Cinquin et al., 2010).

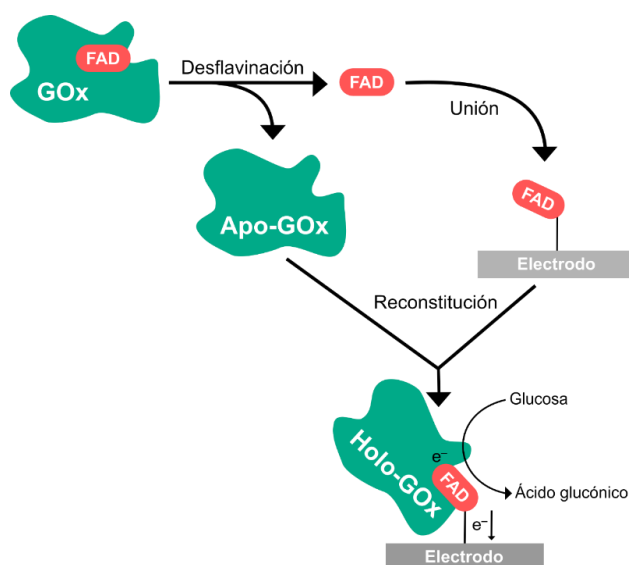


Figura 4. Proceso de desflavinación y reconstitución de glucosa oxidasa sobre electrodos.

reconstitución de la apoenzima (Heller, 2003; Zayats et al., 2008; Fruk et al., 2009; Slaughter y Tanmay, 2015) (Figura 4).

Por otro lado, la glucosa deshidrogenasa es inmovilizada uniendo su cofactor PQQ sobre electrodos de oro por medio de nanopartículas de oro funcionalizadas con grupos amino. Los electrodos anódicos contruidos con este método han generado la mayor densidad de corriente reportada en la literatura para electrodos con enzimas inmovilizadas orientadamente (Zayats et al., 2005).

En electrodos catódicos la lacasa es la principal enzima utilizada ya que cuenta con un sitio redox dependiente de cobre denominado T1, que se encuentra más expuesto en la superficie de la enzima en comparación con los sitios T2 y T3. Se ha reportado que esta enzima puede orientarse molecularmente por el sitio T1 utilizando la molécula ácido 4-[2-aminoetil] benzoico por presentar una estructura similar a los sustratos fenólicos naturales de la enzima (Martinez-Ortiz et al., 2011; Arrocha et al., 2014). Los electrodos fabricados utilizando este método se han usado en celdas de combustible híbridas (ánodo-cinc y cátodo-lacasa molecularmente orientada) que han generado una potencia de 1.19 mW/cm^2 a un voltaje de 0.4 V, situándolas entre las mejores celdas de combustible enzimáticas reportadas (Martinez-Ortiz et al., 2011). Este tipo de celdas suelen presentar resultados superiores a las celdas completas por estar constituidas por un electrodo inorgánico que generalmente es muy estable, por tanto, el electrodo enzimático resulta ser la mayor limitante en la estabilidad. Sin embargo, este tipo de celdas presentan una notoria desventaja, la pasivación de los electrodos metálicos donde la superficie externa del metal es

cubierta con una capa relativamente inerte que interfiere con la interacción del electrolito con electrodo evitando que se produzcan las reacciones redox.

La solución de este problema es la construcción de celdas enzimáticas completas. En este sentido, Arrocha y colaboradores en 2014 fabricaron una celda enzimática completa compuesta por el electrodo reportado por Martínez-Ortiz y colaboradores y un electrodo anódico de alcohol oxidasa. El electrodo anódico estaba compuesto de grafito y C-MWCNT con la enzima alcohol oxidasa inmovilizada sobre ellos por medio de la 4-azidoanilina, la cual tiene afinidad por el sitio activo de la enzima. La celda construida generó $60 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ a un potencial de 0.2 V en presencia de metanol como combustible y O_2 como aceptor final de electrones. En la Tabla 4 se enlistan los reportes más relevantes de celdas de combustible enzimáticas que utilizan electrodos con enzimas orientadas que muestran DET.

Otro ejemplo importante a mencionar es la celda reportada por Yan y colaboradores en 2007, quienes fabricaron un electrodo anódico compuesto por la enzima alcohol deshidrogenasa dependiente de adenina dinucleótido de nicotinamida (NAD). Cabe señalar que el cofactor NAD no está unido al interior de la enzima, como sucede con la glucosa oxidasa y FAD. NAD solo presenta afinidad por la alcohol deshidrogenasa cuando se encuentra en su estado oxidado. Yan y colaboradores unieron NAD a la superficie de un electrodo de oro, posteriormente adicionaron la alcohol deshidrogenasa (sin su cofactor), por afinidad química la enzima incorporó NAD en su sitio activo formando una holo-enzima y posteriormente se empleó glutaraldehído como entrecruzante para evitar la pérdida del complejo alcohol deshidrogenasa-NAD al reducirse el cofactor (NADH). La celda construida con este electrodo empleó un electrodo catódico de carbón vítreo funcionalizado con SWCNT donde fue adsorbida la enzima bilirrubina oxidasa y estabilizada con albúmina de suero bovino (BSA) y glutaraldehído. La celda presentó un OCV de $\approx 0.5 \text{ V}$ y generó $48 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ de potencia (Figura 5).

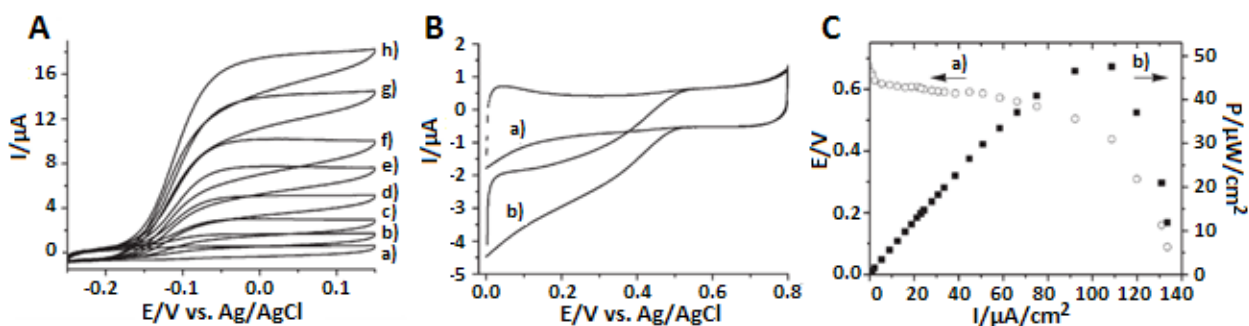


Figura 5. A) Ciclovoltagramas del ánodo-alcohol deshidrogenasa en presencia de a) 0, b) 2, c) 5, d) 8, e) 15, f) 25, g) 40, h) 60 mM de etanol. $v = 5 \text{ mV}/\text{s}$. B) Ciclovoltagramas del cátodo-bilirrubina oxidasa con N_2 (a) y O_2 (b). $v = 10 \text{ mV}/\text{s}$. C) Curva de polarización (a) y dependencia corriente-potencia (b) en presencia de 60 mM de etanol. Modificado de Yan et al., 2017.

Tabla 4. Celdas de combustible construidas con electrodos enzimáticos que presentan DET.

Ánodo	Cátodo	Combustible/ Aceptor de electrones	Densidad de potencia máxima	Referencia
Placa de cinc de 25 cm ² (celda híbrida).	Lacasa unida a tela de grafito por medio de conector 4-[2-aminoetil] benzoico.	Oxidación de cinc/O ₂ .	1.19 mW/cm ² a 0.6 V.	(Martinez-Ortiz et al., 2011)
Alcohol oxidasa (dependiente de FAD) unida a C-MWCNT por medio de la molécula 4-azidoanilina, incluyendo una porción de Nafion® integrada por adsorción.	Lacasa unida a tela de grafito por medio de conector 4-[2-aminoetil] benzoico.	Metanol/O ₂ .	60 μW/cm ² a 0.2 V.	(Arrocha et al., 2014).
Alcohol deshidrogenasa (dependiente de NAD) unida a un electrodo de oro por su cofactor NAD y estabilizada glutaraldehído para mantener la Holo-ADH.	Bilirrubina oxidasa adsorbida en un electrodo de carbón vítreo con un depósito de SWCNT y estabilizada BSA y glutaraldehído.	Etanol/O ₂	48 μW/cm ² (se desconoce el potencial).	(Yan et al., 2007)
Glucosa deshidrogenasa (dependiente de PQQ) unida aleatoriamente a hojas de buckypaper por medio de la molécula ácido 1-pirenobutírico éster de N-hidroxisuccinimida.	Lacasa unida aleatoriamente a hojas de buckypaper por medio de la molécula ácido 1-pirenobutírico éster de N-hidroxisuccinimida.	Glucosa/O ₂ . <i>Celda implantada.</i>	40 μW/cm ² (se desconoce el potencial).	(Szczupak et al., 2012)
Glucosa deshidrogenasa (dependiente de FAD) unida por electropolimerización sobre electrodos de oro funcionalizados con 4-aminotiofenol.	Bilirrubina oxidasa adsorbida en un electrodo de carbón vítreo con un depósito de CNT y estabilizada con bis(sulfosuccinimidil) suberato.	Glucosa/ O ₂ .	32 μW/cm ² (se desconoce el potencial).	(Yehezkeili et al., 2011).
Glucosa deshidrogenasa (dependiente de PQQ) unida aleatoriamente a hojas de buckypaper por medio de la molécula ácido 1-pirenobutírico éster de N-hidroxisuccinimida.	Lacasa unida aleatoriamente a hojas de buckypaper por medio de la molécula ácido 1-pirenobutírico éster de N-hidroxisuccinimida.	Glucosa/O ₂ . <i>Celda implantada</i>	30 μW/cm ² (se desconoce el potencial).	(Halámková et al., 2012)

En 2012, el grupo del Dr. Evgeny Katz publicó dos trabajos que reportaban la construcción de celdas de combustible enzimáticas implantadas. Los electrodos eran láminas de “buckypaper”, el cual es una especie de hoja plana compuesta de fibras de nanotubos de carbono que proveen alta conductividad y resistencia mecánica. Las láminas de buckypaper pueden ser cortadas fácilmente con tijeras y además son flexibles, lo que las hacen sumamente versátiles para su uso en dispositivos como electrodos implantables en organismos. Como molécula conectora utilizaron al 1-pirenobutírico éster de N-hidroxisuccinimida que se une a los nanotubos de carbono por interacciones π - π con los cuatro anillos aromáticos que posee, quedando libre el grupo éster de N-hidroxisuccinimida que se puede unir a enzimas aleatoriamente.

Con este arreglo, lograron unir tanto la glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ en el ánodo como la lacasa en el cátodo. La relevancia de este trabajo se debe a que, a pesar de unir aleatoriamente las enzimas, los potenciales a los que los electrodos respondieron en presencia de sus sustratos corresponden a los potenciales en los cuales las enzimas realizan su catálisis demostrando claramente la transferencia de electrones desde el sitio redox (Figura 6). El electrodo anódico-glucosa deshidrogenasa respondió a ≈ -0.1 V (vs Ag/AgCl), que es el potencial formal de reducción ($E^{\circ'}$ a pH 7) de su cofactor PQQ (Figura 6A). El cátodo-lacasa presentó el mismo comportamiento, en presencia de O_2 mostró un aumento inicial de corriente a un potencial de ≈ 0.57 V, que es el $E^{\circ'}$ del sitio T1 de la lacasa del hongo *Trametes versicolor* (Figura 6B).

Estos electrodos fueron implantados exitosamente en almejas y caracoles aprovechando que sus sistema circulatorio es abierto y la hemolinfa contiene una concentración satisfactoria de glucosa y O_2 para el funcionamiento de la celda enzimática (Halámková et al., 2012; Szczupak et al., 2012).

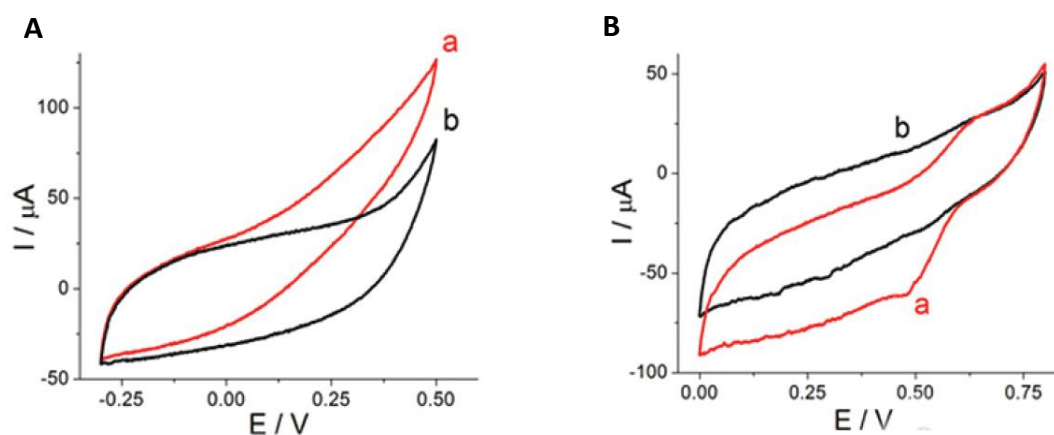


Figura 6. Ciclovoltagramas del ánodo-glucosa deshidrogenasa con 20 mM de glucosa (a) y sin glucosa (b). B) Ciclovoltagramas del cátodo-lacasa con O_2 (a) y N_2 (b) (ambos $v=1$ mV/s). Modificado de Halámková et al., 2012.

Un ejemplo similar fue reportado por Yehezkeli y colaboradores en 2011, quienes emplearon un método de unión aleatoria de la glucosa deshidrogenasa dependiente de FAD (no dependiente de O_2) por medio electropolimerización. Esto lo lograron a través de la modificación de los tres componentes que conformaban el electrodo anódico: el electrodo de oro, nanopartículas de oro y la enzima glucosa deshidrogenasa. Tanto el electrodo de oro como la enzima fueron funcionalizadas superficialmente con 4-aminotiofenol, adicionalmente las nanopartículas de oro fueron funcionalizadas con ácido 2-mercaptoetanosulfónico. Al someter todos los componentes a un proceso de polimerización electroquímica por medio de voltametrías cíclicas (número de ciclos desconocido, rango: -0.1 a 1.1 V vs SCE, $v= 0.1$ mV/s) lograron la unión de la enzima a la superficie del electrodo, que mostró un aumento de corriente un potencial inicial de ≈ -0.3 V (vs SCE) en presencia de glucosa.

Este trabajo mostró uno de los potenciales de respuesta más cercanos al E° de FAD (-0.45 V vs Ag/AgCl), sin embargo, la respuesta máxima era cercana a 0.3 V (vs SCE). Al utilizarse este electrodo en una celda de combustible complementada con un cátodo compuesto por bilirrubina oxidasa adsorbida en un electrodo de carbón vítreo funcionalizado con SWCNT, la celda presentó un OCV de ≈ 0.6 V y generó $32 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ de densidad de potencia. No obstante, este resultado lo alcanzaron utilizando una concentración de 200 mM de glucosa en el electrolito (Yehezkeli et al., 2011) (Figura 7).

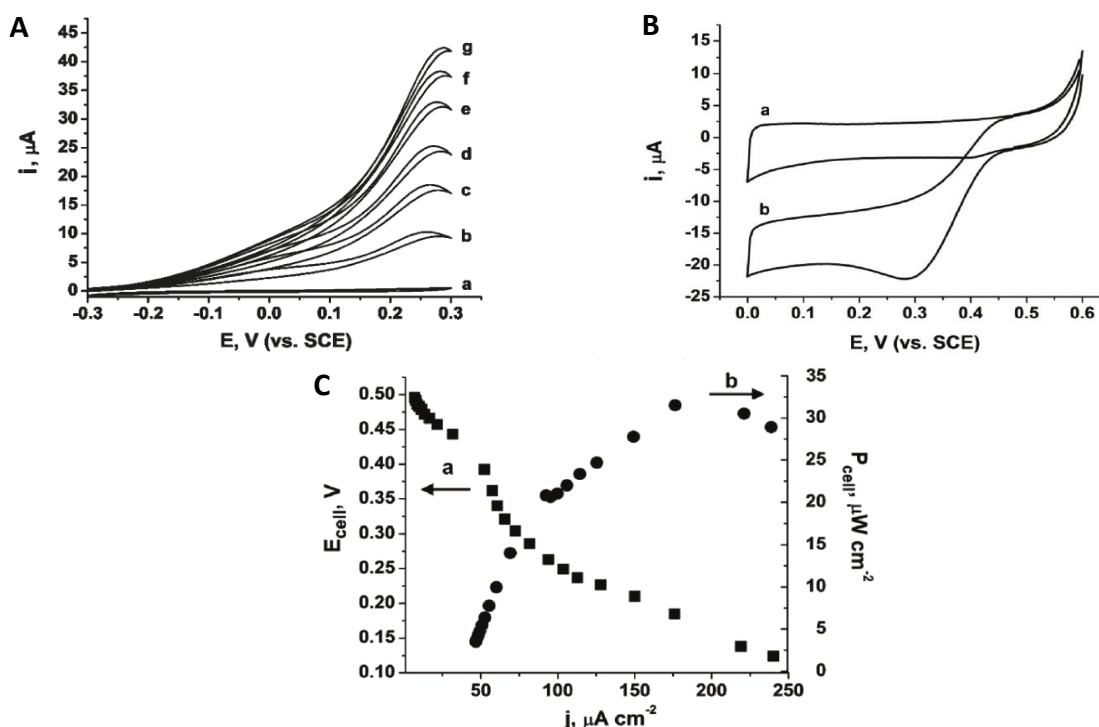


Figura 7. A) Ciclovoltagramas del ánodo-glucosa deshidrogenasa en presencia de a) 0, b) 60, c) 100, d) 140, e) 180, f) 220, g) 260 mM de glucosa. B) Voltametría cíclica del cátodo-bilirrubina oxidasa con N_2 (a) y O_2 (b). C) Curva de polarización (a) y dependencia corriente-potencia (b) en presencia de 200 mM de glucosa. Modificado de Yehezkeli et al., 2011.

1.2.4 Glucosa oxidasa

La glucosa oxidasa (del hongo filamentoso *Aspergillus niger*) es una glicoproteína oxidoreductasa conformada por un homodímero con un peso de 80 kDa cada subunidad (Frederick et al. 1990). Su función es catalizar la oxidación de glucosa a δ -gluconolactona a través de la reducción de O_2 para formar H_2O_2 , la transformación de la δ -gluconolactona a ácido glucónico (producto final) se produce por medio de una hidrólisis espontánea.

La reacción redox llevada a cabo por la glucosa oxidasa depende de su cofactor FAD, formado por una unidad de riboflavina unida a un pirofosfato, que a su vez está unida a una molécula de ribosa y esta a una molécula de adenina. Es por esto que la glucosa oxidasa se encuentra clasificada dentro del grupo de las flavoproteínas (Figura 8). Cada subunidad de la glucosa oxidasa cuenta con una molécula de FAD unida por interacción de cargas. A pesar de que la glucosa es el principal sustrato de esta enzima, se ha reportado que puede catalizar la oxidación de gliceraldehído y dihidroxiacetona, los cuales actúan como análogos de la glucosa (Chan y Bruice, 1977). La reacción de reducción la glucosa oxidasa no solo puede utilizar O_2 como aceptor final de electrones, se ha demostrado que la 1,4-benzoquinona, metil-1,4-benzoquinona, 1,2-naftoquinona, 1,2-naftoquinona-4-ácido sulfónico, fenazina metosulfato, ferricianuro de potasio y el 2,6-dicloroindofenol funcionan de igual manera como sustratos (Wohlfahrt et al., 2004).

Dentro del complejo que rodea FAD en la enzima (19 Å al interior), se encuentran los residuos de aminoácidos E412, H516 y H559, incluyendo una molécula de H_2O , que forman puentes de hidrógeno con el N1 de la isoaloxazina de FAD (Figura 9A). Estos resultados obtenidos por medio de cristalografía proponen que se pierde la molécula de H_2O cuando la glucosa entra en contacto con el sitio activo,

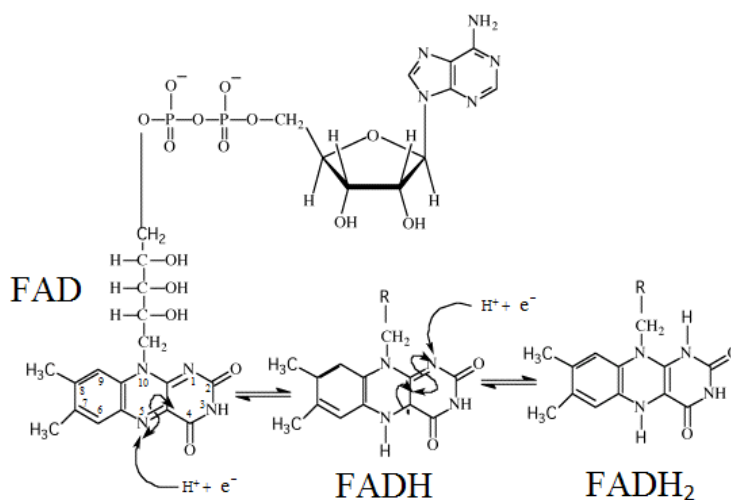


Figura 8. Estructuras de FAD en sus diferentes estados de oxidación.

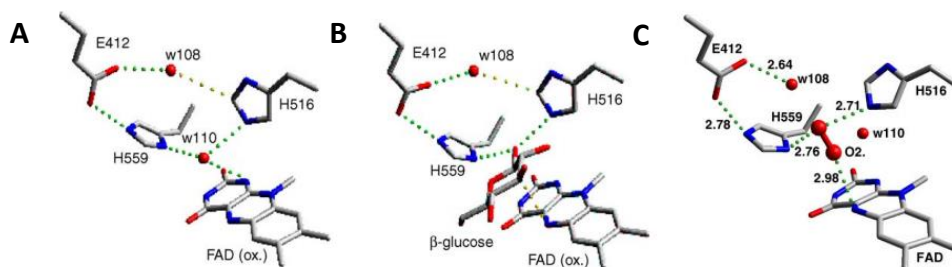


Figura 9. Región de la isoaloxazina de FAD en presencia de H₂O (A), glucosa (B) y O₂ (C). Modificado de Leskovac et al., 2005.

reajustando los puentes de hidrógeno. Aquí el N5 de la isoaloxazina funciona como centro catalítico para la remoción de un grupo hidruro proveniente del grupo hidroxilo del C1 de la glucosa (Figura 9B), después el N1 de la isoaloxazina se carga negativamente. FADH⁻ posteriormente es oxidado por el O₂ formando H₂O₂ en un proceso de dos etapas (Figura 9C) (Leskovac et al., 2005).

Al ser la glucosa una de las moléculas orgánicas más comunes utilizadas por los seres vivos como fuente de energía, la glucosa oxidasa ha sido blanco de estudio para aplicaciones bioelectroquímicas. Desde los años sesentas se ha utilizado la glucosa oxidasa en sistemas electroquímicos como catalizador bioquímico en ánodos donde el combustible sea su sustrato, la glucosa. Bajo este concepto se han fabricado una gran cantidad de electrodos enzimáticos (Rasmussen et al., 2016). Sin embargo, la mayoría de estos han sido electrodos que emplean mediadores como elemento de transporte de electrones entre las enzimas y los electrodos, ya que ha resultado complicada la conexión apropiada del sitio redox de la enzima (FAD) con el electrodo para propiciar la DET.

El método de unión racional de la glucosa oxidasa que mejores resultados ha mostrado es la unión de la enzima por su cofactor FAD. Esto ha sido posible por la capacidad de desflavinación de la glucosa oxidasa por medio de soluciones desnaturizantes que permiten la flexibilización de la estructura de la enzima liberando así el cofactor FAD generando una apo-enzima. De esta manera el grupo de Itamar Willner fue capaz de fabricar un electrodo enzimático novedoso donde la glucosa oxidasa fue reconstituida con FAD modificado con una molécula de ferroceno. Al reconstituir la holo-enzima con este cofactor modificado, el grupo ferroceno, el cual no quedaba embebido en la proteína, servía como mediador de los electrones entre la enzima en solución y un electrodo de oro (Riklin et al., 1995). Este fue el primer trabajo que demostró que FAD puede ser utilizado como blanco para la unión racional de la glucosa oxidasa.

FAD cuenta con dos grupos reactivos en su estructura que se han utilizado para establecer su unión con electrodos. El primero es el grupo amino primario del C6 de la adenina y el segundo son los grupos hidroxilo

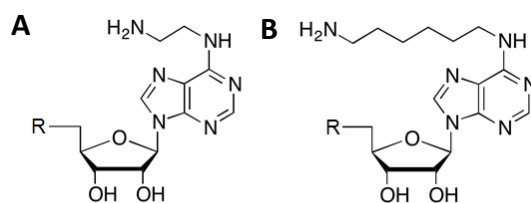


Figura 10. A) N6-(2-Aminoetil)-FAD. B) N6-(6-Aminohexil)-FAD.

del C2 y C3 de la ribosa. Algo importante a mencionar es que los electrodos fabricados por reconstitución de apo-glucosa oxidasa sobre FAD unido a electrodos por el grupo amino no han empleado FAD nativo, en cambio han utilizado variantes de FAD que presentan un grupo amino extra que se prolonga de dos o seis carbonos en una cadena alifática a partir del residuo amino del C6 de la ribosa (Figura 10).

Con estas variantes de FAD-NH₂ se han fabricado electrodos anódicos con glucosa oxidasa y rotaxano como mediador redox que funciona como un sistema de transferencia de 2 electrones, mostrando una tasa de transferencia de electrones de 400 s⁻¹ (Katz et al., 2004). También se han reportado electrodos sin mediadores donde los intermediarios con lo que se une FAD al electrodo son nanopartículas de oro. Estos electrodos mostraron una densidad de corriente de hasta 460 μA/cm² con una tasa de transferencia de electrones ≈ 5000 s⁻¹, teniendo respuestas amperométricas a partir de ≈ 0.25 V (vs SCE). Sin embargo, la mayor corriente asociada a la concentración de glucosa fue obtenida a 0.6 V (vs SCE) (Figura 11) (Xiao et al., 2003). Incluso han sido fabricados electrodos con interruptor de electrones utilizando la molécula 1,2-bis[2-metil-5-(4-piridina)-3-tienil] ciclopentano N,N'-ácido diacético como conector intermedio entre el electrodo y el FAD-NH₂, el cual pierde su conductividad al modificar su estructura en presencia o ausencia de luz con longitud de onda >530 nm. Este electrodo mostró una respuesta amperométrica a valores mayores de -0.3 V (vs SCE) siendo 0.2 V (vs SCE) en donde obtuvo la mayor corriente en presencia de glucosa (Yehezkeli et al., 2010).

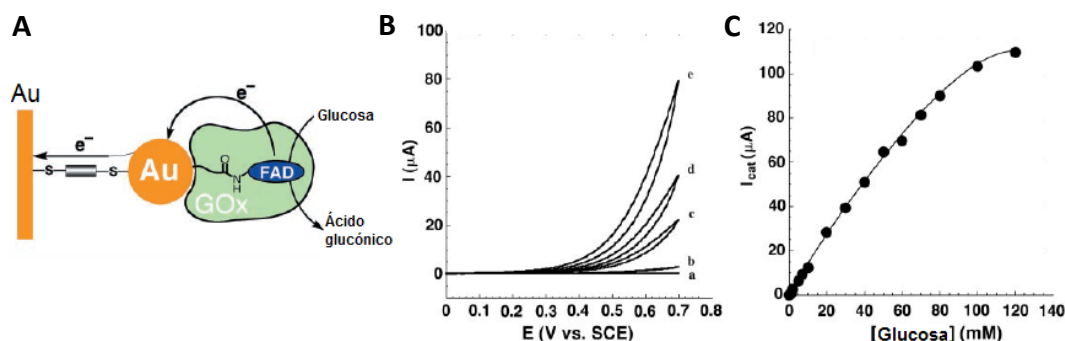


Figura 11. A) Esquema de los componentes del electrodo anódico. B) Ciclovoltagramas del electrodo en presencia de a) 0, b) 1, c) 10, d) 20 y e) 50 mM de glucosa ($v = 5$ mV/s). C) Relación corriente-concentración de glucosa ($E^\circ = 0.6$ V vs SCE). Modificado de Xiao et al., 2003.

La reconstitución de apo-glucosa oxidasa sobre electrodos con FAD inmovilizado por los grupos hidroxilo de la ribosa sí ha empleado FAD nativo, el método más exitoso para la unión de FAD es por medio de un intermediario con un grupo borónico como el ácido 3-aminofenilborónico. De esta manera se han logrado construir electrodos anódicos por polimerización superficial del ácido borónico, unión de FAD y por último la reconstitución de la apo-glucosa oxidasa, los cuales funcionan como sensores amperométrico a un potencial de 0.5 V (vs Ag/AgCl) y una sensibilidad de 5.94 $\mu\text{A}/\text{mM}$ (Şenel et al., 2013). El mejor electrodo construido empleando esta metodología utilizó como intermediario entre el ácido 3-aminofenilborónico y el FAD a la molécula PQQ (cofactor de oxidoreductasas), de esta manera se promovió la transferencia de 2 electrones como naturalmente se comporta FAD. Este electrodo logró generar una densidad de corriente de 140 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ con una tasa de transferencia de electrones de 700 s^{-1} , observándose respuesta en presencia de glucosa a un potencial de -0.2 V (vs SCE), mientras el potencial ideal para el análisis de la relación respuesta amperométrica-concentración de glucosa fue alcanzado a 0.2 V (vs SCE) (Zayats et al., 2002) (Figura 12).

Estos electrodos anódicos construidos empleando a la glucosa oxidasa resultan una buena opción para ser utilizados como sensores amperométricos de glucosa, ya que presentan una alta sensibilidad y excelente respuesta, sin embargo, los potenciales a los que operan tienden a ser lejanos a los potenciales de FAD, incluso cercanos a los potenciales de los cátodos, por tanto cuando son utilizados en celdas de combustible enzimáticas completas el OCV suele ser bajo, lo que conlleva a una producción de potencia baja.

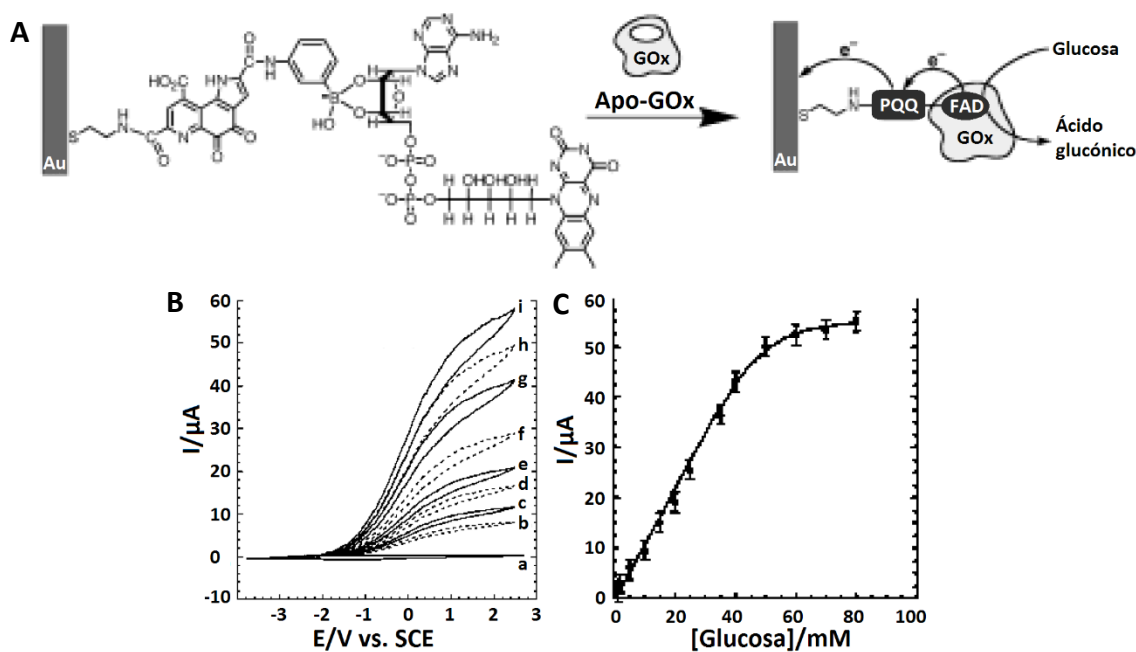


Figura 12. A) Esquema de los componentes del electrodo anódico. B) Ciclovoltagramas del electrodo en presencia de a) 0, b) 5, c) 10, d) 15, e) 20, f) 25, g) 35, h) 40, e i) 50 mM de glucosa ($v = 5 \text{ mV/s}$). C) Relación corriente-concentración de glucosa ($E = 0.2 \text{ V vs SCE}$). Modificado de Zayats et al., 2002.

1.2.5 Glucosa deshidrogenasa

La glucosa deshidrogenasa soluble (de la bacteria *Acinetobacter calcoaceticus*) es una proteína oxidoreductasa conformada por un homodímero de un peso de 50 kDa cada subunidad (Cleton-Jansen et al., 1989). Esta enzima cataliza la oxidación de glucosa formando δ -gluconolactona, la cual espontáneamente se hidroliza formando ácido glucónico, la glucosa deshidrogenasa regresa a su estado nativo transfiriendo los electrones a diversos aceptores de electrones, sin embargo, su aceptor final natural aún es incierto.

En *A. calcoaceticus*, existen dos versiones de esta enzima, la glucosa deshidrogenasa soluble codificada por el gen *gdhB* y la glucosa deshidrogenasa unida a membrana codificada por el gen *gdhA*. La glucosa deshidrogenasa unida a membrana tiene como aceptor final de electrones la coenzima Q, no obstante, no se sabe cuál es la función fisiológica de la glucosa deshidrogenasa soluble al igual que su aceptor final de electrones. Se ha comprobado que tiene la capacidad de transferir electrones a una gran variedad de moléculas como el N,N,N',N'-tetrametil bifenilendiamina (azul de Werster), con el que se puede medir la actividad de la enzima por métodos espectrofotométricos (Cleton-Jansen et al., 1989).

La glucosa deshidrogenasa soluble naturalmente se encuentra en el espacio periplasmático de la *A. calcoaceticus*, esto es posible gracias a que cuenta con 24 residuos de aminoácidos que funcionan como señal de exportación (Cleton-Jansen et al., 1989).

La reacción catalizada por la glucosa deshidrogenasa depende de su cofactor PQQ, el cual es una ortoquinona. El PQQ se reduce a su forma quinol aceptando dos electrones reduciéndose así los oxígenos correspondientes al C4 y C5, teniendo este proceso un potencial de reducción formal a -0.12 V (vs Ag/AgCl) (Figura 13). Cada una de las subunidades de la glucosa deshidrogenasa cuenta con una molécula de PQQ que encuentra embebida en la enzima unida por interacción de cargas. Esta característica de interacción de la enzima y el PQQ ha permitido la producción de apo-enzimas por medio de la extracción el cofactor.

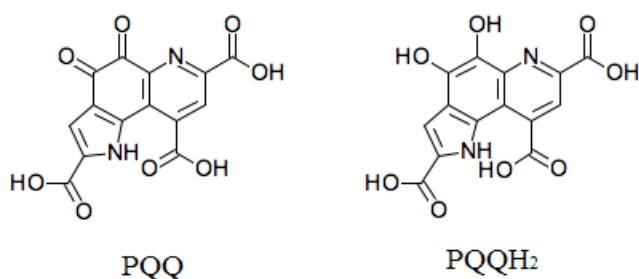


Figura 13. Estructuras de PQQ en sus diferentes estados de oxidación.

Además, la glucosa deshidrogenasa cuenta con 4 iones calcio de los cuales se resalta la relevancia de uno ya que está coordinado con el C6, N5 y C7 del grupo carboxilo del PQQ (Geiger y Gorisch, 1989).

La importancia de esta enzima recae en que cataliza la oxidación de glucosa sin emplear O_2 como aceptor final de electrones, por tanto no forma H_2O_2 como residuo, el cual es un fuerte agente oxidante que puede oxidar los mismos residuos de aminoácido de la enzima inactivándola. En el caso de electrodos, la producción de H_2O_2 afecta la respuesta amperométrica de los electrodos. La glucosa deshidrogenasa al utilizar otros aceptores finales de electrones la hacen un excelente candidato para la fabricación de electrodos anódicos.

La unión racional de esta enzima ha sido un reto que hasta hoy ha sido atacado empleando la unión del cofactor PQQ a los electrodos y la posterior reconstitución de una versión apo-glucosa deshidrogenasa, lo que conlleva a la formación de la versión holo-glucosa deshidrogenasa la cual ya es catalíticamente activa. La producción recombinante de glucosa deshidrogenasa en *E. coli* tiene una ventaja importante en el proceso de producción de electrodos utilizando esta metodología, ya que las enzimas son sintetizadas en su forma apo-enzima, esto porque *E. coli* no cuenta con rutas de síntesis de PQQ (Olsthoorn y Duine, 1996).

Utilizando este método de reconstitución de apo-glucosa deshidrogenasa se han fabricado electrodos anódicos que presentan DET. Por medio de electropolimerización de ácido poliacrílico sobre una superficie de oro y posteriormente su funcionalización con polianilina se logró unir PQQ electroquímicamente activo, en el cual la glucosa deshidrogenasa pudo ser reconstituida. Los electrodos fabricados mostraron respuesta en presencia de glucosa a potenciales mayores a 0.25 V (vs SCE), siendo 0.3 V (vs SCE) el mejor potencial para establecer la relación corriente-concentración de glucosa (Figura 14) (Raitman et al., 2002).

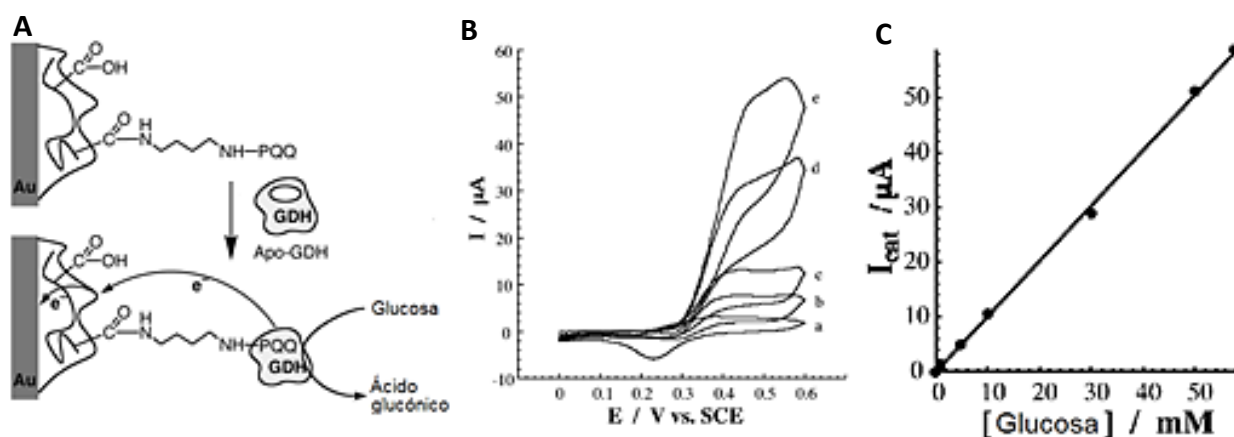


Figura 14. A) Esquema de los componentes del electrodo anódico. B) Ciclovoltagramas del electrodo en presencia de a) 0, b) 5, c) 10, d) 20 y e) 50 mM de glucosa ($v = 2$ mV/s). C) Relación corriente-concentración de glucosa ($E = 0.3$ V vs SCE). Modificado de Raitman et al., 2002.

Uno de los mejores trabajos de fabricación de electrodos anódicos con glucosa deshidrogenasa unida racionalmente ha empleado este mismo método. Zayats y colaboradores en 2005 reportaron un electrodo anódico que constaba de los siguientes componentes: un electrodo base de oro que fue funcionalizado con nanopartículas de oro por medio de unión de moléculas fenólicas con grupos tiol en posiciones *para*, estas nanopartículas a su vez fueron funcionalizadas con trifenilfosfina funcionalizado con polianilina al cual se le unió el PQQ. Con este arreglo se logró reconstituir la glucosa deshidrogenasa sobre los electrodos construidos. El electrodo enzimático generó $1480 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ con una tasa de transferencia de electrones de 11800 s^{-1} , observándose una respuesta amperométrica en presencia de glucosa a potenciales mayores a 0.2 V (vs SCE), mientras que el potencial ideal para el análisis de la relación respuesta amperométrica-concentración de glucosa fue alcanzado a 0.7 V (vs SCE) (Figura 15), esto lo sitúa como uno de los mejores electrodos anódicos enzimáticos reportados hasta el momento.

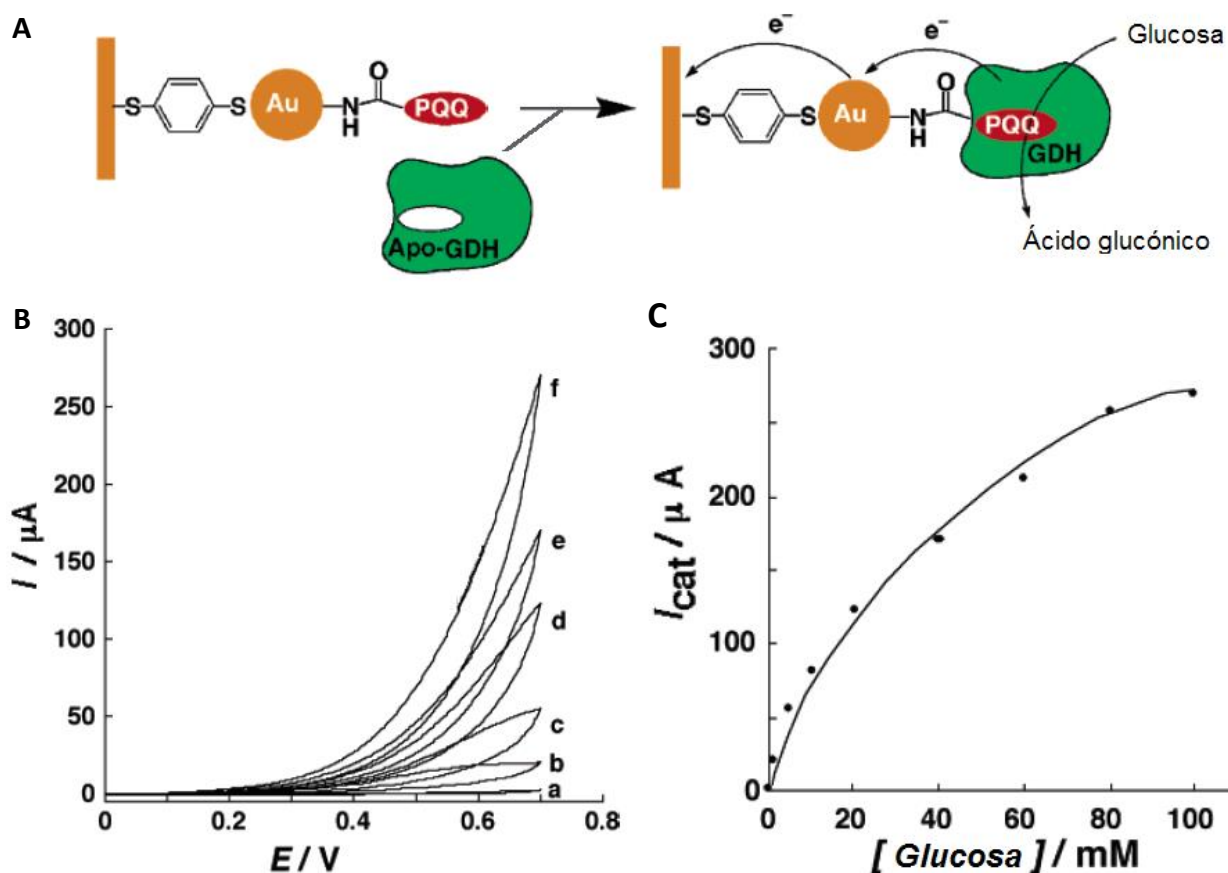


Figura 15. A) Esquema de los componentes del electrodo anódico. B) Ciclovoltagramas del electrodo en presencia de a) 0, b) 1, c) 5, d) 20, e) 40 y f) 100 mM de glucosa ($v = 5 \text{ mV/s}$). C) Relación corriente-concentración de glucosa ($E = 0.7 \text{ V}$ vs SCE). Modificado de Zayats et al., 2005.

1.2.6 Lacasa

La lacasa es una enzima oxidoreductasa monomérica, se caracteriza por presentar 4 iones de cobre en su interior que le permiten desempeñar su función redox. Ha sido purificada principalmente de plantas y hongos, siendo asociada en plantas a la síntesis de lignina (Thurston, 1994), en cambio en hongos ha sido asociada al proceso de deslignificación y patogénesis sobre plantas. A pesar de no ser tan comunes, también se han caracterizado lacasas en insectos donde participan en la síntesis de cutícula (Kramer et al. 2001) y en bacterias en el proceso de esporulación (Martins et al. 2002; Claus, 2003). Se sabe que un gran número de compuestos fenólicos pueden emplearse como sustratos análogos de la lacasa, que pueden ser oxidados por esta enzima. Se ha descrito que lacasas provenientes de hongos denominados “de la pudrición blanca”, como *Trametes versicolor*, *Podospora anserina*, *Trametes hirsuta*, *Trametes ochracea*, *Trametes villosa*, *Trametes gallica*, *Cerrena maxima*, *Coriolopsis polizona*, *Coriolopsis gallica*, *Lentinus tigrinus* y *Pleurotus eryngii*, presentan principalmente versiones extracelulares, no obstante también han sido descritas, en menor medida, lacasas intracelulares que no se sabe con exactitud cuál es su función (Morozova et al., 2007).

El peso molecular de las lacasas ronda entre 50 y 130 kDa, señalando que las de menor peso han sido purificadas de hongos (Morozova et al., 2007). Al igual que la glucosa oxidasa, las lacasas son glicoproteínas siendo la manosa, N-acetilglucosamina y galactosa los carbohidratos a los que están asociadas. Su punto isoeléctrico es de 4 y su pH óptimo de actividad se encuentra entre 4 y 6, además su temperatura de actividad óptima promedio es por encima de los 37°C.

La lacasa de *C. gallica* cuenta con 3 dominios globulares, dos de ellos contienen los sitios asociados a los iones de cobre. El dominio 3 engloba el sitio T1 el cual contiene un ion cobre coordinado por un arreglo de tres aminoácidos (H455, H394 y C450). El dominio 1 y una región del dominio 3 contienen a los sitios T2 y T3 conformando el “clúster trinuclear T2/T3”. El sitio T2 cuenta con un ion cobre coordinado por 2 histidinas (H64 y H397), en cambio, el sitio T3 contiene dos iones cobre coordinados por 3 histidinas cada uno (H451, H66, H109, H449, H399 y H111) (Martínez-Ortiz et al., 2010).

Estudios cristalográficos muestran que el sitio T1 se encuentra a 8 Å de la superficie y unido por medio de la C450 al clúster T2/T3, situado a 12 Å por debajo, este sitio cuenta con un arreglo de aminoácidos superficiales hidrofóbicos que forman un ambiente ideal para la interacción con moléculas de la misma característica, como lo son las moléculas fenólicas (Matera et al., 2008; Rodgers et al., 2010). En el caso

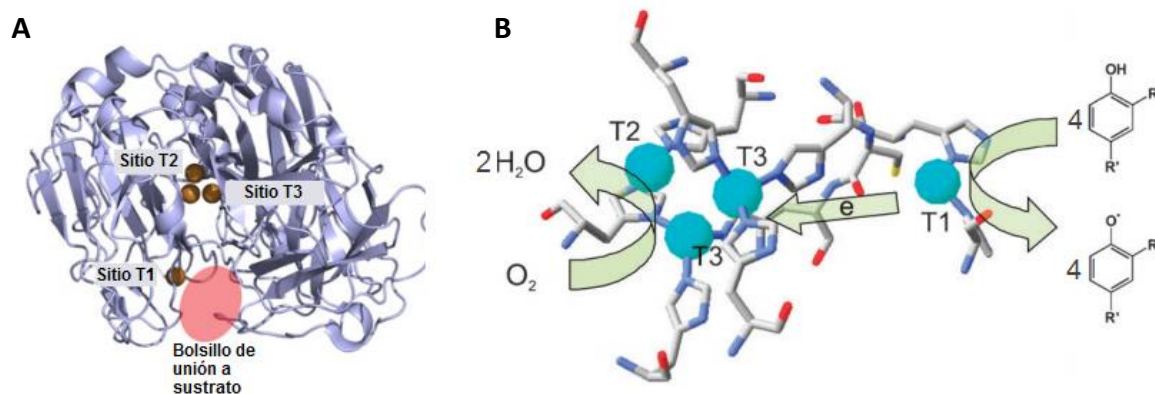


Figura 16. A) Esquema de la estructura cristalográfica de la lacasa donde se muestra la posición de los iones de cobre presentes en los sitios T1, T2 y T3, incluyendo el sitio activo de oxidación de sustratos. Modificado de Rodgers et al., 2010. B) Flujo de electrones y relación estequiométrica genérica del ciclo catalítico de las lacasas. Modificado de Sosna et al., 2010.

del clúster T2/T3, existe un canal con acceso al sitio T3 por el cual entra el O₂ para ser reducido y formar una molécula de H₂O, la cual sale por un canal diferente que conecta con el sitio T2 (Figura 16) (Bento et al., 2005; Matera et al., 2008).

Los sustratos al entrar en contacto con el sitio T1 son oxidados despojándolos de un electrón, al ser cuatro iones Cu⁺² los que se encuentran disponibles para recibir los electrones, el ciclo catalítico requiere de cuatro moléculas sustrato. Los electrones son transferidos del sitio T1 al cluster T2/T3 a través de la C450 que interactúa con las histidinas que coordinan los dos átomos del sitio T3. Al estar los sitios reducidos, el clúster T2/T3 interactúa con el O₂ produciendo anión dioxígeno (intermediario peróxido) por transferencia de 2e⁻ (Yoon et al., 2005). Posteriormente un átomo de oxígeno se une a uno de los iones cobre del sitio T3, mientras que el otro átomo de oxígeno del anión se une simultáneamente al átomo de cobre restante del sitio T3 y al del sitio T2. Estas uniones estabilizan el anión dioxígeno provocando su ruptura formando un intermediario conocido como μ₃-oxo el cual corresponde a un átomo de oxígeno unido a tres iones cobre. Esta configuración favorece la reducción del O₂ para formar dos moléculas de H₂O, dejando al sistema en su estado inicial para un nuevo ciclo catalítico (Morozova et al., 2007).

Algo interesante de estas enzimas es el alto potencial redox en el cual realizan la catálisis. Este alto potencial redox es asociado al sitio T1 que contiene el primer ion de cobre que entra en contacto con los electrones obtenidos de los sustratos. Una manera de clasificar estas enzimas es por medio del potencial formal del sitio T1. Las lacasas provenientes de *T. versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *C. máxima*, *T. hirsute*, *T. ochracea*, *T. togii* y *C. gallica* pertenecen a la categoría de alto potencial redox por ser de 0.73 a 0.78 V (vs NHE) (Martinez-Ortiz et al. 2011). En cambio las lacasas obtenidas de *Myceliophthora*

thermophila, *Scytalidium thermophilum*, *Coprinus cinereus* y *Rhizoctonia solani* forman parte de la categoría media por tener un potencial redox de 0.51 a 0.71 V (vs NHE) (Morozova et al., 2007). Por último, la lacasa obtenida de *Rhus vernicifera*, que es el árbol de la laca y del cual se deriva su nombre, pertenece a la categoría baja por tener un potencial redox de 0.43 V (vs NHE).

Las lacasas, especialmente las de alto potencial redox, resultan de gran interés para su uso en aplicaciones bioelectroquímicas por ser muy cercano al potencial formal termodinámico del O₂, que es 0.81 V (vs NHE). Por tanto, siendo el O₂ su sustrato, se han construido múltiples electrodos que favorecen la reacción de reducción de O₂ para usarse como cátodos en celdas de combustible.

La forma más sencilla de funcionalizar electrodos con lacasas es por medio de adsorción, donde la enzima se internaliza en los pequeños huecos de los electrodos obteniendo una conexión y DET que inicia en el potencial redox del sitio T1. Esto se debe a que el sitio T1 se encuentra muy cercano a la superficie de la enzima (8 Å), por lo que es posible la transferencia de electrones por efecto túnel (Gray y Winkler, 2003). Los estudios que han mostrado los mejores resultados utilizaron electrodos de grafito pirolítico (Lee et al., 1984; Thuesen et al., 1998; Shleev et al., 2005) (Figura 17).

Existen reportes en donde los electrodos presentan mejor respuesta si previamente son funcionalizados con SWCNTs y MWCNTs, los cuales funcionan como cables moleculares que al estar posicionados aleatoriamente en la superficie del electrodo entran en contacto de mejor manera con la superficie de la enzima lo que facilita la transferencia de electrones del electrodo a la lacasa promoviendo su reducción (Lörcher et al., 2013).

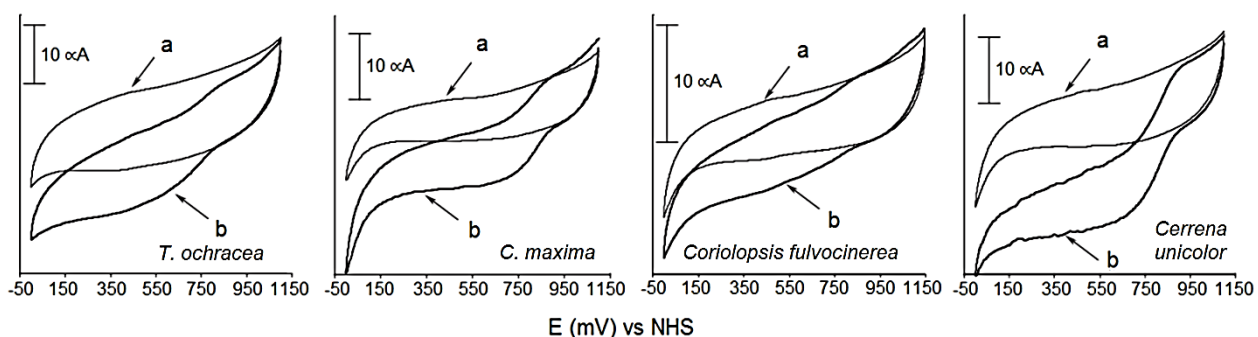


Figura 17. Ciclovoltagramas de varios electrodos enzimáticos compuestos por lacasas de diferentes hongos adsorbidas en electrodos de grafito pirolítico mostrando DET en respuesta a saturación de N₂ (a) y O₂ (b). Modificado de Sheleev et al., 2005.

A pesar de que este método de conexión de la lacasa con los electrodos ha tenido resultados favorables, las enzimas que son electroquímicamente activas en la superficie del electrodo corresponden a un porcentaje pequeño.

Para afrontar este problema y mejorar la eficiencia de los electrodos se ha optado por la unión racional de las enzimas. Un método reportado que ha tenido éxito ha sido la funcionalización de electrodos con moléculas con morfología similar a los sustratos de la lacasa, de esta forma la lacasa es directamente unida por su sitio activo. Se ha reportado que el uso de derivados de antraceno son excelentes para llevar a cabo esta función, ya que al ser de naturaleza hidrofóbica la lacasa se une por interacción con el bolsillo hidrofóbico de su sitio activo donde son oxidados los sustratos naturales (Blanford et al., 2007). Utilizando estos electrodos lograron obtener una densidad de corriente mayor a 0.6 mA/cm^2 perdiendo 40% de su actividad tras pasar 8 semanas (Figura 18).

Basándose en el mismo concepto Martínez-Ortiz y colaboradores inmovilizaron la lacasa de *C. gallica* en telas de fibras de grafito utilizando la molécula 4-[2-aminoetil] benzoico, la cual exponía el grupo ácido benzoico después de ser unido. Comprobaron que esta molécula tiene afinidad por sitio activo de la lacasa, promoviendo su unión orientada a través del grupo carboxilo del 4-[2-aminoetil] benzoico y grupos amino de lisinas cercanas al sitio activo (Martinez-Ortiz et al., 2011).

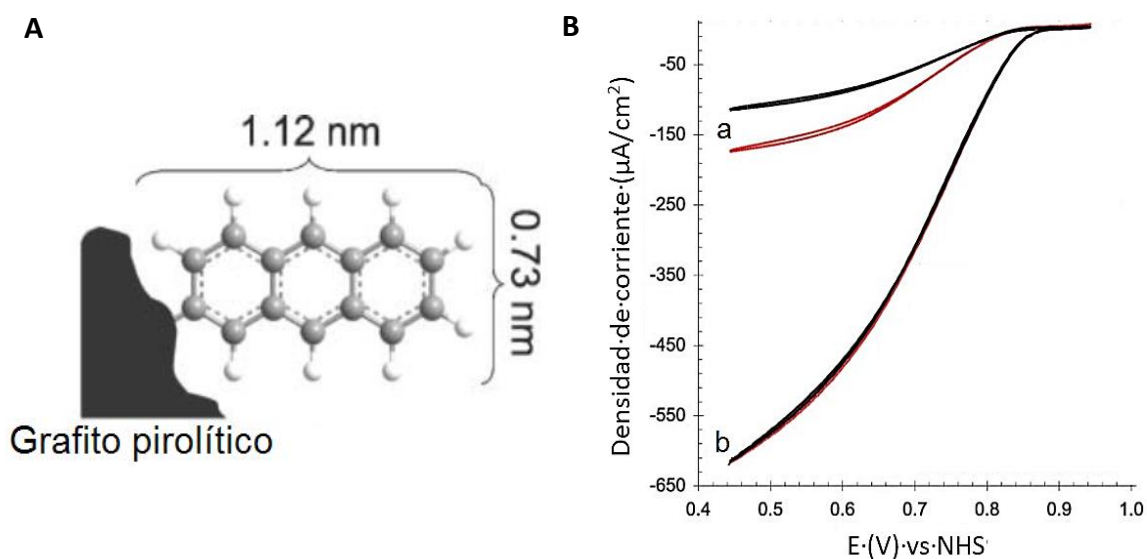


Figura 18. A) Esquema de la unión del grafito pirolítico modificado con antraceno. B) Ciclovoltogramas de electrodos al ser sumergidos en una solución con lacasa (negro) y al remplazar la solución por una sin lacasa (rojo) saturada con N₂ (a) y O₂ (b). $v = 5 \text{ mV/s}$, rpm de electrodo de disco rotatorio = 2500. Modificado de Blandford et al., 2007.

1.3 Justificación

Las fuentes de energía que históricamente han sustentado el desarrollo de nuestra civilización (petróleo, carbón y gas natural) se encuentran en un inminente proceso de reemplazo, debido a que en pocos años las reservas no podrán abastecer la demanda mundial creciente y los productos de desecho generados por estas fuentes de energía resultan nocivos para el medio ambiente. Un claro ejemplo de este efecto es el cambio climático. Estos aspectos han incentivado la inversión en investigación que provea una respuesta ante esta demanda de energía, teniendo como principales ejes la búsqueda de mayor eficiencia y compatibilidad con el medio ambiente. La energía solar, geotérmica, nuclear, hidráulica y eólica son las que hasta el día de hoy han tenido un gran desarrollo y pueden ser consideradas para sustentar nuestra civilización como fuentes de energía primarias.

Una tecnología prometedora que permite la obtención de energía eléctrica a partir de compuestos orgánicos son las celdas de combustible enzimáticas, las cuales han demostrado, no solo que son eficientes y ambientalmente amigables, sino también compatibles con seres vivos. Esto abre la puerta a la obtención de energía eléctrica directamente de moléculas comunes presentes en organismos, siendo el abastecimiento de energía a dispositivos médicos implantables o no invasivos las aplicaciones con más relevancia, como sensores de metabolitos, marcapasos, bombas de fármacos, estimuladores nerviosos, entre otros. Sin embargo, esta tecnología sigue en desarrollo y no se han logrado fabricar celdas lo suficientemente duraderas y estables que cumplan los propósitos para los que son consideradas. De esta manera, el diseño, desarrollo y evaluación de nuevas celdas de combustible enzimáticas resulta crucial para el mejoramiento de esta tecnología. Este trabajo atiende esta necesidad diseñando y fabricando una nueva celda de combustible enzimática.

1.4 Hipótesis

La inmovilización molecularmente orientada de glucosa oxidasa, glucosa deshidrogenasa y lacasa para la transferencia directa de electrones en una celda de combustible enzimática generará mayor densidad de potencia y corriente en comparación con electrodos enzimáticos inmovilizados aleatoriamente.

1.5 Objetivo general

Diseñar, construir y caracterizar una celda de combustible enzimática compuesta por un bioelectrodo anódico de glucosa oxidasa o glucosa deshidrogenasa y un bioelectrodo catódico de lacasa con inmovilización molecularmente orientada para mejorar la transferencia directa de electrones.

1.5.1 Objetivos específicos

1. Diseñar la estrategia de inmovilización molecularmente orientada de la glucosa oxidasa y glucosa deshidrogenasa en electrodos anódicos de oro covalentemente empleando moléculas conectoras.
2. Caracterizar electroquímicamente los electrodos con glucosa oxidasa y glucosa deshidrogenasa inmovilizadas respectivamente.
3. Diseñar, construir y caracterizar una celda de combustible enzimática compuesta por bioelectrodos de glucosa oxidasa y lacasa.
4. Evaluar la eficiencia y capacidad de la celda de combustible enzimática construida.

Capítulo 2. Materiales y métodos

2.1 Sistema electroquímico

Las técnicas electroquímicas utilizadas en este trabajo fueron realizadas utilizando un sistema clásico de tres electrodos (Figura 19).

1. Electrodo de trabajo (W): Oro (Basi®).
2. Contraelectrodo (C): Platino (Basi®).
3. Electrodo de referencia (R): Ag/AgCl (Basi®).

Se utilizó el potenciostato STAT-400 (DropSens®) para evaluar el sistema electroquímico por medio de las técnicas voltametría cíclica, voltametría de barrido lineal y cronoamperometría.

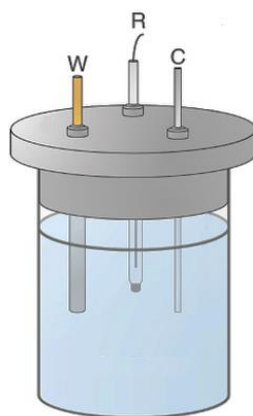


Figura 19. Sistema electroquímico de tres electrodos contenidos en un recipiente de vidrio con electrolito.

2.2 Electrodo de oro

2.2.1 Limpieza

Cada electrodo de oro recibió un tratamiento de limpieza mecánica y electroquímica. El tratamiento mecánico consistió en el pulido con alúmina ($1\ \mu\text{m}$, $0.3\ \mu\text{m}$ y $0.05\ \mu\text{m}$ de tamaño de partícula) y el tratamiento electroquímico consistió en la oxidación y reducción de la superficie del oro por medio de voltametría cíclica ($v= 0.1\ \text{V/s}$, rango= -0.2 a $1.55\ \text{V}$ vs Ag/AgCl) en una solución de H_2SO_4 $0.5\ \text{M}$. Se realizaron los ciclos necesarios para alcanzar un pico de reducción estable del oro a un potencial de $0.9\ \text{V}$ (vs Ag/AgCl).

2.2.2 Evaluación en buffer

Se analizó la interacción de los electrodos de oro con tres diferentes buffers favorables para la glucosa oxidasa. Se realizaron voltametrías cíclicas ($v = 0.1$ V/s, rango = -0.6 a 0.8 V) de los electrodos en los siguientes buffers.

- Buffer de acetatos 50 mM pH 5.1.
- Buffer de fosfatos 50 mM pH 5.1.
- Buffer de fosfatos 50 mM pH 7.

2.3. Electrodo anódico

2.3.1 Producción de la apo-glucosa oxidasa

La enzima glucosa oxidasa (del hongo *A. niger*) se incubó durante 5 min en una solución desnaturalizante compuesta de Na_2SO_4 20% ajustada a un pH de 1.4 con H_2SO_4 concentrado, después se centrifugó, se retiró el sobrenadante, el pellet fue resuspendido en la misma solución desnaturalizante y se repitió el proceso. El pellet resultante se resuspendió en buffer de fosfatos de sodio 0.2 M pH 6.5 y se almacenó a -20°C . Se evaluó un perfil de absorbancia (200-600 nm) del sobrenadante y de la apo-glucosa oxidasa por medio de espectrofotómetro (Cary 60 UV-VIS Agilent Technologies®) esperando la presencia o ausencia, respectivamente, de un pico a una longitud de onda de 446 nm que es característico de FAD para corroborar la extracción del cofactor.

La apo-glucosa oxidasa producida se incubó por una noche a 4°C en una solución de FAD 10 mM en buffer fosfatos de sodio 0.2 M pH 6.5 (Figura 20).

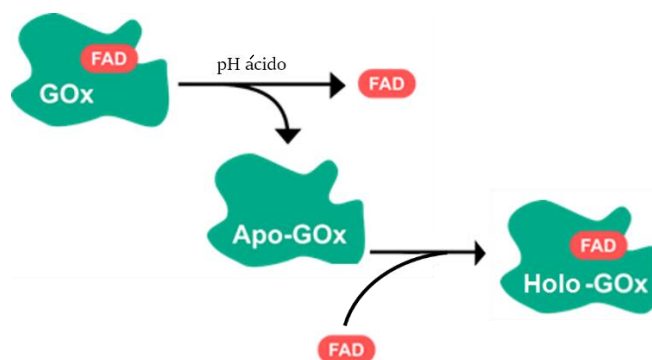


Figura 20. Proceso de producción de apo-glucosa oxidasa y su posterior reconstitución para la formación de holo-glucosa oxidasa.

2.3.3 Ensayo de actividad de la glucosa oxidasa

Se evaluó la actividad enzimática y específica de la glucosa oxidasa nativa, la apo-glucosa oxidasa producida y la holo-glucosa oxidasa tras la reconstitución. La reacción contenía glucosa 95 mM, guayacol 16 mM (Coeficiente de extinción_{470 nm} = 26600 M⁻¹cm⁻¹), peroxidasa 60 U/ml (del rábano blanco *Armoracia rusticata*) y glucosa oxidasa 1 U/ml, todo en buffer de acetatos 50 mM pH 5.1 a 35°C. La estimación de la actividad de la glucosa oxidasa fue por medio de espectrofotometría evaluando el cambio absorbancia a una longitud de onda 470 nm. La relación estequiométrica de la reacción se muestra en la Figura 21.

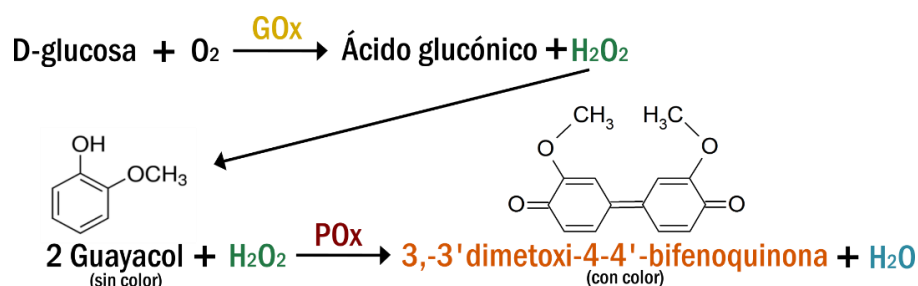


Figura 21. Relación estequiométrica en la reacción para la cuantificación de la actividad de la glucosa oxidasa.

2.3.4 Inmovilización molecularmente orientada

Se empleó a la molécula ácido 4-mercaptobezoico (4AMB) o 4-aminotiofenol (4ATP) como conectores iniciales. Los electrodos de oro se incubaron con una solución etanólica de 4AMB o 4ATP 10 mM por una noche a temperatura ambiente. Después de este proceso, los electrodos fueron lavados con etanol absoluto y se dejaron secar.

La unión de FAD y PQQ a los electrodos, respectivamente, se realizó por medio de la unión previa de moléculas aromáticas, sobre la capa de 4AMB o 4ATP. Estas uniones se realizaron por medio de los activadores de carboxilos EDC y NHS en una solución de dimetilsulfóxido (DMSO). La unión de FAD y PQQ sobre las cadenas sintetizadas requirió de EDC y NHS a temperatura ambiente por 1 h en buffer MES 0.1 M pH 4.5.

Los electrodos funcionalizados con FAD fueron sumergidos en una solución de apo-glucosa oxidasa 2 mg/ml en buffer de fosfatos 2 M pH 6.5 y se dejaron incubar por una noche a 4°C o 1 h a temperatura ambiente. Por último, los electrodos modificados fueron lavados para su posterior evaluación (Figura 22).

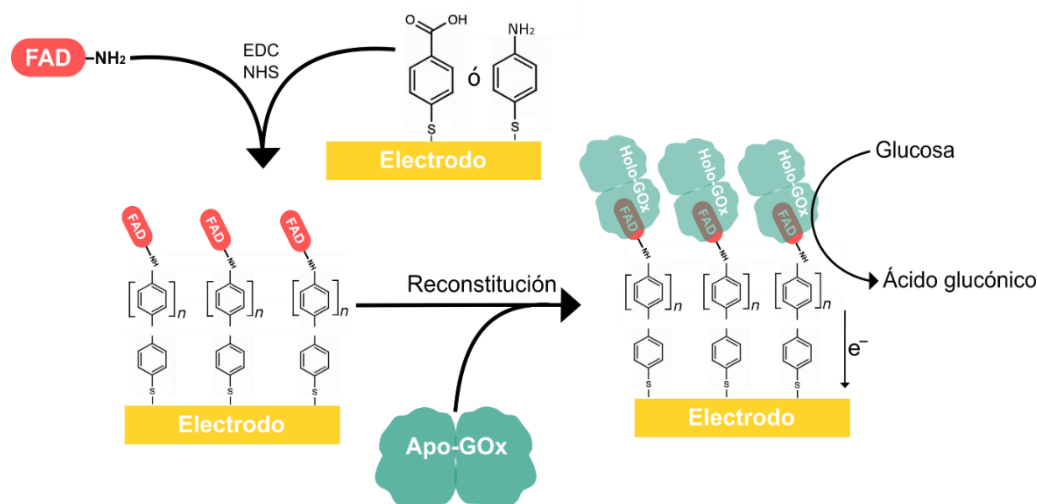


Figura 22. Proceso de producción de electrodos con glucosa oxidasa molecularmente orientada.

Los electrodos funcionalizados con PQQ fueron sumergidos en una solución de apo-glucosa deshidrogenasa 1 mg/ml y CaCl₂ 30 mM en buffer HEPES 20 mM y se dejaron incubar por 40 min a temperatura ambiente. Por último, los electrodos modificados fueron lavados con buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.3 para su posterior evaluación.

Los electrodos funcionalizados con FAD fueron sumergidos en una solución de apo-glucosa oxidasa 2 mg/ml en buffer de fosfatos 2 M pH 6.5 y se dejaron incubar por una noche a 4°C o 1 h a temperatura ambiente. Por último, los electrodos modificados fueron lavados para su posterior evaluación (Figura 22).

Los electrodos funcionalizados con PQQ fueron sumergidos en una solución de apo-glucosa deshidrogenasa 1 mg/ml y CaCl₂ 30 mM en buffer HEPES 20 mM y se dejaron incubar por 40 min a temperatura ambiente. Por último, los electrodos modificados fueron lavados con buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.3 para su posterior evaluación.

2.3.5 Inmovilización aleatoria

Se utilizó el 4ATP como molécula conectora. Los electrodos de oro se incubaron con una solución etanólica de 4ATP 10 mM por una noche a temperatura ambiente. Posteriormente los electrodos fueron lavados con etanol absoluto, se dejaron secar, se les agregó una solución de glucosa oxidasa 2 mg/ml, EDC y NHS 10 mM en buffer MES 0.1 M pH 4.5 y se dejaron incubar por 1 h a 4°C. Por último, los electrodos fueron lavados con buffer de fosfatos 2 M pH 6.5 para su posterior evaluación (Figura 23).

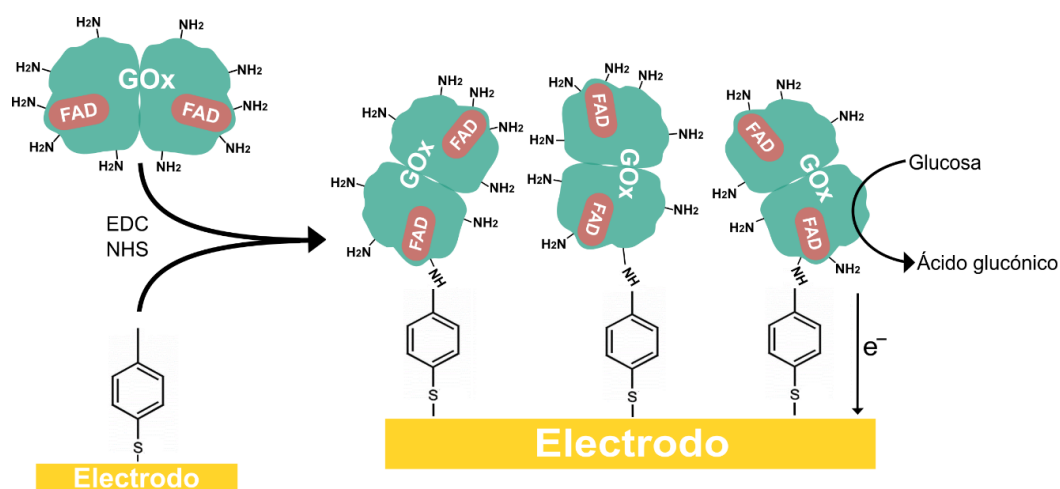


Figura 23. Proceso de producción de electrodos con glucosa oxidasa unida aleatoriamente.

2.4 Electrodo cátodo-lacasa

2.4.1 Interacción de la lacasa 4AMB

Se analizó la interacción del 4AMB con la lacasa (del hongo ligninolítico *C. gallica*) evaluando un perfil de absorbancia (500 a 800 nm) de la lacasa en presencia de concentraciones ascendentes de 4AMB en una solución de acetonitrilo 10% en buffer de succinatos 50 mM pH 4.5.

2.4.2 Inmovilización molecularmente orientada de la lacasa

La unión de 4AMB, bifeníl-4',4' ácido carboxílico y 4-[2-aminoetil] benzoico al electrodo de oro se realizó empleando el método propuesto propuesta con anterioridad que utiliza EDC y NHS. Después de lavar y secar los electrodos, se sumergieron en una solución de lacasa 1 mg/ml en buffer MES 0.1 M pH 4.5 y se dejó incubando por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó a la solución EDC y NHS 10 mM y se dejó incubar a 4°C por 1 h. Por último, los electrodos se lavaron con buffer de succinatos 50 mM pH 4.5 para su posterior evaluación.

2.5 Evaluación electroquímica

Cada modificación de los electrodos fue evaluada por medio de voltametría cíclica ($v=0.1$ V/s) en presencia del buffer saturado con N₂ favorable para la enzima correspondiente. Las evaluaciones de la oxidación y reducción electroenzimática de la glucosa y del O₂, respectivamente, se realizó por medio de ciclovolametrías en presencia del sustrato de la enzima (Tabla 5).

Tabla 5. Sustrato y buffer utilizados en las evaluaciones electroenzimática.

Enzima	Buffer	Sustrato
Glucosa oxidasa	Fosfatos 0.1 M pH 7.3	D-glucosa
Glucosa deshidrogenasa	Fosfatos 0.1 M pH 7.3	D-glucosa
Lacasa	Succinatos 50 mM pH 4.5	O ₂ *

*Se saturó con N₂ el buffer para evaluar la actividad de la lacasa en ausencia de O₂.

2.6. Construcción y caracterización de la celda de combustible

La estructura de la celda fue construida con paredes de acrílico, conteniendo la cámara anódica y la catódica separadas por una membrana de intercambio catiónica de Nafion® cuando fue necesaria, además cuenta con conductos de entrada y salida para el flujo apropiado del buffer y el sustrato (combustible) (Figura 24). El electrodo anódico y catódico tienen un área superficial de $7.06 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$ con las enzimas unidas bajo las condiciones previamente descritas. La caracterización de la celda construida consistió en la evaluación del OCV por medio cronopotenciometría, la densidad de potencia por medio de voltametría de barrido lineal (1 mV/s) y la densidad de potencia por cronoamperometría.

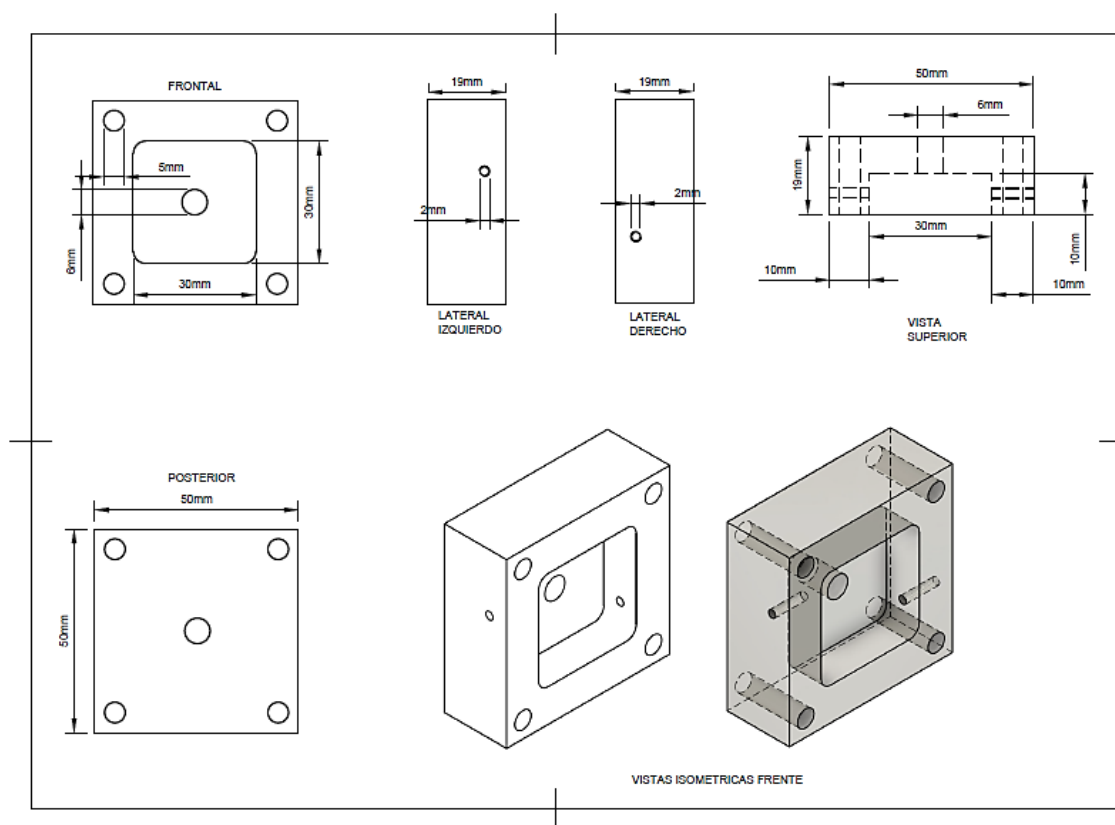


Figura 24. Esquema técnico de la celda construida para el arreglo de electrodos enzimáticos. El diseño gráfico de la celda se realizó con el software AutoDesk FUSION 360.

Capítulo 3. Resultados y discusión

3.1 Evaluación de los electrodos de oro

3.1.1 Limpieza

El proceso de limpieza de los electrodos de oro constó de dos fases; una limpieza mecánica por medio de alúmina (Al_2O_3) de $1\ \mu\text{m}$, $0.3\ \mu\text{m}$ y $0.05\ \mu\text{m}$ de tamaño de partícula como agente abrasivo y un tratamiento de barrido electroquímico para promover la reducción del oro formando oro metálico en ambiente ácido (H_2SO_4 $0.5\ \text{M}$).

Al realizar este proceso, se obtuvo un ciclovoltagrama característico del oro que muestra una serie de picos de oxidación (Au_2O_3) que inician a $\approx 0.1\ \text{V}$, lo que indica que se trata de oro policristalino ya que los arreglos cristalinos de oro “100” o “111” presentan picos de oxidación únicos. Además, se observa claramente el pico único de reducción del oro a $\approx 0.9\ \text{V}$. Se obtuvo una carga coulométrica (Q_{exp}) de $36.56\ \mu\text{C}$ correspondiente al pico de reducción y un área superficial electroactiva (A_r) de $0.09\ \text{cm}^2$ con un factor de rugosidad (Fr) de 1.28 tomando en cuenta una Q teórica (Q_{teo}) de $400\ \mu\text{C}/\text{cm}^2$ para un electrodo de oro policristalino (Sarapuu et al., 2001). Este resultado es un valor muy cercano a una superficie plana (Figura 25).

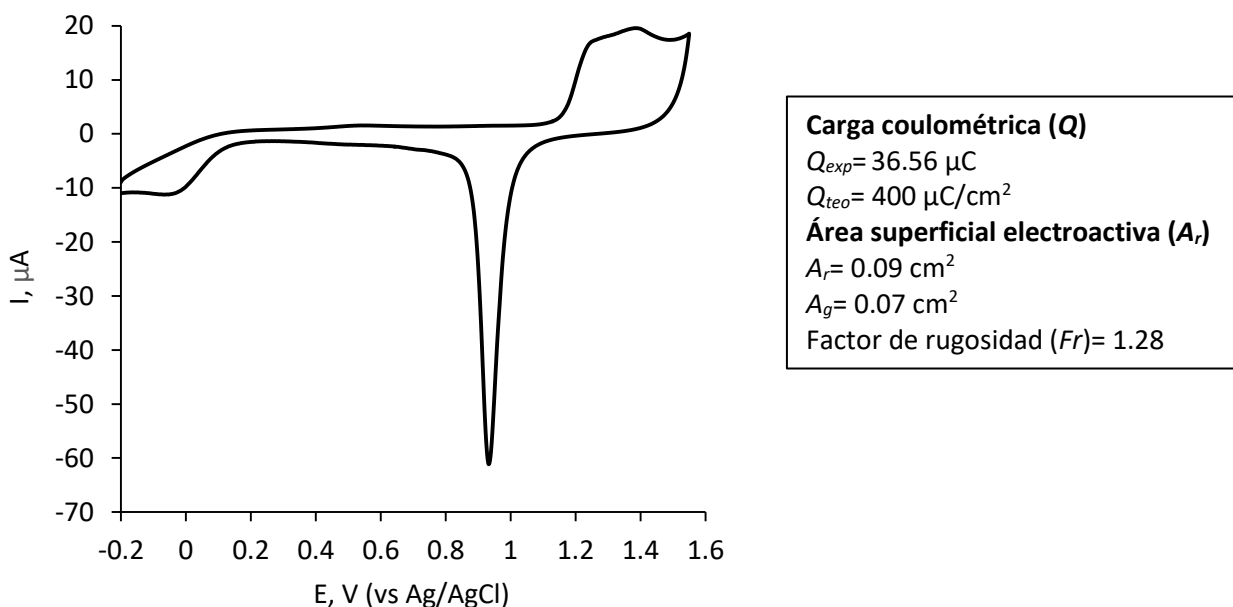


Figura 25. Ciclovoltagrama de un electrodo de oro posterior al tratamiento de limpieza mecánica con alúmina. H_2SO_4 $0.5\ \text{M}$, $v = 0.1\ \text{V/s}$, ciclo 5.

Después de conocer estos parámetros, los electrodos de oro que fueron utilizados en experimentos posteriores recibieron un tratamiento similar de limpieza para obtener un Fr entre 1.2 y 1.3.

3.1.2 Comportamiento de los electrodos de oro

Una característica importante de los buffers empleados en sistemas electroquímicos con una interfaz enzimática es que estos deben ser compatibles con las enzimas empleadas y que preferentemente no presenten actividad redox en los potenciales a los cuales se realizan las evaluaciones electroquímicas. Para determinar estos aspectos, se evaluó el comportamiento de los electrodos de oro limpios en buffer de fosfatos, que fue el buffer utilizado para medir la actividad de la glucosa oxidasa. Los ciclovoltagramas de estos experimentos muestran que el electrodo de oro presenta una corriente basal menor de $\pm 1 \mu\text{A}$ en el rango de potenciales evaluados, lo que indica que el buffer no es un problema al momento de realizar evaluaciones posteriores ya que esta corriente es muy pequeña (Figura 26).

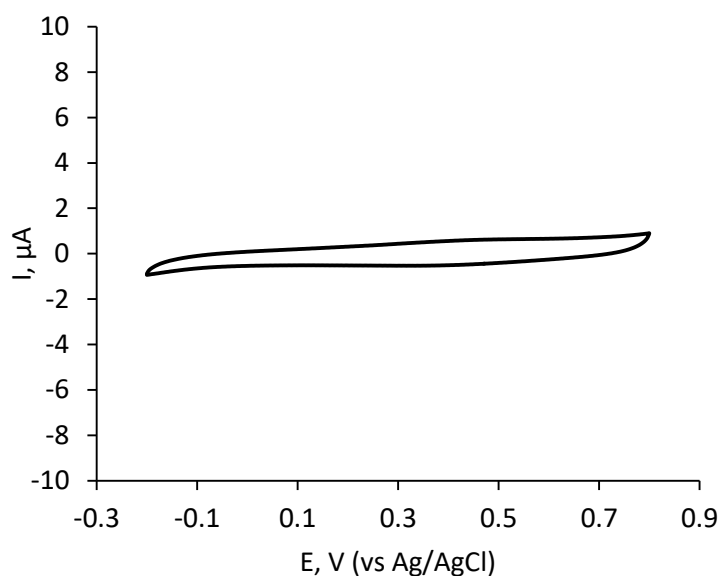


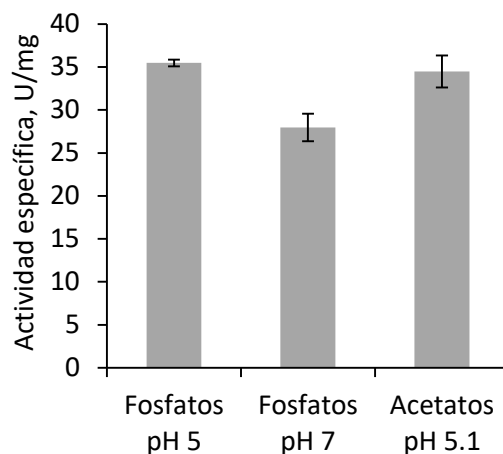
Figura 26. Ciclovoltagrama de un electrodo de oro en presencia de buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3. $v = 0.1 \text{ V/s}$, ciclo 5.

De igual forma, se evaluó la actividad de la glucosa oxidasa en los diferentes buffers para definir cuál de ellos se utilizaría en pruebas posteriores. Como podemos observar en la Tabla 6 y la Figura 27, la glucosa oxidasa presentó una misma actividad en buffer de fosfatos de sodio pH 5 en comparación con el buffer de acetatos pH 5.1. En el caso del buffer de fosfatos de sodio pH 7.3, la glucosa oxidasa disminuye su actividad en un $\approx 18\%$, no obstante se demuestra que a pH cercano al fisiológico humano esta enzima no pierde significativamente su actividad.

Tabla 6. Actividad de la glucosa oxidasa en diferentes buffer.

Buffer*	Actividad enzimática (U/ml)	Actividad específica (U/mg)
Acetatos pH 5.1	0.0177	35.46 ±0.38
Fosfatos pH 5	0.014	27.96 ±1.61
Fosfatos pH 7.3	0.0172	34.46 ±1.86

*0.1 M.

**Figura 27.** Actividad específica de la glucosa oxidasa en diferentes buffers.

3.2 Desflavinación de glucosa oxidasa

Dentro del espectro de métodos utilizados para realizar la conexión de la glucosa oxidasa con un electrodo, destaca la unión del sitio redox directamente al electrodo utilizado en el sistema electroquímico. Este método tiene como objetivo la búsqueda de la DET entre la enzima y los electrodos. Sin embargo, el proceso de unión de la glucosa oxidasa a través de su sitio redox presenta un problema, el cofactor FAD, encargado de realizar la catálisis redox en la glucosa oxidasa, se encuentra embebido a $\approx 18 \text{ \AA}$ de la superficie (medido desde la región más cercana a la superficie).

Para superar este problema se decidió someter a la glucosa oxidasa a un proceso de desnaturalización reversible para extraer el cofactor FAD de su interior, esto es posible ya que el FAD se encuentra unido a la glucosa oxidasa solo por unión electrostática. Este tratamiento tiene como objetivo producir una apo-glucosa oxidasa que no presenta actividad catalítica, pero al entrar en contacto con FAD de nuevo en condiciones de pH superiores a 5 y no mayores a 7.6 la glucosa oxidasa integra de nuevo al cofactor regenerando la holo-glucosa oxidasa y recuperando su actividad. De esta forma es posible hacer la unión

de FAD sobre el electrodo de oro y posteriormente reconstituir la apo-glucosa oxidasa sobre los electrodos funcionalizados con el cofactor.

Se logró extraer exitosamente FAD por medio de una solución desnaturalizante y a su vez generar una apo-glucosa oxidasa (método modificado de Vidal et al., 2004). La Figura 28A muestra un perfil de absorbancia de la glucosa oxidasa nativa (Figura 28A, línea negra) y de la apo-glucosa oxidasa generada (Figura 28A, línea roja), donde se puede observar que solo la glucosa oxidasa nativa cuenta con el pico característico del espectro de absorbancia de FAD ($\lambda_{\text{FAD}} \approx 446 \text{ nm}$) (Figura 28B), además el sobrenadante resultante del proceso de extracción de FAD muestra un pico en la misma longitud de onda que la glucosa oxidasa nativa (Figura 28, línea segmentada), lo que corrobora que FAD fue extraído con éxito.

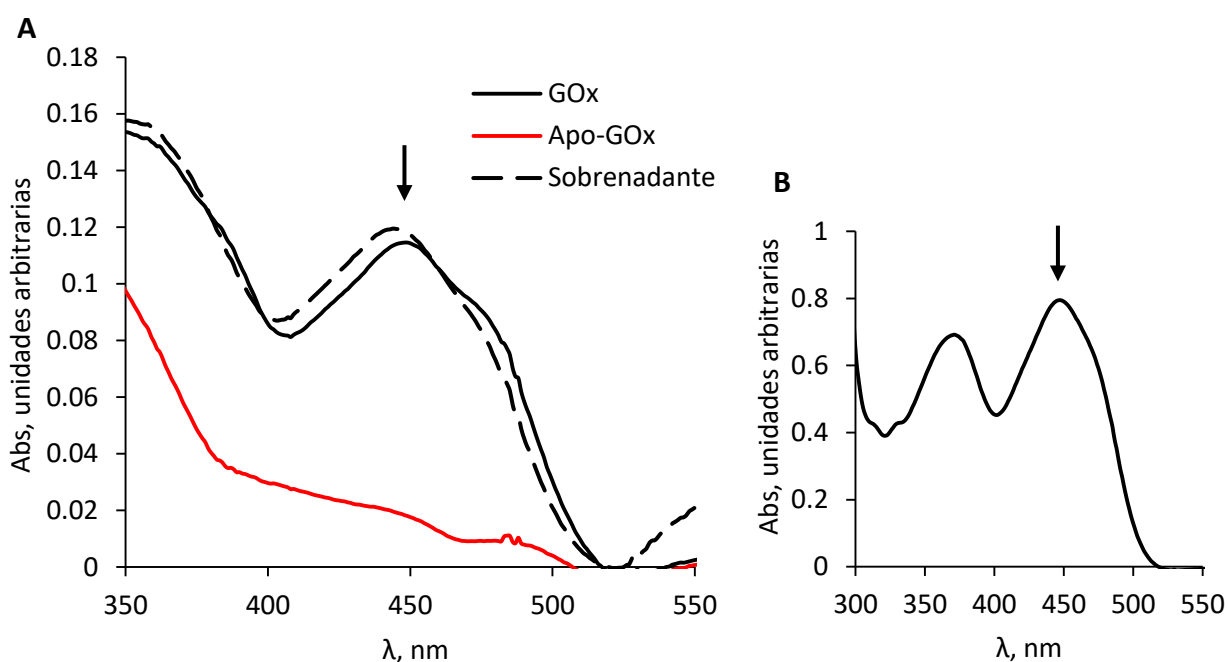


Figura 28. A) Perfil de absorbancia de la glucosa oxidasa nativa (línea negra), apo-glucosa oxidasa (línea roja) y el sobrenadante que contenía el FAD extraído (línea segmentada). $\lambda = 446 \text{ nm}$ (flecha). B) Perfil de absorbancia de FAD 10 mM. $\lambda = 446 \text{ nm}$ (flecha).

3.3 Reconstitución de la glucosa oxidasa

Superado el objetivo de extraer FAD de la glucosa oxidasa, se prosiguió con estandarizar la reconstitución de la apo-enzima. Esto fue posible dejando la apo-glucosa oxidasa en interacción con FAD (en una relación molar 1:10) por una noche, de esta forma la enzima se plegaría espontáneamente sobre su cofactor reconstituyendo su estructura y recuperando su actividad. Se cuantificó la actividad enzimática de las

diferentes versiones generadas de la enzima para evaluar la eficiencia del método de desflavinación y reconstitución de la glucosa oxidasa.

La glucosa oxidasa nativa tuvo una actividad específica de 30.16 U/ml, en cambio la apo-glucosa oxidasa no presentó actividad, lo cual era lo esperado ya que al perder FAD pierde su capacidad redox. Por último, la glucosa oxidasa reconstituida (holo-glucosa oxidasa) presentó una actividad de 24.8 U/ml, lo que significa la recuperación del 82% de su actividad basal (Tabla 7).

Tabla 7. Actividad de la glucosa oxidasa tras el proceso de desflavinación y reconstitución.

Enzima	Actividad enzimática (U/ml)	Actividad específica (U/mg)
Glucosa oxidasa	9.95 x 10 ⁻³	30.16 ±0.56
Apo-Glucosa oxidasa	Sin actividad	Sin actividad
Holo-Glucosa oxidasa	8.18 x 10 ⁻³	24.8 ±1.66 (82%)

Este porcentaje de recuperación de actividad obtenido se encuentra por encima de lo reportado en la literatura donde se utilizó un método similar, siendo un 50% de recuperación el mejor resultado publicado (Posthuma-Trumpie et al., 2007).

3.4 Electrodo anódico de glucosa oxidasa

3.4.1 Unión de FAD y reconstitución de glucosa oxidasa

Ya estandarizado un método eficiente de producción de apo-glucosa oxidasa, se decidió iniciar los experimentos de funcionalización de los electrodos de oro con el cofactor FAD con el fin de reconstituir la apo-glucosa oxidasa sobre ellos y obtener una conexión directa entre el electrodo y el sitio redox de la enzima.

Para lograr esto se siguió una serie de pasos de síntesis de cadenas de moléculas aromáticas sobre el electrodo de oro donde la última molécula unida fuera FAD. Se utilizaron moléculas aromáticas que tuvieran como mínimo un grupo tiol (R-SH) para la funcionalización de los electrodos de oro, esto porque los grupos tiol se unen espontáneamente al oro metálico formando un enlace covalente coordinado. Se han reportado una gran cantidad de moléculas tioladas que en contacto con oro forman monocapas autoensamblables (SAM) (Häkkinen, 2012; Hoffman et al., 2007; Ma et al., 2013). De esta forma se puede

funcionalizar el electrodo de oro con moléculas tioladas que a su vez contengan grupos reactivos de interés para la unión de nuevas moléculas sobre ellos, por ejemplo cofactores.

Las moléculas con grupos tiol que se utilizaron en este trabajo son el 4ATP y el 4AMB, las cuales tienen un anillo aromático, el cual contiene electrones resonantes que le confieren características conductoras a la molécula. Además, estas dos moléculas cuentan con un grupo amino y carboxilo, respectivamente, en posición *para* los cuales pueden ser utilizados para unir otras moléculas por medio de enlaces amida.

Tras funcionalizar electrodos de oro con 4ATP, quedando libres grupos amino, se utilizó glutaraldehído para unir FAD. Esto fue posible gracias a que el glutaraldehído presenta dos grupos aldehídos que se unen a grupos amino formando bases de Schiff, caracterizadas por mantener el doble enlace del oxígeno sustituyéndolo por el nitrógeno del grupo amino.

La unión de FAD sobre el electrodo utilizando este método resultó exitosa. Claramente se observan los picos redox del cofactor a un $E^{\circ'} = -0.45$ V. Se logró unir 0.962 pmoles de FAD, lo que significa una densidad de cobertura de 6.31×10^2 moles/cm² y un 15% de área de cobertura de la superficie del electrodo partiendo de un radio hidrodinámico de FAD de ≈ 1.15 nm (Figura 29).

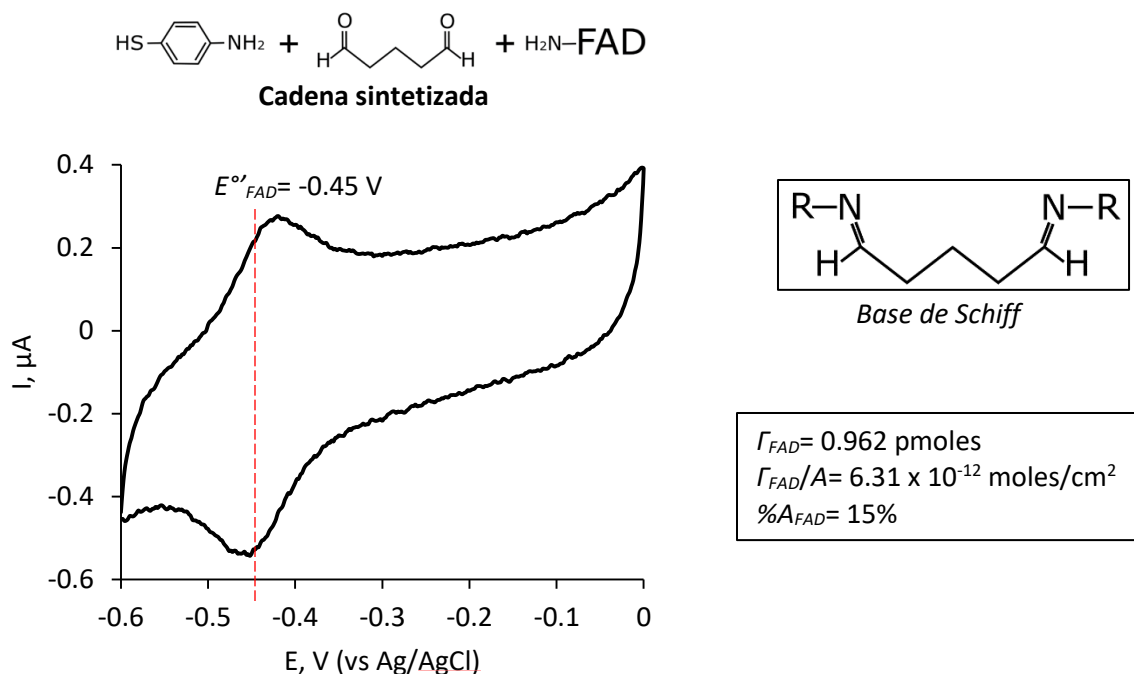


Figura 29. Ciclovoltograma de electrodo de oro funcionalizado con FAD. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 0.2$ V/s, ciclo 5.

A pesar de demostrar que FAD fue unido al electrodo de oro, los picos redox asociados a FAD desaparecieron al realizar la evaluación de los electrodos tras 3 h del proceso de funcionalización, lo cual indica que no es estable la unión de FAD con el electrodo (Figura 30). Independientemente de este resultado negativo se decidió reconstituir la apo-glucosa oxidasa sobre electrodos recién funcionalizados con FAD bajo el mismo protocolo. Los electrodos se evaluaron en presencia y ausencia de glucosa después de una noche en incubación a 4°C sumergidos en una solución de apo-glucosa oxidasa 2 mg/ml. El ciclovoltagrama de este experimento muestra que no hay aumento en la corriente asociado a la oxidación electroenzimática de la glucosa (Figura 31).

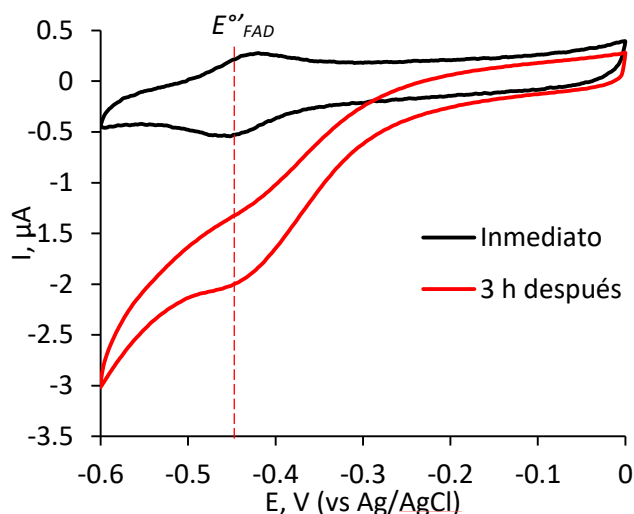


Figura 30. Ciclovoltagramas de electrodos de oro funcionalizados con FAD evaluados inmediatamente después del proceso de funcionalización y después de 3 h a 4°C sumergidos en buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 0.2$ V/s, ciclo 5.

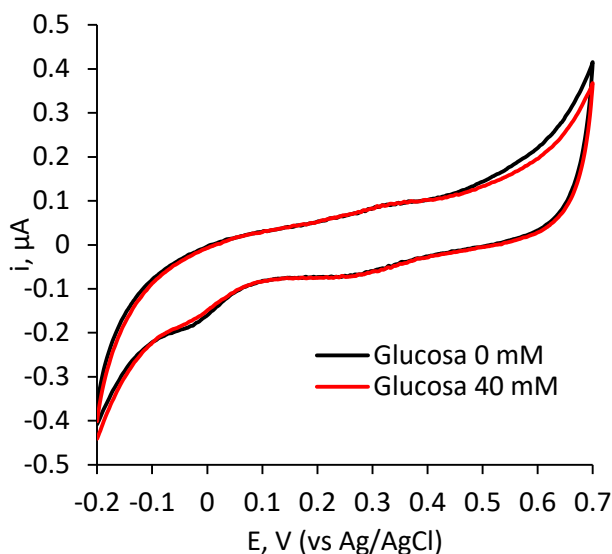


Figura 31. Ciclovoltagramas de electrodos de oro con glucosa oxidasa orientada molecularmente en ausencia (negra) y presencia (roja) de glucosa 40 mM. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 5$ mV/s, ciclo 5.

Tras la aparente reconstitución fallida de la apo-glucosa oxidasa sobre los electrodos de oro, se evaluó de nuevo la presencia de FAD por medio de una ciclovoltametría que corroboró que los electrodos no presentan los picos redox asociados a FAD (Figura 32). La inestabilidad de la unión de FAD sobre el electrodo puede deberse a la unión débil del glutaraldehído con los grupos amino, ya que esta unión no es de tipo covalente.

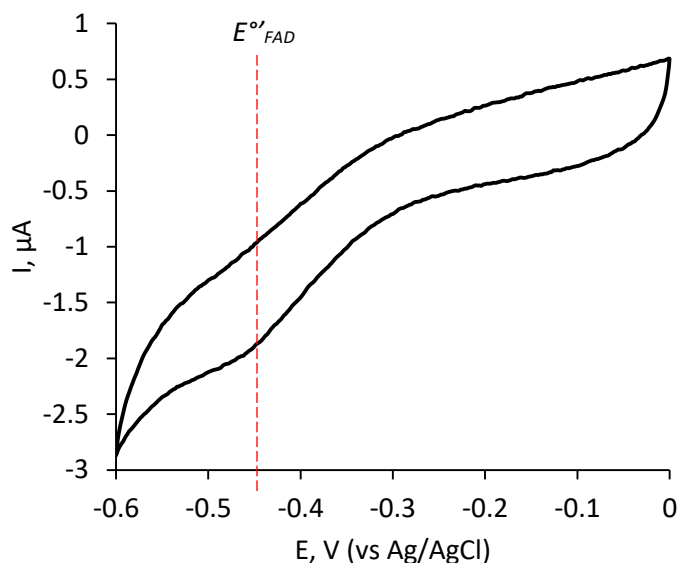


Figura 32. Ciclovoltagramas de electrodos de oro funcionalizados con glucosa oxidasa orientada molecularmente después de ser evaluado en presencia de glucosa. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 0.2$ V/s, ciclo 5.

Se decidió reducir las bases de Schiff formadas en el proceso de unión para estabilizar la unión de FAD con el electrodo funcionalizado con 4ATP por medio del glutaraldehído. Para esto se usó NaBH_3CN (20 mM), el cual es un agente reductor fuerte. De esta forma se perdería el doble enlace del N incorporándose un H, esto haría menos conductora la cadena sintetizada pero resultaría en una unión más estable de FAD en la superficie del electrodo de oro.

Con este procedimiento se logró unir aparentemente una fracción mayor de FAD en la superficie del electrodo de oro, sin embargo, el tratamiento con NaBH_3CN utilizado en los electrodos funcionalizados afecta los picos redox de FAD, los cuales se desplazan a valores positivos, situación que puede deberse a la modificación de FAD al sufrir la reducción de alguno de sus grupos reactivos modificando su arreglo electrónico. Además, no están claramente definidos los picos redox, por lo que resultan complicadas y poco reproducibles las mediciones de la carga coulométrica en estos ciclovoltagramas. A pesar de esto, los electrodos presentaron una mayor estabilidad en el tiempo ya que FAD sigue unido a los electrodos y

se encuentra electroquímicamente activo al ser evaluados 3 h después de ser funcionalizados y almacenados a 4°C (Figura 33).

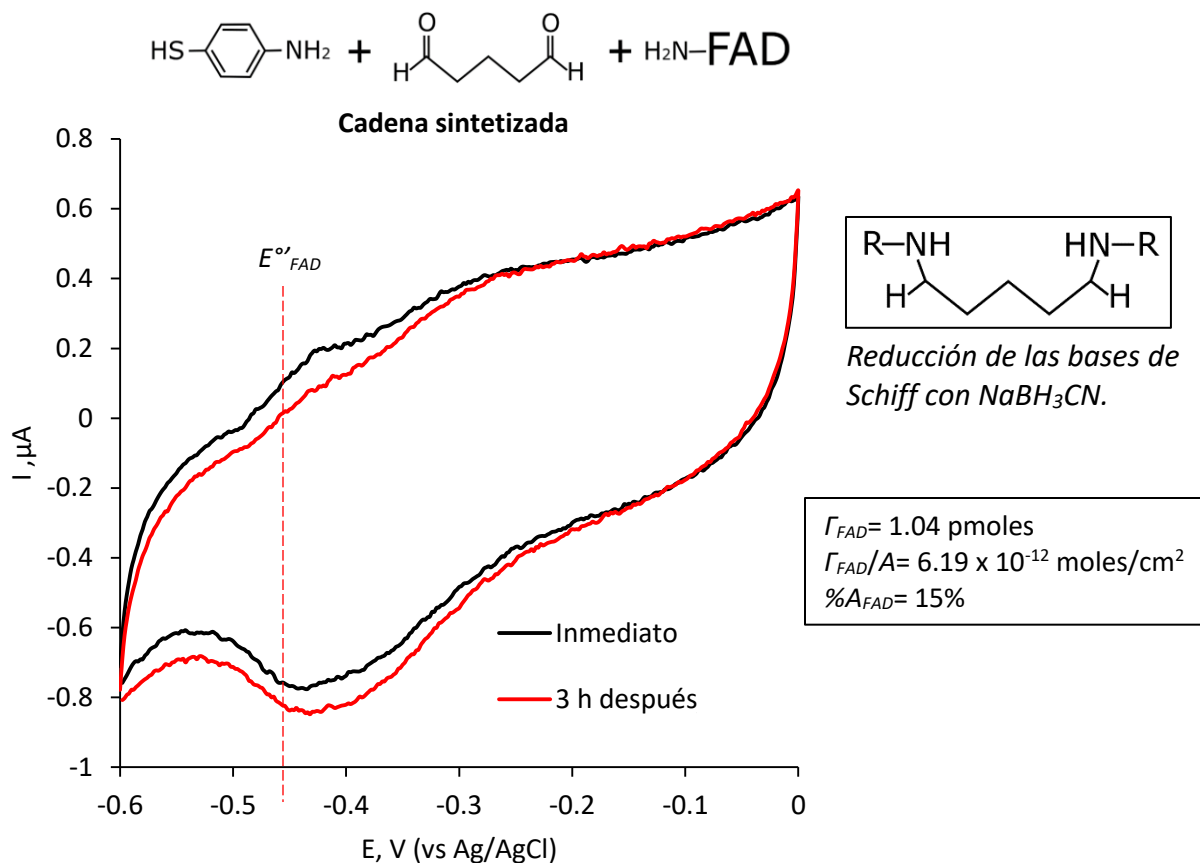


Figura 33. Ciclovoltogramas de electrodos funcionalizados con FAD evaluados inmediatamente después de la funcionalización y después de 3 h a 4°C. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 0.2 \text{ V/s}$, ciclo 5.

Al haber obtenido estos resultados, se decidió fabricar electrodos nuevos empleando el método descrito para ser incubados posteriormente con apo-glucosa oxidasa con el fin de que se reconstituyera. Los ciclovoltogramas de estos electrodos no mostraron un pico asociado a la oxidación de glucosa a pesar de obtener una unión más estable de FAD en los electrodos, lo que sugiere que la apo-glucosa oxidasa no se reconstituyó correctamente sobre los electrodos (Figura 34). Esto puede deberse a que el tratamiento con NaBH₃CN afecta la estructura de FAD provocando una incompatibilidad con el sitio de unión de la glucosa oxidasa. Además, la distancia a la que FAD se encuentra de la superficie del electrodo de oro al ser unido con glutaraldehído y posteriormente perder las bases de Schiff es pequeña, lo que podría causar un impedimento estérico en el proceso de reconstitución de la apo-glucosa oxidasa en los electrodos funcionalizados.

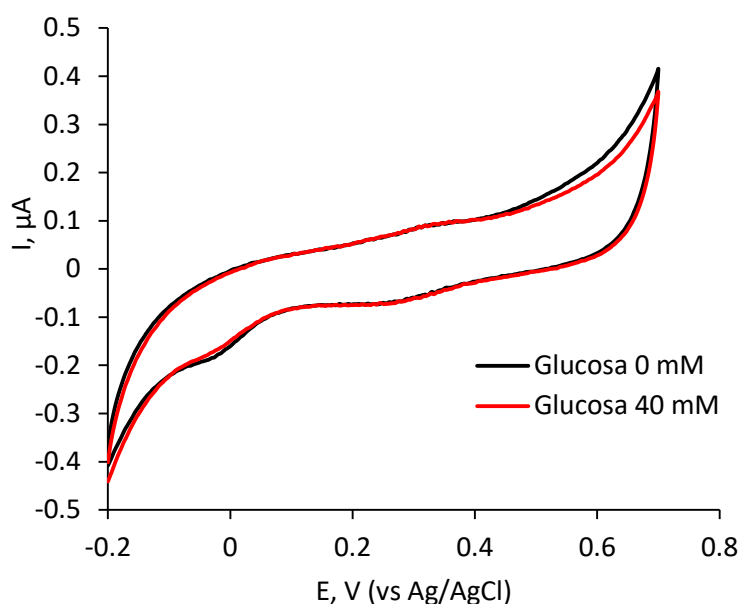


Figura 34. Ciclovoltogramas de electrodos con glucosa oxidasa orientada molecularmente en ausencia (negra) y presencia (roja) de glucosa. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 5$ mV/s, ciclo 5.

Se utilizaron otras moléculas que sirvieran como conectores conductores entre FAD y el electrodo de oro teniendo como objetivo la estabilización de la unión de FAD y el aumento de la distancia a la que este se encuentra de la superficie para así evitar el impedimento estérico durante la reconstitución. El bifeníl-4',4' ácido carboxílico y el 4,4'-diaminobifeníl fueron las moléculas seleccionadas para llevar a cabo los siguientes experimentos, las cuales comparten la característica de poseer dos anillos aromáticos y dos grupos carboxilo y amino, respectivamente, en posición *para*. Su característica aromática resulta de interés ya que los electrones resonantes en estos grupos los hacen moléculas conductoras, por tanto pueden ser usados como cables moleculares. Además, poseen dos grupos reactivos muy comunes y fáciles de unir en presencia de EDC y NHS que pueden utilizarse para unirse entre ellas, con FAD o con las moléculas tioladas mencionadas previamente. Sin embargo, la solubilidad de estas moléculas en soluciones acuosas es casi nula por presentar dos anillos aromáticos, por lo que el protocolo convencional de unión por química de EDC y NHS no puede ser utilizado ya que la formación del enlace amida se favorece en buffer MES 0.1 M pH 4.5 (Fischer, 2010).

Ante esto, se evaluó el protocolo de unión por química de EDC y NHS en solventes orgánicos en los que sí fuera soluble el bifeníl-4',4' ácido carboxílico y el 4,4'-diaminobifeníl, tal como el DMSO. Se funcionalizaron electrodos de oro con 4ATP y se sumergieron en una solución de EDC, NHS 10 mM y bifeníl-4',4' ácido carboxílico 5 mM disueltos en DMSO puro. La reacción se dejó en reposo a temperatura ambiente por 4 h. Posteriormente, los electrodos fueron lavados con DMSO y buffer MES para eliminar las moléculas que

no se unieron. Por último, se utilizó el protocolo convencional de unión por enlace amida para unir FAD a los electrodos funcionalizados. Para esto los electrodos fueron sumergidos en una solución de FAD 5 mM, EDC y NHS 10 mM disueltos en buffer MES 0.1 M pH 4.5 y se dejaron reaccionar por 1 h a temperatura ambiente con el objetivo de unir el grupo amino del FAD con los grupos carboxilo superficiales del electrodo de oro después de ser funcionalizado.

El protocolo empleado resultó exitoso, se lograron sintetizar cadenas de moléculas aromáticas de ≈ 17.8 Å de longitud y unir a FAD de forma estable. Los electrodos fueron funcionalizados con 4.29 pmoles de FAD que cubren el 70% del área del electrodo (Figura 35).

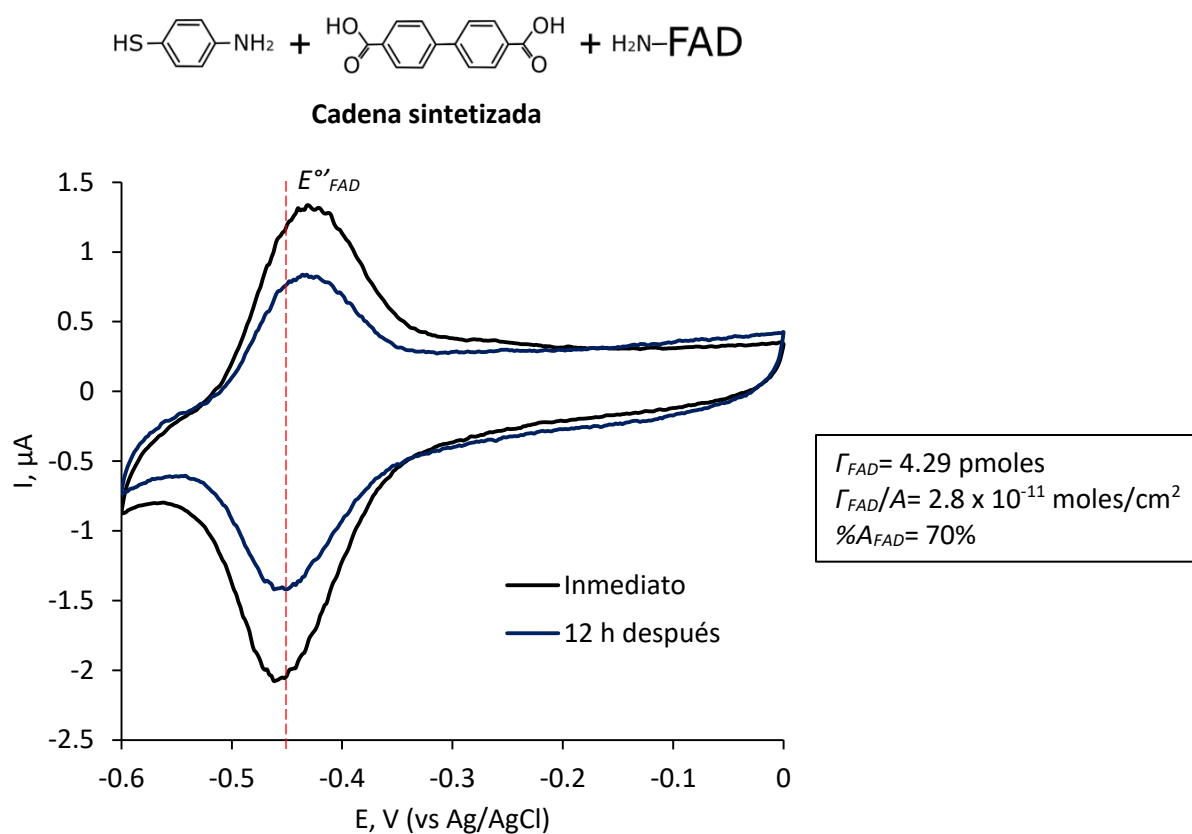


Figura 35. Ciclovoltogramas de electrodos funcionalizados con FAD evaluados inmediatamente después de la funcionalización y después de 12 h a 4°C. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 0.2$ V/s, ciclo 5.

La cantidad de FAD unida en los electrodos se encuentra muy cercana a lo reportado en trabajos donde flavoproteínas fueron reconstituidas sobre electrodos usados como sensores amperométricos (Vidal et al., 2004; Zayats et al., 2002; 2005).

No obstante, los electrodos no mostraron un aumento de corriente en alguno de los potenciales evaluados por ciclovoltametría al agregar glucosa al electrolito después de utilizar el protocolo de reconstitución de la apo-glucosa oxidasa (Figura 36).

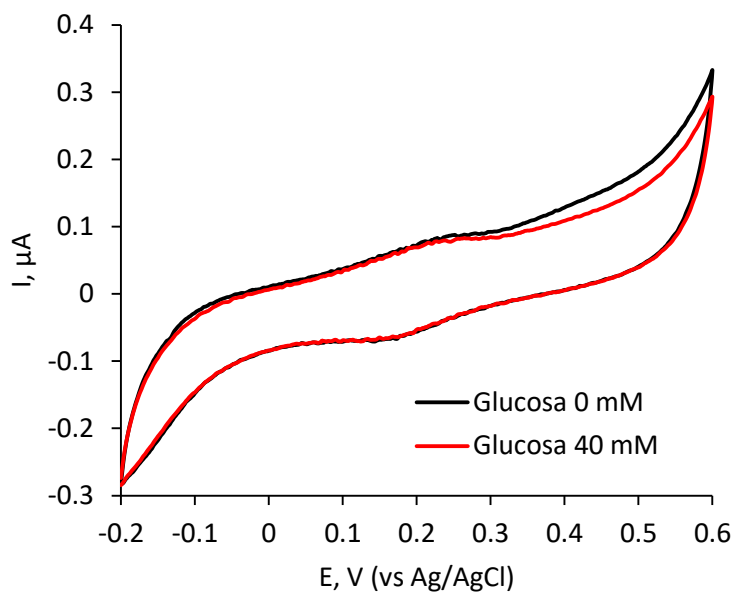


Figura 36. Ciclovoltagramas de electrodos de oro con glucosa oxidasa orientada molecularmente en ausencia (negra) y presencia (roja) de glucosa 40 mM. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 5$ mV/s, ciclo 5.

Sin embargo, se puede observar que FAD sigue unido al electrodo después del proceso de reconstitución de la glucosa oxidasa y la experimentación en presencia de glucosa (Figura 37).

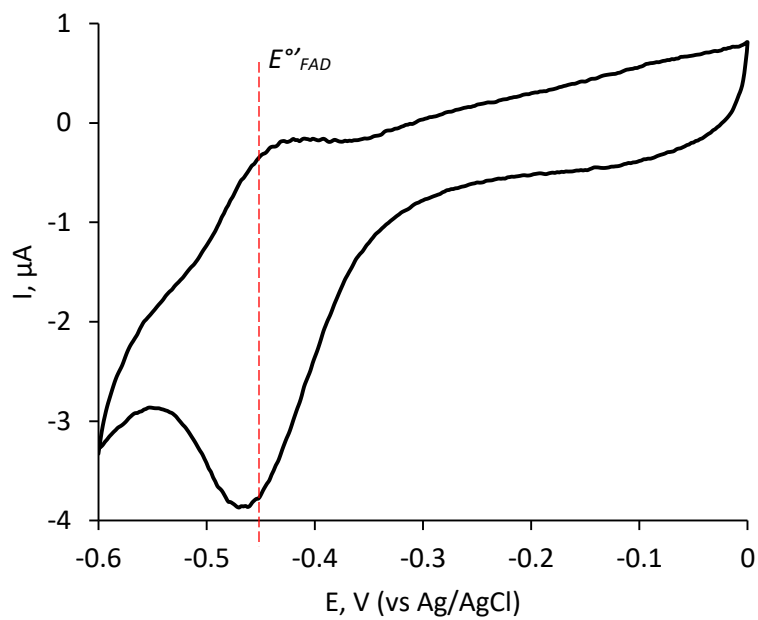


Figura 37. Ciclovoltagrama de electrodos funcionalizados con FAD después de la reconstitución de la glucosa oxidasa. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 0.2$ V/s, ciclo 5.

Se realizaron modificaciones *in silico* de FAD en la estructura tridimensional de la glucosa oxidasa utilizando el software PyMOL®. La Figura 38 muestra que la cadena sintetizada y unida a FAD permite que el grupo tiol del 4ATP quede expuesto en la superficie de la glucosa oxidasa después del proceso de reconstitución, sin embargo, el problema del impedimento estérico posiblemente no fue resuelto ya que la distancia a la que FAD se encuentra en el interior de la glucosa oxidasa es muy cercana a la longitud de la cadena sintetizada.

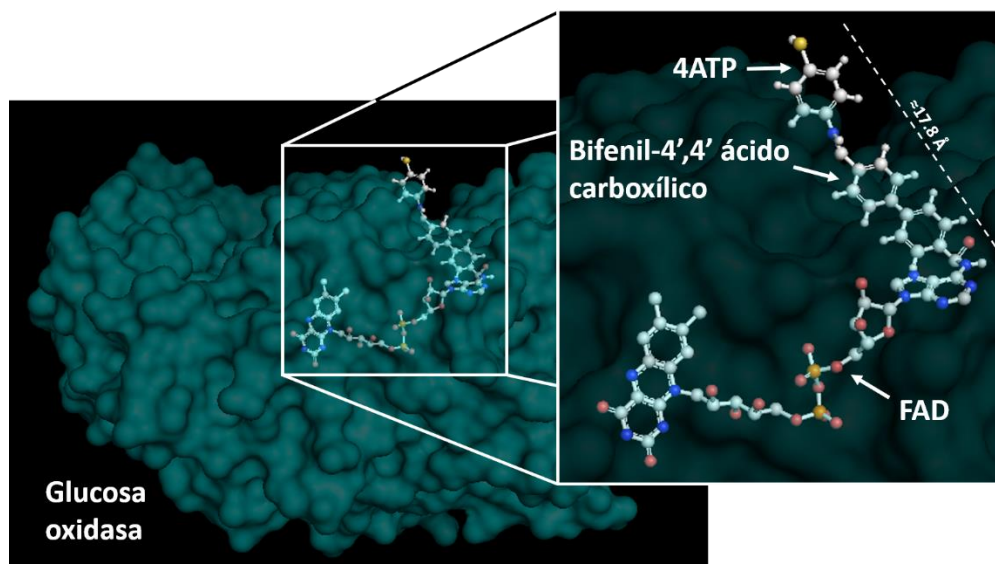


Figura 38. Estructura tridimensional del monómero de la glucosa oxidasa asociado a FAD modificado con bifencil-4',4' ácido carboxílico y 4ATP. Imágenes obtenidas con el software PyMOL v1.74 a partir del registro con código 1CF3 del Protein Data Bank.

Para descartar esta posibilidad se sintetizaron cadenas de mayor longitud utilizando el ácido 4-aminobenzoico, que puede unirse al bifencil-4',4' ácido carboxílico y luego a FAD, pero la longitud de la cadena sintetizada no puede ser controlada por la autopolimerización del ácido 4-aminobenzoico. Aun así, la unión de FAD fue posible, pero los electrodos no mostraron aumento de corriente en presencia de glucosa después de someterse al proceso de reconstitución de la glucosa oxidasa (Figura 39).

Al no obtener resultados favorables utilizando el ácido 4-aminobenzoico, se sintetizaron dos cadenas de mayor longitud utilizando las moléculas 4,4'-diaminobifenil y bifencil-4',4' ácido carboxílico en conjunto, de esta forma puede ser controlada la longitud de la cadena ya que las moléculas utilizadas no se autopolimerizan y las uniones se realizan en un proceso secuencial pero en pasos separados.

La primera cadena sintetizada constó de una molécula de 4,4'-diaminobifenil funcionalizada sobre 4AMB, posteriormente a ella se le unió el bifencil-4',4' ácido carboxílico y por último fue unido FAD. Este método de unión de FAD resultó exitoso logrando unir 1.4 pmoles, obteniendo una cadena de ≈ 24.6 Å (Figura 40).

Los electrodos funcionalizados con FAD fueron incubados una noche a 4°C en una solución de apo-glucosa oxidasa esperando que fuera reconstituida y unida a los electrodos orientadamente. Los ciclovoltagramas obtenidos de estos electrodos no muestran respuesta al agregar glucosa al buffer, por tanto la reconstitución de la glucosa oxidasa no fue exitosa (Figura 41). Al igual que en experimentos anteriores, FAD sigue unido al electrodos después del proceso de reconstitución y análisis en presencia de glucosa oxidasa, lo que corrobora la unión estable de FAD (Anexo 1).

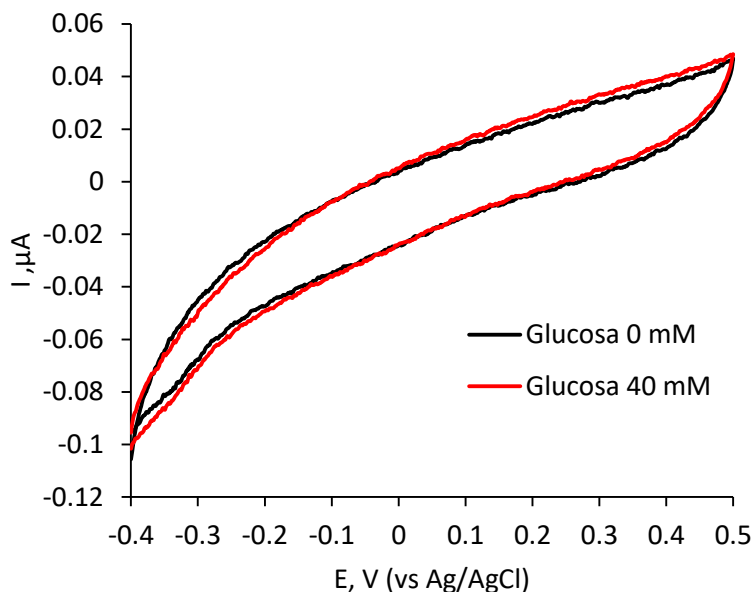


Figura 41. Ciclovoltagramas de electrodos de oro con glucosa oxidasa orientada molecularmente en ausencia (negra) y presencia (roja) de glucosa 40 mM. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 5 \text{ mV/s}$, ciclo 5.

La segunda cadena sintetizada, la cual fue la de mayor longitud en este trabajo ($\approx 35.1 \text{ \AA}$), se conformaba por dos moléculas de 4,4'-diaminobifenil y una molécula bifeníl-4',4' ácido carboxílico dispuestas de forma alternada previas a FAD (Figura 42). Se logró unir a los electrodos 2.24 pmoles de FAD obteniendo una señal estable a pesar de estar unido a una cadena de gran longitud (Figura 43). No obstante, los electrodos de nuevo no mostraron respuesta en presencia de glucosa después del proceso de reconstitución de la glucosa oxidasa (Figura 44) e igual que en experimentos anteriores FAD se mantuvo unido al electrodo después de los análisis (Anexo 2).

La serie de experimentos anteriores demuestran que la unión de FAD sobre los electrodos no es un problema, además, el método de síntesis de cadenas de moléculas aromáticas hidrofóbicas resulta efectivo en DMSO utilizando la química de EDC y NHS para la formación de enlaces amida. La reconstitución de la glucosa oxidasa en cambio no resultó exitosa, ninguno de los electrodos obtuvo

respuesta en presencia de glucosa a pesar de comprobar que en solución la glucosa oxidasa se reconstituye de forma eficiente perdiendo menos del 20% de su actividad. Por tanto se decidió modificar el protocolo de reconstitución de la glucosa oxidasa.

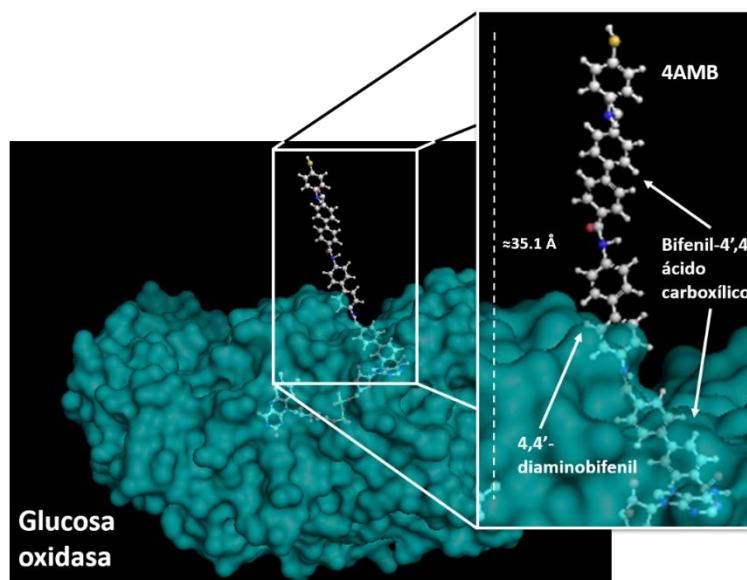


Figura 42. Estructura tridimensional del monómero de la glucosa oxidasa asociado a FAD modificado con bifenil-4',4' ácido carboxílico, 4,4'-diaminobifenil y 4AMB. Imágenes obtenidas con el software PyMOL v1.74 a partir del registro con código 1CF3 del Protein Data Bank.

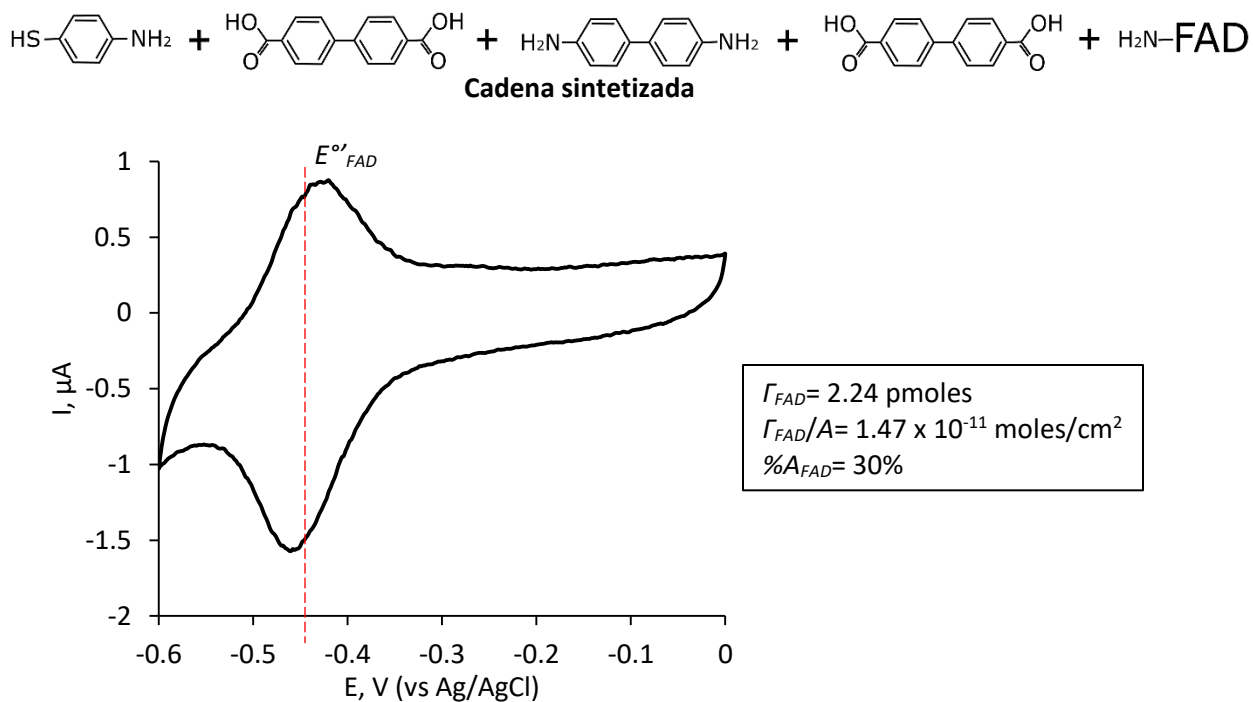


Figura 43. Ciclovoltagrama de electrodos funcionalizados con FAD. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 0.2$ V/s, ciclo 5.

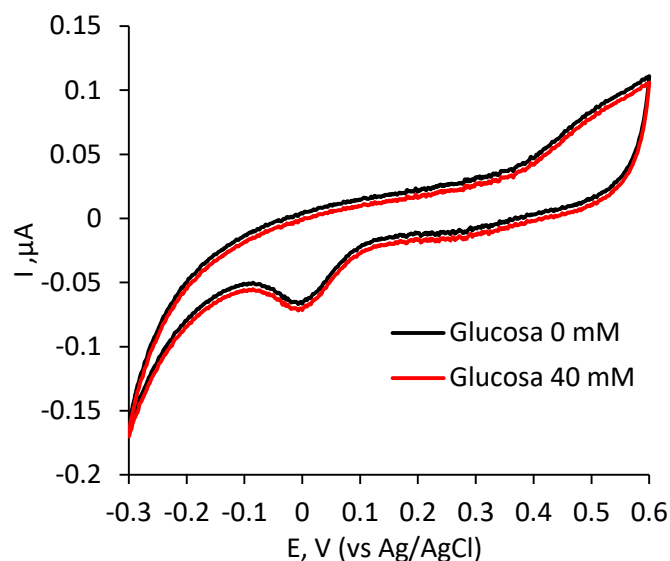


Figura 44. Ciclovoltagramas de electrodos de oro con glucosa oxidasa orientada molecularmente en ausencia (negra) y presencia (roja) de glucosa 40 mM. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 5$ mV/s, ciclo 5.

En primer lugar, los electrodos funcionalizados con FAD por medio del proceso descrito para la Figura 35, fueron sumergidos en una solución de apo-glucosa oxidasa por 1 h a temperatura ambiente, esto aumentaría la cinética de las moléculas promoviendo que la interacción de la apo-enzima con FAD aumentara. En segundo lugar, los electrodos fueron sumergidos en una solución de apo-glucosa oxidasa en buffer de fosfatos con un pH inicial de 3 que fue modificado hasta 6.5 agregando equivalentes de una solución concentrada de Na_2HPO_4 cada 10 min hasta cumplir 1 h y posteriormente dejando los electrodos en interacción por una noche, todo a 4°C . De esta forma se flexibilizaría la estructura de la apo-glucosa oxidasa permitiendo una mejor interacción de sitio activo con el FAD para promover la reconstitución. No obstante ninguno de los métodos empleados resultó satisfactorio (Anexo 3).

Como previamente fue discutido, el impedimento estérico debido a la longitud de las cadenas con que está unido FAD puede ser la razón por la que la apo-glucosa oxidasa no se reconstituye sobre los electrodos, sin embargo, la misma unión eficiente de FAD sobre el electrodo puede causar este mismo problema ya que, como fue mencionando previamente, FAD puede cubrir hasta un 70% del área del electrodo formando una superficie saturada que impida que la apo-glucosa oxidasa interactúe adecuadamente con la apo-glucosa oxidasa. Atendiendo esto, se unió FAD sobre cadenas sintetizadas por medio del proceso de la Figura 35 utilizando una concentración menor de FAD, pasando de 10 mM a 0.1 mM. Con esto se buscó que las moléculas de FAD unidas se encuentren más alejadas unas de otras.

De esta forma se unieron 0.81 pmoles de FAD, siendo este valor un orden menor en comparación con resultados previos, que indica un porcentaje de cobertura del 13% (Figura 45). A pesar de someter al electrodo al proceso de reconstitución de la apo-enzima, estos no mostraron respuesta (Figura 46).

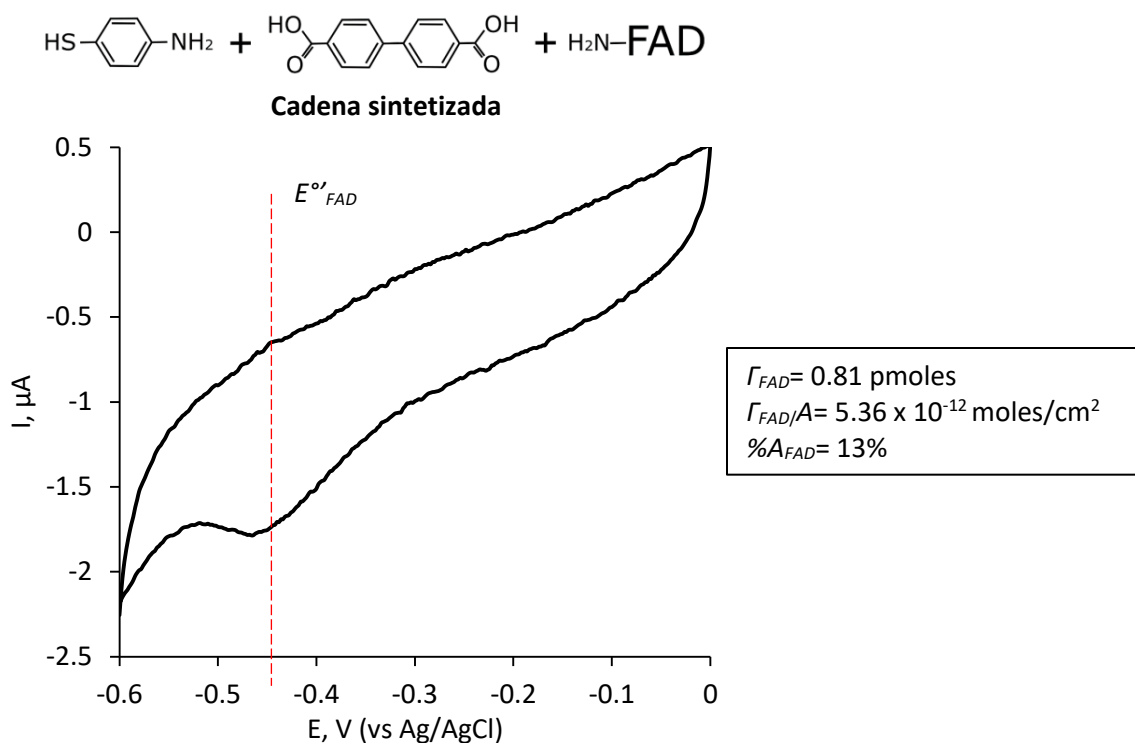


Figura 45. Ciclovoltagrama de electrodos funcionalizados con FAD. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 0.2$ V/s, ciclo 5.

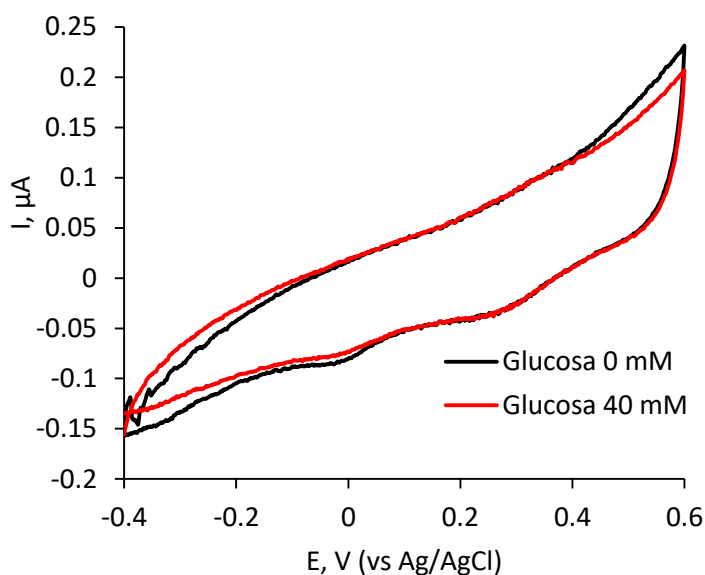


Figura 46. Ciclovoltagramas de electrodos de oro con glucosa oxidasa orientada molecularmente en ausencia (negra) y presencia (roja) de glucosa 40 mM. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 5$ mV/s, ciclo 5.

Al no obtener electrodos con una clara reconstitución de la glucosa oxidasa, se abordó el problema partiendo del protocolo de reconstitución de la apo-enzima en solución. Si el FAD modificado puede ser utilizado para reconstitución de la apo-glucosa oxidasa en solución, la holo-glucosa oxidasa resultante puede ser unida a los electrodos ya que el grupo tiol estaría expuesto en la superficie. La unión de grupos tiol en oro en condiciones acuosas ya ha sido reportada en sistemas que incluyen enzimas por lo que resulta una opción viable (Bonanni et al., 2003; Heering et al., 2004).

FAD fue modificado por medio de una reacción que contenía FAD 1 mM, bifeníl-4',4' ácido carboxílico 5 mM, 4ATP 5 mM, EDC y NHS 20 mM. La reacción se incubó por 4 h y se agregó una fracción de la solución resultante a una solución de apo-glucosa oxidasa para una relación molar 1:10 (GOx:FAD) que se dejó incubar por una noche a 4°C. Se cuantificó la actividad enzimática de la holo-glucosa oxidasa con FAD modificado en comparación con el FAD nativo. La Tabla 8 muestra que la glucosa oxidasa reconstituida con FAD modificado pierde el 31% de la actividad. La holo-enzima resultante fue incubada con electrodos de oro limpios por 1 h a temperatura ambiente. Después del proceso de reconstitución, los electrodos fueron evaluados en presencia de glucosa pero se observó respuesta al agregar glucosa.

Tabla 8. Actividad de la glucosa oxidasa tras reconstitución con FAD nativo y FAD modificado.

Enzima	Actividad enzimática (U/ml)	Actividad específica (U/mg)
Holo-Glucosa oxidasa (FAD nativo)	1.01×10^{-2}	15.51 ± 1.25
Holo-Glucosa oxidasa (FAD modificado)	6.99×10^{-3}	10.66 ± 0.84

Los múltiples trabajos de reconstitución de glucosa oxidasa sobre electrodos funcionalizados con FAD reportados por el grupo del Dr. Willner refieren que el proceso de transferencia de electrones resulta favorecido cuando los electrodos emulan las características naturales al proceso redox que se da en las enzimas (Zayats et al., 2002; Willner et al., 2009). En el caso de la glucosa oxidasa, la catálisis redox de FAD requiere de $2 e^-$, por lo que el uso de moléculas conectoras con la misma característica podría resultar en el favorecimiento de la transferencia de electrones superando una barrera de incompatibilidad con las moléculas que previamente fueron utilizadas en este trabajo.

Al igual que lo reportado por Zayats y colaboradores en 2002, se utilizó al PQQ como intermediario de conexión de FAD. Este cofactor de oxidoreductasas como la glucosa y alcohol deshidrogenasa contiene tres grupos carboxilo que pueden ser unidos fácilmente a grupos amino.

Se sintetizaron dos cadenas de longitudes diferentes utilizando 4ATP como molécula inicial. La primera cadena se sintetizó uniendo PQQ al 4ATP y posteriormente FAD. Con este arreglo de moléculas se obtuvo un ciclovoltagrama con picos dobles correspondientes a los E° de los dos cofactores. Se unieron 2.99 pmoles de PQQ y 0.93 pmoles de FAD obteniendo una relación molar de 1:0.3 (PQQ:FAD), la cual es muy cercana a lo reportado por Zayats y colaboradores (Figura 47A). La segunda cadena sintetizada fue de mayor longitud ya que utilizó al ácido 4-aminobenzoico como molécula intermedia entre el PQQ y FAD. De esta forma se unieron 5.06 pmoles de PQQ y 1.25 pmoles de FAD lo que significa una relación molar de 1:0.24 (PQQ:FAD) (Figura 47B), que es similar a lo obtenido previamente.

A pesar de comprobar que los electrodos funcionalizados presentaban cofactores electroquímicamente activos y estables ya que se mantuvieron unidos después del proceso de reconstitución de glucosa oxidasa y análisis (Anexo 4), no se observó aumento en la corriente durante las ciclovoltametrías después de agregar glucosa al electrolito (Figura 48).

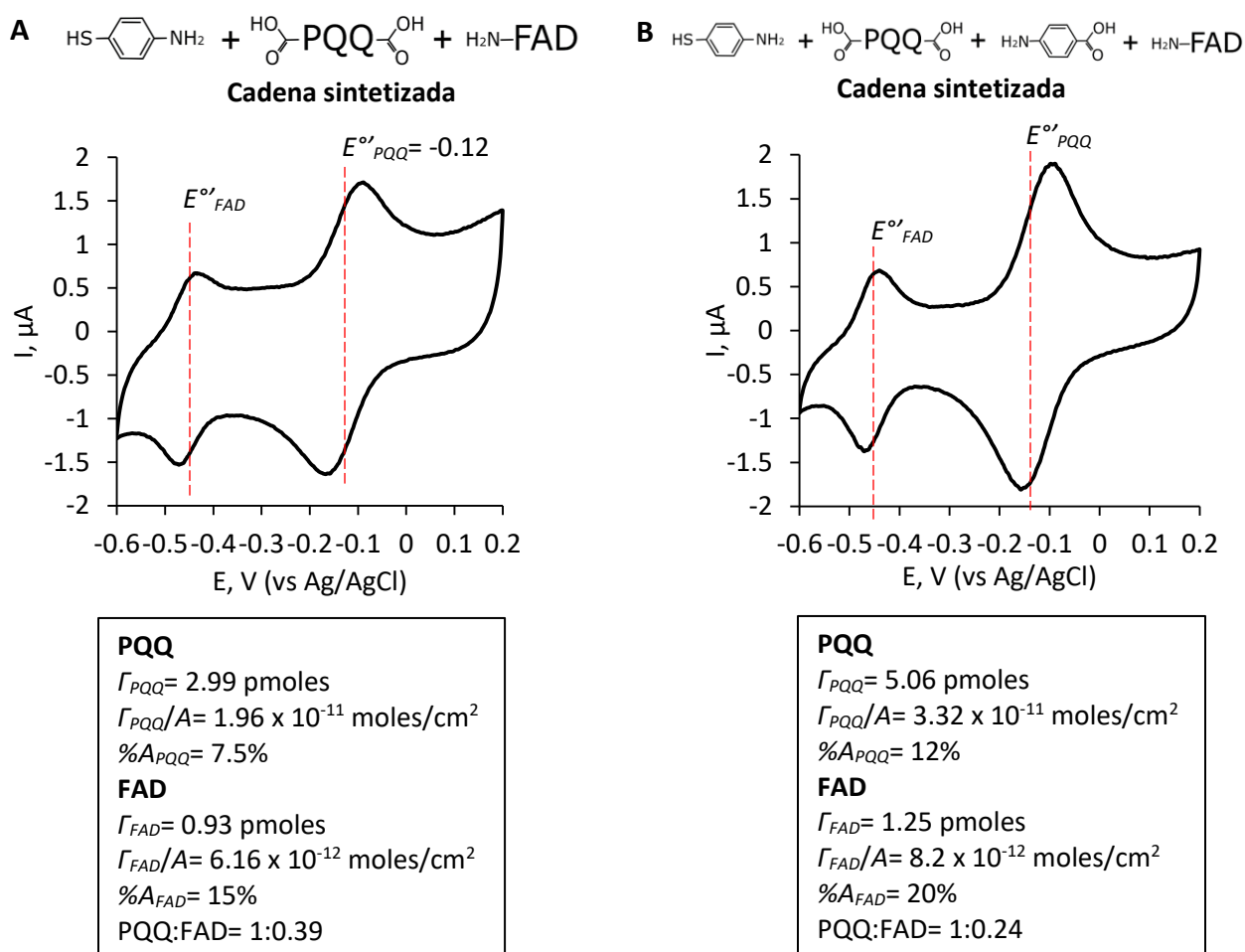


Figura 47. Ciclovoltagramas de electrodos de oro funcionalizados con PQQ y FAD. A) Cadena sintetizada de menor longitud. B) Cadena sintetizada de mayor longitud. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 0.2$ V/s, ciclo 5.

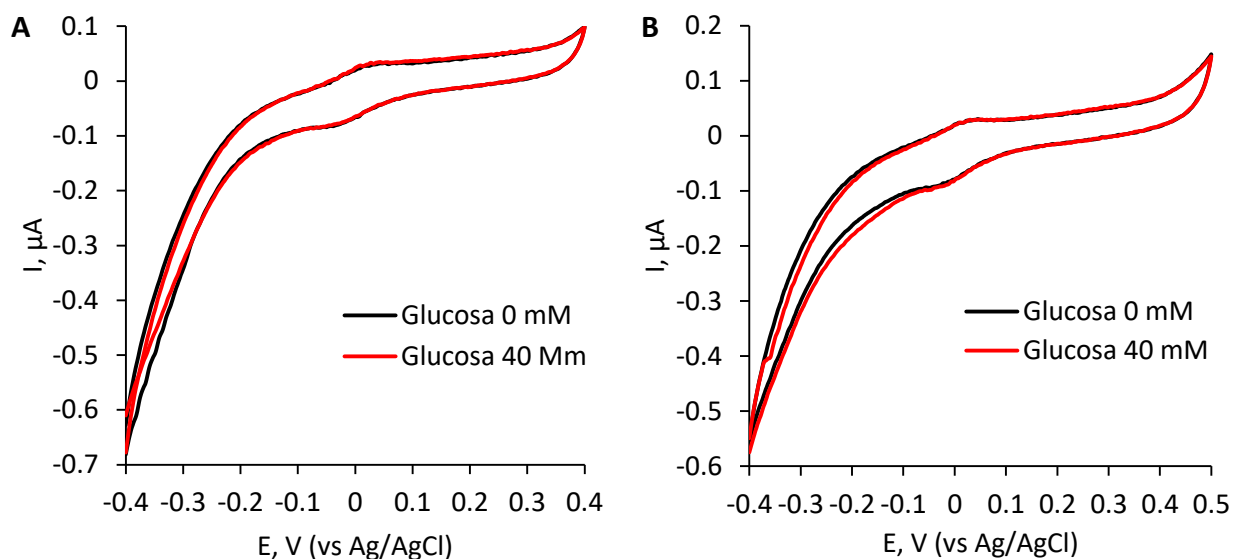


Figura 48. Ciclovoltogramas de electrodos de oro funcionalizados con PQQ y FAD con glucosa oxidasa orientada molecularmente en ausencia (negra) y presencia (roja) de glucosa 40 mM. A) Cadena sintetizada de menor longitud. B) Cadena sintetizada de mayor longitud. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 0.2$ V/s, ciclo 5.

Como última prueba de unión de FAD atacando su grupo amino, se funcionalizaron electrodos de oro con C-MWCNTs y posteriormente se unió FAD covalentemente. Estos nanomateriales poseen una alta conductividad y una longitud promedio de 50 nm, por lo que sirven como cables para conectar la glucosa oxidasa y el electrodo. El uso de CNTs en la reconstitución apo-enzimas con fines electroquímicos ya ha sido abordado por el grupo del Dr. Willner obteniendo resultados favorables (Patolsky et al., 2004; Yan et al., 2007).

Los MWCNTs fueron oxidados al sumergirse en una solución de ácido sulfúrico-ácido nítrico en una relación 1:3 a 80°C con reflujo. Con este procedimiento se producen grupos carboxilo en la superficie de los CNTs. Se unieron los C-MWCNTs a electrodos de oro funcionalizados previamente con 4ATP dejándolos en interacción con EDC y NHS 20 mM por 1 h a temperatura ambiente. Los electrodos resultantes fueron lavados y sumergidos en una solución de FAD, EDC y NHS para ser funcionalizados con el cofactor por medio de un enlace amida entre el grupo amino de FAD y los grupos carboxilo libres de los C-MWCNTs.

La unión de FAD sobre los electrodos funcionalizados con C-MWCNTs funcionó, se logró unir 1.45 pmoles de FAD (Figura 49), sin embargo, los electrodos no mostraron actividad al momento de evaluarlos en presencia de glucosa (Figura 50). También se comprobó que FAD siguió unido a los electrodos después del proceso de reconstitución y análisis (Anexo 5).

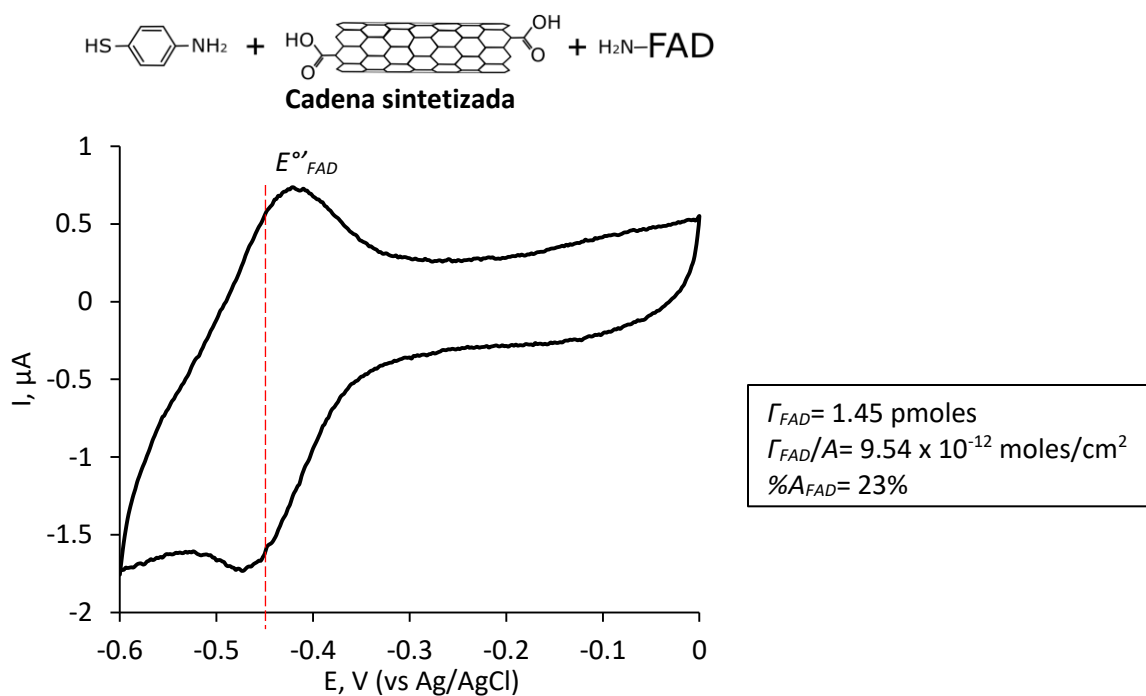


Figura 49. Ciclovoltagrama de electrodos funcionalizados con C-MWCNTs y FAD. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 0.2 \text{ V/s}$, ciclo 5.

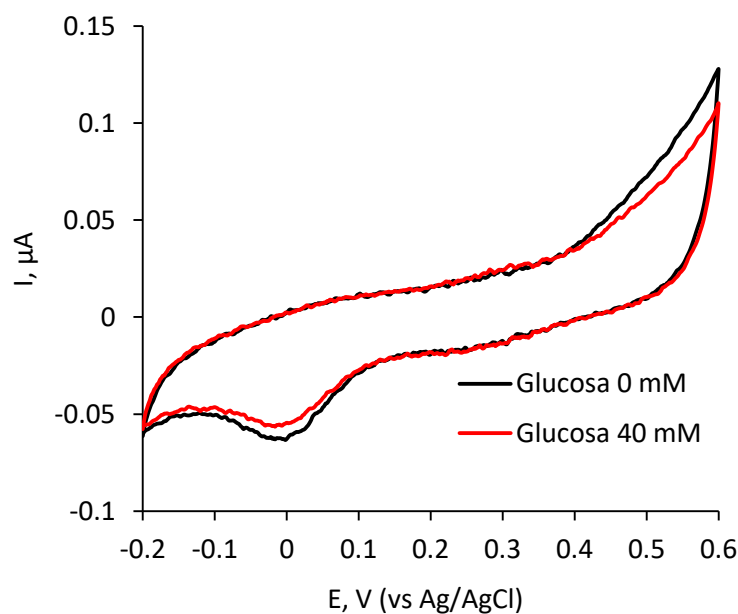


Figura 50. Ciclovoltagramas de electrodos de oro con glucosa oxidasa orientada molecularmente en ausencia (negra) y presencia (roja) de glucosa 40 mM. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 5 \text{ mV/s}$, ciclo 5.

Los experimentos anteriores tuvieron como objetivo utilizar el grupo amino del FAD para unir el cofactor. Este grupo reactivo fue elegido en primer término porque es fácil de unir, su unión resultante por enlace

amida es covalente, por tanto es muy estable y por último porque los modelos cristalográficos de la glucosa oxidasa muestra que es el grupo más expuesto a la superficie de la enzima (Figura 51).

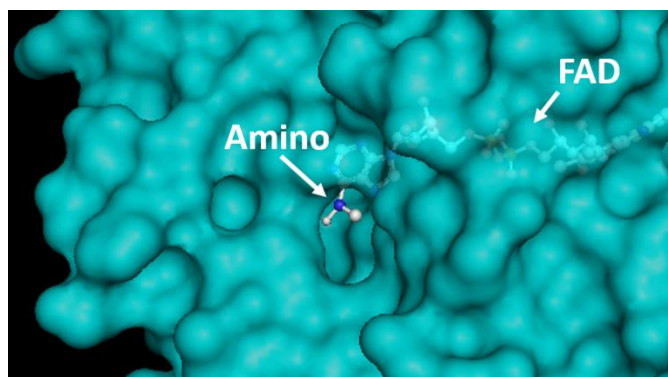


Figura 51. Estructura tridimensional del monómero de la glucosa oxidasa asociado a FAD. Las flechas muestran el FAD embebido en la enzima y su grupo amino, el cual se muestra expuesto por una cavidad en la superficie de la estructura. Imágenes obtenidas con el software PyMOL v1.74 a partir del registro con código 1CF3 del Protein Data Bank.

No obstante todos los trabajos que reportan la unión de FAD por medio del grupo amino no utilizaron el FAD nativo, en su lugar utilizaron versiones de FAD modificadas con un amino que se prolonga dos o seis carbonos a partir del N6 (amino nativo) de FAD (Xiao et al., 2003; Katz et al., 2004; Yehezkeli et al., 2010). Esto le provee mayor flexibilidad a FAD al momento de estar unido a los electrodos lo que permite que la apo-glucosa oxidasa se pliegue con mayor eficiencia en estos electrodos en comparación con las cadenas construidas en este trabajo.

FAD también puede ser unido por medio de la molécula de ribosa que contiene, ya que cuenta con dos grupos hidroxilo que se ha demostrado su unión a ácido borónico. Con este método se han fabricado electrodos enzimáticos por reconstitución de la apo-glucosa oxidasa (Zayats et al., 2002; Şenel et al., 2013), lo que indica que la unión de FAD por la ribosa no inhibe la reconstitución a pesar de que los modelos cristalográficos de la glucosa oxidasa muestran que los grupos hidroxilo están menos expuestos en comparación con el grupo amino.

Atacando ahora a la ribosa de FAD, se sintetizaron dos cadenas de diferente longitud utilizando el 4-carboxifenil ácido borónico como molécula. La primera cadena sintetizada requirió de la funcionalización de electrodos de oro con 4ATP, posteriormente se unió el 4-carboxifenil ácido borónico utilizando EDC y NHS. La segunda cadena que fue sintetizada utilizó como molécula inicial a 4AMB, al cual se le unió una

molécula de 4,4'-diaminobifenil y por último se unió el 4-carboxifenil ácido borónico. Los electrodos resultantes se dejaron en interacción con FAD 10 mM por una noche a temperatura ambiente.

Se logró unir 0.12 pmoles y 0.22 pmoles de FAD en las cadenas de menor y mayor longitud sintetizadas, respectivamente (Figura 52). Estos electrodos fueron sumergidos en una solución de apo-glucosa oxidasa que se dejó incubar por una noche a temperatura a 4°C. A pesar de haber unido FAD con un método nuevo, los electrodos no presentaron aumento de corriente en presencia de glucosa al ser evaluado por medio de ciclovoltametrías (Figura 53).

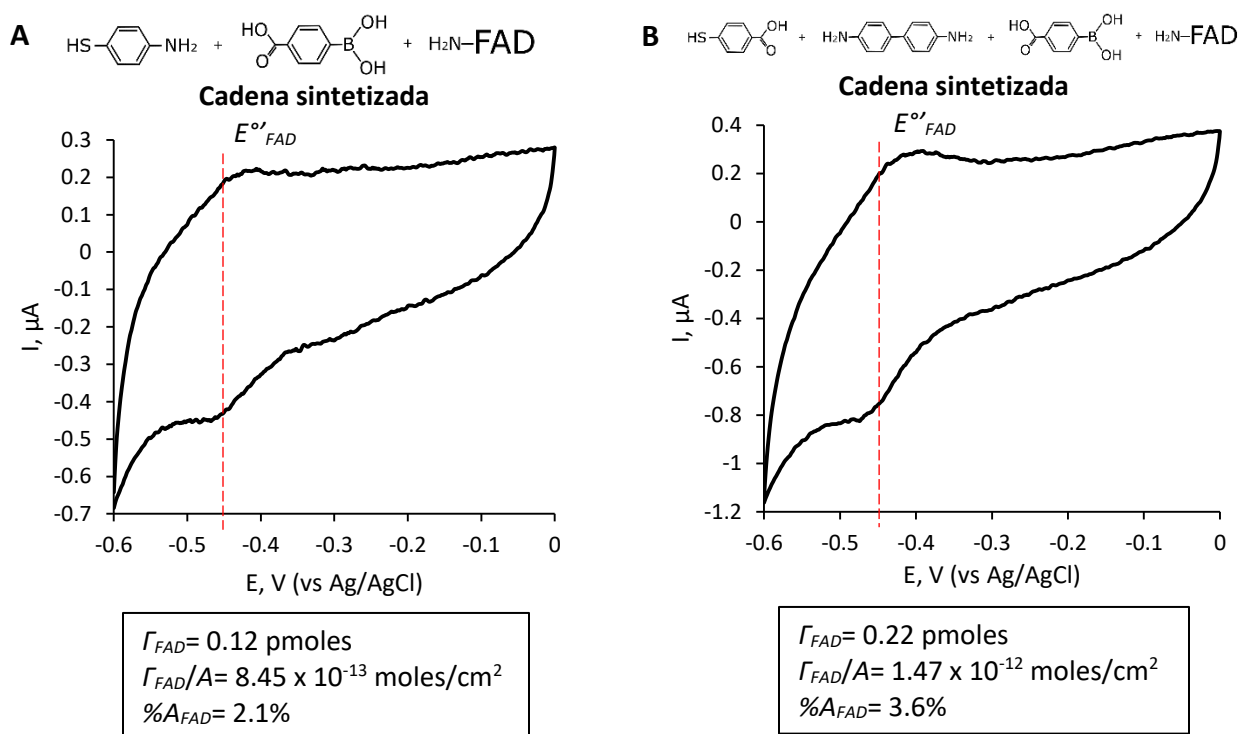


Figura 52. Ciclovoltagramas de electrodos de oro funcionalizados con FAD. A) Cadena sintetizada de menor longitud. B) Cadena sintetizada de mayor longitud. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 0.2$ V/s, ciclo 5.

La serie de experimentos anteriores tuvieron como objetivo unir la glucosa oxidasa racionalmente a electrodos de oro por medio de su reconstitución para obtener una conexión directa con su sitio redox, con esto se obtendrían electrodos enzimáticos con un potencial de respuesta teóricamente cercano al potencial de oxidación del cofactor FAD en presencia de glucosa. La unión racional de la glucosa oxidasa tendría grandes ventajas con respecto a otros métodos al momento de construir una celda de combustible completa, esto porque la diferencia de potencial de los electrodos con glucosa oxidasa en comparación con electrodos catódicos de lacasa sería mayor y la celda generaría mayor potencia. Además, la unión orientada de las enzimas promueve que todas las enzimas que estén unidas al electrodo sean

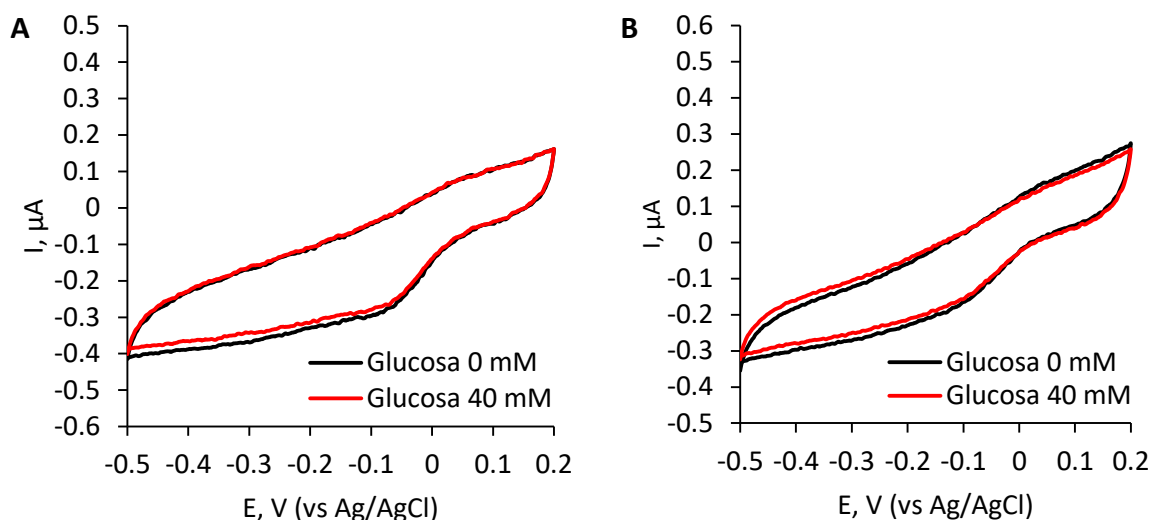


Figura 53. Ciclovoltogramas de electrodos de oro funcionalizados con FAD con glucosa oxidasa orientada molecularmente en ausencia (negra) y presencia (roja) de glucosa 40 mM. A) Cadena sintetizada de menor longitud. B) Cadena sintetizada de mayor longitud. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 0.2$ V/s, ciclo 5.

electroquímicamente activas y la transferencia de electrones no requiera de intermediarios que proveen resistencia eléctrica al sistema y por tanto disminuyan la eficiencia de la celda.

Es claro que la unión de FAD electroquímicamente activo sobre la superficie de los electrodos no fue un reto que fue superado satisfactoriamente. A diferencia de esto, la reconstitución de la apo-glucosa oxidasa no tuvo éxito en ninguno de los experimentos llevados a cabo. Hasta el momento el grupo de Dr. Willner, quien propuso y demostró que es posible la unión orientada de la glucosa oxidasa por reconstitución, ha sido el único en utilizar este método, el cual tuvo su auge entre los años 1999 y 2005 donde fueron fabricados un número considerable de electrodos anódicos con aplicaciones como sensores amperométricos principalmente (Zayats et al., 2008). Sin embargo, las celdas de combustible construidas con los electrodos fabricados no han superado los $100 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (Tabla 4).

3.4.2 Adsorción electrostática de glucosa oxidasa

La adsorción de enzimas oxidoreductasas en electrodos es un método común para el análisis de los sitios redox de las enzimas o de su comportamiento electroquímico en presencia de sus sustratos. Este método es de gran utilidad cuando se exploran por primera vez las características de una enzima en un sistema electroquímico, además es muy sencillo de implementar. Dentro del conjunto de oxidoreductasas que han sido estudiadas por medio de técnicas electroquímicas, se ha descubierto que no todas las enzimas presentan DET entre los sitios catalíticos y los electrodos utilizados.

En el caso de la glucosa oxidasa no se sabe con certeza si esta puede llevar a cabo DET ya que su sitio redox, dependiente del cofactor FAD, se encuentra embebido a $\approx 18 \text{ \AA}$ de distancia de la superficie de la enzima tomando en cuenta los modelos cristalográficos disponibles, además la proteína está glicosilada, lo que le provee una cubierta aislante. Se ha comprobado por medio de cálculos teóricos y modelos cristalográficos de proteínas que la distancia mínima a la cual se pueden transferir electrones por medio de efecto túnel es menor a 15 \AA (Page et al., 1999; Munro et al., 2002; Luong et al., 2016; Milton y Minter, 2017), además la transferencia de electrones decae exponencialmente al acercarse a este valor límite (Luong et al., 2016).

Se decidió explorar la adsorción de la glucosa oxidasa para analizar su capacidad de establecer DET con electrodos de oro con una mayor porosidad. Se utilizaron electrodos oro con un pulido mecánico intermedio (solo alúmina de 1 \mu m) y reducción electroquímica hasta llevarlos a un Fr de 2. La adsorción de la glucosa oxidasa se realizó por medio de unión electrostática. Los electrodos de oro fueron polarizados sometiéndolos a una serie de voltametrías lineales oxidativas con el fin de polarizar positivamente el electrodo. El proceso de polarización se llevó a cabo en una solución de glucosa oxidasa a una concentración 5 mg/ml en buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3. La glucosa oxidasa tiene una carga global negativa a pH 7.3 ya que su punto isoeléctrico es de ≈ 4.5 , por lo que en estas condiciones se adsorbería en los electrodos de oro. Como esta unión no es permanente, los electrodos de oro fueron funcionalizados con 4AMB y BSA previo a su polarización en presencia de glucosa oxidasa. Esto se realizó utilizando una solución 0.1 mM de 4AMB para propiciar una funcionalización parcial de los electrodos, posteriormente se unió BSA utilizando EDC y NHS. Después del proceso de polarización ya descrito se entrecruzó el complejo formado utilizando nuevamente EDC y NHS (Figura 54).

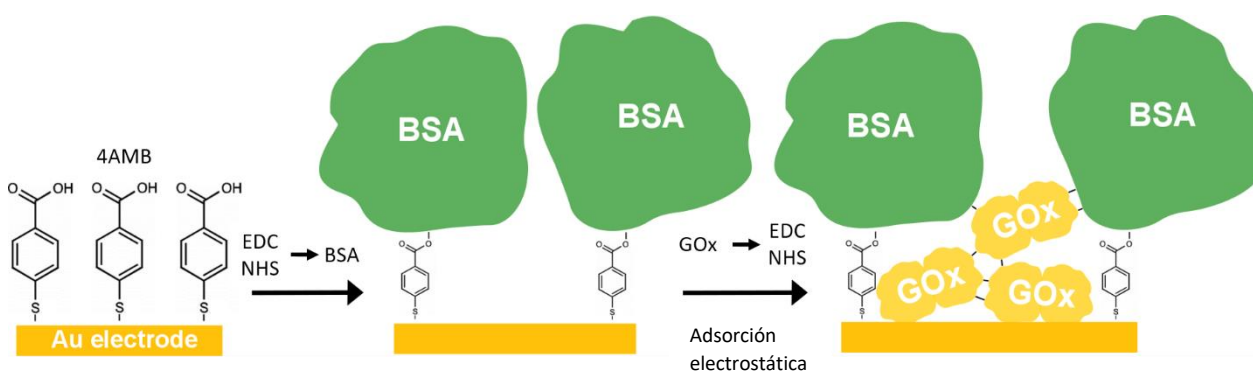


Figura 54. Proceso de fabricación del electrodo anódico con glucosa oxidasa unida por adsorción electrostática.

Los electrodos fabricados utilizando este método presentaron respuesta en presencia de glucosa a un potencial inicial de ≈ -0.35 V (vs Ag/AgCl) lo cual es favorable ya que se encuentra cercano al potencial redox de FAD (Figura 55).

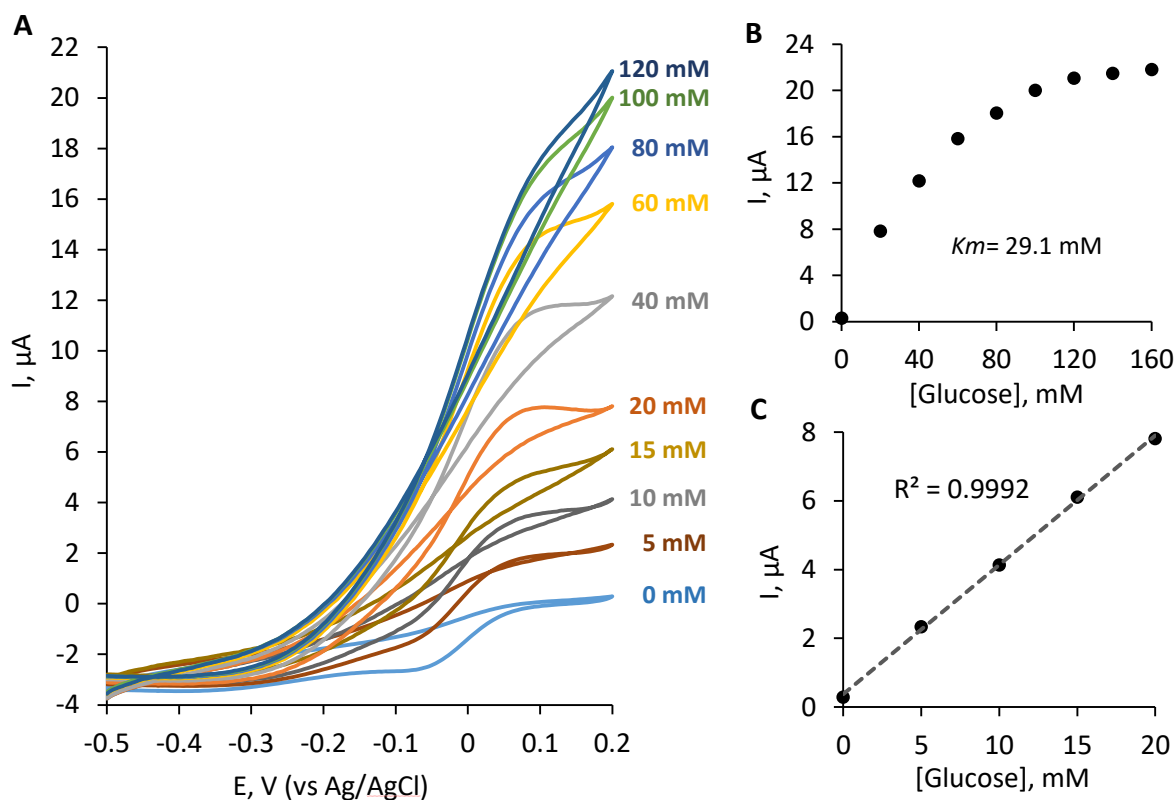


Figura 55. A) Ciclovoltogramas correspondientes a la oxidación de la glucosa por el electrodo con glucosa oxidasa adsorbida. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.4, $v = 5$ mV s^{-1} . B) Curva de calibración para diferentes concentraciones de glucosa. $E = 0.2$ V. C) Respuesta del electrodo en concentraciones fisiológicas humanas de glucosa. $E = 0.2$ V.

Con el fin de saber si la respuesta del electrodo en presencia de glucosa correspondía a la transferencia de electrones de la enzima y no a un efecto del mismo electrodo o la oxidación de algún componente residual de la reacción enzimática, como el H_2O_2 , se realizaron los controles descritos en la Tabla 9.

Desafortunadamente, la oxidación de glucosa en los electrodos es independiente de la presencia de glucosa oxidasa ya que los electrodos que fueron sometidos a una serie de voltametrías lineales tuvieron respuesta similar a los electrodos fabricados previamente (Figura 56). El oro es un metal poco reactivo cuando se encuentra en su forma metálica, sin embargo, existen reportes de la oxidación de azúcares utilizando electrodos de oro con una capa de Au_2O_3 y AuO_2 , la cual sí es reactiva en presencia de una gran cantidad de moléculas orgánicas (Pasta et al., 2010). No obstante, la oxidación de glucosa se establece a potenciales lejanos a lo obtenido en estos electrodos.

Tabla 9. Controles implementados para el electrodo anódico con glucosa oxidasa adsorbida en electrodos de oro.

Características del electrodo	Evaluación	Respuesta
Con GOx adsorbida electrostáticamente*	Buffer con glucosa 20 mM saturado con N ₂ .	Sí
Con GOx adsorbida electrostáticamente*	Buffer con H ₂ O ₂ 0.1 mM.	No
GOx adsorbida sin el proceso de polarización de los electrodos*	Buffer con glucosa 20 mM.	No
Electrodo de oro limpios sin el proceso de polarización	Buffer con glucosa 20 mM.	No
Electrodo de oro con el proceso de polarización sin presencia de GOx	Buffer con glucosa 20 mM.	Sí

*Estos electrodos fueron funcionalizados previamente con 4AMB y BSA como fue descrito previamente.

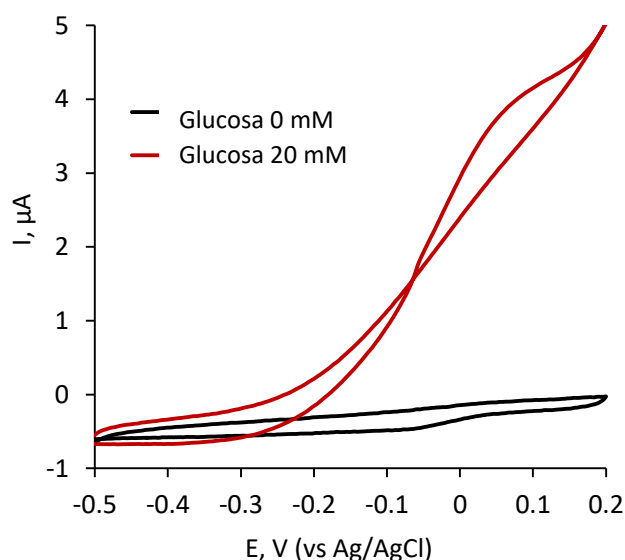


Figura 56. Ciclovoltagramas de electrodos de oro con glucosa oxidasa adsorbida en ausencia (negra) y presencia (roja) de glucosa 20 mM. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 5$ mV/s, ciclo 5.

La elección del intervalo de potenciales a los que fueron sometidos los electrodos durante las voltametrías lineales en presencia de glucosa oxidasa fue definida en función de los intervalos establecidos en el diagrama de Pourbaix para un sistema Au-H₂O y evitar la formación de óxidos de oro que interfirieran con la oxidación de la glucosa (Anexo 6). A pesar de tomar estas medidas, el electrodo de oro fue el responsable de la oxidación de la glucosa a un potencial jamás reportado, además la constante de Michaelis-Menten (K_m) resultó un orden mayor a la K_m de la glucosa oxidasa, lo que significa que el proceso de adsorción afecta la estructura de la enzima disminuyendo su afinidad por la glucosa o que simplemente la enzima no está involucrada en la respuesta observada en las voltametrías cíclicas. A pesar

de los resultados obtenidos, se construyó una celda combustible híbrida ánodo-oro cátodo-lacasa obteniendo un OCV de 0.78 V y una densidad de potencia máxima de $54.26 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. Los detalles de esta celda se describen en el anexo 7.

La adsorción de glucosa oxidasa en electrodos porosos ha sido una técnica poco utilizada por resultar complicada la obtención de DET con esta enzima. Du Toit y colaboradores reportaron en 2014 la fabricación de un electrodo anódico compuesto por oro altamente poroso el cual fue polarizado en presencia de glucosa oxidasa, un método similar al utilizado en este trabajo. Los electrodos que fabricaron presentaron una respuesta en presencia de glucosa a potenciales mayores 0.4 V (vs SCE), el cual es un potencial muy lejano al E° de FAD, no obstante la K_m que obtuvieron fue 6.3 mM pero no mantuvieron una respuesta estable ya que a las 24 h de su fabricación perdieron $\approx 80\%$ de su actividad. Este trabajo reporta los controles adecuados para corroborar que efectivamente la GOx es la responsable de la oxidación de la glucosa.

Inspirado por la unión electrostática, el grupo del Dr. Cai en 2009 fabricó un electrodo anódico funcionalizando platino con polianilina utilizando óxido de aluminio con nanoconductos como plantilla. El resultado del proceso de polimerización derivó en la formación de nanotubos de anilina altamente ordenados en la superficie del electrodo de platino. La glucosa oxidasa fue adsorbida eficientemente en los nanotubos al proveer una carga positiva la anilina en condiciones de pH 5.5. Los ciclovoltogramas reportados en este trabajo muestran picos de redox correspondientes a FAD y un aumento de corriente en el pico de oxidación al agregar glucosa obteniendo una K_m de 2.3 mM (Figura 57). Este trabajo ha sido el único que ha comprobado contundentemente la DET entre la glucosa oxidasa nativa y un electrodo a un potencial correspondiente a FAD sin su unión orientada.

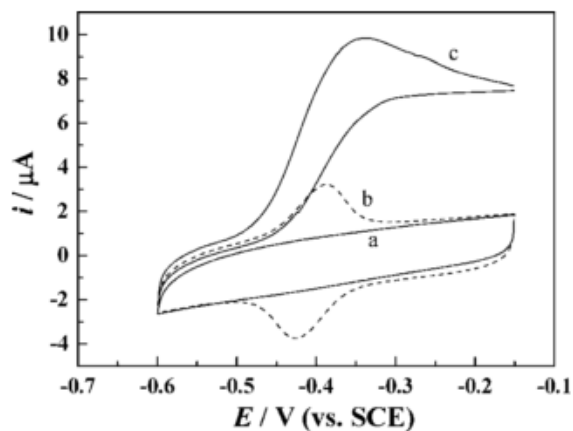


Figura 57. Ciclovoltagramas de un ánodo de platino sin (a) y con glucosa oxidada (b) adsorbida en presencia de glucosa 2 mM. Buffer de fosfatos 0.1 M pH 5.5, $v = 10 \text{ mV/s}$. Modificado de Wang et al., 2009.

3.4.3 Adsorción de glucosa oxidasa en CNTs

En la literatura existen múltiples reportes del uso de nanomateriales conductores a base de carbono, tales como los MWCNTs, SWCNTs y el grafeno, en conjunto con enzimas utilizados como biosensores. La glucosa oxidasa es la enzima más utilizada en este tipo de electrodos, la gran mayoría de los electrodos anódicos fabricados no requirieron de la unión de la enzima, sino que esta solo es adsorbida en la red tridimensional formada por los nanomateriales, por lo que su construcción es relativamente fácil (Cai y Chen, 2004; Yang et al., 2008; Kang et al., 2009; Le Goff et al., 2011; Holzinger et al., 2012; Zebda et al., 2013).

Se decidió construir electrodos anódicos utilizando SWCNTs para evaluar la actividad de la glucosa oxidasa. Para esto se depositaron en electrodos de oro limpios 20 μl de una solución de SWCNTs 5 mg/ml en H_2O , posteriormente dejó consolidar el depósito calentando el electrodo en un horno a 60°C por 30 min. Posteriormente los electrodos fueron sumergidos en una solución 10 mg/ml de glucosa oxidasa por 30 min para adsorber la enzima en la red de SWCNTs. Por último, se agregó quitosano 0.2% y glutaraldehído 10 mM para formar una cubierta que impidiera la pérdida de la enzima por difusión.

Los electrodos fabricados mostraron picos redox correspondientes a FAD (Figura 58). Sin embargo, al realizar pruebas de respuesta de los electrodos en presencia de glucosa no se observó aumento de corriente en los potenciales evaluados (Figura 59).

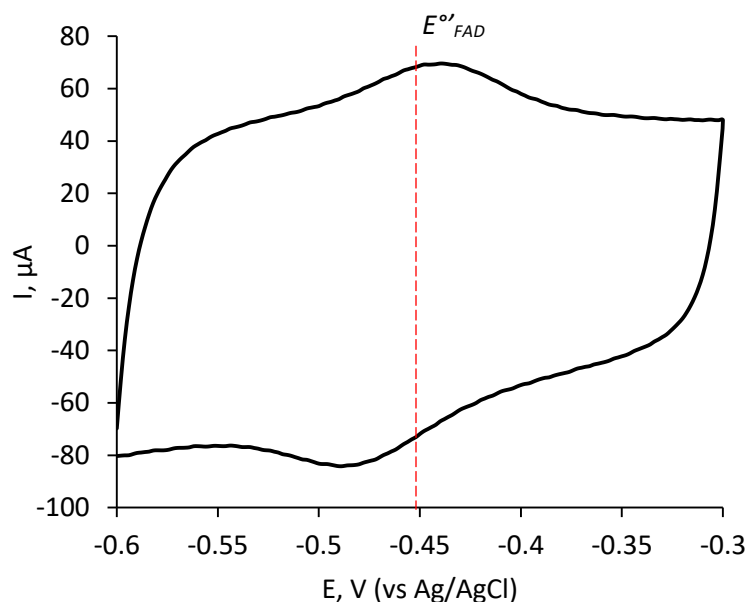


Figura 58. Ciclovoltograma de electrodos de oro con un depósito de SWCNTs y glucosa oxidasa adsorbida. Buffer de fosfato 0.1 M pH 7.3, $v = 0.2 \text{ V/s}$, ciclo 5.

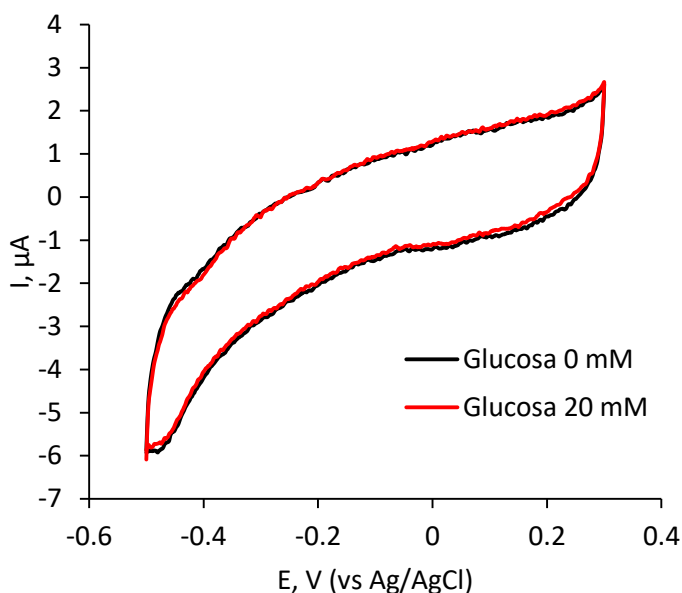


Figura 59. Ciclovoltogramas de electrodos de oro con un depósito de SWCNTs y glucosa oxidasa adsorbida en ausencia (negra) y presencia (roja) de glucosa 20 mM. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 5$ mV/s, ciclo 5.

Estos resultados son contradictorios ya que, si los electrodos muestran una respuesta correspondiente a FAD, los SWCNTs están en contacto o lo suficientemente cerca del sitio redox de la glucosa oxidasa para que exista DET y por tanto aumento del pico oxidativo en presencia de glucosa. Estos resultados han sido reportados previamente por otros autores donde muestran que se requiere de un mediador para obtener una señal en presencia de glucosa a pesar de obtener una señal correspondiente a FAD (Cai y Chen, 2004).

Un estudio reciente realizado por Bartlett y colaboradores ha abordado este problema comúnmente reportado en electrodos en donde se emplea glucosa oxidasa absorbida en CNTs y grafeno. Estos autores realizaron una evaluación de la glucosa oxidasa purificada y vendida por las principales empresas reportadas en los estudios realizados, demostrando que los picos redox observados correspondientes a FAD no demuestran una conexión directa entre las enzimas y los electrodos, en cambio estos picos corresponden a FAD procedente de enzimas que se desnaturalizaron o del mismo proceso de purificación. Este estudio refuta las conclusiones de una gran cantidad de publicaciones en donde se emplean nanomateriales para facilitar la conducción de electrones entre la glucosa oxidasa y los electrodos sin el uso de un mediador (Bartlett y Al-Lolage, 2017; Milton y Minteer, 2017).

Claramente se puede concluir que es sumamente complicado establecer DET en la glucosa oxidasa. El método más eficiente que se ha descrito hasta hoy es la unión orientada de la enzima por medio de su

cofactor FAD, sin embargo, este proceso de unión requiere una serie de pasos que afectan la actividad de la enzima, tal como la generación de apo-enzimas, además los electrodos fabricados no muestran los resultados esperados para electrodos de estas características en términos de densidad de corriente en comparación con electrodos que utilizan mediadores. A pesar del antecedente del Dr. Cai, donde es clara la DET de la glucosa oxidasa con nanotubos de polianilina, la gran mayoría de trabajos donde la enzima es adsorbida demuestran lo contrario.

Muchas oxidorectasas dependientes de cobre como la lacasa y la bilirrubina oxidasa, poseen su sitio de unión a sustrato cerca de la superficie, lo que permite utilizar nanomateriales como los CNTs para facilitar la conducción de electrones desde el electrodo hacia estas enzimas, en cambio la glucosa oxidasa no posee esta característica por lo que la DET por efecto túnel no sucede (Figura 60). Solo realizando un proceso de deglicocilación de la glucosa oxidasa se ha obtenido una respuesta clara al ser absorbida en electrodos, pero la eficiencia es sumamente baja (Courjean et al., 2009; PrévotEAU et al., 2010).

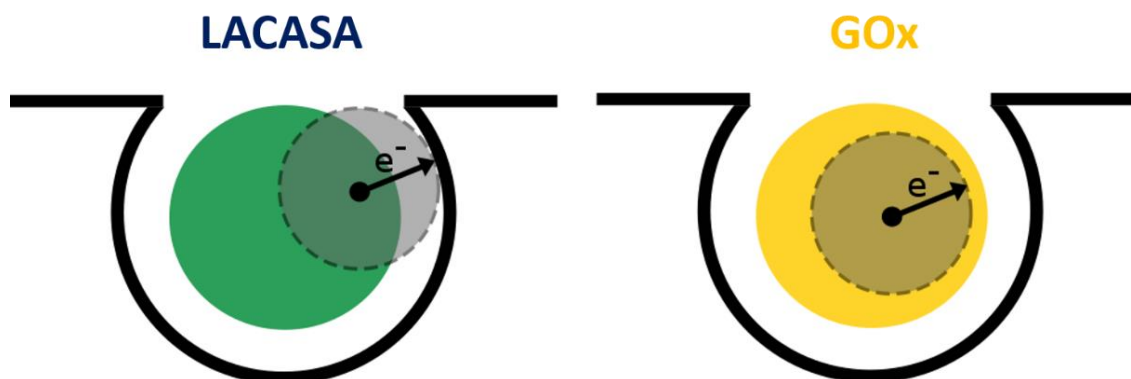


Figura 60. Esquema del rango de transferencia de electrones por efecto túnel en la lacasa y la glucosa oxidasa.

3.4.4 Transferencia mediada de electrones

Como no fue posible fabricar un electrodo ánodo-glucosa oxidasa con DET se decidió cambiar de enfoque y experimentar con la transferencia mediada de electrones (MET). Los electrodos de estas características requieren de una molécula redox que sirva como agente mediador de electrones entre la enzima y el electrodo utilizado.

La fabricación de estos electrodos consistió en el depósito SWCNTs sobre electrodos de oro utilizando el método descrito anteriormente, posteriormente se les agregó una mezcla de 10 μ l de glucosa oxidasa 40 mg/ml y 4 μ l del mediador a una concentración 0.1 M. Después de secarse con un aire presurizado, se

agregó 10 μl de quitosano 0.2%, se secó de igual manera y por último se agregó 10 μl de glutaraldehído 10% que fue lavado 10 min después.

Las moléculas redox que fueron evaluadas como potenciales mediadores para la glucosa oxidasa fueron el 3,7-bis (dimetilamino) (azul de metileno), el naftil etilendiamina, la naftoquinona y la hidroquinona. La Figura 61 muestra los ciclovoltagramas realizados de los electrodos fabricados en presencia y ausencia de glucosa y la Tabla 10 los parámetros electroquímicos obtenidos.

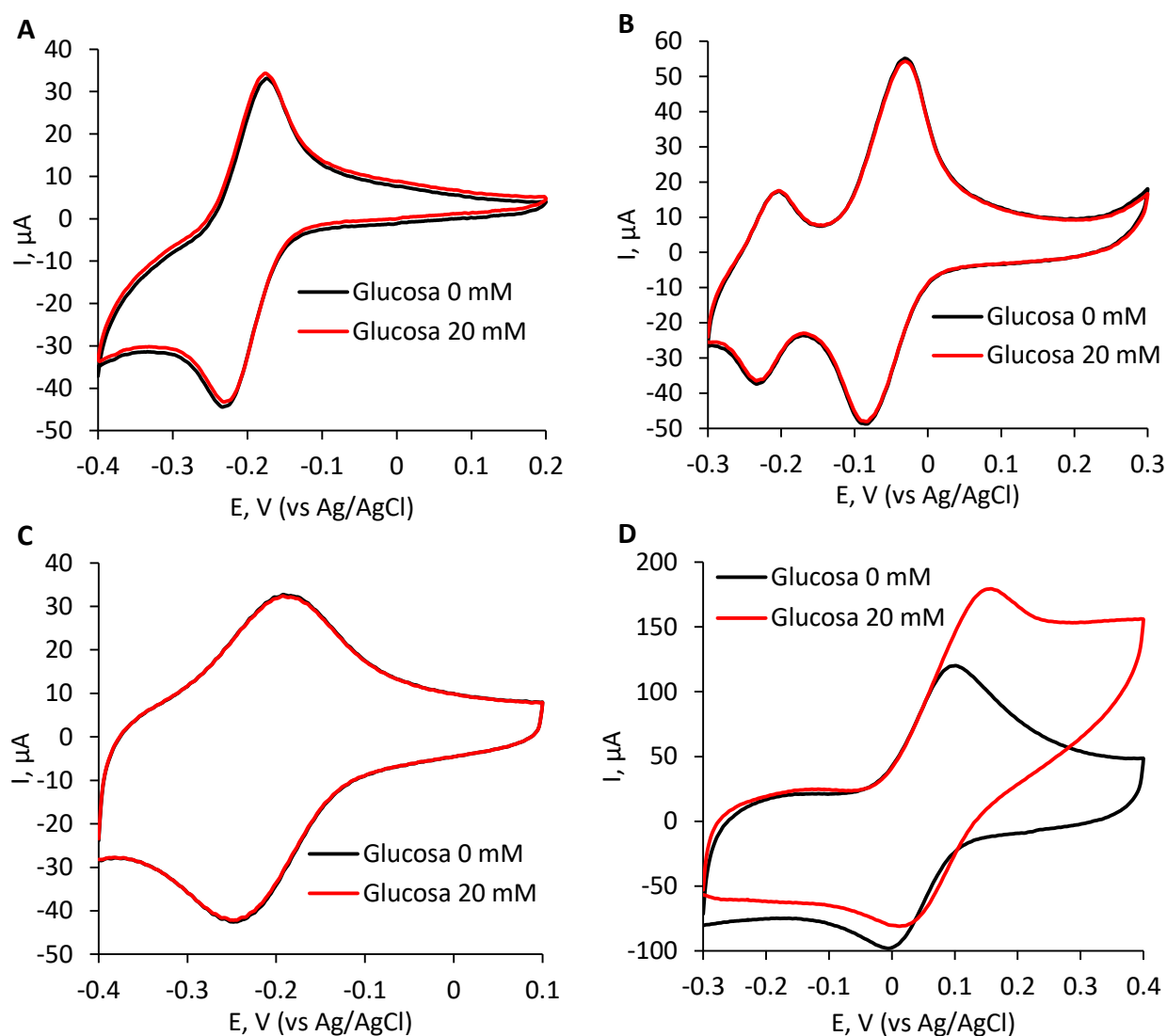


Figura 61. Ciclovoltagramas de electrodos de oro con un depósito de SWCNTs, glucosa oxidasa y mediador en ausencia (negra) y presencia (roja) de glucosa 20 mM. A) Naftoquinona. B) Naftil etilendiamina. C) 3,7-bis (dimetilamino) azul de metileno. D) Hidroquinona. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 5 \text{ mV/s}$, ciclo 5.

Tabla 10. Controles implementados para el electrodo anódico con glucosa oxidasa adsorbida en electrodos de oro.

Mediador	E° del mediador (V)	Densidad de corriente (mA/cm ²)
Naftoquinona	-0.206	Sin respuesta
Naftil etilendiamina	-0.218 y -0.057	Sin respuesta
3,7-bis (dimetilamino)	-0.219	Sin respuesta
Hidroquinona	0.038	2.52

Como podemos ver en la Figura 62, solo el electrodo que contenía hidroquinona como mediador presentó actividad al agregar glucosa. Al evaluar diferentes concentraciones de glucosa el electrodo llegó a su saturación entre 25 y 30 mM (Figura 62A), obteniendo una $K_m = 11.12 \pm 1.02$ mM que es cercana a la K_m de la enzima en solución (Figura 62B).

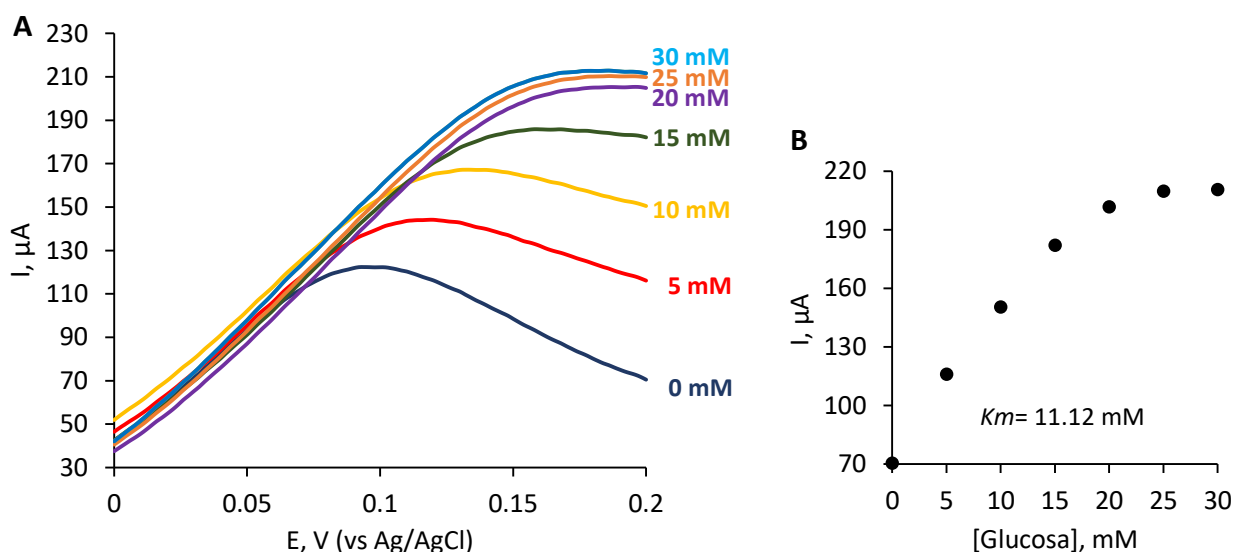


Figura 62. A) Voltagramas de barrido lineal correspondientes a la oxidación de glucosa por el electrodo con SWCNTs, glucosa oxidasa e hidroquinona. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.4, $v = 5$ mV s⁻¹. B) Curva de calibración para diferentes concentraciones de glucosa. $E = 0.2$ V.

Con estos electrodos se logró generar una densidad de corriente máxima de 2.52 mA/cm² a un potencial de ≈ 0.15 V. Este resultado se encuentra dentro de los mejores resultados reportados hasta el momento para electrodo con MET (Milton et al., 2015; Hou et al., 2016; Gross et al., 2017), además no disminuyó su eficiencia al evaluarlo en presencia de buffer de succinatos 50 mM pH 4.5 (Anexo 8), en el cual la lacasa tiene su mayor eficiencia. Este electrodo fabricado que presenta MET por medio de hidroquinona, glucosa oxidasa y SWCNTs fue utilizado para la fabricación de la celda de combustible completa.

3.5 Electrodo anódico de glucosa deshidrogenasa

3.5.1 Unión de PQQ y reconstitución de glucosa oxidasa

Al igual que la unión de FAD sobre los electrodos de oro, PQQ fue unida utilizando cadenas de moléculas aromáticas. La primera unión de PQQ que se realizó requirió de la funcionalización del electrodo de oro con 4ATP, el cual cuenta con un grupo amino libre con el cual se pudo formar un enlace amida con alguno de los tres grupos carboxilo que PQQ presenta en su estructura.

Con este método se logró unir 6.21 pmoles de PQQ cubriendo el 15% de la superficie del electrodo (radio hidrodinámico_{PQQ}= 0.9 nm) (Figura 63), lo que es muy cercano a lo reportado previamente (Zayats et al, 2005; 2008). Aunque se obtuvo una señal estable de PQQ, la distancia a la que se encuentra de la superficie del electrodo es corta utilizando solo el 4ATP como conector, por lo que la reconstitución de la apo-glucosa deshidrogenasa se vería afectada por presentarse un impedimento estérico.

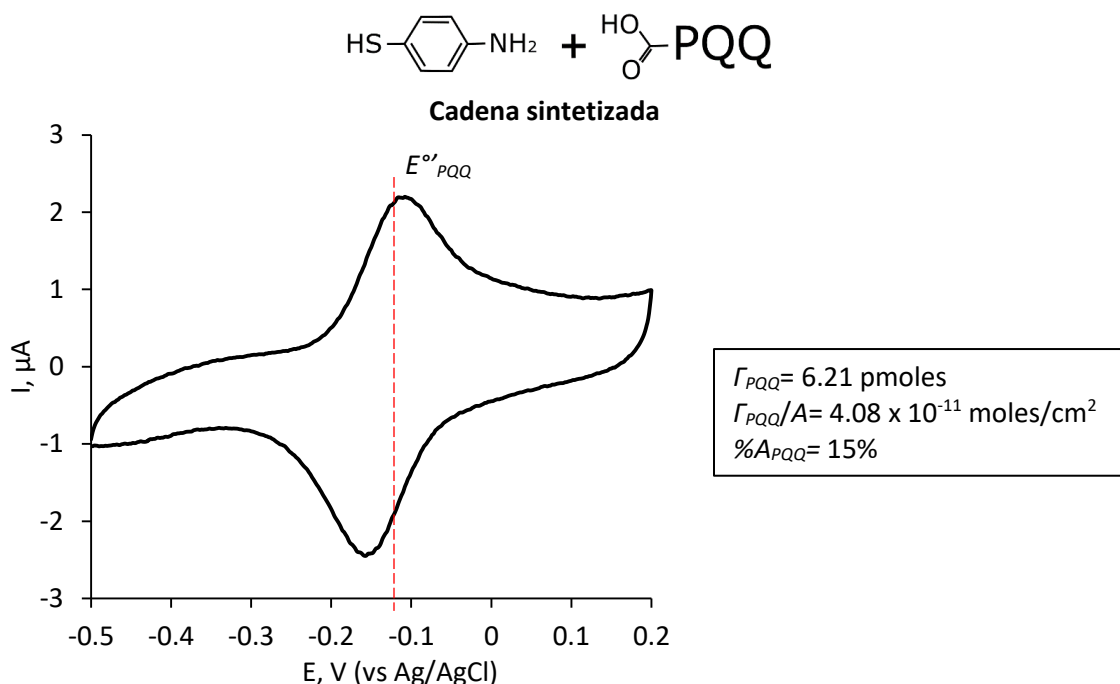


Figura 63. Ciclovoltagrama de electrodos funcionalizados con PQQ. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 0.2$ V/s, ciclo 5.

Para establecer una distancia favorable entre el PQQ y el electrodo se funcionalizaron electrodos de oro con 4AMB, posteriormente se unió 4,4'-diaminobifenil y por último se unió el PQQ. Con esta serie de uniones se logró unir a los electrodos 1.54 pmoles de PQQ (Figura 64).

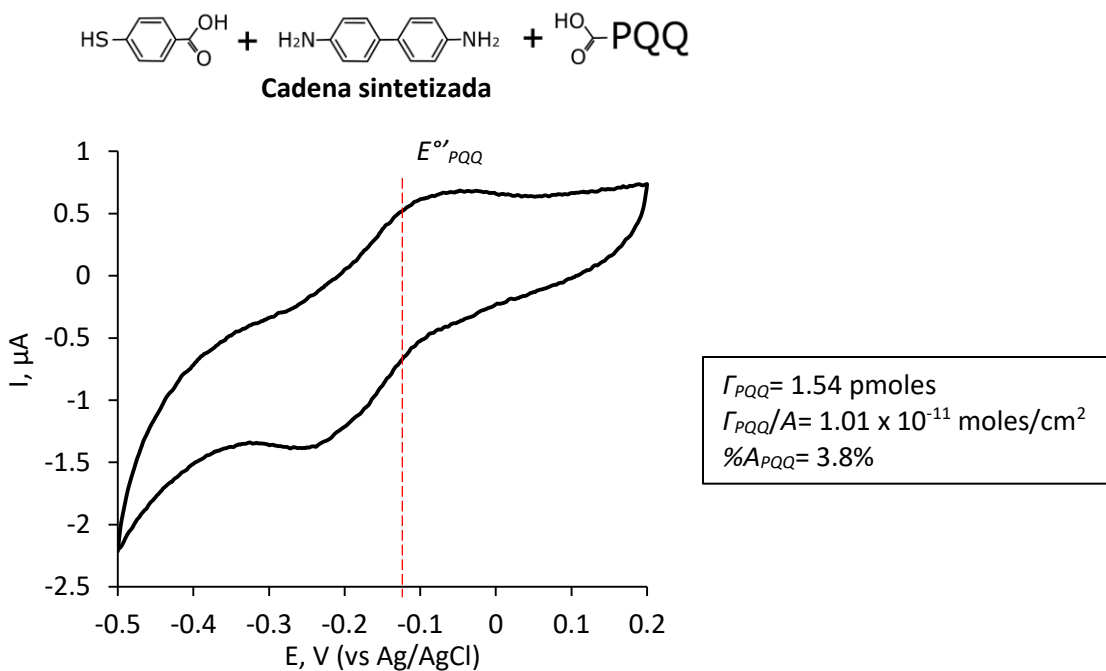


Figura 64. Ciclovoltagrama de electrodos funcionalizados con PQQ. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 0.2$ V/s, ciclo 5.

Después de incubar los electrodos en una solución con apo-glucosa deshidrogenasa en buffer HEPES 20 mM con CaCl_2 30 mM por 40 min a temperatura ambiente, se evaluó su actividad en presencia y ausencia de glucosa. Los electrodos fabricados mostraron un pequeño aumento de corriente al agregar glucosa, que inicia a ≈ -0.12 V (vs Ag/AgCl), el cual es el $E^{\circ'}$ de PQQ (Figura 65).

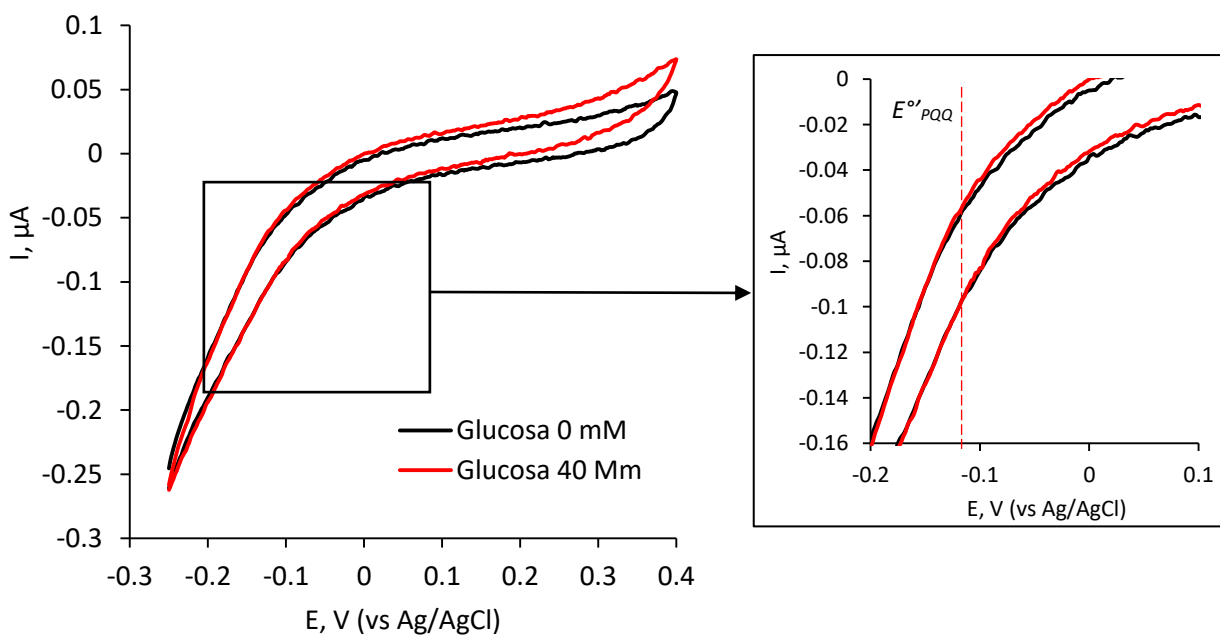


Figura 65. Ciclovoltagramas de electrodos de oro con glucosa deshidrogenasa molecularmente orientada. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 5$ mV/s, ciclo 5.

La densidad de corriente generada por estos electrodos no alcanzó $1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, además de presentarse a 4 V (vs Ag/AgCl), que es un valor muy cercano al E° del sitio T1 de la lacasa, por lo que su uso en una celda de combustible no sería viable. No obstante el PQQ se mantuvo unido estable al electrodo después del proceso de reconstitución y análisis (Anexo 9).

Como la respuesta de los electrodos construidos fue muy baja, se decidió construir una cadena de mayor longitud a la que se unió PQQ, ya que la baja ineficiencia de los electrodos puede deberse a la ineficiente reconstitución de la apo-glucosa deshidrogenasa por la distancia a la que se encuentra PQQ de la superficie del electrodo.

Se sintetizó una cadena formada por 4ATP como molécula inicial, posteriormente se unió el bifenil-4',4' ácido carboxílico, luego el 4,4'-diaminobifenil y por último se unió PQQ. Fue posible unir 2.03 pmoles de PQQ en la superficie del electrodo lo que cubrió el 5.1% del electrodo (Figura 66).

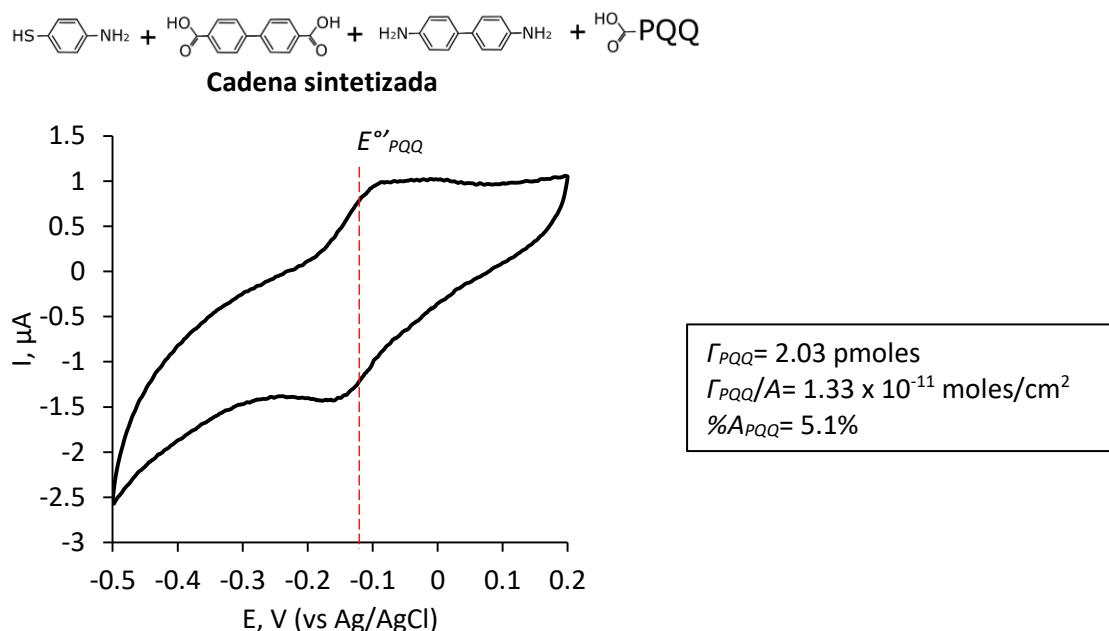


Figura 66. Ciclovoltagrama de electrodos funcionalizados con PQQ. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 0.2 \text{ V/s}$, ciclo 5.

Después de incubar los electrodos en una solución con apo-glucosa deshidrogenasa en buffer HEPES 20 mM con CaCl_2 30 mM por 40 min a temperatura ambiente, se evaluó su actividad obteniendo de nuevo un pequeño aumento de corriente al agregar glucosa. De igual forma la respuesta de los electrodos inició a $\approx -0.12 \text{ V}$ (vs Ag/AgCl) (Figura 67).

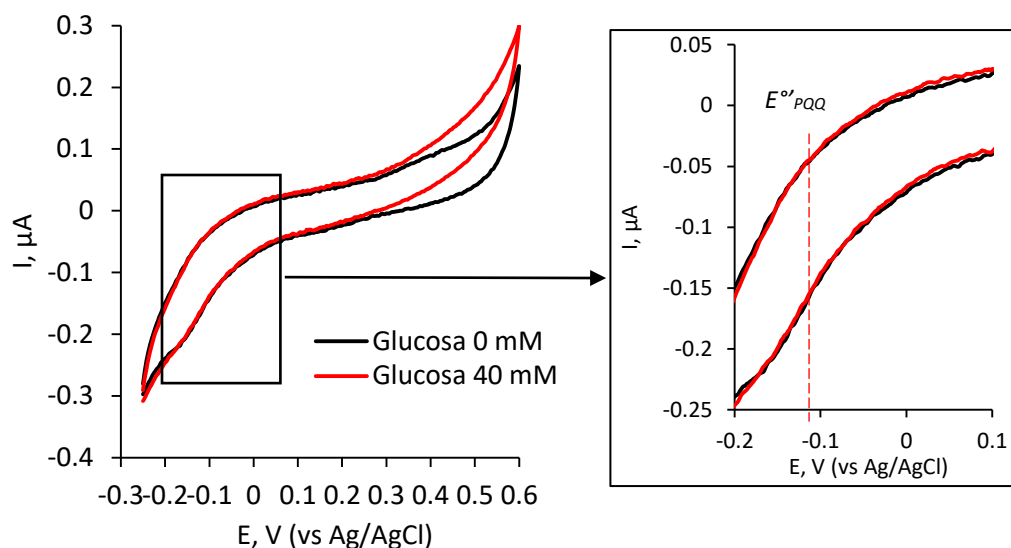


Figura 67. Ciclovoltagramas de electrodos de oro con glucosa deshidrogenasa molecularmente orientada. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v=5$ mV/s, ciclo 5.

La densidad de corriente alcanzada por estos electrodos fue de $3.9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ a 0.6 V. Este valor, además de ser muy pequeño en comparación con los resultados reportados en otros trabajos (Zayats et al., 2005), se aprecia a potenciales positivos (vs Ag/AgCl) por lo que estos electrodos no se podrían utilizar en celdas.

PQQ, a diferencia de FAD, es un cofactor que se encuentra más expuesto en la superficie de la enzima ($\approx 12 \text{ \AA}$ al interior de la enzima), además cuenta con tres grupos carboxilo que pueden ser usados para unirlos a superficies como los electrodos (Figura 68). Aunque se sintetizaron dos cadenas de longitudes variables para favorecer la interacción del cofactor con la apo-glucosa oxidasa, no se obtuvieron resultados relevantes, por lo que se decidió no continuar con otros ensayos.

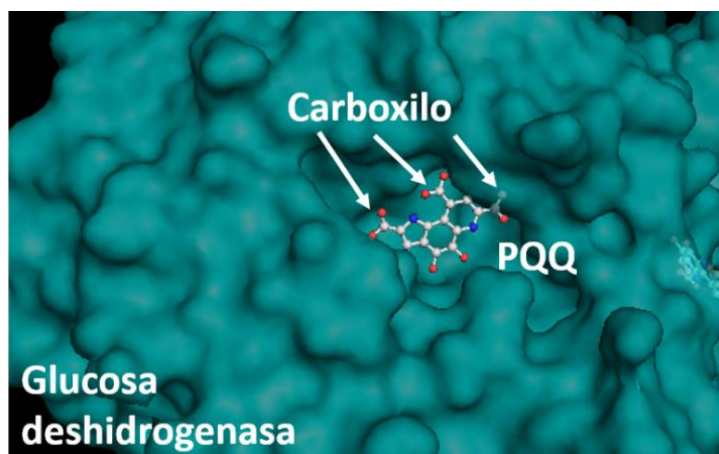


Figura 68. Estructura tridimensional del dímero de la glucosa deshidrogenasa asociada a PQQ. Imágenes obtenidas con el software PyMOL v1.74 a partir del registro con código 1C9U del Protein Data Bank.

3.6 Electrodo catódico de lacasa

3.6.1 Interacción de la lacasa con el 4AMB

La unión orientada de la lacasa en los electrodos de oro se basa en la unión de moléculas con afinidad por el sitio T1 de la lacasa. Martínez-Ortiz y colaboradores en 2011 mostraron que el ácido benzoico se une favorablemente a la lacasa en su sitio activo sin oxidarse y no sufre oxidación. Esto dio lugar a utilizar moléculas que contengan residuos de ácido benzoico como el 4AMB, el bifeníl-4',4' ácido carboxílico y el 4-[2-aminoetil] benzoico para la orientación de la lacasa y su posterior unión utilizando EDC y NHS. De esta forma la unión covalente de la lacasa se realizaría con lisinas cercanas al sitio activo promoviendo la DET en todas las enzimas unidas.

La primera molécula utilizada fue el 4AMB, el cual tiene una estructura similar al ácido benzoico. Se evaluó la afinidad del 4AMB con el sitio T1 de la lacasa evaluando la absorbancia de la enzima a 609 nm de longitud de onda, esperando una modificación en el espectro de absorbancia en presencia del 4AMB.

En la Figura 69 se puede observar que el espectro de absorbancia de la lacasa en presencia de 4AMB 20 mM. Este cambio es más notorio al evaluar la saturación de la enzima con diferentes concentraciones del conector (Figura 70).

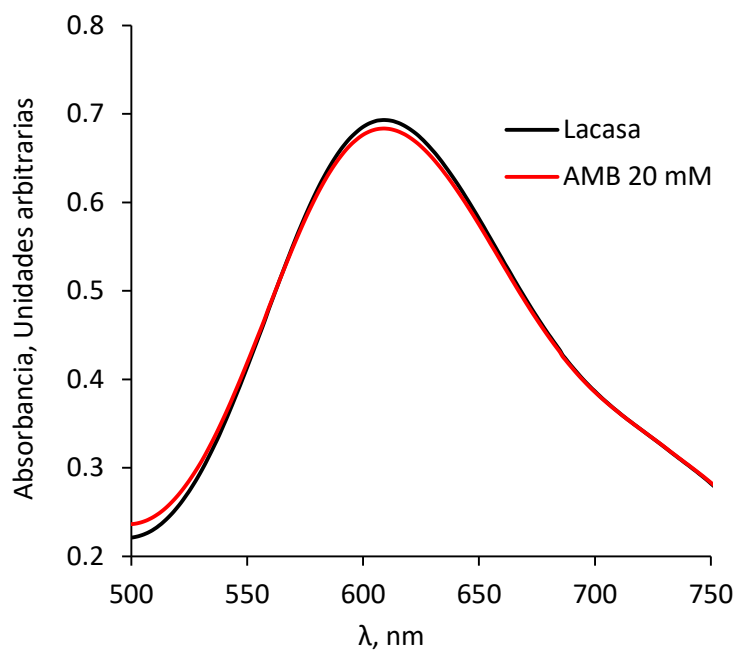


Figura 69. Perfil de absorbancia de la lacasa en ausencia (línea negra) y presencia de 4AMB 20 mM (línea roja).

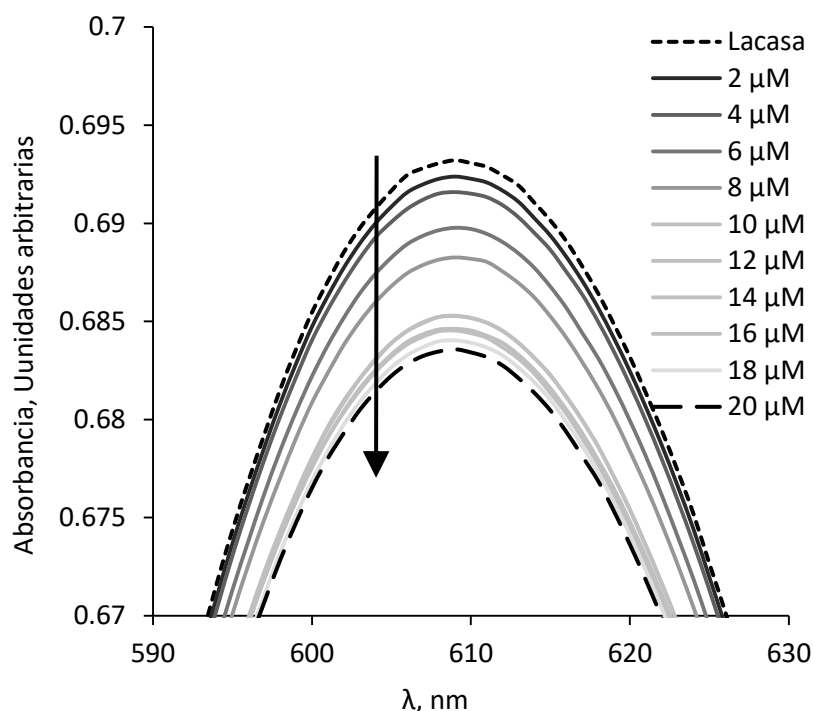


Figura 70. Perfil de absorbanza de la lacasa en presencia de concentraciones ascendentes de 4AMB. La flecha indica la dirección de incremento de la concentración de 4AMB.

Con los resultados obtenidos se calculó la diferencia de absorbanza de las mediciones en presencia de 4AMB y el espectro de la lacasa, estos resultados se resumen en la Figura 71. Se puede observar que el 4AMB (20 mM) no presenta *per se* una absorbanza significativa que afecte las mediciones de la lacasa (Figura 71, línea segmentada), además se puede observar claramente un cambio en el espectro de absorbanza de la lacasa en presencia del 4AMB y este cambio es más notorio en el pico de absorbanza del sitio T1, lo que indica que sí hay interacción de la molécula conectora 4AMB con la lacasa, específicamente con el sitio T1.

Al graficar la diferencia presente en el pico de absorbanza del sitio T1 (609 nm de longitud de onda) se puede observar que los puntos muestran un comportamiento sigmoïdal, que responde a la ecuación de Hill, la cual es empleada para analizar cinéticas enzimáticas (Figura 72). Con estos datos se obtuvo una constante de asociación (K_A) de la lacasa con el 4AMB de $7.48 \pm 0.53 \mu\text{M}$, que es muy cercano a lo reportado por Martínez-Ortiz y colaboradores ($6.6 \pm 0.11 \mu\text{M}$). Cabe mencionar que en los estudios realizados por Martínez-Ortiz y colaboradores no utilizaron el conector 4-[2-aminoetil] benzoico para el análisis de la interacción de la lacasa, en lugar de este usaron ácido benzoico.

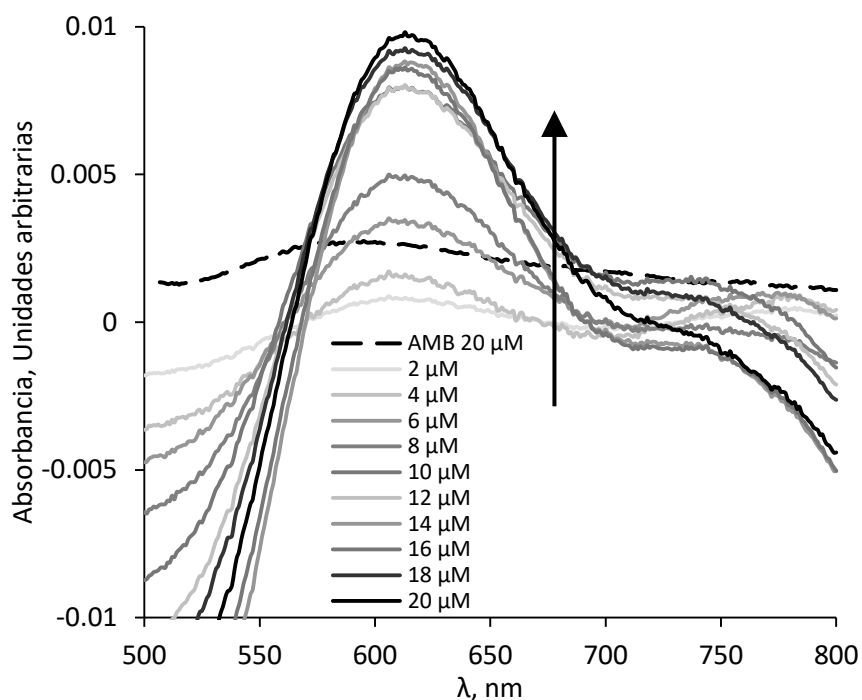


Figura 71. Diferencia entre el espectro de absorción de la lacasa en interacción con concentraciones ascendentes de 4AMB. La flecha indica la dirección de incremento de la concentración de 4AMB.

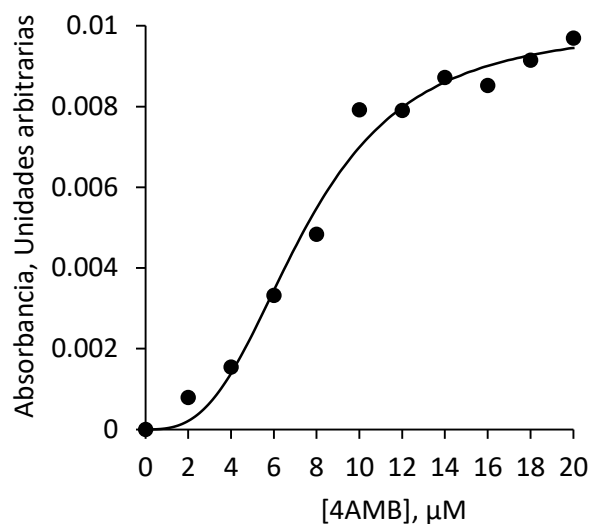


Figura 72. Cinética de interacción del 4AMB con la lacasa.

3.6.2 Unión orientada de lacasa

Después de conocer que el 4AMB interacciona directamente con el sitio activo T1, se funcionalizaron electrodos de oro con esta molécula. Posteriormente se dejaron los electrodos en una solución de lacasa 2 mg/ml por 20 min a temperatura ambiente para que la enzima se orientara por su sitio T1, por último se

agregó a la solución EDC y NHS para unir covalentemente la enzima al conector 4AMB a través los aminos de lisinas cercanas al sitio T1. Después 30 min de reacción se lavaron con buffer succinatos 50 mM pH 4.5 y se evaluaron en este mismo buffer saturado con N_2 como control y con O_2 para analizar la reacción de reducción a ≈ 0.57 V (vs Ag/AgCl). Desafortunadamente, los ciclovoltagramas de estos electrodos no muestran una respuesta en el potencial de reducción del O_2 lo que indica que no hay DET con el electrodo (Figura 73).

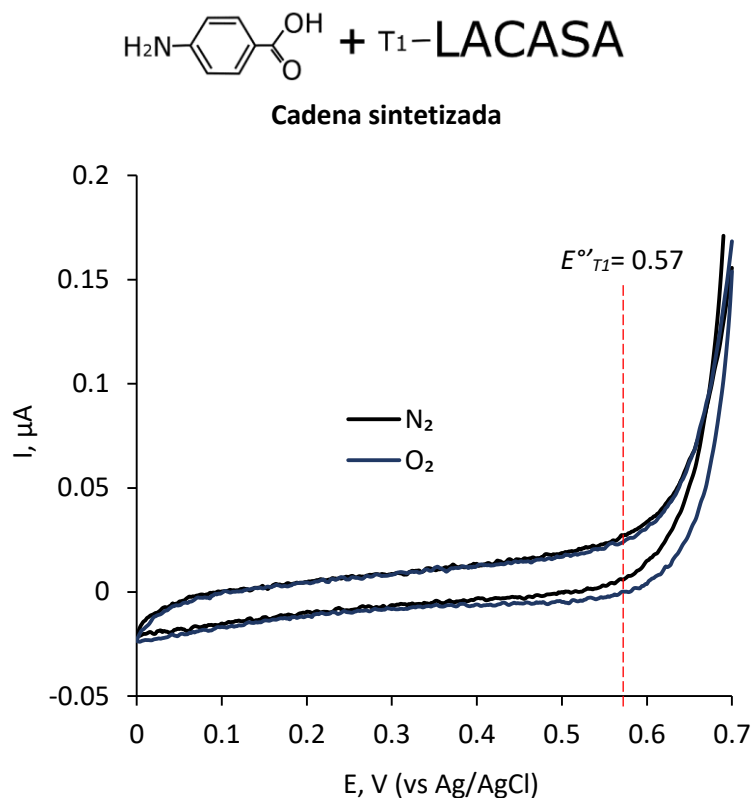


Figura 73. Ciclovoltagramas de electrodos con lacasa orientada molecularmente en condiciones de saturación de N_2 (negro) y O_2 (azul). Buffer de succinatos 50 mM pH 4.5, $v = 5$ mV/s, ciclo 5.

Al no obtener resultados favorables, se intentó orientar la lacasa utilizando una cadena de mayor longitud. Se unió el bifenil-4',4' ácido carboxílico el cual cuenta con dos residuos de ácido benzoico en su estructura. Tras la unión del bifenil-4',4' ácido carboxílico utilizando 4ATP como molécula inicial, se unió la lacasa utilizando el método descrito previamente. Sin embargo, los electrodos fabricados no presentaron actividad al saturar con O_2 el buffer de succinatos en donde estaban sumergidos (Figura 74).

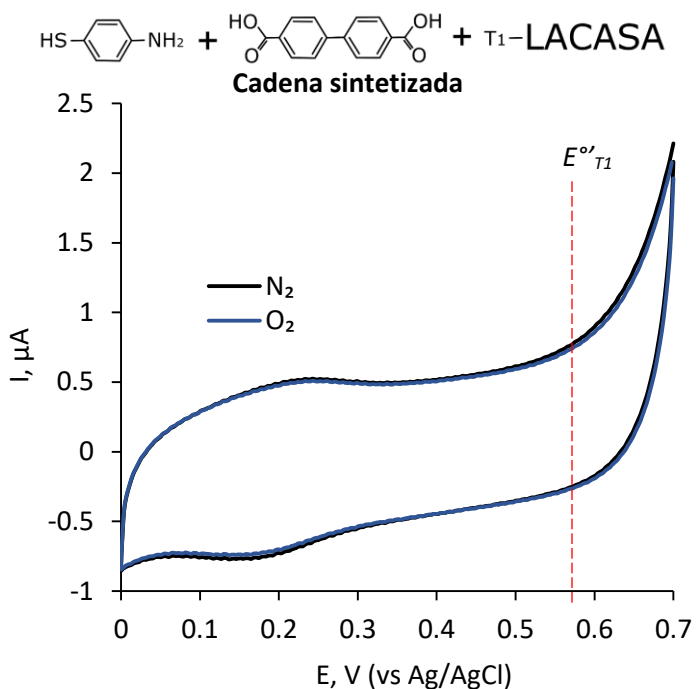


Figura 74. Ciclovoltogramas de electrodos con lacasa orientada molecularmente en condiciones de saturación de N₂ (negro) y O₂ (azul). Buffer de succinatos 50 mM pH 4.5, $v = 5$ mV/s, ciclo 5.

Al no obtener resultados favorables, se decidió utilizar el método desarrollado por Martínez-Ortiz y colaboradores, en la cual se funcionaliza una tela de fibras de grafito 4-[2-aminoetil] benzoico y luego la lacasa se orienta y une covalentemente utilizando EDC y NHS. No obstante, no se obtuvieron resultados positivos con este método a pesar de seguir estrictamente el protocolo como fue descrito (Figura 75).

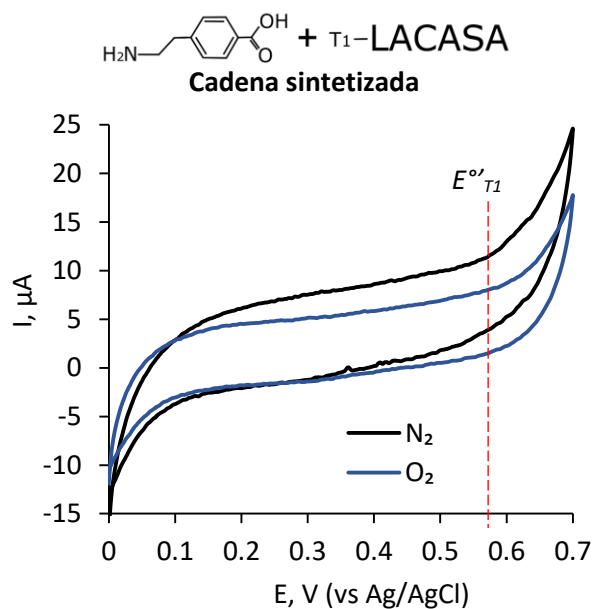


Figura 75. Ciclovoltogramas de electrodos funcionalizados con lacasa orientada molecularmente en condiciones de saturación de N₂ (negro) y O₂ (azul). Buffer de succinatos 50 mM pH 4.5, $v = 5$ mV/s, ciclo 5.

3.6.2 Adsorción de lacasa en CNTs

Se decidió explorar la adsorción de la lacasa en CNTs para obtener un electrodo cátodo con actividad en presencia de O_2 que pudiera ser usado para complementar el electrodo ánodo-glucosa oxidasa con MET en una celda completa.

El procedimiento de adsorción de lacasa consistió en el depósito de SWCNTs sobre electrodos de oro utilizando el procedimiento descrito anteriormente. Después del secado de los electrodos se agregó 10 μ l de lacasa 10 mg/ml y se dejó en reposo por 20 min. Posteriormente, los electrodos fueron lavados con buffer de succinatos y se les agregó 10 μ l de glutaraldehído 10 mM para entrecruzar las enzimas y que estas no fueran difundidas al medio.

Los electrodos fabricados obtuvieron resultados satisfactorios. Al realizar evaluación en saturación de N_2 solo se puede observar la corriente basal asociada a la capacitancia de los SWCNTs (14 μ F/cm²), en cambio en saturación de O_2 los electrodos presentaron un notorio aumento de corriente correspondiente al $E^{\prime\prime}$ del sitio T1 de la lacasa alcanzando una densidad de corriente máxima de ≈ 2 mA/cm² (Figura 76, línea azul). Además, al evaluar la actividad del electrodo sin saturar la solución con O_2 (O_2 disuelto) se obtuvieron 0.48 mA/cm² de densidad de corriente a 0.54 V (vs Ag/AgCl) (Figura 76, línea roja).

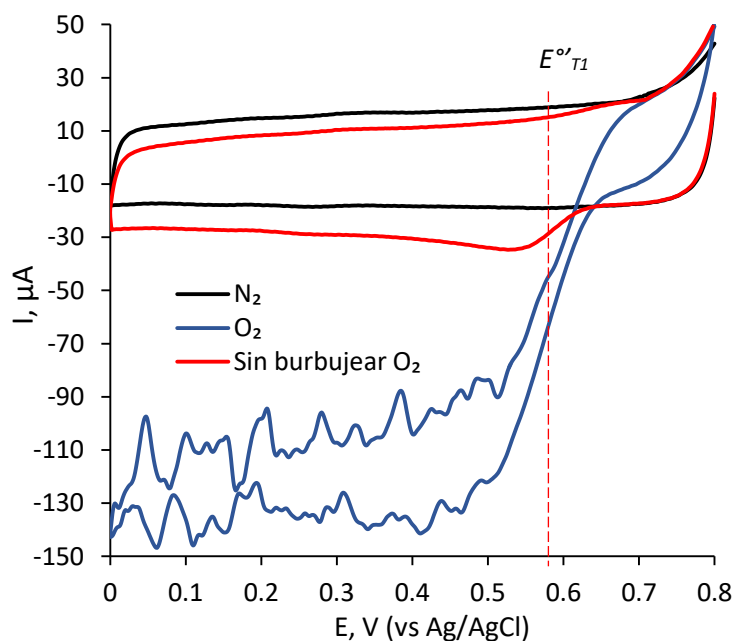


Figura 76. Ciclovoltagramas de electrodos con depósito de SWCNTs y lacasa adsorbida en ambiente saturado con N_2 (negro) y saturado con O_2 (azul). Buffer de succinatos 50 mM pH 4.5, $v = 10$ mV/s, ciclo 5.

El uso de SWCNTs en la fabricación del electrodo cátodo-lacasa permite el establecimiento de DET gracias a la red tridimensional que forma este nanomaterial. El sitio T1 de la lacasa, encargado de la oxidación de componentes fenólicos, posee la característica de encontrarse cerca de la superficie de la enzima, por lo que al adsorberse en la red de SWCNTs el transporte de electrones por efecto túnel se ve favorecido. Esta técnica de fabricación de electrodos catódicos enzimáticos ha sido utilizada por otros autores para completar celdas de combustible enzimáticas ya que estos electrodos suelen ser estables y duraderos por lo que no tienden a ser el electrodo limitante en el sistema electroquímico (Yehezkeili et al., 2011; Holzinger et al., 2012). Estos electrodos fabricados se utilizarán en la fabricación de la celda de combustible.

3.7 Celda de combustible enzimática

La celda de combustible enzimática fue construida utilizando los electrodos ánodo-glucosa oxidasa y cátodo-lacasa. El ánodo-glucosa oxidasa contiene hidroquinona y SWCNTs, además fue cubierto con quitosano. El electrodo cátodo-lacasa contiene SWCNTs y glutaraldehído como agente entrecruzante (Figura 77). Estos dos electrodos difieren en el mecanismo con que son transferidos los electrones en el sistema electroquímico. El ánodo-glucosa oxidasa lo hace por medio de MET utilizando hidroquinona como agente mediador, en cambio el cátodo-lacasa presenta DET favorecida por la red de SWCNTs en la que está adsorbida.

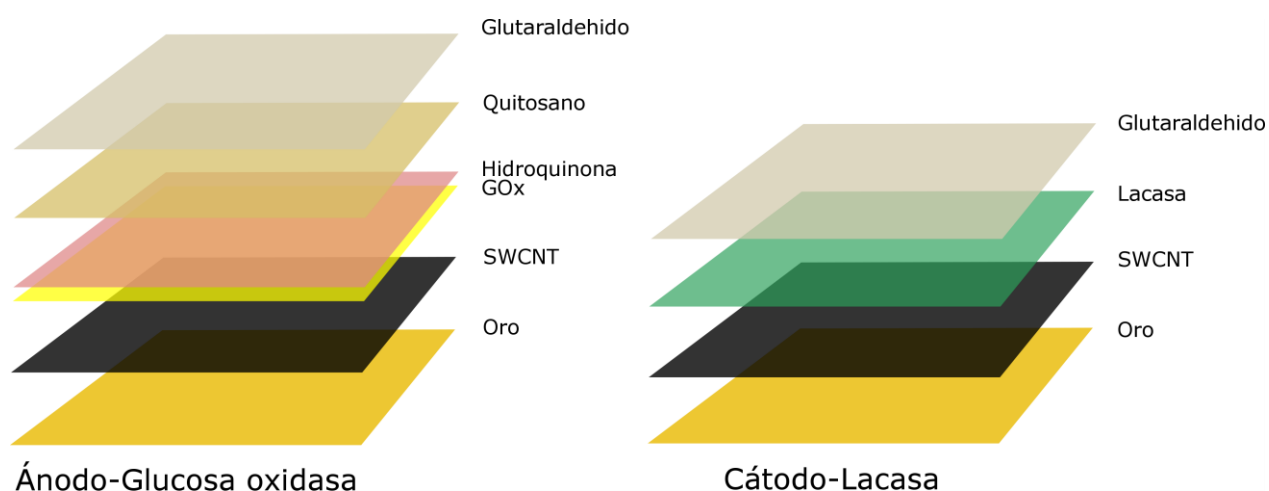


Figura 77. Esquema de la estructura en capas que conforman a los electrodos ánodo y cátodo utilizados en la celda de combustible enzimática.

El mecanismo de la celda de combustible construida consiste en la oxidación de la glucosa y la reducción de hidroquinona en presencia de glucosa oxidasa, posteriormente en la oxidación de hidroquinona cediendo los electrones obtenidos a la red de SWCNTs y por último en la reducción del O_2 catalizada por la lacasa. A continuación se muestran las reacciones redox llevadas a cabo en los electrodos enzimáticos de la celda de combustible (Figura 78):

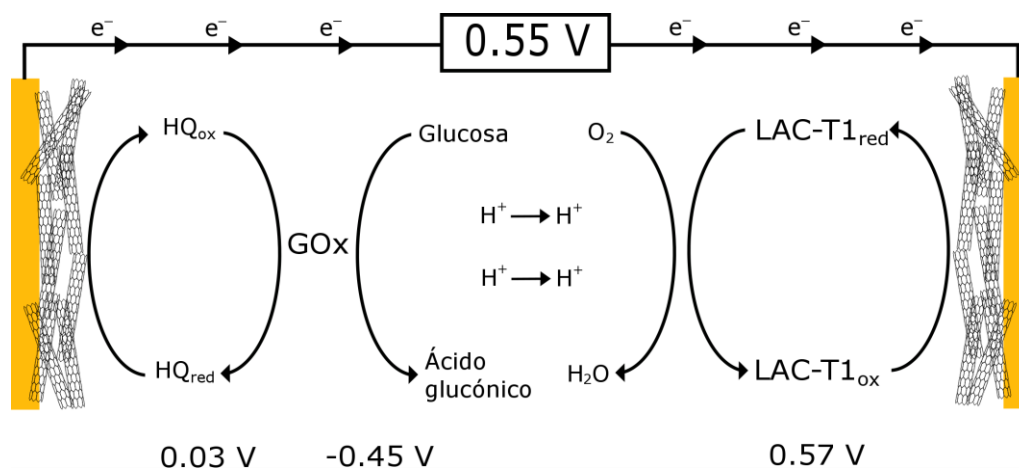
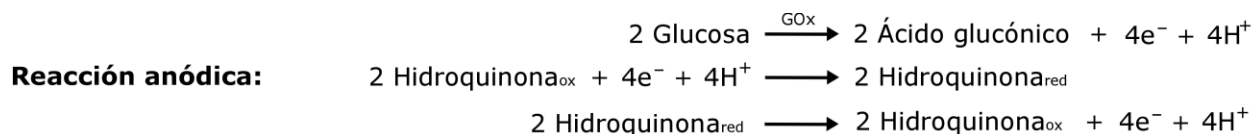


Figura 78. Esquema de la celda de combustible enzimática con las reacciones redox llevadas a cabo en los electrodos.

El electrolito que se utilizó para evaluar la celda de combustible fue el buffer de succinatos 50 mM pH 4.5. La razón de utilizar este buffer es porque el cátodo-lacasa presenta su máxima actividad en estas condiciones y el ánodo-glucosa oxidasa no se ve afectado a pesar de estar en un pH menor al óptimo. Las evaluaciones de la celda enzimática se realizaron en condiciones de saturación de O_2 y glucosa 20 mM.

El cronopotenciograma obtenido de la celda mostro un OCV de 0.551 V que se mantuvo estable a lo largo de 1 h de evaluación (Figura 79).

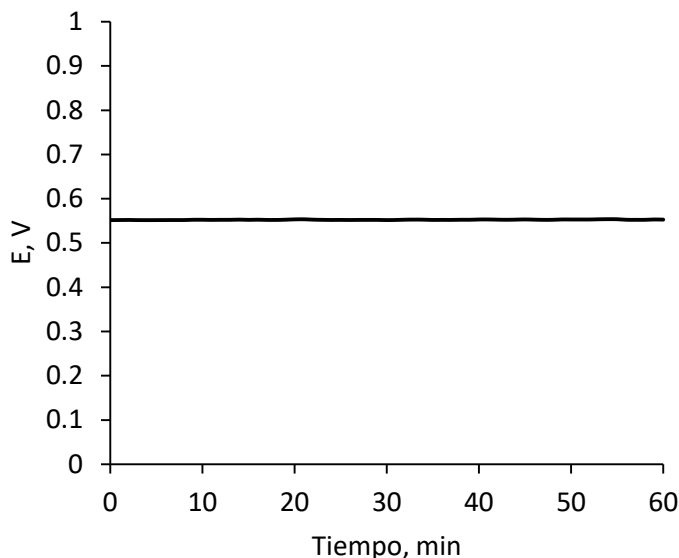


Figura 79. Cronopotenciograma de la celda de combustible enzimática ánodo-glucosa oxidasa cátodo-lacasa. Buffer de succinatos 50 mM pH 4.5, ánodo= R y C, cátodo= W.

La evaluación de la potencia de la celda de combustible se realizó por medio de curvas de polarización de electrodos por medio de voltametrías de barrido lineal a una velocidad de 1mV/s. Esta técnica permite polarizar los electrodos desde el OCV hasta corto circuito. Como el producto de los valores de corriente obtenidos y potencial evaluado corresponden a la potencia ($P_{(W)} = E_{(V)} \times I_{(A)}$) se puede conocer la potencia máxima que una celda de combustible puede generar en condiciones ideales.

La celda de combustible construida presentó una densidad de corriente máxima a corto circuito de 1.9 mA/cm². La curva de potencia obtenida con la polarización de los electrodos nos muestra que la celda generó una densidad de potencia máxima de 0.328 mW/cm² a 0.26 V (Figura 80). Después de la primera evaluación los electrodos ánodo y cátodo utilizados fueron guardados en buffer de fosfatos y buffer de succinatos a 4°C, respectivamente, para ser evaluados de nueva cuenta durante cuatro días por medio de cronoamperometria en las mismas condiciones descritas. Esta evaluación muestra que los electrodos en la celda de combustible sufrieron una pérdida del 58% de la corriente generada al pasar cuatro días desde su construcción (Figura 81). En comparación con cualquier celda de combustible con enzimas racionalmente unidas y que presentan DET, la celda construida produjo un orden mayor de potencia que lo reportado hasta el momento (Tabla 4).

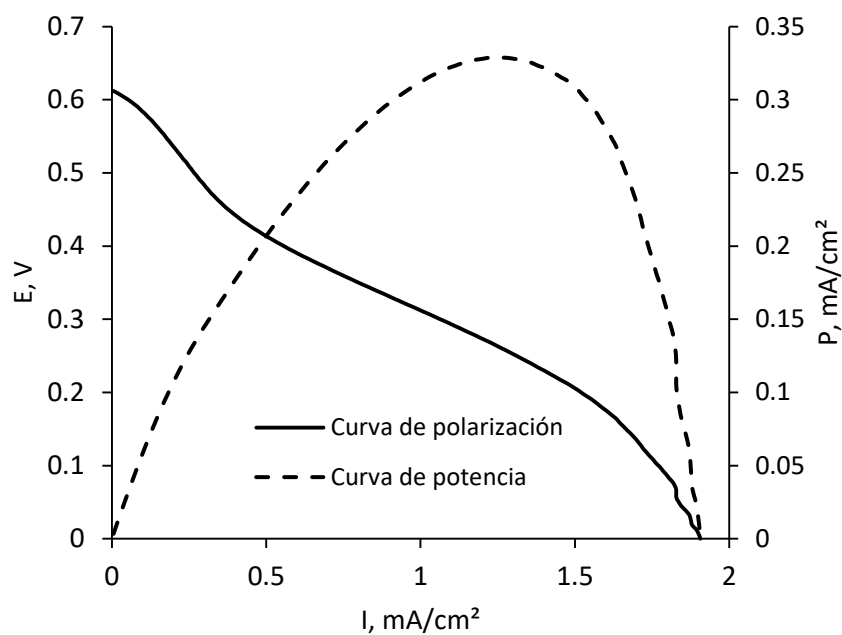


Figura 80. Curva de polarización (línea sólida) y curva de potencia (línea segmentada) de la celda de combustible ánodo-glucosa oxidasa cátodo-lacasa. Buffer de succinatos 50 mM pH 4.5, $v = 1$ mV/s, ánodo= R y C, cátodo= W.

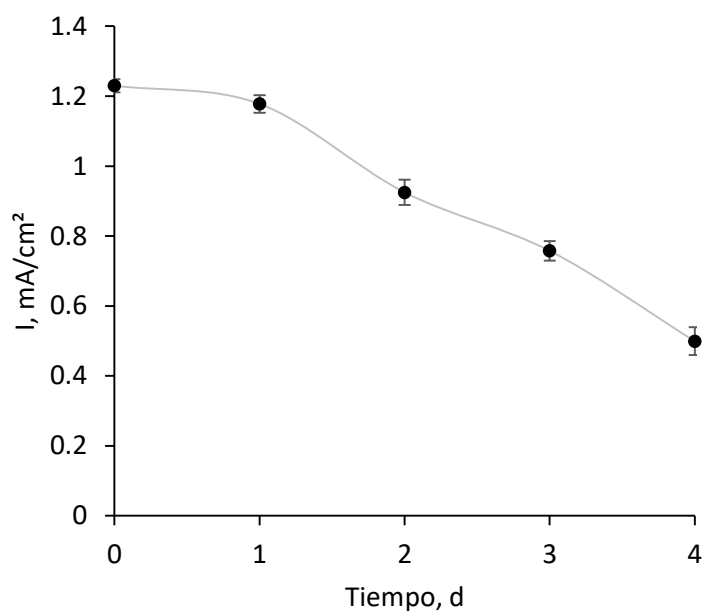


Figura 81. Cronoamperometría de la celda de combustible ánodo-glucosa oxidasa cátodo-lacasa durante 4 d. $E = 0.26$ V, ánodo= R y C, cátodo= W.

La gran mayoría de las celdas de combustible enzimáticas fabricadas son evaluadas en electrolitos con pH cercano al fisiológico humano por su principal aplicación como abastecedores de energía subcutáneos o implantables. No obstante, también se requieren celdas de combustible que puedan situarse en la

superficie de la piel evitando un procedimiento de instalación invasivo. En este caso el sudor es uno de los fluidos corporales de interés ya que posee concentraciones satisfactorias de compuestos orgánicos como glucosa y lactato. El sudor por lo general posee un pH de aproximadamente 4.5 por lo que muchas de las celdas de combustible enzimáticas evaluadas a pH mayor se verían afectadas en su estabilidad y potencia en estas condiciones. La celda de combustible enzimática construida cumple con la característica de funcionar a un pH similar al del sudor. La principal perspectiva para la celda de combustible construida es su evaluación como dispositivo cutáneo.

Capítulo 4. Conclusiones

Se diseñó un protocolo eficiente de producción de apo-glucosa oxidasa y reconstitución in vitro utilizado para la unión orientada de la glucosa oxidasa en un electrodo anódico con DET. Este método tuvo como objetivo la reconstitución de glucosa oxidasa y glucosa deshidrogenasa sobre electrodos de oro funcionalizados con los cofactores respectivos de las enzimas. La unión de los cofactores sobre los electrodos fue exitosa, sin embargo, en ninguno de los electrodos fabricados se logró reconstituir al menos en su forma activa y con esto unir orientadamente la glucosa oxidasa y la glucosa deshidrogenasa.

Ante estos resultados se fabricó un electrodo ánodo-glucosa oxidasa con MET utilizando hidroquinona como agente mediador y SWCNTs. El electrodo fabricado tuvo una densidad de corriente máxima de 2.52 mA/cm^2 manteniendo su actividad tanto en pH 7.3 como en pH 4.5, además presentó una $K_m = 11.12 \pm 1.02 \text{ mM}$.

El electrodo catódico consistió en la funcionalización de electrodos de oro con moléculas con estructura similar al ácido benzoico, ya que se comprobó que este es afín al sitio T1 de la lacasa. De esta forma se buscó orientar la lacasa y posteriormente unirla covalentemente. A pesar de fabricar tres electrodos con moléculas que contenían un residuo de ácido benzoico, no se logró obtener DET entre la lacasa y los electrodos. Para superar esto se adsorbió lacasa en electrodos de oro con un depósito de SWCNTs. Los electrodos fabricados con este método obtuvieron una densidad de corriente máxima de 2 mA/cm^2 .

Con el ánodo-glucosa oxidasa con MET y el cátodo-lacasa con DET se construyó una celda que obtuvo un OCV de 0.55 V, generó una densidad de potencia máxima de 0.328 mW/cm^2 a 0.26 V y registró una pérdida del 58% de su actividad después de cuatro días de su primera evaluación.

Literatura citada

- Arrocha, A., Cano-Castillo, U., Aguila, S. A., y Vázquez-Duhalt, R. (2014). Enzyme orientation for direct electron transfer in an enzymatic fuel cell with alcohol oxidase and laccase electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 61, 569–574. <http://doi.org/10.1016/j.bios.2014.06.009>
- Bandodkar, A. J., y Wang, J. (2016). Wearable Biofuel Cells: A Review. *Electroanalysis*, 1(858), 1–14. <http://doi.org/10.1002/elan.201600019>
- Bartlett, P. N., y Al-Lolage, F. A. (2017). There is no evidence to support literature claims of direct electron transfer (DET) for native glucose oxidase (GOx) at carbon nanotubes or graphene. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. <http://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.06.021>
- Bento, I., Martins, L. O., Gato Lopes, G., Arménia Carrondo, M., y Lindley, P. F. (2005). Dioxygen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective. *Dalton Transactions*, 3(21), 3507–3513. <http://doi.org/10.1039/b504806k>
- Berezin, I. V., Bogdanovskaya, V. A., Varfolomeev, S. D., Tarasevich, M. R., y Yaropolov, A. I. (1978). Bioelectrocatalysis. Equilibrium oxygen potential under the laccase action. *Doklady Akademii Nauk USSR*, 240, 615–618.
- Blanford, C. F., Heath, R. S., y Armstrong, F. a. (2007). A stable electrode for high-potential, electrocatalytic O(2) reduction based on rational attachment of a blue copper oxidase to a graphite surface. *Chemical Communications*, 17, 1710–1712. <http://doi.org/10.1039/b703114a>
- Bonanni, B., Alliata, D., Bizzarri, A. R., y Cannistraro, S. (2003). Topological and Electron-Transfer Properties of Yeast Cytochrome c Adsorbed on Bare Gold Electrodes. *ChemPhysChem*, 4, 1183–1188. <http://doi.org/10.1002/cphc.200300784>
- Cai, C., y Chen, J. (2004). Direct electron transfer of glucose oxidase promoted by carbon nanotubes. *Analytical Biochemistry*, 332(1), 75–83. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2004.05.057>
- Castorena-Gonzalez, J. A., Foote, C., MacVittie, K., Halámek, J., Halámková, L., Martinez-Lemus, L. A., y Katz, E. (2013). Biofuel Cell Operating in Vivo in Rat. *Electroanalysis*, 25(7), 1579–1584. <http://doi.org/10.1002/elan.201300136>
- Chan, T. W., y Bruice, T. C. (1977). One and two electron transfer reactions of glucose oxidase. *Bioelectrochemistry*, 99(7), 2387–23689.
- Chang, R. (2010). Química. Décima edición. Mexico.: Editorial McGraw Hill.
- Chen, Y., Gai, P., Zhang, J., y Zhu, J.-J. (2015). Design of an enzymatic biofuel cell with large power output. *Journal of Material Chemistry A*, 3(21), 11511–11516. <http://doi.org/10.1039/C5TA01432H>
- Cinquin, P., Gondran, C., Giroud, F., Mazabrard, S., Pellissier, A., Boucher, F., y Cosnier, S. (2010). A glucose BioFuel cell implanted in Rats. *PLoS ONE*, 5(5), 1–7. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0010476>
- Claus, H. (2003). Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology*, 179(3), 145–150. <http://doi.org/10.1007/s00203-002-0510-7>
- Cleton-Jansen, A.-M., Goosen, N., Vink, K., y van de Putte, P. (1989). Cloning, characterization and DNA sequencing of the gene encoding the Mr 50,000 quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*. *Molecular & General Genetics: MGG*, 217, 430–6.

<http://doi.org/10.1007/BF02464914>

- Cohen, B. (1931). The bacterial culture as an electrical half-cell. *Journal of Bacteriology*, *21*, 18–19.
- Courjean, O., Gao, F., y Mano, N. (2009). Deglycosylation of glucose oxidase for direct and efficient glucose electrooxidation on a glassy carbon electrode. *Angewandte Chemie-International Edition*, *48*(32), 5897–5899. <http://doi.org/10.1002/anie.200902191>
- Das, M., y Goswami, P. (2013). Direct electrochemistry of alcohol oxidase using multiwalled carbon nanotube as electroactive matrix for biosensor application. *Bioelectrochemistry*, *89*, 19–25. <http://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2012.08.007>
- Du Toit, H., y Di Lorenzo, M. (2014). Electrochimica Acta Glucose Oxidase Directly Immobilized onto Highly Porous Gold Electrodes for Sensing and Fuel Cell applications. *Electrochimica Acta*, *138*, 86–92. <http://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.06.074>
- Fischer, M. J. E. (2010). Chapter 3 Amine Coupling Through EDC/NHS: A Practical Approach. *Methods in Molecular Biology*, *626*, 55–74. <http://doi.org/10.1007/978-1-60761-670-2>
- Frederick, K. R., Tung, J., Emerick, R. S., Masiarz, F. R., Chamberlain, S. H., Vasavada, A., y Rosenberg, S. (1990). Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *The Journal of Biological Chemistry*, *265*(7), 3793–3802. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(66\)09022-0](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(66)09022-0)
- Geiger, O., y Gorisch, H. (1989). Reversible thermal inactivation of the quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*. Ca^{2+} ions are necessary for re-activation. *Biochem J*, *261*(2), 415–421. <http://doi.org/bj2610415>
- Gray, H. B., y Winkler, J. R. (2003). Electron tunneling through proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, *36*(3), 341–372. <http://doi.org/10.1017/S0033583503003913>
- Gross, A. J., Chen, X., Giroud, F., Abreu, C., Le Goff, A., Holzinger, M., y Cosnier, S. (2017). A High Power Buckypaper Biofuel Cell: Exploiting 1,10-Phenanthroline-5,6-dione with FAD-Dependent Dehydrogenase for Catalytically-Powerful Glucose Oxidation. *ACS Catalysis*, *7*(7), 4408–4416. <http://doi.org/10.1021/acscatal.7b00738>
- Grove, W. R. (1839). On voltaic series and the combination of gases by platinum. *The London and Edinburgh Philosophical Magazine and Journal of Science*, *14*(127–130), 1839.
- Güven, G., Şahin, S., Güven, A., y Yu, E. H. (2016). Power Harvesting from Human Serum in Buckypaper-Based Enzymatic Biofuel Cell. *Frontiers in Energy Research*, *4*, 1–7. <http://doi.org/10.3389/fenrg.2016.00004>
- Häkkinen, H. (2012). The gold–sulfur interface at the nanoscale. *Nature Chemistry*, *4*(6), 443–455. <http://doi.org/10.1038/nchem.1352>
- Halámková, L., Halámek, J., Bocharova, V., Szczupak, A., Alfonta, L., y Katz, E. (2012). Implanted biofuel cell operating in a living snail. *Journal of the American Chemical Society*, *134*(11), 5040–5043. <http://doi.org/10.1021/ja211714w>
- Heering, H. A., Wiertz, F. G. M., Dekker, C., y Vries, S. De. (2004). Direct Immobilization of Native Yeast Iso-1 Cytochrome c on Bare Gold : Fast Electron Relay to Redox Enzymes and. *Journal of American Chemical Society*, *126*, 11103–11112.
- Hoffman, A. S., Diego, S., Estroff, L. A., Kriebel, J. K., Nuzzo, R. G., Whitesides, G. M., y Diego, S. (2007). Structure of a Thiol. *Science*, *318*, 430–434.
- Holzinger, M., Le Goff, A., y Cosnier, S. (2012). Carbon nanotube/enzyme biofuel cells. *Electrochimica*

- Acta*, 82, 179–190. <http://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.12.135>
- Hou, C., Lang, Q., y Liu, A. (2016). Tailoring 1,4-naphthoquinone with electron-withdrawing group: Toward developing redox polymer and FAD-GDH based hydrogel bioanode for efficient electrocatalytic glucose oxidation. *Electrochimica Acta*, 211, 663–670. <http://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.06.078>
- Kamitaka, Y., Tsujimura, S., Setoyama, N., Kajino, T., y Kano, K. (2007). Fructose/dioxygen biofuel cell based on direct electron transfer-type bioelectrocatalysis. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 9, 1793–1801. <http://doi.org/10.1039/b617650j>
- Kang, X., Wang, J., Wu, H., Aksay, I. A., Liu, J., y Lin, Y. (2009). Glucose Oxidase-graphene-chitosan modified electrode for direct electrochemistry and glucose sensing. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(4), 901–905. <http://doi.org/10.1016/j.bios.2009.09.004>
- Katz, E., Sheeney-Haj-Ichia, L., y Willner, I. (2004). Electrical contacting of glucose oxidase in a redox-active rotaxane configuration. *Angewandte Chemie-International Edition*, 116, 3354–3362. <http://doi.org/10.1002/anie.200353455>
- Kramer, K. J., Kanost, M. R., Hopkins, T. L., Jiang, H., Zhu, Y. C., Xu, R., y Turecek, F. (2001). Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems. *Tetrahedron*, 57, 385–392. [http://doi.org/10.1016/S0040-4020\(00\)00949-2](http://doi.org/10.1016/S0040-4020(00)00949-2)
- Le Goff, A., Holzinger, M., y Cosnier, S. (2011). Enzymatic biosensors based on SWCNT-conducting polymer electrodes. *The Analyst*, 136(7), 1279–1287. <http://doi.org/10.1039/c0an00904k>
- Lee, C. W., Gray, H. B., Anson, F. C., y Malmström, B. G. (1984). Catalysis of the reduction of dioxygen at graphite electrodes coated with fungal laccase A. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 172, 289–300. [http://doi.org/10.1016/0022-0728\(84\)80193-X](http://doi.org/10.1016/0022-0728(84)80193-X)
- Leskovac, V., Trivic, S., Wohlfahrt, G., Kandrac, J., y Pericin, D. (2005). Glucose oxidase from *Aspergillus niger* : the mechanism of action with molecular oxygen , quinones , and one-electron acceptors. *The International Journal of Biochemistry and and Cell Biology*, 37, 731–750. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.10.014>
- Lörcher, S., Lopes, P., Kartashov, A., y Ferapontova, E. E. (2013). Direct bio-electrocatalysis of O₂ reduction by *Streptomyces coelicolor* laccase orientated at promoter-modified graphite electrodes. *ChemPhysChem*, 14(10), 2112–2124. <http://doi.org/10.1002/cphc.201300069>
- Luong, J. H. T., Glennon, J. D., Gedanken, A., y Vashist, S. K. (2016). Achievement and assessment of direct electron transfer of glucose oxidase in electrochemical biosensing using carbon nanotubes , graphene , and their nanocomposites. *Microchimica Acta*, 184(2), 369–388. <http://doi.org/10.1007/s00604-016-2049-3>
- Luz, R. A. S., Pereira, A. R., de Souza, J. C. P., Sales, F. C. P. F., y Crespilho, F. N. (2014). Enzyme Biofuel Cells: Thermodynamics, Kinetics and Challenges in Applicability. *ChemElectroChem*, 1(11), 1751–1777. <http://doi.org/10.1002/celec.201402141>
- Ma, W., Ying, Y.-L., Qin, L.-X., Gu, Z., Zhou, H., Li, D.-W., y Long, Y.-T. (2013). Investigating electron-transfer processes using a biomimetic hybrid bilayer membrane system. *Nature Protocols*, 8(3), 439–450. <http://doi.org/10.1038/nprot.2013.007>
- MacVittie, K., Conlon, T., y Katz, E. (2015). A wireless transmission system powered by an enzyme biofuel cell implanted in an orange. *Bioelectrochemistry*, 106, 28–33. <http://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.10.005>

- Martínez-Ortiz, J. (2010). Diseño y construcción de una celda de combustible enzimática híbrida Zn-lacasa. *Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM.*
- Martinez-Ortiz, J., Flores, R., y Vazquez-Duhalt, R. (2011). Molecular design of laccase cathode for direct electron transfer in a biofuel cell. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5), 2626–2631. <http://doi.org/10.1016/j.bios.2010.11.022>
- Martins, L. O., Soares, C. M., Pereira, M. M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G. H., y Henriques, A. O. (2002). Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the Bacillus subtilis endospore coat. *Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 18849–18859. <http://doi.org/10.1074/jbc.M200827200>
- Matera, I., Gullotto, A., Tilli, S., Ferraroni, M., Scozzafava, A., y Briganti, F. (2008). Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus Trametes trogii complexed with p-toluate. *Inorganica Chimica Acta*, 361, 4129–4137. <http://doi.org/10.1016/j.ica.2008.03.091>
- Meredith, M. T., Kao, D.-Y., Hickey, D., Schmidtke, D. W., y Glatzhofer, D. T. (2011). High Current Density Ferrocene-Modified Linear Poly(ethylenimine) Bioanodes and Their Use in Biofuel Cells. *Journal of The Electrochemical Society*, 158(2), B166–B171. <http://doi.org/10.1149/1.3505950>
- Meredith, M. T., y Minteer, S. D. (2012). Biofuel Cells: Enhanced Enzymatic Bioelectrocatalysis. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 5(1), 157–179. <http://doi.org/10.1146/annurev-anchem-062011-143049>
- Milton, R. D., Hickey, D. P., Abdellaoui, S., Lim, K., Wu, F., Tan, B., y Minteer, S. D. (2015). Rational design of quinones for high power density biofuel cells. *Chemical Science*, 6(8), 4867–4875. <http://doi.org/10.1039/C5SC01538C>
- Milton, R. D., y Minteer, S. D. (2017). Direct enzymatic bioelectrocatalysis: differentiating between myth and reality. *Journal of the Royal Society Interface*, 14(131), 20170253. <http://doi.org/10.1098/rsif.2017.0253>
- Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shleev, S. V, y Yaropolov, A. I. (2007). Blue Laccase. *Biochemistry (Moscow)*, 72(10), 1136–1150.
- Munro, A. W., Leys, D. G., Mclean, K. J., Marshall, K. R., Ost, T. W. B., Daff, S., y Dutton, L. (2002). P450 BM3: the very model of a modern flavocytochrome. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(5), 250–257.
- Olsthoorn, A. J., y Duine, J. A. (1996). Production, characterization, and reconstitution of recombinant quinoprotein glucose dehydrogenase (soluble type; EC 1.1.99.17) apoenzyme of Acinetobacter calcoaceticus. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 336(1), 42–8. <http://doi.org/10.1006/abbi.1996.0530>
- Page, C. C., Moser, C. C., Chen, X., y Dutton, P. L. (1999). Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature*, 13(2), 47–52.
- Pasta, M., La, F., y Cui, Y. (2010). Electrochimica Acta Mechanism of glucose electrochemical oxidation on gold surface. *Electrochimica Acta*, 55(20), 5561–5568. <http://doi.org/10.1016/j.electacta.2010.04.069>
- Patolsky, F., Weizmann, Y., y Willner, I. (2004). Long-Range Electrical Contacting of Redox Enzymes by SWCNT Connectors. *Angewandte Chemie International Edition*, 2113–2117. <http://doi.org/10.1002/anie.200353275>
- Posthuma-Trumpie, G. A., van den Berg, W. A. M., van den Wiel, D. F. M., Schaaper, W. M. M., Korf, J., y

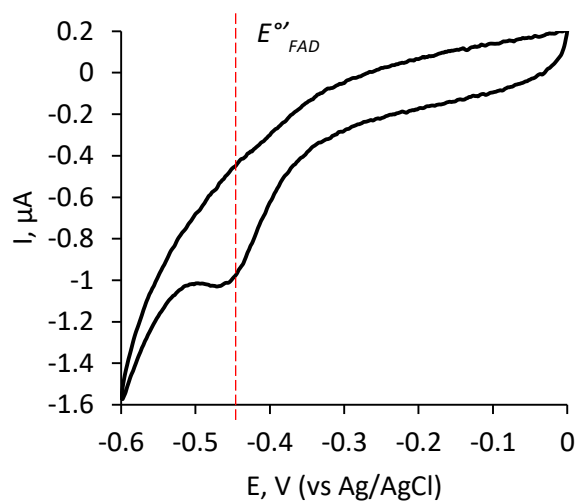
- van Berkel, W. J. H. (2007). Reconstitution of apoglucose oxidase with FAD conjugates for biosensing of progesterone. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1774, 803–812. <http://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.04.009>
- Potter, M. C. (1910). Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proceedings of the Royal Society B*, 84, 260–276.
- PrévotEAU, A., Courjean, O., y Mano, N. (2010). Deglycosylation of glucose oxidase to improve biosensors and biofuel cells. *Electrochemistry Communications*, 12(2), 213–215. <http://doi.org/10.1016/j.elecom.2009.11.027>
- Raitman, O. A., Patolsky, F., Katz, E., y Willner, I. (2002). Electrical contacting of glucose dehydrogenase by the reconstitution of a pyrroloquinoline quinone-functionalized polyaniline film associated with an Au-electrode : an in situ electrochemical SPR study. *Chemical Communication*, 1936–1937. <http://doi.org/10.1039/b205393d>
- Rasmussen, M., Abdellaoui, S., y Minter, S. D. (2016). Enzymatic biofuel cells: 30 years of critical advancements. *Biosensors and Bioelectronics*, 76, 91–102. <http://doi.org/10.1016/j.bios.2015.06.029>
- Reuillard, B., Abreu, C., Lalaoui, N., Le Goff, A., Holzinger, M., Ondel, O., y Cosnier, S. (2015). One-year stability for a glucose/oxygen biofuel cell combined with pH reactivation of the laccase/carbon nanotube biocathode. *Bioelectrochemistry*, 106, 73–76. <http://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2015.04.009>
- Riklin, A., Katz, E., Willner, I., Stocker, A., y Bückmann, A. (1995). Improving enzyme-electrode contacts by redox modification of cofactors. *Nature*, 376, 672–675. <http://doi.org/10.1038/376672a0>
- Rodgers, C. J., Blanford, C. F., Giddens, S. R., Skamnioti, P., Armstrong, F. A., y Gurr, S. J. (2010). Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes? *Trends in Biotechnology*, 28(2), 63–72. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.11.001>
- Sarapuu, A., Tammeveski, K., Tenno, T. T., Sammelselg, V., Kontturi, K., y Schiffrin, D. J. (2001). Electrochemical reduction of oxygen on thin-film Au electrodes in acid solution. *Electrochemistry Communications*, 3, 446–450.
- Schröder, U., Niesen, J., y Scholz, F. (2003). A generation of microbial fuel cells with current outputs boosted by more than one order of magnitude. *Angewandte Chemie International Edition*, 42, 2880–2883.
- Şenel, M., Nergiz, C., Dervisevic, M., y Çevik, E. (2013). Development of Amperometric glucose biosensor based on reconstitution of glucose oxidase on polymeric 3-Aminophenyl Boronic Acid Monolayer. *Electroanalysis*, 25(5), 1194–1200. <http://doi.org/10.1002/elan.201200535>
- Sharaf, O. Z., y Orhan, M. F. (2014). An overview of fuel cell technology: Fundamentals and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 32, 810–853. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.012>
- Shleev, S., Jarosz-Wilkolazka, A., Khalunina, A., Morozova, O., Yaropolov, A., Ruzgas, T., y Gorton, L. (2005). Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes. *Bioelectrochemistry*, 67, 115–124. <http://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2005.02.004>
- Slaughter, G., y Tanmay, K. (2015). Enzymatic glucose biofuel cell and its application. *Journal of Biochips & Tissue Chips*, 5(1), 1–10. <http://doi.org/10.4172/2153-0777.1000111>
- Sokic-Lazic, D., Arechederra, R. L., Treu, B. L., y Minter, S. D. (2010). Oxidation of biofuels: Fuel diversity

- and effectiveness of fuel oxidation through multiple enzyme cascades. *Electroanalysis*, 22(7–8), 757–764. <http://doi.org/10.1002/elan.200980010>
- Soukharev, V., Mano, N., y Heller, A. (2004). A miniature biofuel cell operating at 0.78 V. *Journal of American Chemical Society*, 126, 8368–8369.
- Szczupak, A., Halámek, J., Halámková, L., Bocharova, V., Alfonta, L., y Katz, E. (2012). Living battery – biofuel cells operating in vivo in clams. *Energy & Environmental Science*, 5(10), 8891–8895. <http://doi.org/10.1039/c2ee21626d>
- Thuesen, M. H., Farver, O., Reinhammar, B., y Ulstrup, J. (1998). Cyclic Voltammetry and Electrocatalysis of Blue Copper Oxidase from *Polyporus versicolor* laccase. *Acta Chemica Scandinavica*. <http://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.52-0555>
- Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140, 19–26.
- Turnbull, P. C. B., Tindall, B. W., Coetzee, J. D., Conradie, C. M., Bull, R. L., Lindeque, P. M., y Huebschle, O. J. B. (2004). Vaccine-induced protection against anthrax in cheetah (*Acinonyx jubatus*) and black rhinoceros (*Diceros bicornis*). *Vaccine*, 22(25–26), 3340–3347. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.02.037>
- Vazquez-Duhalt, R., Aguila, S. A., Arrocha, A. A., y Ayala, M. (2014). QM/MM Molecular Modeling and Marcus Theory in the Molecular Design of Electrodes for Enzymatic Fuel Cells. *ChemElectroChem*, 1(3), 496–513. <http://doi.org/10.1002/celec.201300096>
- Vidal, J., Espuelas, J., y Castillo, J. (2004). Amperometric cholesterol biosensor based on in situ reconstituted cholesterol oxidase on an immobilized monolayer of flavin adenine dinucleotide cofactor. *Analytical Biochemistry*, 333, 88–98. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2004.06.005>
- Wang, Z., Liu, S., Wu, P., y Cai, C. (2009). Detection of glucose based on direct electron transfer reaction of glucose oxidase immobilized on highly ordered polyaniline nanotubes. *Analytical Chemistry*, 81(4), 1638–1645. <http://doi.org/10.1021/ac802421h>
- Wang, Z., Xia, L., Xia, J., An, Z., y Gong, S. (2016). Direct energy harvesting from starch by hybrid enzymatic and non-enzymatic cascade bioanode. *RSC Advances*, 6(31), 26421–26424. <http://doi.org/10.1039/C6RA02059C>
- Willner, I. (2002). Biomaterial for Sensors, Fuel Cells y Circuitry. *Science*, 298(5602), 2407–2408.
- Willner, I., Yan, Y. M., Willner, B., y Tel-Vered, R. (2009). Integrated enzyme-based biofuel cells - A review. *Fuel Cells*, 9(1), 7–24. <http://doi.org/10.1002/uce.200800115>
- Wohlfahrt, G., Trivi, S., Zeremski, J., Pericin, D., y Vladimir, L. (2004). The chemical mechanism of action of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 260, 69–83. <http://doi.org/10.1023/B>
- Xiao, Y., Patolsky, F., Katz, E., Hainfeld, J. F., y Willner, I. (2003). “Plugging into Enzymes”: Nanowiring of Redox Enzymes by a Gold Nanoparticle. *Science*, 299, 1877–1881.
- Yahiro, A., Lee, M., y Kimble, D. (1964). Bioelectrochemistry I Enzyme Utilizing Bio- Fuel Cell Studies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 88, 373–383.
- Yan, Y. M., Yehezkeli, O., y Willner, I. (2007). Integrated, electrically contacted NAD(P)⁺-dependent enzyme-carbon nanotube electrodes for biosensors and biofuel cell applications. *Chemistry-A European Journal*, 13(36), 10168–10175. <http://doi.org/10.1002/chem.200700806>
- Yang, J., Zhang, R., Xu, Y., He, P., y Fang, Y. (2008). Direct electrochemistry study of glucose oxidase on Pt

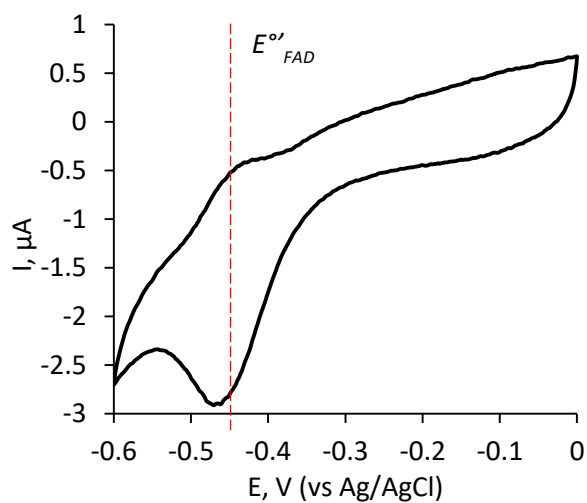
nanoparticle-modified aligned carbon nanotubes electrode by the assistance of chitosan-CdS and its biosensing for glucose. *Electrochemistry Communications*, 10(12), 1889–1892. <http://doi.org/10.1016/j.elecom.2008.10.007>

- Yehezkeli, O., Moshe, M., Tel-Vered, R., Feng, Y., Li, Y., Tian, H., y Willner, I. (2010). Switchable photochemical/electrochemical wiring of glucose oxidase with electrodes. *Analyst*, 135(3), 474–476. <http://doi.org/10.1039/b927009d>
- Yehezkeli, O., Tel-Vered, R., Raichlin, S., y Willner, I. (2011). Nano-engineered flavin-dependent glucose dehydrogenase/gold nanoparticle-modified electrodes for glucose sensing and biofuel cell applications. *ACS Nano*, 5(3), 2385–2391. <http://doi.org/10.1021/nn200313t>
- Yoon, J., Mirica, L. M., Stack, T. D. P., y Solomon, E. I. (2005). Variable-Temperature , Variable-Field Magnetic Circular Dichroism Studies of Tris-Hydroxy- and μ_3 -Oxo-Bridged Trinuclear Cu (II) Complexes : Evaluation of Proposed Structures of the Native Intermediate of the Multicopper Oxidases. *Journal of the American Chemical Society*, 127, 13680–13693.
- Zayats, M., Katz, E., Baron, R., y Willner, I. (2005). Reconstitution of Apo-Glucose Dehydrogenase on Pyrroloquinoline Quinone-Functionalized Au Nanoparticles Yields an Electrically Contacted Biocatalyst. *Journal of the American Chemical Society*, 127(35), 12400–12406.
- Zayats, M., Katz, E., y Willner, I. (2002). Electrical Contacting of Glucose Oxidase by Surface-Reconstitution of the Apo-Protein on a Relay-Boronic Acid-FAD Cofactor Monolayer. *Journal of the American Chemical Society*, 124(10), 2120–2121.
- Zayats, M., Willner, B., y Willner, I. (2008). Design of amperometric biosensors and biofuel cells by the reconstitution of electrically contacted enzyme electrodes. *Electroanalysis*, 20(6), 583–601. <http://doi.org/10.1002/elan.200704128>
- Zebda, A., Cosnier, S., Alcaraz, J., Holzinger, M., Le Goff, A., Gondran, C., y Cinquin, P. (2013). Single glucose biofuel cells implanted in rats power electronic devices. *Scientific Reports*, 3(1516). <http://doi.org/10.1038/srep01516>
- Zebda, A., Gondran, C., Cinquin, P., y Cosnier, S. (2012). Glucose biofuel cell construction based on enzyme, graphite particle and redox mediator compression. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 173, 760–764. <http://doi.org/10.1016/j.snb.2012.07.089>
- Zebda, A., Gondran, C., Le Goff, A., Holzinger, M., Cinquin, P., y Cosnier, S. (2011). Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes. *Nature Communications*, 2(370). <http://doi.org/10.1038/ncomms1365>
- Zhang, T., Zeng, Y., Chen, S., Ai, X., y Yang, H. (2007). Improved performances of E. coli-catalyzed microbial fuel cells with composite graphite/PTFE anodes. *Electrochemistry Communications*, 9, 349–353.

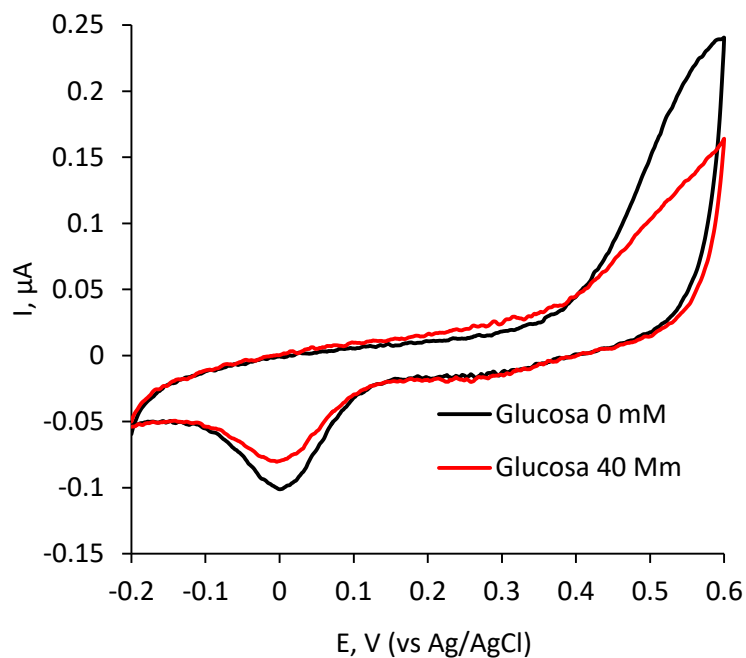
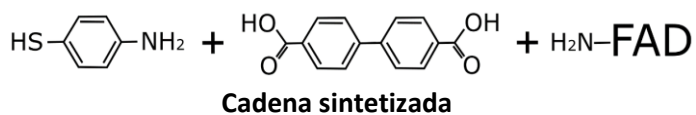
Anexos



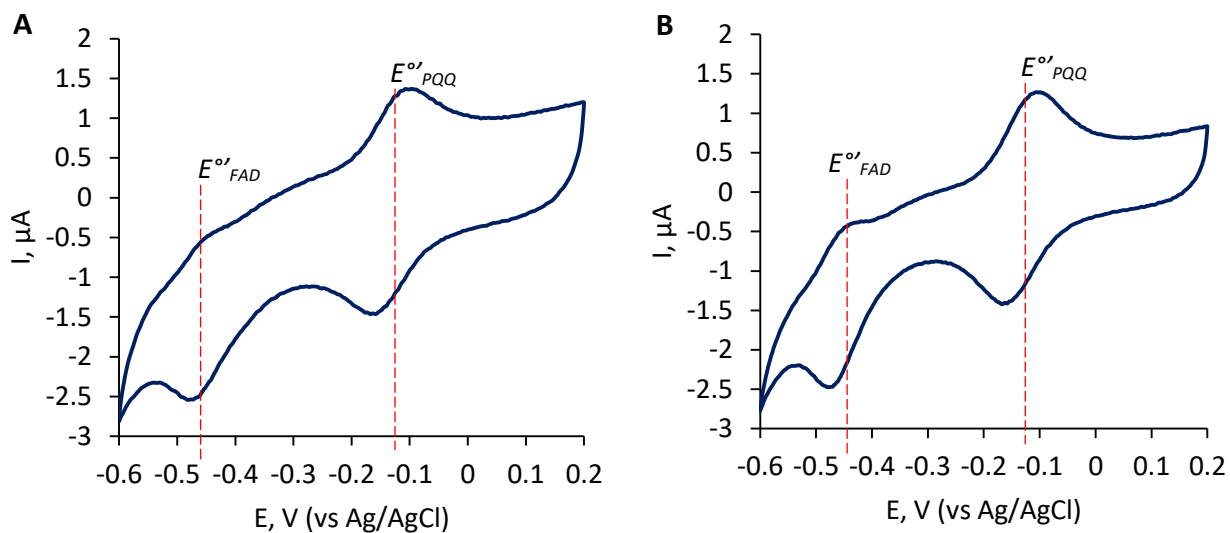
Anexo 1. Ciclovoltograma de electrodos funcionalizados con FAD después de la reconstitución de la glucosa oxidasa. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 0.2 \text{ V/s}$, ciclo 5.



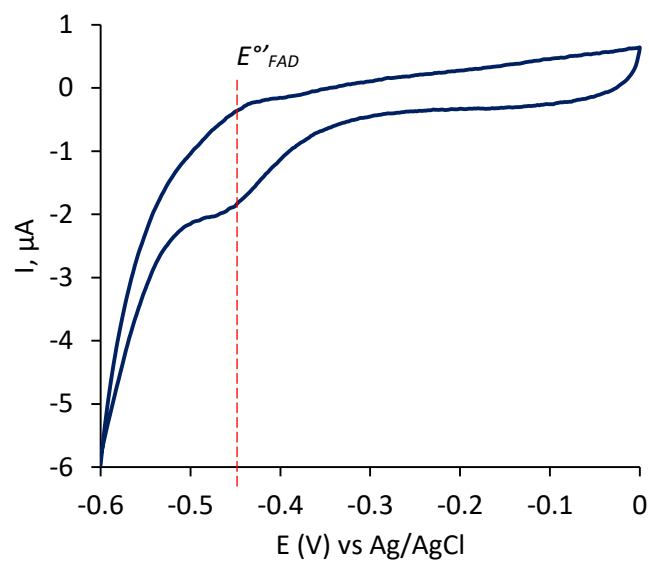
Anexo 2. Ciclovoltograma de electrodos funcionalizados con FAD después de la reconstitución de la glucosa oxidasa. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 0.2 \text{ V/s}$, ciclo 5.



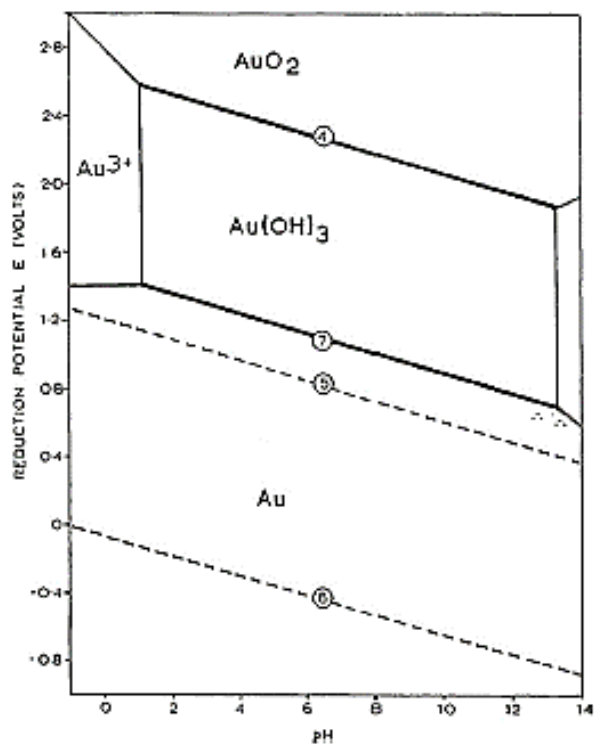
Anexo 3. Ciclovoltogramas de electrodos de oro con glucosa oxidasa orientada molecularmente en ausencia (negra) y presencia (roja) de glucosa 40 mM. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 5$ mV/s, ciclo 5.



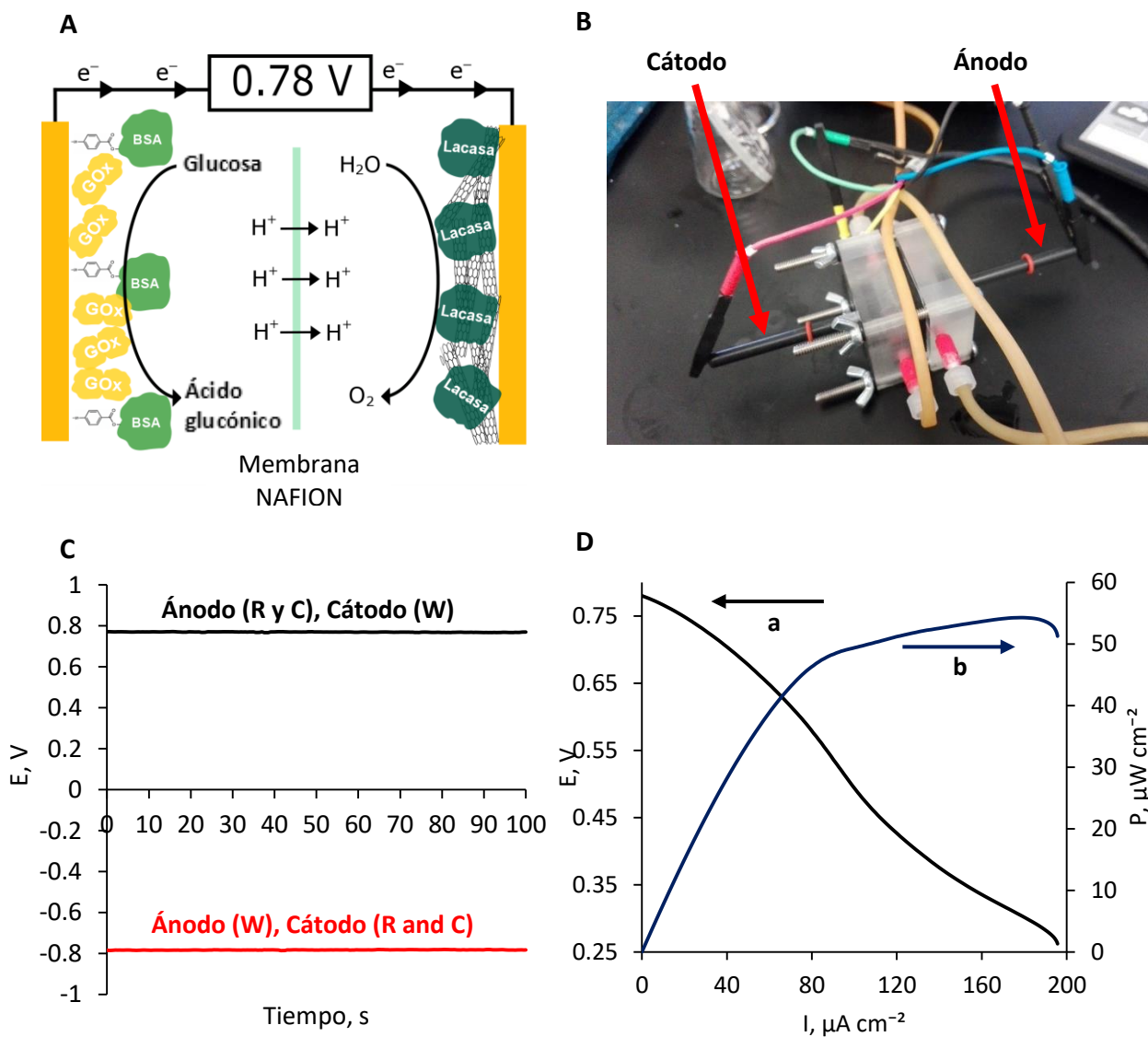
Anexo 4. Ciclovoltogramas de electrodos de oro funcionalizados con PQQ y FAD después del proceso de recostitución de glucosa oxidasa. A) Cadena sintetizada de menor longitud. B) Cadena sintetizada de mayor longitud. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 0.2$ V/s, ciclo 5.



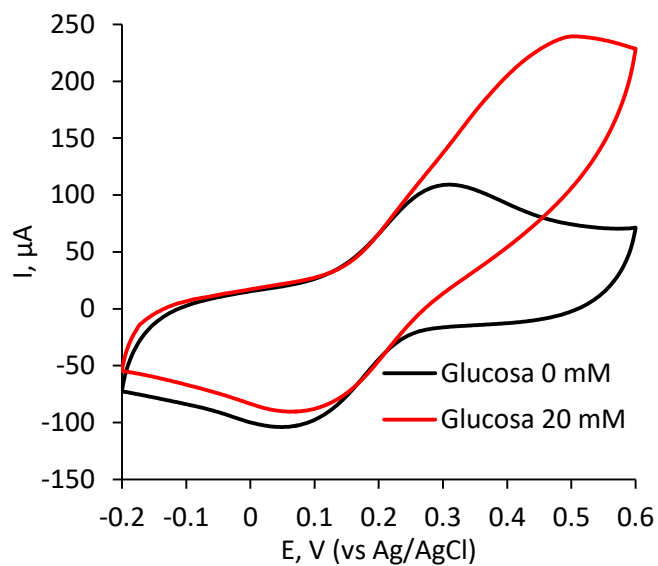
Anexo 5. Ciclovoltagrama de electrodos funcionalizados con FAD después de la reconstitución de la glucosa oxidasa. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 0.2$ V/s, ciclo 5.



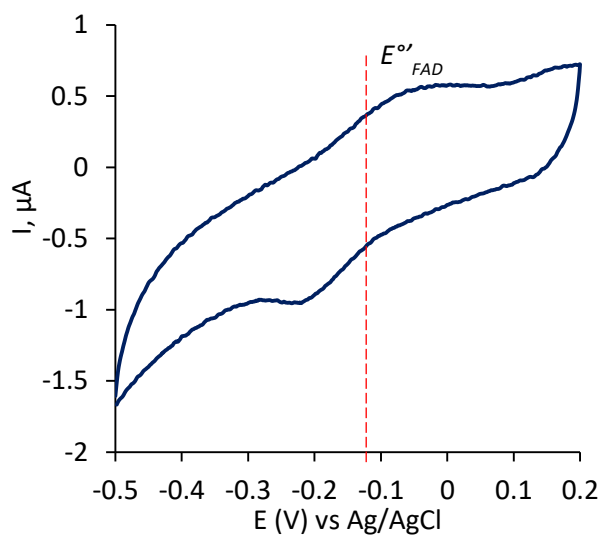
Anexo 6. Diagrama de Pourbaix para un sistema Au-H₂O a 25°C.



Anexo 7. A) Esquema de la celda de combustible híbrida ánodo-oro cátodo-lacasa con SWCNTs. B) Fotografía de la celda de combustible construida. C) Cronopotenciometría de la celda combustible. D) (a) Curva de polarización. (b) Curva de potencia. Cámara anódica: glucosa 160 mM, buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.4. Cámara catódica: Buffer de succinatos 50 mM pH 4.6 saturado con O₂. $v = 1$ mV/s.



Anexo 8. Ciclovoltagramas de electrodos de oro con SWCNTs, glucosa oxidasa e hidroquinona en ausencia (negra) y presencia (roja) de glucosa 40 mM. Buffer de succinatos 50 mM pH 4.5, $v = 5$ mV/s, ciclo 5.



Anexo 9. Ciclovoltagramas de electrodos funcionalizados con PQQ después del proceso de reconstitución de la glucosa deshidrogenasa. Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.3, $v = 0.2$ V/s, ciclo 5.