



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Energía Renovable

DESARROLLO DE ELECTRODOS POLIMÉRICOS ENZIMÁTICOS PARA LA OXIDACIÓN DE ETANOL

Tesis que presenta

DENISE ESTHER GUTIÉRREZ DOMÍNGUEZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida, Yucatán. Octubre 2012

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación Científica, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de los expuesto en la presentación Declaración.

Mérida, Yucatán, México. Octubre de 2012

I.A Denise Esther Gutiérrez Domínguez

El trabajo de tesis titulado "Desarrollo de electrodos poliméricos enzimáticos para la oxidación de etanol", fue desarrollado por la estudiante Denise Esther Gutiérrez Domínguez en el laboratorio de la Unidad de Energía Renovable del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de la Dra. Mascha Afra Smit, en el programa de Maestría en Ciencias en Energía Renovable de este Centro.

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela Director Académico Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo financiero otorgado por CONACYT con la beca 251809 y con los proyectos CIAM 58636 y Fordecyt 116157.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, Unidad de Energía Renovable, por las instalaciones y facilidades concedidas para el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Blondy Canto Canché por su colaboración en el proyecto. Al Dr. Iván Oliva Arias y al Dr. Oscar Ceh del Centro de Investigaciones Avanzadas unidad Mérida por las facilidades otorgadas.

A la directora de este trabajo Dra. Mascha Afra Smit y al comité tutorial-revisor integrado por la Dra. Daniella Esperanza Pacheco Catalán, Dr. Rodrigo Patiño Díaz y Dra. Mónica Arely Lucio García.

A los técnicos M.C. Enrique Escobedo Hernández, I.Q. Martín Baas López, M.C. Lizbeth A. Castro Concha y Q.I. Tanit Toledano Thompson por el apoyo técnico brindado.

A mis padres (María Esther y Ángel Luis) y hermanos (Luis David y Ángel Arturo) por su apoyo incondicional y a mis amigos que se volvieron como mi familia: Nancy, Paco, Mayra, Fernando, Anahí y Miguel.

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO GENERAL	3
OBJETIVOS PARTICULARES	3
JUSTIFICACIÓN	4
HIPÓTESIS DE TRABAJO	4
CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES	5
1.1 ENZIMAS	5
1.1.1 Enzimas óxido-reductasas	7
1.1.2 Actividad Enzimática	10
1.2 POLÍMEROS INTRÍNSECAMENTE CONDUCTORES	11
1.2.1 Polimerización	13
1.2.2 Estados de oxidación y niveles de energía	15
1.2.3 Polimerización Química	17
1.2.4 Polimerización Electroquímica	17
1.3 ELECTRODOS ENZIMÁTICOS	18
1.4 CELDAS DE COMBUSTIBLE ENZIMÁTICAS	23
CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	27
2.1 REACTIVOS Y EQUIPOS	27
2.2 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SOLUCIÓN	28
2.2.1 Método espectrofotométrico	28
2.2.2 Método electroquímico	32
2.3 PREPARACIÓN DEL ELECTRODO	33
2.3.1 Síntesis del polímero	33
2.3.2 Impedancia electroquímica	35
2.3.3 Inmovilización de la enzima	35
2.4 CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA	
2.4.1. Voltamperometría cíclica antes de aplicar la enzima	

Índice

2.4.2 Voltamperometría cíclica de electrodos poliméricos enzimáticos	36
2.4.3 Amperometría	37
2.5 OTRAS PRUEBAS	37
2.5.1 Cuantificación de la enzima	37
2.5.2 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	38
2.5.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	39
2.5.4 Caracterización con el Microscopio de Fuerza Atómica (AFM)	39
2.6 EVALUACIÓN DE LOS ELECTRODOS EN UNA CELDA DE COMBUSTI	BLE
	40
CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
3.1 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SOLUCIÓN	41
3.1.1 Método espectrofotométrico	41
3.1.2 Método electroquímico	41
3.2 PREPARACIÓN DEL ELECTRODO	43
3.2.1 Síntesis del polímero	43
3.2.2 Inmovilización de la enzima.	45
3.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS ELECTRODOS ENZIMÁTICOS	45
3.3.1 Caracterización antes de la enzima	45
3.3.2 Caracterización con la enzima	47
3.3.3 Cuantificación de la enzima	55
3.3.4 Caracterización con el Microscopio de Fuerza Atómica	58
3.4 EVALUACIÓN LOS ELECTRODOS EN UNA CELDA DE COMBUSTIBLE	62
CONCLUSIONES	67
PERSPECTIVAS	69
BIBLIOGRAFÍA	71

Lista de Tablas

Tabla 1.1. Principales características de celda de combustible convencional y enzimática	24
Tabla 1.2. Compendio de celdas de combustible enzimáticas reportadas	26
Tabla 3.1. Valores de resistencia óhmica en la celda para diferentes electrodos	46
Tabla 3.2. Absorbancia de soluciones finales de trabajo de voltamperometrías cíclicas	53

Lista de Figuras

Figura 1.1. Mecanismo de reacción de enzimas deshidrogenasas [12]	7
Figura 1.2. Estructura de NAD ⁺ y NADH [13].	7
Figura 1.3. Reacción de oxidación de etanol por la enzima YADH [21]	9
Figura 1.4. Mecanismo de propagación de poli(pirrol) a través de la unión de radicales	
catiónicos [29]	14
Figura 1.5. Estructura de poli(pirrol) (a) neutro, (b) polarón y (c) bipolarón [29]	16
Figura 1.6. Diagrama electrónico de energía de poli(pirrol) (a) neutro, (b) polarón, (c)	
bipolarón y (d) completamente dopado [29].	16
Figura 1.7. Electrodo enzimático [30].	19
Figura 1.8. Métodos de inmovilización de enzimas [30]	19
Figura 2.1. Método espectroscópico de absorción [52]	28
Figura 2.2. Celdas de cuarzo usadas en la medición espectrofotométrica.	31
Figura 2.3. Celda de tres electrodos.	33
Figura 2.4. Curva de polarización del pirrol	34
Figura 2.5. Proceso de inmovilización de la enzima YADH	35
Figura 2.6. Análisis cuantitativo de BSA usando el NanoOrange®Protein Quantitation	Kit
[34]	38
Figura 3.1. Voltamperometrías cíclicas vs SCE a diferentes velocidades de un electrodo	o de
carbón en solución buffer de fosfatos con etanol 2 mM, NAD ⁺ 1.5 mM y YADH. Cicle	0
cinco	42
Figura 3.2. Curva <i>I vs t</i> obtenida durante el depósito de poli(pirrol) a 0.7V _{SCE}	43
Figura 3.3. Electrodos de carbón: (a) sin polímero y (b) con polímero	43
Figura 3.4. Micrografías SEM de poli(pirrol) depositado potenciostáticamente sobre pa	pel
carbón	44
Figura 3.5. Electrodos poliméricos con enzima depositada.	45
Figura 3.6. Voltamperometría cíclica de PPy en solución de NaH ₂ PO ₄ 0.1 M a 10 mV/s	s, vs
SCE, ciclo cinco.	46

Figura 3.7. Voltamperometrias del electrodo de carbón con diferente concentración de
YADH adsorbida. Solución buffer de fosfatos pH 8.2, con 2 mM de etanol y 1.5 mM de
NAD ⁺ a 100 mV/s vs SCE, segundo ciclo
Figura 3.8. Voltamperometrías cíclicas de electrodos poliméricos con enzima adsorbida en
diferente concentración, 100 mV/s, vs SCE segundo ciclo
Figura 3.9. Voltamperometrías cíclicas de electrodos poliméricos con enzima entrecruzada,
100 mV/s, vs SCE, segundo ciclo
Figura 3.10. Voltamperometrías cíclicas de electrodos poliméricos con enzima
inmovilizada, 100 mV/s, vs SCE, segundo ciclo50
Figura 3.11. Voltamperometrías cíclicas en diferentes tiempos del electrodo polimérico con
enzima adsorbida, 100 mV/s, vs SCE, segundo ciclo
Figura 3.12. Voltamperometrías cíclicas en diferentes tiempos del electrodo polimérico con
enzima entrecruzada, 100 mV/s, vs SCE, segundo ciclo
Figura 3.13. Espectro infrarrojo de una solución final de trabajo de las voltamperometrías
cíclicas de electrodos poliméricos enzimáticos
Figura 3.14. Amperometrías con electrodos poliméricos enzimáticos a 0.85 V _{SCE} 54
Figura 3.15. Curvas de calibración de BSA y YADH a 597 nm56
Figura 3.16. Proteínas solubles medidas con NanoOrange®
Figura 3.17. Electrodo de PPy con NanoOrange®57
Figura 3.18. Espectros de emisión de fluorescencia de YADH, PPy y electrodo polimérico
enzimático
Figura 3.19. Imágenes AFM 3D: (a) papel carbón, (b) PPy, (c) formaciones de PPy, (d)
PPy_YADH
Figura 3.20. Imágenes AFM 3D del electrodo de PPy con YADH adsorbida. Área de
escaneo (a) 1 μm, (b) 300 nm61
Figura 3.21. Curvas I vs E de electrodo polimérico con enzima adsorbida
Figura 3.22. Curvas I vs E de electrodo polimérico con enzima entrecruzada64
Figura 3.23. Curvas de potencia de electrodos poliméricos enzimáticos

Resumen

Las celdas de combustible enzimáticas son dispositivos en los cuales las enzimas se localizan en el electrodo para catalizar la oxidación del combustible; dichos catalizadores biológicos, a diferencia de los inorgánicos, presentan la ventaja de ser selectivos, renovables y limpios. Dentro de los soportes compatibles con las enzimas están los polímeros conductores como el poli(pirrol). En este trabajo la elaboración de los ánodos poliméricos se realizó inmovilizando la enzima alcohol deshidrogenasa de Saccharomyces cerevisiae (YADH) sobre poli(pirrol) depositado en papel carbón mediante un método electroquímico potenciostático. Los procedimientos de inmovilización enzimática aplicados fueron la adsorción directa y el entrecruzamiento con glutaraldehído. La caracterización de los electrodos se hizo mediante voltamperometría cíclica y amperometría, utilizando solución buffer de fosfatos con etanol y β -NAD⁺, como electrolito soporte. Las pruebas de voltamperometría cíclica demuestran que, en los electrodos con poli(pirrol), la reacción de oxidación enzimática del etanol ocurre alrededor de $0V_{SCE}$, registrando valores de corriente superiores por dos órdenes de magnitud a aquellos registrados en electrodos enzimáticos de carbón. Además, los electrodos poliméricos con enzima entrecruzada con glutaraldehído presentan valores de corriente mayores que aquellos con enzima adsorbida, lo cual refleja una mejor retención de la enzima activa en el electrodo. Asimismo, los electrodos con enzima entrecruzada conservan la actividad catalítica por más tiempo que aquellos con enzima adsorbida. Por otra parte, se realizaron mediciones espectrofotométricas y de fluorescencia para determinar respectivamente la actividad enzimática y cuantificar la proteína inmovilizada. Finalmente, ambos electrodos poliméricos enzimáticos se evaluaron como ánodos en una celda de combustible.

Abstract

Enzymatic fuel cells are devices in which enzymes are located in the electrode in order to catalyze fuel oxidation. These biological catalysts, unlike inorganic ones, have the advantage of being selective, renewable and clean. The enzymes are supported onto an electronically conducting material, compatible with the enzymes, for example conductive polymers such as polypyrrole. In this project, polymeric anodes were prepared by immobilizing the enzyme alcohol dehydrogenase from Saccharomyces cerevisiae (YADH) in polypyrrole, potentiostatically electrodeposited onto carbon paper. The applied enzymatic immobilization procedures were both direct adsorption and crosslinking with glutaraldehyde. Characterization of electrodes was made by cyclic voltammetry using a phosphate buffer solution with ethanol and β -NAD⁺, as supporting electrolyte. Cyclic voltammetry showed that enzymatic ethanol oxidation occurs at potential around $0V_{SCE}$ for the polypyrrole electrodes, recording current values higher by two orders of magnitude than those recorded for ethanol oxidation by enzymatic electrodes on carbon. Furthermore, the polymeric enzymatic electrodes crosslinked with glutaraldehyde showed higher current values than those with adsorbed enzyme, which reflects a better retention of the protein on the electrode. Also, electrodes with crosslinked enzyme preserve catalytic activity for longer times than those with adsorbed enzyme. Spectrophotometric and fluorescence measurements were performed in order to determinate respectively enzymatic activity and quantify the immobilized protein. Fuel cell performance is presented for both electrodes with adsorbed and crosslinked enzyme working as anode in an enzymatic ethanol fuel cell.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, temas como la seguridad energética y el calentamiento global han sido los principales promotores del uso de fuentes de energía alternas a los hidrocarburos, teniendo mayor interés en aquellas que son de carácter renovable y amigable con el medio ambiente.

La Agencia Internacional de Energía (IEA por sus siglas en inglés) define a la energía renovable como aquella que se origina a partir de procesos naturales que se restituyen tan rápido como se consumen. El sol, el viento, las caídas de agua (hidroeléctrica), la biomasa y el aprovechamiento del calor interno de la tierra (geotérmica) son ejemplos de dichos procesos.

El incremento en el uso de fuentes renovables de energía contribuye a la diversificación energética en aspectos tecnológicos y geográficos, lo cual permite reducir la dependencia que hay con los combustibles fósiles y los efectos negativos que tiene para la economía la inestabilidad de sus precios [1]. Las tecnologías que han presentado un mayor crecimiento en los últimos años y en las cuales se han demostrado altas eficiencias en la obtención de energía son la solar, eólica y la del hidrógeno [2].

El hidrógeno (H_2) es el elemento más abundante del universo y el más simple sobre la tierra, sin embargo, no se encuentra de manera natural como gas, siempre esta enlazado a otros elementos formando diferentes compuestos, entre ellos, los alcoholes. Éstos se han considerado como combustibles potenciales para aplicaciones móviles, siendo el etanol el más atractivo por la viabilidad de producirlo en grandes cantidades a partir de productos agrícolas y de la fermentación de la biomasa [3].

Las reacciones de oxidación del H_2 , así como de los compuestos que lo contienen, son parte del objeto de estudio de la llamada tecnología del H_2 , la cual aprovecha la conversión electroquímica directa del H_2 para generar electricidad y calor mediante celdas de combustible. En una celda de combustible típica de H_2 , éste se oxida en el ánodo liberando electrones y protones; mientras los electrones pasan a través de un circuito eléctrico externo, los protones atraviesan un electrolito para llegar al cátodo donde reaccionan con el oxígeno produciendo agua. Sin embargo, algunas limitaciones en su funcionamiento aunado al hecho de que trabajan con catalizadores basados en metales preciosos y aleaciones de éstos, condujo al desarrollo de las bioceldas de combustible [4].

Las bioceldas de combustible operan de la misma manera que las celdas convencionales, con la diferencia de que el catalizador inorgánico es remplazado por un catalizador biológico que consiste en organismos vivos productores de enzimas o las enzimas mismas, capaces de oxidar una amplia variedad de combustibles [5]. Las celdas basadas en enzimas han atraído la atención debido a los avances reportados, en ellas la enzima se ubica en el electrodo para catalizar la oxidación del combustible y participa directamente en la reacción que genera electricidad, ofreciendo la ventaja de ser un catalizador renovable, limpio, con selectividad en la reacción, flexibilidad en el tipo de combustible utilizado y con la habilidad de operar a temperaturas de bajas a medias [6]. La eficiencia de estas celdas se encuentra estrechamente ligada a la permanencia de la enzima en el electrodo y a la velocidad de transferencia del electrón desde el sitio activo de la enzima hasta la superficie del electrodo, debido a que la estabilidad de la enzima representa el tiempo de vida útil y la densidad de corriente del dispositivo [7].

Desde 1970, se ha dedicado un considerable esfuerzo a combinar la selectividad de las reacciones catalizadas por enzimas y los transductores electroquímicos para la determinación de compuestos de interés biológico y bioquímico, ya que con dicha combinación se obtienen procedimientos que están libres de la mayoría de las interferencias [8]. Sin embargo, el hecho de que por naturaleza las enzimas presenten periodos de actividad muy cortos (incluso en su propio ambiente), llevó al uso de técnicas de inmovilización para extender su tiempo de vida [9] y de esa forma constituir un *electrodo enzimático*.

En este trabajo se propone el desarrollo de electrodos enzimáticos mediante el acoplamiento de una enzima a un material polimérico, para la oxidación directa del etanol a acetaldehído, por lo cual se han planteado los siguientes objetivos de trabajo:

OBJETIVO GENERAL

Preparar y caracterizar ánodos enzimáticos mediante la inmovilización de la enzima alcohol deshidrogenasa en un material polimérico, para realizar la oxidación de etanol.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Sintetizar electroquímicamente el material polimérico.
- Determinar espectrofotométricamente la actividad de la enzima en solución.
- Elaborar electrodos enzimáticos.
- Caracterizar electroquímica y morfológicamente los electrodos enzimáticos.
- Caracterizar los ánodos enzimáticos en una celda de combustible.

JUSTIFICACIÓN

La formación de compuestos intermedios y el envenenamiento del electrodo por la presencia de CO_2 son inconvenientes observados en las celdas de combustible de etanol directo durante la reacción de oxidación; éstos se relacionan con el uso de catalizadores metálicos convencionales y actúan en detrimento del desempeño de la celda. La sustitución de dichos catalizadores por enzimas que oxidan el etanol a acetaldehído de manera natural evita dichos inconvenientes, por lo que atendiendo a los tratamientos que extienden el tiempo de vida útil de la proteína se plantea la siguiente hipótesis de trabajo.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La inmovilización de la enzima alcohol deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* sobre el polímero conductor intrínseco poli(pirrol) permite conservar la actividad catalítica para la reacción de oxidación de etanol, que presenta en condiciones solubles en buffer de fosfatos.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1 ENZIMAS

Las proteínas son biopolímeros compuestas de 20 α -aminoácidos distintos, por lo que el conjunto único de aminoácidos (cadena polipeptídica) que conforman una proteína le confiere sus propiedades particulares.

Las proteínas que constan de una sola cadena polipeptídica se denominan monoméricas y aquellas que poseen dos o más cadenas son oligoméricas, por lo que se puede decir que una proteína tiene múltiples subunidades cuando cada cadena se considera como una subunidad. Aquellas proteínas que se forman únicamente por residuos de aminoácidos se llaman proteínas simples, mientras que las que contienen además otro grupo químico (grupo prostético), como un átomo metálico, reciben el nombre de proteínas conjugadas.

La actividad funcional de estas moléculas depende de su plegamiento en una estructura tridimensional denominada conformación nativa, la cual se establece en cuatro niveles: *estructura primaria*, definida como la secuencia de residuos de aminoácidos de la proteína; *estructura secundaria*, se forma cuando determinadas regiones de la secuencia primaria se pliegan en una estructura regular repetida; *estructura terciaria*, se conforma mediante la interacción de elementos de la estructura secundaria; y *estructura cuaternaria*, definida como la asociación de dos o más cadenas polipeptídicas para formar una proteína de múltiples unidades [10].

La estabilidad de una proteína se debe a un balance entre fuerzas estabilizadoras y desestabilizadoras, por lo que cualquier cambio en su interacción la afecta. La temperatura es el principal factor que influye en este proceso ya que, de manera general, a mayor temperatura la estabilidad de la proteína disminuye, sin embargo, los rangos de tolerancia térmica dependen del tipo de proteína tratada, por ejemplo, la albúmina de suero en solución se desnaturaliza a temperaturas menores de 0°C y mayores de 50°C. Otro factor

determinante es el pH, puesto que valores extremos provocan una repulsión entre cargas dentro de la proteína y por consecuencia su desdoblamiento [11].

La mayoría de las enzimas son proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones biológicas. Se encuentran entre las más notables de las biomoléculas conocidas debido a su extraordinaria especificidad y a su poder catalítico, mucho mayor que el de los catalizadores hechos por el hombre.

La clasificación internacional de las enzimas las divide en seis clases principales. De acuerdo con el tipo de reacción en la que intervienen, éstas son:

- 1. Óxido-reductasas (Reacciones de óxido-reducción).
- 2. Transferasas (Transferencia de grupos funcionales)
- 3. Hidrolasas (Reacciones de hidrólisis).
- 4. Liasas (Adición a los dobles enlaces).
- 5. Isomerasas (Reacciones de isomerización)
- 6. Ligasas (Formación de enlaces con escisión del ATP).

Más del 30% de todas las enzimas conocidas son óxido-reductasas, es decir, catalizan reacciones redox. Muchas llevan a cabo la transferencia de electrones a larga distancia y acoplan este proceso a transformaciones discretas de un sustrato en el sito catalítico y también a cambios conformacionales y de bombeo transmembranal de iones/protones. Este acoplamiento significa que el potencial electroquímico (que controla los estados de oxidación y la velocidad a la cual se interconvierten) debe ser un poderoso y directo determinante de la actividad enzimática y también una importante variable experimental, sin embargo estas predicciones siguen en gran parte inexploradas [12].

1.1.1 Enzimas óxido-reductasas

Las enzimas óxido-reductasas se pueden clasificar en función del aceptor de electrones al cual están acopladas; estos pueden ser NAD⁺, NADP⁺, citocromos, oxígeno, quinonas u otros compuestos. Dentro de las enzimas dependientes de NAD⁺, encontramos al grupo de las deshidrogenasas, las cuales se diferencian con base en el sustrato sobre el cual actúan y cuya función es transferir dos átomos de hidrógeno del sustrato en estado reducido al aceptor de electrones, NAD⁺, como lo muestra la siguiente figura:



X = O, NH

Figura 1.1. Mecanismo de reacción de enzimas deshidrogenasas [12].

La parte activa del NAD^+ se encuentra en el anillo heterocíclico de nicotinamida. En su forma oxidada es una sal piridina, la cual se transforma a 1,4-dihidro-piridina cuando se reduce, como se muestra en la figura 1.2.



R = Ribosa-ADP

Figura 1.2. Estructura de NAD⁺ y NADH [13].

El potencial redox del NAD⁺ es de -0.32V, por lo tanto su forma reducida, el NADH, es de los agentes reductores biológicos más fuertes que se encuentran fácilmente disponibles. Este compuesto es un reactivo estequiométrico que no se une a la enzima de forma covalente durante la reacción, por lo que se libera como NADH al final de la misma. Ya que el NADH presenta una fuerte absorción espectroscópica a 340 nm, la reacción de reducción se puede seguir por espectrofotometría. Físicamente el NAD⁺ tiene el aspecto de polvo blanco, es higroscópico y muy soluble en agua; su solución es incolora y estable durante aproximadamente una semana a 4°C y pH neutro, de lo contrario se descompone rápidamente [13].

Las enzimas alcohol deshidrogenasas (ADH) conocidas hasta ahora se pueden clasificar en tres grupos: las de cadena larga con hierro activado y aproximadamente 385 aminoácidos por subunidad; las de cadena media, dependientes de zinc, con aproximadamente 350 aminoácidos por subunidad (*e.g.* ADH de hígado de caballo) y las de cadena corta, independientes de zinc, con cerca de 250 aminoácidos por subunidad (*e.g.* ADH de *Lactobacillus brevis*) [14].

La alcohol deshidrogenasa de levadura (YADH, por sus siglas en inglés) es la enzima más estudiada y se obtiene comúnmente de la levadura para pan, *Saccharomyces cerevisiae*. Pertenece al segundo grupo de alcohol deshidrogenasas y se trata de un tetrámero de peso molecular entre 141 y 152 kDa [15,16], identificado por la comisión internacional de las enzimas con el número 1.1.1.1. Está compuesta de 4 subunidades, cada una de las cuales posee un átomo de zinc, dos grupos reactivos sulfhidrilos y un residuo de histidina en el sitio activo [17, 18, 19].

El mecanismo de reacción de esta molécula consiste en una catálisis electrofílica mediada por el zinc y en la cual se convierte el etanol y el NAD⁺ en acetaldehído y NADH, como lo muestra la figura 1.3. La actividad de esta enzima disminuye cuando las concentraciones del alcohol son mínimas o excesivas [20]. La YADH puede actuar sobre otros alcoholes además del etanol; en general, se observó que para la YADH los alcoholes son mejores sustratos conforme su longitud de cadena es más corta [21].



Figura 1.3. Reacción de oxidación de etanol por la enzima YADH [21].

Entre los inhibidores de esta enzima se encuentran el N-alquil-maleimida, la iodoacetamida, la 1,10-fenantrolina, la 8-hidroxiquinolina, el 2,2'-bipiridilo, la tiourea, análogos de β -NAD, derivados de purinas y pirimidinas, el cloroetanol y el fluoroetanol [22]. Por otra parte, la YADH se desnaturaliza de manera reversible en concentraciones de urea menores a 2 M, debido a que se disocia en sus unidades. Sin embargo, a concentraciones mayores se produce un desprendimiento de las cadenas peptídicas y se genera una desnaturalización irreversible, ya que pierde la capacidad de enlazarse con la coenzima. Otros estudios han demostrado que su desnaturalización por temperatura se presenta entre 35°C y 40°C, además de que los tratamientos con rayos X, luz ultravioleta y foto oxidación también son capaces de inactivarla.

Con base en su composición, es probable que la YADH se pueda enlazar con cuatro moléculas de coenzima, una por cada subunidad. Sin embargo, estudios realizados al respecto, utilizando diferentes métodos de cuantificación, reportan resultados diferentes que van desde 2.2 a 4 moléculas de NADH o NAD⁺ por molécula de enzima. En los casos en los que se hallaron enlazadas menos de 4 moléculas de coenzima se infiere que se trata de una cooperación negativa [21].

1.1.2 Actividad Enzimática

La actividad de algunas enzimas depende solamente de su estructura como proteínas, mientras que otras, como la YADH, necesitan además uno o más componentes no proteicos, llamados *cofactores*. El cofactor puede ser un ion metálico, o bien una molécula orgánica llamada coenzima. El complejo enzima-cofactor catalíticamente activo recibe el nombre de holoenzima. En las enzimas que precisan de iones metálicos como cofactores, el ion metálico puede actuar como centro catalítico primario, como grupo puente para reunir el sustrato y la enzima o como agente estabilizante de la conformación de la proteína enzimática en su forma catalíticamente activa. Las enzimas que precisan de iones metálico, por sí solo, ya posee una actividad catalítica primaria, muy incrementada a su vez por la proteína enzimática [23].

La unidad de actividad enzimática empleada más comúnmente se define como la cantidad de enzima que origina la transformación de 1.0µmol (10⁻⁶mol) de sustrato por minuto a 25 °C en condiciones óptimas de medida [23], mientras la actividad específica de una enzima se refiere al número de µmoles de sustrato transformados a producto por minuto y por miligramo de proteína bajo ciertas condiciones específicas de temperatura y pH [24].

La cantidad de una enzima en una disolución determinada puede contabilizarse con relación al efecto catalítico que produce. Las pruebas deben realizarse en condiciones donde el pH sea óptimo y la concentración del sustrato sea mayor al nivel de saturación, de tal modo que la velocidad inicial de la reacción sea de orden cero respecto al sustrato. En estas condiciones, la velocidad inicial de la reacción solamente es proporcional a la concentración de la enzima. En el caso de las enzimas que necesitan cofactores, éstos deben añadirse también en concentraciones superiores a la de saturación, de modo que el verdadero factor limitante de la velocidad en el sistema sea la concentración de la enzima.

En general la medida de la velocidad de formación del producto de la reacción es más confiable que la medida de la desaparición del sustrato, ya que éste debe de estar en concentraciones bastante elevadas para garantizar la cinética de orden cero.

La determinación cuantitativa de la actividad enzimática es más rápida y conveniente cuando el producto es coloreado o absorbe luz en la región del ultravioleta, ya que la velocidad de aparición del producto puede seguirse con un espectrofotómetro. Para esto no debe haber otros componentes que absorban o dispersen luz, de lo contrario, deberán prepararse los correspondientes blancos para efectuar la adecuada sustracción [23].

1.2 POLÍMEROS INTRÍNSECAMENTE CONDUCTORES

Los polímeros habían sido considerados y aplicados como aislantes, incluso cualquier conducción eléctrica en ellos era generalmente considerada como un fenómeno indeseable. Sin embargo, actualmente la conductividad iónica de polímeros electrolitos y polielectrolitos es ampliamente utilizada en sistemas electroquímicos, fuentes de energía, sensores y en el desarrollo de todos los dispositivos electroquímicos de estado sólido.

La síntesis, caracterización y aplicación de sistemas poliméricos electrónicamente conductores se encuentra todavía como prioridad en la actividad de investigación en electroquímica, debido al amplio rango de aplicaciones prometedoras que poseen estos compuestos en los campos de almacenamiento de energía, electrocatálisis, electroquímica orgánica, bioelectroquímica, fotoelectroquímica, electroanálisis, tecnologías de microsistemas, dispositivos electrónicos, detección de microondas y protección de corrosión, entre otros.

Los polímeros electroquímicamente activos se pueden clasificar en varias categorías de acuerdo al modo de propagación de carga, lo cual está relacionado a la estructura química del polímero. Las dos principales categorías son: polímeros conductores de electrones y polímeros conductores de protones (iones).

Dentro de los primeros se encuentran los polímeros intrínsecamente conductores, también llamados plásticos electrónicamente conductores, polímeros electrónicos, metales sintéticos, conductores orgánicos, polímeros conductores y metales plásticos. En ellos el movimiento de los electrones deslocalizados ocurre a través de sistemas conjugados [24],

11

siendo los ejemplos más simples el poli(acetileno), poli(anilina), poli(pirrol), poli(tiofeno) y poli(benceno) [25].

Este tipo de polímeros se han aplicado extensamente como transductores electroquímicos debido a que proporcionan una matriz estable y porosa para la inmovilización de biocomponentes que facilitan el proceso de transferencia de electrones. Los polímeros conductores empleados comúnmente para la inmovilización de enzimas son la poli(anilina), el poli(pirrol) y el poli(tiofeno) [26].

La poli(anilina) es útil como matriz retenedora de enzimas y su característica transductora físico-química para convertir la señal bioquímica en una señal eléctrica la hacen atractiva para el desarrollo de electrodos enzimáticos. Se ha reportado que este material puede ser empleado como elemento de detección para la estimación de glucosa, ácido úrico, galactosa, NADH y xantina [27].

Por otra parte, los poli(pirrol)es han ganado mucho interés para la inmovilización de enzimas debido a su bajo potencial de oxidación, estabilidad ambiental, sensibilidad y buena calidad como matriz. Estas características permiten el crecimiento de películas a partir de soluciones acuosas que son compatibles con la mayoría de los sistemas biológicos. Además su fácil polimerización, alta conductividad eléctrica, estabilidad química y habilidad para formar películas independientes son ventajas adicionales para su aplicación en electrodos enzimáticos [28].

La estabilidad de un electrodo enzimático basado en poli(pirrol) depende de la degradación que pueda sufrir el polímero en un ambiente acuoso si el dispositivo se usa para determinaciones continuas. Entre los instrumentos creados con base en este polímero se encuentran los biosensores catalíticos, los inmunosensores, los sensores de ADN y aquellos con tecnología de impresión molecular [29].

El poli(pirrol) también ha sido un material clave en aplicaciones como dispositivos electrónicos, electrodos para baterías recargables y supercondensadores, electrolitos sólidos

para capacitores, materiales de blindaje electromagnético, sensores, materiales protectores de corrosión, actuadores, equipos electroquímicos y membranas.

1.2.1 Polimerización

El mecanismo más aceptado para explicar la polimerización del poli(pirrol) es el de acoplamiento entre radicales catiónicos (figura 1.4), en el cual, durante el primer paso, la oxidación de un monómero de pirrol genera un radical catión; posteriormente, la unión de dos radicales cationes y la liberación de un protón produce un bipirrol. El bipirrol es oxidado de nuevo y se une a otro segmento oxidado. En los pasos siguientes la re-oxidación, unión y liberación de protones continúa para formar oligómeros y finalmente poli(pirrol). Una vez que la longitud de la cadena excede la solubilidad límite del solvente, ocurre la precipitación del polímero [29].

Paso inicial



Figura 1.4. Mecanismo de propagación de poli(pirrol) a través de la unión de radicales catiónicos [29].

1.2.2 Estados de oxidación y niveles de energía

El poli(pirrol) con la estructura bencenoide mostrado en la figura 1.5(a) es neutral y considerado como un aislante, al cual le correspondería un diagrama de energía como el mostrado en la figura 1.6(a). Se sabe que la brecha de banda en este estado es de 3.16eV, la cual es muy ancha para que pueda ocurrir la transferencia de electrones de la banda de valencia a la de conducción a temperatura ambiente.

Sin embargo, la cadena de poli(pirrol) se dopa simultáneamente durante la polimerización, es decir, los contra-aniones que se encuentran en el medio de reacción se incorporan en el crecimiento de las cadenas de poli(pirrol) para mantener la neutralidad eléctrica del sistema, y de esta forma se generan otras estructuras que reducen la brecha de banda. La extracción de una carga negativa de un segmento neutral de la cadena de poli(pirrol) en combinación con la carga positiva y los espines no apareados forman lo que se llama un polarón, figura 1.5(b). Como se observa en la figura 1.6(b), este polarón induce dos nuevos estados intermedios dentro de la brecha de banda.

Conforme avanza la reacción, otros electrones son removidos de la cadena de poli(pirrol) que ya contiene un polarón, ocasionando la formación de un bipolarón, el cual es energéticamente favorecido en lugar de la formación de dos polarones. Un bipolarón abarca más de cuatro anillos de pirrol, figura 1.5(c), y sus estados energéticos se encuentran más lejos del borde de banda que los del polarón, como lo muestra la figura 1.6(c). A medida que la oxidación sigue, dichos estados de energía se traslapan y forman pequeñas bandas nuevas intermedias características del poli(pirrol) completamente dopado, figura 1.6(d).

La síntesis de este polímero puede iniciarse mediante acción química (utilizando agentes oxidantes) produciendo poli(pirrol) en forma de polvo, mediante acción electroquímica (con una corriente anódica) generando poli(pirrol) en forma de película y por foto inducción. Cada método se utiliza para una aplicación en particular del polímero, siendo el último el menos empleado debido a su baja velocidad de polimerización respecto a las otras dos [29].

Un efecto del cambio de estado en el polímero debido al dopaje es la variación de color, pasando en este caso de amarillo a negro en la reacción reducción→oxidación.



Figura 1.5. Estructura de poli(pirrol) (a) neutro, (b) polarón y (c) bipolarón [29].



Figura 1.6. Diagrama electrónico de energía de poli(pirrol) (a) neutro, (b) polarón, (c) bipolarón y (d) completamente dopado [29].

1.2.3 Polimerización Química

En este tipo de polimerización, el pirrol se mezcla con un agente oxidante (quinonas, cloruro férrico o persulfatos) junto con un dopante disuelto en un solvente adecuado, dando como resultado la precipitación de polvo de poli(pirrol) dopado. Generalmente, la conductividad eléctrica del poli(pirrol) preparado por esta vía es ligeramente menor que aquella de las películas preparadas electroquímicamente. Sin embargo, este método es conveniente para la producción comercial del polímero, ya que presenta más facilidades para controlar el peso molecular y las características estructurales del polímero resultante que el método de oxidación electroquímica.

Entre los tipos de polimerización química se encuentran la polimerización con surfactantes, la polimerización con dopantes de ácido sulfúrico, la polimerización *in situ* sobre polímeros de látex, la polimerización *in situ* sobre sustratos y la polimerización fluida interfacial y supercrítica [30].

1.2.4 Polimerización Electroquímica

En el método de polimerización electroquímica, el pirrol y el electrolito se disuelven en un solvente adecuado y la solución se somete a oxidación, formando una película conductora de poli(pirrol) en el electrodo anódico de trabajo. Este tipo de polimerización es una forma rápida, fácil y limpia para obtener películas de poli(pirrol). Sin embargo, las cantidades de producto generado y el alto costo del proceso limitan su aplicación industrial.

Dentro de esta categoría se encuentran las técnicas de polimerización electroquímica sobre metales oxidables, la polimerización sobre electrodos modificados y la polimerización sobre poli(pirrol) substituido [30]. También están en esta categoría las técnicas a potencial constante, galvanostáticas, voltamperometrías cíclicas y de pulsos de potencial.

Las condiciones de preparación influyen en las propiedades de la película formada, pues se ha visto que aquellas que presentan mejor calidad se producen en soluciones neutras o ligeramente ácidas, ya que en soluciones muy ácidas la película se vuelve dura e incluso con aspecto de polvo, mientras que en soluciones alcalinas sólo se pueden formar películas delgadas. Los estudios también demuestran que en un rango de 0.65-0.80V con referencia al electrodo de calomel saturado (SCE, por sus siglas en inglés), las películas se adhieren al soporte, son conductoras y tienen una superficie brillante; pero a potenciales positivos mayores de 1 V sufren daños irreversibles: pierden conductividad y se pueden desprender de la superficie del electrodo [31].

Cabe mencionar que casi en cualquier situación donde el potencial de un electrodo que se encuentre en una solución de pirrol llegue a los +0.6 V_{SCE} , se producirá la formación de una película de poli(pirrol) notable a simple vista [31], por lo que en una deposición a potencial controlado, el grosor de la película formada sólo se limita por la disponibilidad del pirrol. La apariencia de la película está en función de la concentración del monómero, el pH, el potencial y la duración de la prueba; sin embargo, las películas gruesas presentan un color negro mientras que las delgadas un color amarillo.

El comportamiento de los picos de oxidación del polímero a valores de pH muy ácidos y básicos es similar debido a que en la oxidación del pirrol se liberan protones y la capa de solución cercana a la superficie del electrodo se vuelve ácida, aun cuando se esté utilizando una solución neutra, pero no buffer, como electrolito. Estos picos también varían de acuerdo al anión utilizado en la solución de electrolito [31].

1.3 ELECTRODOS ENZIMÁTICOS

Los electrodos enzimáticos están basados en el acoplamiento de una capa de enzima con un electrodo apropiado. Este tipo de electrodos combinan la especificidad de la enzima para un sustrato con el poder analítico de dispositivos electroquímicos. Como resultado de tal combinación, los electrodos enzimáticos han demostrado ser extremadamente útiles para monitorizar una amplia variedad de sustratos de importancia analítica en muestras clínicas, ambientales y alimenticias.



La operación de un electrodo enzimático se ilustra en la figura 1.7. La capa de enzima inmovilizada se elige para catalizar una reacción, la cual genera o consume una especie detectable. La preferencia de la detección del electrodo depende primordialmente del sistema enzimático empleado. Por ejemplo, las pruebas amperométricas son muy adecuadas cuando se emplean enzimas oxidasas o deshidrogenasas. El éxito del electrodo enzimático tiene que ver con la inmovilización de la capa de enzima. El objetivo es proporcionar un contacto íntimo entre la enzima y la superficie de detección mientras se mantiene la estabilidad de la enzima, por lo tanto, varios esquemas físicos y químicos se pueden utilizar para la inmovilización de la enzima sobre el electrodo, como se muestra en la figura 1.8 [30]. El enfoque más simple es atrapar una solución de la enzima entre el electrodo y la membrana de diálisis, o se pueden usar películas poliméricas para capturar la enzima, también es factible lograr mejoras adicionales combinando varias membranas o revestimientos [30].

Los cinco métodos principales para la inmovilización de enzimas se enlistan a continuación:

- 1. *Adsorción*. Es la propuesta más simple e involucra una preparación mínima, sin embargo, el enlace formado es débil y por lo mismo esta opción es recomendable para trabajos exploratorios de periodos de tiempo cortos.
- 2. Microencapsulación. En esta técnica, la enzima se fija detrás de una membrana permitiendo un contacto cercano entre ella y el transductor. Presenta las ventajas de no interferir con el buen funcionamiento de la enzima y limitar tanto la contaminación como la biodegradación de la proteína. Es estable ante cambios en la temperatura, pH, fuerza iónica y composición química. Un inconveniente del sistema es que puede ser permeable a gases, electrones y materiales de moléculas pequeñas.
- 3. Aprisionamiento. En este caso, la enzima se mezcla con una solución de monómero, el cual, al ser polimerizado, forma un gel que encierra a las enzimas dentro de él. Desafortunadamente esto puede representar una barrera para la difusión de sustrato y disminuir en la velocidad de reacción, aunado al hecho de que se puede perder actividad biológica a través de los poros en el gel. La poliacrilamida es el gel más común usado en este método, sin embargo también se han utilizado geles de almidón, nylon y silastic.
- 4. Entrecruzamiento. Con este método, la enzima se une químicamente a un soporte sólido o gel, empleando un reactivo bifuncional como el glutaraldehído. Aunque puede haber alguna limitación en la difusión del sustrato y la fuerza mecánica del sistema es poca, esta técnica resulta útil para estabilizar el material adsorbido.
- Enlaces covalentes. Este procedimiento implica un diseño de enlace cuidadoso entre el grupo funcional de la enzima y la matriz soporte. Una ventaja particular de este método es que la enzima no se desligará durante el uso [32].

Existen varios métodos rápidos y precisos para cuantificar proteínas en solución, pero es difícil encontrar alguno adecuado para proteínas inmovilizadas. De acuerdo a la comparación realizada por Katerkamp *et al.* [33], entre los métodos de tipo radioquímico,
fotométrico, inmuno-enzimático y fluorescente-espectroscópico, probados sobre enzimas inmovilizadas en superficies sólidas, el más conveniente resulta ser el último. Dentro de esa categoría se encuentra el método llamado NanoOrange®Protein Quantitation Kit, cuyas ventajas radican en ser de manejo relativamente fácil y poseer una alta sensibilidad, ya que su rango de detección se encuentra entre los 10 ng/ml y los 10 μ g/ml. El reactivo NanoOrange® no es fluorescente de manera libre, sin embargo, cuando interactúa con proteínas experimenta un aumento muy marcado en la fluorescencia. Al unirse a la proteína, este reactivo presenta un pico de excitación en los 470 nm y un pico de emisión alrededor de los 570 nm [34].

Los electrodos enzimáticos se pueden dividir en tres grupos, de acuerdo a su funcionamiento. El primer grupo está compuesto por aquellos electrodos que son sensibles a la concentración de sustratos naturales y productos de la reacción enzimática, siendo las oxidasas el principal tipo de enzimas utilizadas en este tipo de electrodos, seguidas de las deshidrogenasas. En este grupo también se incluyen aquellos electrodos en los que se combinan dos o más tipos de enzimas de manera que el producto de una reacción enzimática sirve como sustrato para otra.

El segundo grupo está constituido por los electrodos enzimáticos que usan un mediador como portador de electrones entre el sitio activo de la enzima y el electrodo. Generalmente el mediador es una partícula de bajo peso molecular de origen natural o artificial. Sin embargo, la presencia de este elemento repercute negativamente en la estabilidad del electrodo.

El tercer grupo lo forman aquellos electrodos en los que ocurre una transferencia directa de electrones entre la enzima y el electrodo. Este proceso también es llamado bioelectrocatálisis. La ventaja de este tipo de electrodos radica en la ausencia de partículas que causen interferencias, además de su alta selectividad y sensibilidad que se reflejan en altas densidades de corriente; dichas características son favorables para la miniaturización de los electrodos [35].

A continuación se describen algunos ejemplos de electrodos enzimáticos construidos alrededor del mundo.

Investigadores de la Universidad Marathwada, en Maharashtra, India [36], desarrollaron el electrodo polianilina-polivinil sulfonato-glucosa oxidasa (PANI-PVS-GOD), para determinar glucosa. Usaron un electrodo de cristal recubierto con óxido de indio estaño para la síntesis de la película polianilina-polivinil sulfonato mediante un método potenciostático, e inmovilizaron la enzima sobre la película sintetizada por entrecruzamiento vía glutaraldehído, en una solución buffer de fosfato o de acetato, observando que el buffer de fosfato proporciona una respuesta más rápida en medidas potenciostáticas comparada con el buffer de acetato. Otro trabajo desarrollado en este lugar, es el electrodo poli(N-metilpirrol)- ácido polivinilo sulfónico-nitrato de sodio-glucosa oxidasa (P(NMP)/PVS/NaNO₃/GODx); en este caso la película polimérica se sintetizó electroquímicamente y la enzima se inmovilizó por entrecruzamiento vía glutaraldehído. De nuevo, el electrodo presentó mayor sensibilidad y estabilidad en solución buffer de fosfatos, que en la solución buffer de acetato [28].

De igual manera en la India, pero ahora en Nueva Delhi se llevó a cabo la inmovilización de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) sobre una película de polianilina preparada electroquímicamente. El método de inmovilización utilizado fue la adsorción física de la enzima sobre la película del polímero. Las pruebas fotométricas y amperométricas aplicadas al electrodo (LDH/PANI) mostraron un tiempo de respuesta de 90 segundos y una vida útil de alrededor de dos semanas a 4-10°C, lo cual llevó a los investigadores a concluir que es un electrodo adecuado como sensor de piruvato [27].

Por otra parte, en la Universidad Normal Nanjing, en China, trabajaron con la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), inmovilizándola mediante interacción de cargas sobre nanotubos de carbón de pared simple (SWNTs) cubiertos con una capa del polielectrolito poli(cloruro de dimetildialilamonio) (PDDA), formando nanocompuestos ADH-PDDA-SWNTs. Posteriormente, desarrollaron un biosensor Nafion®/ADH-PDDA-SWNTs por la inmovilización de los nanocompuestos ADH-PDDA-SWNTs sobre la superficie de un

electrodo de carbón vítreo usando el Nafion® como cubierta. Dicho biosensor mostró actividad electrocatalítica hacia la oxidación del etanol con buena estabilidad, reproducibilidad y alta afinidad biológica [37].

En Taiwan, en la Universidad Nacional Chung Hsing [38], Tsai y colaboradores construyeron un electrodo para detección de etanol usando como sensor la enzima alcohol deshidrogenasa, a la cual inmovilizaron físicamente dentro de un compuesto de poli(alcohol vinílico)-conjugados con nanotubos de multiparedes de carbón (PVA-MWCNT). Para hacer las mediciones se basaron en la señal producida por el NADH, producto de la reacción enzimática, y concluyeron que dicho electrodo es viable para la detección de etanol en bebidas alcohólicas como cerveza y vino rojo.

Finalmente, y en la misma categoría de electrodos sensibles a etanol, investigadores del departamento de energía de Japón, inmovilizaron la enzima alcohol deshidrogenasa sobre una película de poli[1-(2-carboxietil)pirrol]. A pesar de que la actividad de la enzima disminuyó por el proceso de inmovilización, el electrodo presentó una respuesta amperométrica al etanol en presencia de NADH [39].

1.4 CELDAS DE COMBUSTIBLE ENZIMÁTICAS

En 1964 se describió por primera vez una celda de combustible enzimática cuando Yahiro *et al.* reportaron el funcionamiento de una celda con glucosa, colocando la enzima alcohol deshidrogenasa en la solución del ánodo y Pt en el cátodo abierto.

Las celdas de combustible enzimáticas (EFC por sus siglas en inglés) se definen como celdas de combustibles en las cuales se utilizan enzimas aisladas en al menos una parte del sistema. A pesar de que el mecanismo de operación es el mismo que en las celdas de combustible convencionales, las EFC presentan diferencias significativas que se enlistan en la tabla 1.1 [6].

Tabla 1.1. Principales características de celda de combustible convencional y enzimática.

Parámetro	Celda convencional	Celda enzimática	
Catalizador	Metales nobles	Enzimas	
pH	Altamente ácido o básico	Entre 7.0 y 9.0	
Temperatura	Arriba de 80°C	Entre 22 y 25 °C	
Eficiencia (%)	40 a 60	40	
Combustible	H _a metanol etc	Carbohidratos, metanol,	
Combustible	11 ₂ , metallol, etc.	etanol.	

Como en cualquier celda de combustible, en las EFC las pérdidas de voltaje se deben a tres razones principales:

- 1. Pérdidas por activación,
- 2. Pérdidas óhmicas,
- 3. Pérdidas por concentración.

Las pérdidas por activación ocurren a bajas densidades de corriente debido a una barrera energética para transferir la carga desde la enzima hasta el electrodo. Estas pérdidas se pueden reducir incrementando la superficie del electrodo y mejorando las condiciones de operación como la temperatura y el pH.

Las pérdidas óhmicas se originan por la resistencia al transporte de carga que representan los componentes de la celda. Una forma de disminuirlas es incrementando la conductividad de la solución sin afectar el funcionamiento de la enzima.

El tercer tipo de pérdida es causado por la resistencia al transporte de masa, lo cual genera altos gradientes de concentración cerca de la superficie del electrodo. Se presentan normalmente a densidades de corriente altas y se pueden superar asegurándose que la solución se encuentra bien mezclada.

Las celdas de combustible tienen un límite máximo en el voltaje de operación que se define por la diferencia de potencial entre el oxidante y el reductor. En las EFC, este límite máximo lo determina el potencial redox de los sitios activos que trabajan sobre el sustrato.

Los sustratos más usados en este tipo de celdas son los azúcares como la glucosa, lactosa, fructuosa y celobiosa, y los alcoholes como el etanol. Recientemente el glicerol se ha considerado como combustible para estas celdas debido a que es abundante y posee una alta densidad de energía [9].

Para lograr una completa oxidación del sustrato y de esa forma obtener mayor rendimiento, se han preparado sistemas de enzimas en cascada que imitan a los ciclos biológicos de las rutas metabólicas presentes en las células vivas, como son el ciclo del ácido cítrico para oxidar etanol y el ciclo de Kreb's para oxidar el piruvato [6].

Lo anterior favorece el desarrollo de las EFCs sin membrana, ya que uno de los requerimientos de este tipo de celda es poseer una alta especificidad en las dos reacciones que ocurren dentro del sistema, de manera que los sustratos y productos no interfieran entre si. Algunas de las ventajas que presentan las EFCs sin membrana son: estructura simple, reducción de costos y viabilidad para miniaturización. No obstante, hasta ahora la mayoría de las EFCs desarrolladas presentan el clásico diseño de dos compartimentos separados por una membrana selectiva de iones [9]. La tabla 1.2 [6] presenta una recopilación de sistemas enzimáticos indicando el sustrato sobre el cual trabajaron y la potencia que entregaron.

Finalmente, la posibilidad de construir una EFC es tan grande como la variedad de enzimas que hay y los sustratos en los que pueden funcionar, por lo que las investigaciones se están enfocando en mejorar factores como el tiempo de vida de la enzima, la obtención de mayores densidades de corriente y la transferencia de electrones enzima-electrodo, para hacer viable su aplicación a gran escala [6].

Sustrato	Sistema enzimático	Potencia entregada (mWcm ⁻²)	Referencia
Etanol/O ₂	Alcohol deshidrogenasa/bilirrubina oxidasa	0.46	Topcagic and Minteer [5]
Glucosa/O ₂	Glucosa oxidasa/bilurrubina oxidasa	0.12	Lim et al. [40]
Glucosa	Glucosa deshidrogenasa	0.035	Klotzbach et al. [41]
Etanol	Quino-hemoproteína- alcohol deshidrogenasa	0.0015	Ramanavicius et al. [42]
Etanol	Enzimas deshidrogenasas en cascada	1.01	Sokic-Lazic and Minteer [43]
Glucosa/O ₂	Glucosa deshidrogenasa/lacasa	0.042	Habrioux et al. [44]
Piruvato	deshidrogenasas en cascada	0.93	Sokic-Lazic and Minteer [45]
Glucosa/O ₂	Glucosa deshidrogenasa/ bilurrubina oxidasa	1.45	Sakai et al. [46]
Glucosa/O ₂	Glucosa oxidasa/bilirrubina oxidasa	0.15	Kuwahara et al. [47]
Fructuosa/O ₂	D-fructuosa deshidrogenasa/bilirrubina oxidasa	0.12	Wu et al. [48]
Glucosa	Glucosa deshidrogenasa	0.052	Miyake et al. [49]
Glucosa	Glucosa deshidrogenasa	0.0037	Choi et al. [50]
Etanol	Alcohol deshidrogenasa	0.28	Forti et al. [51]

 Tabla 1.2. Compendio de celdas de combustible enzimáticas reportadas.

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1 REACTIVOS Y EQUIPOS

A continuación se enumeran los principales materiales utilizados para el desarrollo del presente trabajo, distinguiendo entre los que son de carácter reactivo y los equipos.

Reactivos:

- Pirrol en solución grado 98%, marca sigma (C₄H₅N) con un peso fórmula de 67.09, punto de ebullición de 131°C, densidad de 0.967 g/ml a 25°C.
- Enzima alcohol deshidrogenasa de levadura de panadería (S. cerevisiae), marca sigma, A3263 (YADH).
- ✤ B-Nicotinamida Adenina Dinucleotido de un cultivo de células de levadura probado
 ≥ 96.5% (HPLC), marca sigma (C₂₁H₂₇N₇O₁₄P₂), peso fórmula 663.43, N3014.
- Glutaraldehído 50% wt en solución, aglutinante, marca sigma (C₅H₈O₂) peso fórmula 100.12, punto de ebullición 101°C/760mmHg, densidad 1.110.
- ➡ Pirofosfato de sodio decahidratado marca sigma (Na₄O₇P₂.10H₂O) ACS reactivo ≥ 99%.
- Fosfato de sodio monobásico marca sigma (H₂NaO₄P) Reactivoplus ≥ 99%.
- Fosfato de sodio dibásico marca sigma (HNa₂O₄P) Reactivoplus ≥ 99%.
- ✤ Ácido fosfórico J.T Baker (H₃PO₄) PM 98.00.

Equipos:

- Espectrofotómetro Jenway 6405 UV/vis.
- Potenciómetro Hanna Instruments pH 211 Microprocessor pH Meter.
- Potenciostato μAutolab TypeIII.
- Potenciostato BioLogic VSP, VMP3B-10, 10A/20V.
- Espectrofluorómetro Spectronic Unicam, Aminco-Bowman® Series 2.

- Infrarrojo Nicolet con Transformada de Fourier.
- Microscopio Electrónico de Barrido (SEM por sus siglas en inglés) Joel JSM-6360LV.
- Microscopio de Fuerza Atómica MultiMode scanning probe microscope (MM-SPM) V8, marca Bruker.

2.2 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SOLUCIÓN

2.2.1 Método espectrofotométrico

El método analítico espectroscópico se fundamenta en medir la cantidad de radiación que produce o absorbe la especie molecular de interés. En la espectroscopía de absorción, se mide la cantidad de luz absorbida en función de la longitud de onda y cada especie molecular puede absorber sus propias frecuencias de radiación electromagnética, lo que recibe el nombre de espectro de absorción, el cual puede obtenerse en las regiones ultravioleta, visible o infrarroja. En otras palabras, un espectro de absorción es una gráfica de la absorbancia con respecto a la longitud de onda.



Figura 2.1. Método espectroscópico de absorción [52].

Como se muestra en la figura 2.1, la radiación de la energía incidente P_0 , puede ser absorbida por la sustancia de interés, lo que produce la transmisión de un haz de menor energía P. Para que pueda ocurrir la absorción, la energía del haz incidente debe

corresponder a una de las diferencias de energía que se muestran en el inciso b y el espectro de absorción aparece en el inciso c [52].

La ley de absorción, llamada ley de Lambert & Beer, indica cuantitativamente que la cantidad de luz absorbida *A* (absorbancia) depende de la concentración de las moléculas absorbentes, *c*, y de la distancia que recorre la luz, *b*, mediante la expresión:

$$A = \log \frac{P_0}{P} = abc \qquad (1)$$

Ahí, *a* es la constante de proporcionalidad llamada absortividad y cuando la concentración c se expresa en moles por litro y la distancia *b* en centímetros, recibe el nombre de absortividad molar, denominándose con el símbolo ε , quedando la expresión anterior de la siguiente manera:

$$A = \varepsilon b c \qquad (2)$$

donde ϵ tiene unidades de mol·L⁻¹·cm⁻¹

La relación entre la absorbancia y la concentración es lineal: y = mx

donde y = A,

$$m = \varepsilon b.$$

El espectrofotómetro es el instrumento con el cual se mide la absorbancia y consta de una fuente estable de energía radiante, un selector de longitud de onda que aísla una región del espectro para su medida, uno o varios recipientes para la muestra, un detector de radiación que convierte la energía radiante en una señal eléctrica medible y una unidad de procesamiento y lectura de señales [52].

En el caso de la enzima utilizada en este trabajo, la actividad se evaluó con base en la formación de NADH, mediante el método de determinación espectrofotométrico continuo

descrito en la hoja técnica de la enzima (SIGMA). Las condiciones de trabajo fueron: temperatura de 25° C, pH = 8.8, A_{340nm}, trayectoria de luz = 1cm.

Los reactivos utilizados fueron:

- A. Buffer 50mM de pirofosfato de sodio, pH 8.8 a 25°C.
- B. Etanol al 95% (v/v).
- C. Solución 15mM de β -Nicotinamida Adenina Dinucleótido (β -NAD⁺)
- D. Solución 10mM de fosfato de sodio monobásico.
- E. Buffer 10mM de fosfato de sodio dibásico, pH 7.5 a 25°C.
- F. Buffer 10mM de fosfato de sodio dibásico con 0.1% (w/v) de albúmina de suero bovino, pH 7.5 a 25°C (diluyente de la enzima).
- G. Solución de enzima alcohol deshidrogenasa (YADH) 0.02mg/ml.

Procedimiento:

- 1. Programar el espectrofotómetro a una longitud de onda de 340 nm.
- Acondicionar dos celdas de cuarzo (figura 2.2), limpiándolas cuidadosamente con microfibra para evitar ralladuras. En cada celda, pipetear 1.3 ml de reactivo A (buffer), 0.10 ml de reactivo B (etanol) y 1.5 ml de reactivo C (β-NAD⁺).
- 3. Mezclar por inversión y equilibrar a 25°C.
- 4. Añadir a la celda blanco 0.1 ml de reactivo F (diluyente). Colocar en el equipo y calibrar. Retirar la celda.
- 5. Añadir a la celda de prueba 0.1 ml de reactivo G (solución de la enzima), mezclar por inversión e inmediatamente colocar en el equipo para medir el aumento en la absorbancia.
- 6. Tomar la lectura de absorbancia durante 6 minutos, en intervalos de 15 segundos.



Figura 2.2. Celdas de cuarzo usadas en la medición espectrofotométrica.

En las condiciones anteriores, una unidad de enzima convierte 1µmol de etanol a acetaldehído por minuto a pH 8.8 y 25°C.

Con los datos obtenidos de absorbancia, la actividad enzimática se determina realizando los siguientes cálculos:

Unidades/ml de enzima =
$$\frac{(\Delta A_{340nm}/\min \text{Prueba} - \Delta A_{340nm}/\min \text{Blanco})(3)(df)}{(6.22)(0.1)}$$
(3)

- 3 = Volumen total de la prueba (ml)
- df = Factor de dilución
- 6.22 =Coeficiente de extinción milimolar de β -NADH a 340nm.
- 0.1 = Volumen (ml) de la enzima usada.

Sin embargo, por conveniencia, la actividad enzimática generalmente se reporta en unidades/mg sólido cuando la prueba se realiza partiendo de la proteína en estado sólido.

Unidades/mg solido = $\frac{\text{unidades/ml de enzima}}{\text{mg solido /ml de enzima}}$ (4)

Las soluciones buffer requeridas para el ensayo se prepararon siguiendo las indicaciones del mismo protocolo, monitorizando el ajuste del pH con un potenciómetro Hanna Instruments. Las soluciones se elaboraron en fresco, preparando las cantidades necesarias con base en el número de ensayos a realizar.

Cabe mencionar que los reactivos NAD⁺ y YADH, se deben de mantener en hielo y en frascos ámbar una vez que han sido disueltos.

La medición se hizo en un espectrofotómetro JENWAY 6405 UV/Vis.

2.2.2 Método electroquímico

Para determinar cuál es el comportamiento de la enzima en solución mediante técnicas electroquímicas, se trabajó en una celda de tres electrodos (figura 2.3) utilizando como electrodo de trabajo una tira de papel carbón, como referencia un electrodo de calomel saturado y como electrodo auxiliar una barra de grafito. En ella se realizaron voltamperometrías cíclicas a diferentes velocidades de barrido (5, 10, 25, 50 y 100 mV/s) en una ventana de potencial de -0.3 a 0.3 V_{SCE}, usando como electrolito soporte una solución buffer de pirofosfato de sodio 0.1 M y pH 8.2 a 25°C, con una concentración de etanol de 2 mM y 1.5 mM de NAD⁺, a la cual se le añadieron 200 µl de una solución de 451 U/ml de YADH [53].



Figura 2.3. Celda de tres electrodos.

2.3 PREPARACIÓN DEL ELECTRODO

2.3.1 Síntesis del polímero

El soporte para inmovilizar la enzima fue poli(pirrol) (PPy); éste se puede formar por la oxidación de pirrol o por sustitución de monómeros de poli(pirrol) [32]. En este caso, se utilizó el primer método, realizando una polimerización electroquímica aplicando un potencial externo a la solución que contenía el monómero.

El monómero de pirrol se destiló antes de ser utilizado y posteriormente, se preparó una solución de trabajo de pirrol 0.1 M con fosfato de sodio monobásico (NaH₂PO₄) 0.1 M, disolviendo 0.599 mg de la sal y 0.35 ml de pirrol en 50 ml de agua desionizada a 18 M Ω . Esta solución se colocó en una celda de tres electrodos teniendo como referencia al SCE y como auxiliar un electrodo de grafito. El electrodo de trabajo fue una tira de papel carbón de 1 x 2 cm, donde se delimitó un área de 1 cm² (con resina epóxica) sobre la cual quedaría depositado el polímero. A este sistema se le aplicó un potencial constante de 0.7 V durante 420 s [33]; dicho potencial se seleccionó a partir de una curva de polarización realizada previamente con la solución de monómero (figura 2.4).



Figura 2.4. Curva de polarización del pirrol.

El área de depósito en las tiras de papel carbón se lijó y lavó repetidas veces con agua desionizada, dejando secar a temperatura ambiente en un desecador, previo a la deposición. Cabe mencionar que la resina epóxica además de servir para definir el área de sedimento, brinda al electrodo mayor rigidez que permite un mejor manejo evitando que se rompa fácilmente.

La cantidad de poli(pirrol) depositado se calculó con base en la Ley de Faraday, aplicando las ecuaciones 5 y 6, obteniendo la carga del sistema mediante la integración de la corriente registrada a lo largo del tiempo de reacción.

2.3.2 Impedancia electroquímica

Las pruebas de impedancia electroquímica se llevaron a cabo utilizando como electrolito una solución buffer de fosfatos 50 mM y pH 8.8 con 2 mM de etanol. Las pruebas se realizaron en las tres fases de construcción de los electrodos, en las cuales los materiales analizados fueron carbón, carbón/resina y carbón/polímero, respectivamente, usando un rango de frecuencia de 10000 a 1 Hz para evitar datos innecesarios y centrarse en la región resistiva, con una amplitud de 10 mV/s y registrando 25 datos.

2.3.3 Inmovilización de la enzima

Las dos técnicas de inmovilización utilizadas fueron la adsorción directa [54, 55] en el polímero y el entrecruzamiento con un agente aglutinante, que en este caso fue el glutaraldehído [56]. Para esto se siguió el procedimiento mostrado a continuación:



Figura 2.5. Proceso de inmovilización de la enzima YADH.

2.4 CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA

Para caracterizar los electrodos construidos se realizaron las siguientes pruebas electroquímicas:

- Voltamperometría cíclica. Permite observar los procesos de oxidación-reducción tanto del polímero, como los que se presenten debido a la acción de la enzima sobre el sustrato, relacionándolos a un potencial determinado.
- Amperometría. Manteniendo un potencial constante en el electrodo permite observar la variación en la corriente ocasionada por la respuesta de la enzima a la presencia del sustrato.
- Curva de polarización (E vs I). Indica cual es el desempeño del electrodo cuando se utiliza como ánodo en una configuración de celda completa.

En todos los casos, los electrodos se sostuvieron mediante dos placas conductoras a las cuales se sujetó un caimán, asegurando de esta manera que hubiera un buen contacto. La voltamperometría cíclica y la amperometría se realizaron en una celda de tres electrodos teniendo como referencia al SCE y como electrodo auxiliar una barra de grafito.

2.4.1. Voltamperometría cíclica antes de aplicar la enzima

El polímero depositado en las tiras de carbón se caracterizó mediante voltamperometrías cíclicas en una ventana de -1.0 V a 1.1 V_{SCE} (rango dentro del cual se presentaron los procesos de oxidación y reducción del polímero) a 10, 25 y 50 mV/s, en un electrolito de NaH₂PO₄ 0.1 M.

2.4.2 Voltamperometría cíclica de electrodos poliméricos enzimáticos

Siguiendo el proceso experimental reportado por Chenxin Cai [53], en el cual la acción de la enzima sobre el sustrato se hace evidente mediante un pico bien definido de oxidación, se realizó una voltamperometría cíclica utilizando un electrodo de carbón con enzima adsorbida, una solución buffer de pirofosfato de sodio 0.1 M, pH 8.2, como electrolito, 1.5

mM de NAD⁺ y 2 mM de etanol. Las condiciones de medida fueron en un rango de potencial de -0.3 a 0.3 V_{SCE} , variando la velocidad de barrido en 5, 10, 25, 50 y 100 mV/s.

Por otra parte, los electrodos poliméricos con la enzima inmovilizada se sometieron a voltamperometrías cíclicas utilizando una ventana de potencial de -0.3 a 0.3 V_{SCE} con una velocidad de barrido de 100 mV/s en presencia de solución buffer de fosfatos pH 8.8 como electrolito soporte con 5 mM de etanol y 5 mM de NAD⁺.

2.4.3 Amperometría

Las pruebas amperométricas se realizaron aplicando un potencial de 0.85 V_{SCE} al electrodo polimérico enzimático que se encontraba sumergido en una solución buffer de fosfatos pH 8.8 con 5 mM de etanol, adicionando 5 mM del cofactor NAD⁺ 15 minutos después de haber iniciado la medición. Las pruebas descritas hasta ahora se realizaron con el potenciostato μ Autolab TypeIII.

2.5 OTRAS PRUEBAS

2.5.1 Cuantificación de la enzima

La cantidad de enzima remanente en el electrodo, después del proceso de inmovilización, se determinó con el ensayo NanoOrange®Protein Quantitation. Para esto, se inició preparando una curva de calibración con el reactivo estándar de albúmina de suero bovino (BSA por su siglas en inglés) incluida en el kit, además de otra curva de calibración con la enzima YADH, en atención a la recomendación del manual de este kit de realizar una curva de calibración con la proteína de interés siempre que sea posible.

Con el objetivo de abarcar todo el rango de detección del método, se utilizaron las siguientes concentraciones en ambas curvas: 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 y 10 μ g/ml de proteína, considerando también la aclaración de que en el rango de los microgramos el comportamiento que se observa en la curva de calibración ya no es completamente lineal (figura 2.6).



Figura 2.6. Análisis cuantitativo de BSA usando el NanoOrange®Protein Quantitation Kit [34].

Siguiendo el protocolo, cada electrodo con enzima inmovilizada se colocó en un tubo de ensayo donde se agregó el reactivo NanoOrange®, éstos se calentaron a 95°C por 10 minutos, se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se midió la intensidad de fluorescencia de la solución con el electrodo, en el espectrofluorómetro Spectronic a una longitud de emisión de 580 nm con una longitud de onda de excitación de 470 nm [34], una sensibilidad de 500 V y en un rango de 480 a 670 nm. Durante todo el proceso los tubos estuvieron protegidos de la luz.

2.5.2 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Con el fin de identificar el grupo carbonilo C=O correspondiente al acetaldehído se realizó un análisis infrarrojo de las soluciones de trabajo, para lo cual se utilizó un equipo Nicolet con Transformada de Fourier, empleando un dispositivo de reflexión total atenuada (ATR por sus siglas en inglés) para líquidos con un cristal del selenuro de zinc. La medición se hizo con un laser de HeNe (helio-neón) en un rango de 4000 a 650 cm⁻¹, estableciendo una resolución de 4 unidades, con un espacio entre datos de 1.928 cm⁻¹ y un número de escaneo

de 200. Como lectura de fondo se guardó el espectro del agua destilada, el cual se restó de la solución blanco, consistente en solución buffer de fosfatos con etanol y NAD⁺, y de las soluciones muestra, correspondientes a las soluciones finales de la caracterización electroquímica.

2.5.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Se utilizó un microscopio SEM Joel JSM-6360LV con una señal de electrones secundarios, a alto vacío, con una apertura de as de 22 electrones y con una altura de trabajo de 09 unidades. La muestra (poli(pirrol) despositado en el papel carbón) se adhirió al portamuestra con cinta de carbón y se le dio un tratamiento previo de metalizado con oro durante 60 segundos.

2.5.4 Caracterización con el Microscopio de Fuerza Atómica (AFM)

La microscopia de fuerza atómica es un método ampliamente usado para el estudio de las propiedades de macromoléculas y de los complejos que éstas forman, tales como proteínas, ácidos nucleicos y microrganismos; las imágenes se obtienen a través de una punta nanométrica que entra en contacto con la superficie de interés, generando un perfil de la topografía de la muestra. Dicha punta está montada en una base (cantilever) que oscila debido a las fuerzas de interacción que se presentan entre la superficie y la punta cuando se acercan [57,58]. Dependiendo de la forma en que la punta toca la superficie es el nombre que se le da al modo de trabajo, los más comunes son: el modo contacto, en el que, como su nombre lo indica, la punta siempre está en contacto con la superficie de la muestra durante el escaneo, y el modo "tapping", en el cual la punta toca de manera intermitente la superficie en función de la frecuencia de oscilación del cantilever, cuya amplitud determina la fuerza con la que choca la punta en la superficie [59].

Debido a que estas pruebas se realizaron con finalidad de confirmar la adhesión de la enzima en el polímero, se obtuvieron imágenes de cada uno de los materiales que

conforman el electrodo, es decir, del carbón, del poli(pirrol) y del poli(pirrol) después de haber depositado la enzima.

En cada caso se fijó el electrodo de 1 cm² en el porta muestra del equipo y se instaló en el escáner; paso seguido se colocó el cantilever de trabajo en el "probe holder" y se procedió a alinear la señal del láser para establecer una señal suma máxima con los fotodiodos horizontal y vertical en valores de cero. Una vez establecidas dichas condiciones se procedió a seleccionar el modo de trabajo y ajustar los parámetros requeridos para obtener imágenes claras. Con el electrodo de carbón se trabajó en modo "Tapping", al igual que con el electrodo de poli(pirrol) con la enzima depositada, mientras que las imágenes del poli(pirrol) se obtuvieron en modo "Contact".

2.6 EVALUACIÓN DE LOS ELECTRODOS EN UNA CELDA DE COMBUSTIBLE

El electrodo polimérico enzimático se colocó en una monocelda convencional dentro de una solución 50 mM buffer de fosfatos pH 8.8 con 5 mM de etanol y 5 mM de NAD⁺, teniendo un electrodo de platino como auxiliar y un electrodo estándar calomel como referencia. Se realizó un preacondicionamiento, donde se le aplicó un potencial de 0.85 V_{SCE} , durante 10 minutos. Con este proceso se asegura que el polímero se encuentra en estado conductor.

Inmediatamente después se cambió la conexión a una configuración de celda convencional de dos electrodos, conectando como electrodo de trabajo al electrodo polimérico enzimático que funcionó como ánodo, mientras que el electrodo de platino funcionó como cátodo. De esta forma se procedió a realizar las curvas de desempeño, midiendo la corriente que se obtiene al variar el potencial de la celda desde el potencial de circuito abierto hasta cero, utilizando el potenciostato BioLogic.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SOLUCIÓN

3.1.1 Método espectrofotométrico

La medición de la formación de NADH por acción de la enzima alcohol deshidrogenasa se hizo por duplicado y en promedio se obtuvo una actividad de 365 unidades/ml enzima que corresponde a 1.82 X 10⁵ unidades/mg enzima, asegurando de esta manera que la enzima se encontraba en condiciones óptimas. Por las condiciones de trabajo establecidas en el protocolo se infiere que la reacción presenta una cinética de orden cero [23].

Debido a que las técnicas electroquímicas se basan en el registro de señales eléctricas, la conductividad electrónica del electrolito utilizado es un factor importante en ellas y al ver que las concentraciones de las soluciones buffer utilizadas en el manejo de la enzima son muy bajas, se realizó un ensayo de actividad utilizando soluciones buffer al doble de la concentración indicada en el protocolo de SIGMA. El resultado obtenido fue una disminución del 37.5% en la actividad enzimática con valores de 137 unidades/ml enzima y 6.85×10^4 unidades/mg enzima, por lo que en este trabajo se utilizaron las concentraciones originales que se indican en el protocolo.

3.1.2 Método electroquímico

La figura 3.1 muestra las voltamperometrías cíclicas realizada con un electrodo de carbón como sensor de la actividad que presenta la enzima en solución. Como se observa en la gráfica, cerca de los 0 V se forma un pico que corresponde a la oxidación del etanol por acción de la enzima, este pico se define mejor a una velocidad de barrido de 100 mV/s difiriendo en este aspecto con Cai [53], quien reporta que es a una velocidad de 5 mV/s cuando se aprecia este fenómeno.



Figura 3.1. Voltamperometrías cíclicas vs SCE a diferentes velocidades de un electrodo de carbón en solución buffer de fosfatos con etanol 2 mM, NAD⁺ 1.5 mM y YADH. Ciclo cinco.

Esta diferencia puede deberse al soporte utilizado, puesto que los nanotubos de carbón, empleados como base para el electrodo enzimático de Cai, poseen propiedades mecánicas y electrónicas que permiten una transferencia de electrones más eficiente entre el electrodo y la enzima, lo cual permite que a bajas velocidades de barrido (5 mV/s) se aprecie la reacción de oxidación.

Por otra parte, el comportamiento con el soporte de carbón concuerda con lo reportado en técnicas electroquímicas aplicadas a películas de enzimas sobre carbón vítreo, en las que al aumentar la velocidad de barrido es cuando se obtienen datos acerca de la tasa de intercambio de electrones y su relación con la reacción química que los genera [12]. Esto se puede apreciar en la gráfica, al observar una relación directa entre el aumento de la velocidad de barrido y los valores de corriente registrados, los cuales se encuentran en el orden de µA, como se esperaba.

3.2 PREPARACIÓN DEL ELECTRODO

3.2.1 Síntesis del polímero

La figura 3.2 muestra la gráfica *I vs t* que se genera durante el depósito del polímero mediante la técnica electroquímica potenciostática. El valor obtenido de la integración del área bajo la curva permitió calcular un depósito (sección 2.3.1) aproximado de 560 μ g de poli(pirrol) sobre el papel de carbón. El cálculo se realizó específicamente para cada electrodo con el que se trabajó y entre los electrodos utilizados hubo una diferencia de ± 2 μ g de poli(pirrol) depositado. En la figura 3.3 se puede apreciar la diferencia en coloración del electrodo que contiene el poli(pirrol).



Figura 3.2. Curva I vs t obtenida durante el depósito de poli(pirrol) a 0.7V_{SCE}.



Figura 3.3. Electrodos de carbón: (a) sin polímero y (b) con polímero.

Al respecto, Calderón y colaboradores [60] reportan que la polimerización de poli(pirrol) en modo potenciostático genera una película porosa y heterogénea, con una morfología globular típica de técnicas de polimerización electroquímica. Lo anterior concuerda con lo observado en las micrografías obtenidas con el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM por sus siglas en inglés) (figura 3.4) de los electrodos elaborados, en las cuales se puede apreciar la distribución irregular de los aglomerados de poli(pirrol) sobre el papel carbón, figura 3.4 (a), presentando estas formaciones globulares diámetros mayores a 1µ, figura 3.4 (b).



(a)

(b)



La porosidad de la película de poli(pirrol) es favorable en la adsorción de la enzima ya que los huecos formados funcionan como contenedor y de esa manera la enzima no queda completamente expuesta en la superficie del electrodo, disminuyendo ligeramente la probabilidad de desprendimiento al estar en contacto con la solución de trabajo.

3.2.2 Inmovilización de la enzima.

Después de depositar la enzima sobre el electrodo polimérico se observa a simple vista que se forma una película de color blanco, como se muestra en la figura 3.5. Esta coloración se debe a la deshidratación de la enzima, la cual vuelve a presentar sus propiedades de estado sólido.



Figura 3.5. Electrodos poliméricos con enzima depositada.

3.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS ELECTRODOS ENZIMÁTICOS

3.3.1 Caracterización antes de la enzima

El poli(pirrol) depositado potenciostáticamente y caracterizado en solución de fosfatos presentó un proceso de oxidación entre 0.7 y 0.9 V_{SCE} , así como un proceso de reducción alrededor de los -1.0 V_{SCE} (figura 3.6). Asavapiriyanont [31] reporta potenciales de oxidación del poli(pirrol) cercanos a los obtenidos, pero en una solución de trabajo de nitrato de potasio, con corrientes catódicas pequeñas entre 0.45 y 0 V. Como se puede observar en la figura 3.6 los procesos redox del polímero no están dentro de la ventana de trabajo de la enzima (de -0.3 a 0.3 V_{SCE}) y por lo tanto lo observado en su presencia corresponde a su reacción.



Figura 3.6. Voltamperometría cíclica de PPy en solución de NaH₂PO₄ 0.1 M a 10 mV/s, vs SCE, ciclo cinco.

Por otra parte, se realizaron pruebas de impedancia para determinar la resistencia tanto de la solución como de los elementos que conforman los electrodos. Los resultados se muestran a continuación:

Fabla 3.1.	Valores	de res	sistencia	óhmica	en l	a celda	para	diferentes	electrod	os.

T-11-

Elemento	Resistencia (Ω)
Carbón seco	1.4
Solución de fosfatos	37
Electrodo carbón	41
Electrodo carbón/resina	42
Electrodo PPy a 0.9V	63-66*

*Rango de valores obtenido después de 3 mediciones

Como se esperaba, el electrodo con polímero presenta una mayor resistencia que el electrodo de carbón, sin embargo, se considera aceptable teniendo en cuenta que las corrientes generadas al trabajar con la enzima son pequeñas.

3.3.2 Caracterización con la enzima

Las voltamperometrías cíclicas realizadas con YADH adsorbida en carbón, se muestran en la figura 3.7.



Figura 3.7. Voltamperometrias del electrodo de carbón con diferente concentración de YADH adsorbida. Solución buffer de fosfatos pH 8.2, con 2 mM de etanol y 1.5 mM de NAD⁺ a 100 mV/s vs SCE, segundo ciclo.

Una vez más, a diferencia de lo reportado [53], el pico de oxidación del etanol se definió mejor a 100 mV/s que a 5 mV/s, por la diferencia en el soporte empleado, observando también que los valores de corriente registrados se incrementaron al haber una mayor cantidad de enzima inmovilizada, pero permanecieron en el rango de los μ A.

Los electrodos poliméricos con enzima inmovilizada no presentaron este pico de oxidación de etanol [53] debido a que el comportamiento del polímero en el mismo electrolito cubre dicho fenómeno al generar corrientes más grandes que aquellas observadas con el electrodo de carbón.

Sin embargo, como se muestra en la figura 3.8, la presencia de la enzima en el electrodo polimérico provocó un cambio evidente en su comportamiento (ensanchamiento de los óvalos) y el hecho de que respondiera a la variación de la cantidad de enzima adsorbida demuestra que dichos cambios están relacionados con la oxidación del etanol por acción enzimática. El ensanchamiento de los óvalos corresponde al proceso cuasi-reversible de captación y liberación por parte del polímero de los electrones liberados en la reacción de oxidación, al haber una mayor cantidad de enzima, reacciona mayor cantidad de etanol y por ende hay un mayor flujo de electrones, lo cual se reflejan en valores de corriente mayores que aquellos registrados para el polímero sin enzima.



Figura 3.8. Voltamperometrías cíclicas de electrodos poliméricos con enzima adsorbida en diferente concentración, 100 mV/s, vs SCE segundo ciclo.

La misma conducta se observó en los electrodos poliméricos con enzima entrecruzada, en los cuales se trabajó con una concentración de 6 mg/ml de YADH y únicamente se variaron las cantidades y concentraciones del glutaraldehído para obtener la combinación óptima: 20 μ l de glutaraldehído 11 mM con 100 μ l de YADH, como se muestra en la figura 3.9.



Figura 3.9. Voltamperometrías cíclicas de electrodos poliméricos con enzima entrecruzada, 100 mV/s, vs SCE, segundo ciclo.

Como se esperaba, al comparar el desempeño de ambos electrodos poliméricos en la figura 3.10, se aprecia que aquel con enzima entrecruzada presentó valores de corriente mayores que el electrodo con enzima adsorbida, esto es debido a que el reactivo aglutinante permite una mejor retención de la enzima sobre el electrodo y se refleja en una mayor actividad. Cabe enfatizar que en ambos electrodos poliméricos el orden de magnitud en la corriente registrada fue de mA, mientras que con el electrodo de carbón fue de μ A.



Figura 3.10. Voltamperometrías cíclicas de electrodos poliméricos con enzima inmovilizada, 100 mV/s, vs SCE, segundo ciclo.

Con la finalidad de monitorizar el comportamiento de la actividad enzimática con el tiempo, se realizaron voltamperometrías cíclicas cada hora, durante 3 días sobre ambos electrodos. Las figuras 3.11 y 3.12 muestran que para el electrodo polimérico con enzima adsorbida la corriente permaneció constante, salvo ligeras variaciones que probablemente se debieron a pequeños cambios en la temperatura del medio de reacción, mientras que la corriente registrada con el electrodo polimérico con enzima entrecruzada fue más constante.



Figura 3.11. Voltamperometrías cíclicas en diferentes tiempos del electrodo polimérico con enzima adsorbida, 100 mV/s, vs SCE, segundo ciclo.



Figura 3.12. Voltamperometrías cíclicas en diferentes tiempos del electrodo polimérico con enzima entrecruzada, 100 mV/s, vs SCE, segundo ciclo.

Posteriormente, para confirmar que se había llevado a cabo la oxidación de etanol por la YADH, las soluciones finales de las pruebas antes mencionadas se sometieron a un análisis de espectroscopía infrarroja, utilizando un instrumento Nicolet. El rango de número de onda se definió con base en los valores en los cuales se observa la especie de interés, en este caso C=O, obteniendo como resultado lo siguiente:



Figura 3.13. Espectro infrarrojo de una solución final de trabajo de las voltamperometrías cíclicas de electrodos poliméricos enzimáticos.

Todas las muestras analizadas presentaron el mismo comportamiento y por cuestiones prácticas solo se muestra el espectro de una de ellas. La solución blanco consistió en buffer de fosfatos con etanol y en la solución muestra se buscó la presencia de acetaldehído.

De acuerdo con la literatura [8], el pico que se forma a los 1100 cm⁻¹ corresponde al fosfato iónico presente en la solución buffer, mientras que los pequeños picos que se encuentran en 1200-1250 cm⁻¹ corresponden a aminas secundarias (NH-R) [8], las cuales representarían al cofactor en su forma reducida.

La formación de picos en 1600-1700 cm⁻¹ (variando el rango en función de la referencia) indica la presencia de especies con grupos carbonilos (C=O), como son los aldehídos y las cetonas. En este caso, por los elementos de reacción, el único producto posible con grupos de este tipo es el acetaldehído, por lo tanto el pico a los 1653 cm⁻¹ señalaría la presencia de dicho compuesto. Este valor coincide también con el reportado por Hauchecorne *et al.* [61] al analizar por espectroscopía infrarroja al acetaldehído adsorbido en TiO₂.

No obstante, debido a que no hay una diferencia lo suficientemente evidente a simple vista entre los espectros y a que los picos de aminas también pueden corresponder al cofactor oxidado, se hizo una medición espectrofométrica a las soluciones para asegurar la existencia de NADH, cuya presencia es indicativa de que se llevó a cabo la oxidación del etanol. Para esto se calibró el espectrofotómetro con una solución buffer de fosfatos conteniendo 5 mM de etanol y 5 mM de NAD⁺ y se midió la absorbancia a 340 nm. Las mediciones fueron únicas para cada muestra y los resultados fueron los siguientes:

Solución	Absorbancia		
Blanco (buffer+etanol+NAD ⁺)	0		
Solución 1 Enzima entrecruzada	2.97		
Solución 2 Enzima adsorbida	2.67		
Solución 3 Enzima entrecruzada	2.81		

Tabla 3.2. Absorbancia de soluciones finales de trabajo de voltamperometrías cíclicas

La solución 1 es la utilizada en la prueba de actividad de tres días del electrodo polimérico con enzima entrecruzada (figura 3.12); la solución 2 corresponde a la prueba de actividad de tres días del electrodo polimérico con enzima adsorbida (figura 3.11) y la solución 3 es

aquella resultante de la prueba de celda del electrodo polimérico con enzima entrecruzada (figura 3.22).

Los valores mayores de absorbancia de las soluciones 1, 2 y 3 con respecto a la solución blanco, revelan que hay una cantidad considerable de NADH y comprueban la actividad catalítica de la enzima inmovilizada en los electrodos poliméricos.

Por otro lado, las amperometrías realizadas a los electrodos también corroboran que la enzima permanece activa después de haber sido inmovilizada, ya que con ellas se tiene la certeza de que el polímero se encuentra en su estado conductor y muestran de manera más evidente la respuesta inmediata de la enzima al adicionar el cofactor, lo cual inicia la reacción de oxidación del etanol y se traduce en un aumento de la corriente generada, como se observa en la figura 3.14.



Figura 3.14. Amperometrías con electrodos poliméricos enzimáticos a 0.85 V_{SCE}.

Después de 15 minutos de haber iniciado la prueba, la corriente en el electrodo con enzima adsorbida se había estabilizado alrededor de 14 μ A y al momento de adicionar el NAD⁺ al electrolito se registró un aumento que llegó a los 230 μ A. Al término de la prueba, 45

minutos después, la corriente se había estabilizado en 6.4 μ A. En el caso del electrodo con enzima entrecruzada, a los 15 minutos se registraba una corriente de 50 μ A, la cual subió a un valor de 460 μ A al adicionar el NAD⁺, finalizando las lecturas con un valor de 8.4 μ A. Este comportamiento muy probablemente se deba a que parte de la enzima adsorbida en el electrodo se desprende de éste al estar de nuevo en medio líquido, por lo que la cantidad de enzima que reacciona al adicionar el NAD⁺ es menor a aquella que permanece en el electrodo donde se entrecruzó, ya que el agente aglutinante permite una mejor retención de la enzima sobre la superficie del electrodo, lo cual se traduce en más sitios de reacción y por lo tanto una corriente mayor.

Gráficamente es evidente una mejor respuesta en el electrodo con enzima entrecruzada, sin embargo, en ambos casos, los incrementos en los valores de corriente superaron considerablemente a lo reportado con otros sensores de etanol basados en YADH, tal es el caso del biosensor de poli(vinil-alcohol) y nanotubos de carbón [38] cuya respuesta amperométrica fue de 500 nA, y el electrodo de poli[1-(2-carboxietil)pirrol] en el cual se registró un aumento de corriente de 2 μ A después de haber adicionado el etanol [39]. Pero por otro lado, los resultados de este trabajo quedan por debajo de los casi 2.1 mA/cm² generados al utilizar como ánodo en una celda de etanol un electrodo constituido de YADH, azul de Medola y nanopartículas de oro [62].

3.3.3 Cuantificación de la enzima

Para realizar la cuantificación de la enzima, primeramente se realizó una curva de calibración con el reactivo estándar de BSA que contenía el kit y otra con la proteína de interés (YADH) tal y como lo sugiere el mismo método. Dichas curvas se muestran en la figura 3.15.



Figura 3.15. Curvas de calibración de BSA y YADH a 597 nm.

Al obtener las curvas de calibración se observó que la máxima intensidad de fluorescencia se producía a 597 nm, en lugar de 580 nm, por lo que todos los datos se tomaron a esa longitud de onda.

Para asegurar la funcionalidad del reactivo, se probaron tres muestras con proteínas solubles que se cotejaron con la curva de calibración de BSA (figura 3.16), obteniendo concentraciones de entre 8.2 y 8.9 µg/ml de proteína.


Figura 3.16. Proteínas solubles medidas con NanoOrange®.

Posteriormente, tras desarrollar la fluorescencia con los electrodos poliméricos se procedió a medir la intensidad en el espectrofluorómetro, colocando el electrodo y la solución dentro de la celda (figura 3.17). Sin embargo, no fue posible determinar la cantidad de enzima presente debido a que los espectros de emisión obtenidos, que se muestran en la figura 3.18, revelan que la interacción del poli(pirrol) con el reactivo NanoOrange® produce una fluorescencia más grande que aquella emitida por la interacción del reactivo con la proteína y cubre por completo la señal que genera la YADH.



Figura 3.17. Electrodo de PPy con NanoOrange®.



Figura 3.18. Espectros de emisión de fluorescencia de YADH, PPy y electrodo polimérico enzimático.

No obstante, al trabajar con las soluciones de la curva de calibración de YADH, se encontró que la sensibilidad óptima de medición para dicha proteína es de 600 V, lo cual representó una mejor diferenciación entre los valores de fluorescencia para las concentraciones de proteína utilizadas, pues a 500 V las diferencias entre ellas eran mínimas.

3.3.4 Caracterización con el Microscopio de Fuerza Atómica

Las imágenes obtenidas con el AFM MM-SPM V8 se presentan a continuación en un esquema tridimensional, en el cual sólo se definen dos ejes: X (igual a Y) y Z que indican el área de barrido y la altura de la superficie, respectivamente. La diferencia de alturas se identifica por el cambio en la coloración: el color rojo corresponde a las áreas bajas y las de color amarillo a blanco, a las áreas más altas.



 $X=10 \ \mu m$ $Z=103 \ nm$

(b)



X= 10 um Z= 2.6 um



Figura 3.19. Imágenes AFM 3D: (a) papel carbón, (b) PPy, (c) formaciones de PPy, (d) PPy_YADH.

La figura 3.19 (a) muestra la superficie del papel carbón, la cual es bastante uniforme y ligeramente rugosa, pero se puede considerar plana porque las diferencias en las alturas se deben al proceso de fijación de la muestra, durante el cual no quedó perfectamente pegado el papel al porta muestra.

En la imagen de la figura 3.19 (b) se presenta el escaneo realizado al electrodo con polímero, en las mismas dimensiones que para el papel carbón, en el cual se puede observar una superficie bastante irregular con formaciones de hasta 2.6 μ m de altura que corresponden a las aglomeraciones de poli(pirrol). Las zonas de color rojo que se ven completamente lisas dan a entender que la punta no tocó ninguna superficie y por ende esa región corresponde a un hueco de los que quedaron después de la polimerización. Así mismo, el hecho de que en la esquina inferior izquierda, la superficie amarilla se vea plana es debido a que la altura de esa formación excedió el rango del eje Z en el que se mueve la punta. En la imagen de la figura 3.19 (c) se aprecia mejor la formación globular de los depósitos de poli(pirrol) que presentan dimensiones de 1.5 - 2 μ m, concordando con lo observado en las imágenes de SEM.

El inciso (d) de la figura 3.19 corresponde a la imagen obtenida del electrodo polimérico después de haber depositado la enzima, en ella se puede observar una superficie un poco más regular que la anterior, sin huecos, ya que la máxima altura detectada disminuyó a 1.9 µm. Además, la parte central de la imagen da la impresión de haberse "rellenado" ya que es mas homogénea que en ambos extremos donde se notan crecimientos en forma de montaña que se deben al polímero.

Al igual que Tsai [38] y Chen [63], basándose en imágenes de AFM, reportaron diferencias en la morfología de electrodos PVA-MWCNT y de CeHCF(II)-PLL, respectivamente, después de haber incorporado la enzima alcohol deshidrogenasa en ellos, en este caso la diferencia en las alturas registradas es indicativa de que hubo una modificación en la superficie del electrodo al depositar la YADH, quedando ésta un poco suavizada.

No obstante, se hicieron escaneos más pequeños, de 1 μ m y de 300 nm, sobre áreas en las que a simple vista se detectaba la enzima depositada (regiones de color blanco en el electrodo); dichas imágenes [64] mostradas en la figura 3.20, se obtuvieron con un equipo AFM AMBIOS Universal, en modo de contacto intermitente.



Figura 3.20. Imágenes AFM 3D del electrodo de PPy con YADH adsorbida. Área de escaneo (a) 1 μm, (b) 300 nm.

En ellas se puede observar una superficie homogénea, prácticamente plana (alturas en el orden de nm) e incluso formaciones circulares bien definidas (delimitadas con negro), imagen de la figura 3.20 (b), que por sus dimensiones podrían corresponder a la enzima, ya que datos cercanos a estos fueron reportados por Ivanov *et al.* [57], quienes utilizaron esta técnica para visualizar los monómeros y oligómeros de la enzima P450 CYP102A1 en medio de solución buffer de fosfatos, los cuales presentaron alturas de 2.1 y 3.0 nm, respectivamente, con una relación de aparición de 0.3:0.7 en un área de 500 nm.

3.4 EVALUACIÓN LOS ELECTRODOS EN UNA CELDA DE COMBUSTIBLE

Esta serie de pruebas se inició utilizando el electrodo polimérico con enzima adsorbida y después de la activación (sección 2.5) que tomó 10 minutos, se realizaron curvas de polarización en diferentes tiempos para monitorizar el comportamiento de la celda:



Figura 3.21. Curvas I vs E de electrodo polimérico con enzima adsorbida.

El potencial a circuito abierto (OCP) de la celda después de la activación fue de 0.91 V, el cual fue disminuyendo paulatinamente hasta estabilizarse en 0.70 V después de media hora y a partir de este valor el decremento fue muy lento ya que dos horas después se registraban 0.64 V. Los valores de corriente alcanzados a 0 V en las tres pruebas fueron 0.18, 0.13 y 0.11 mA respectivamente. El decremento en el OCP con el tiempo muy probablemente se debe a la desaparición del etanol por acción de la enzima, ya que se trató de un sistema estacionario sin flujo constante de etanol ni NAD⁺ que mantuviera las condiciones iniciales de trabajo.

Las pruebas de impedancia realizadas en el sistema indicaron que el electrolito presentaba una resistencia de 103 Ω por lo que, con la finalidad de disminuir dicho valor, se agregaron sales de fosfatos para duplicar su concentración iónica. El decremento en la resistencia no fue tan bueno como se esperaba, ya que solo bajó a 92 Ω y además cayó el OCP a 0.45 V, alcanzando una corriente máxima de 0.045 mA.

Lo anterior corrobora que la actividad enzimática se ve afectada al aumentar la concentración iónica de la solución buffer, lo cual fue demostrado en un principio con una prueba de actividad enzimática medida espectrofotométricamente donde se utilizó solución de fosfatos al doble de la concentración indicada en el protocolo de SIGMA (sección 3.1.1).

Por tal motivo, para las pruebas de desempeño realizadas usando el electrodo polimérico con enzima entrecruzada se mantuvieron las condiciones originales y se midieron en lapsos de tiempo similares a los anteriores. El valor de OCP en cada prueba fue de 1.0, 0.70 y 0.58 V, con valores de corriente máxima a 0 V de 0.25, 0.19 y 0.13 mA, respectivamente, como se ilustra en la figura 3.22. Las caídas de potencial se atribuyen al sistema estacionario en el que se trabajó, como se mencionó anteriormente.



Figura 3.22. Curvas I vs E de electrodo polimérico con enzima entrecruzada.

Los valores de OCP obtenidos con ambos electrodos poliméricos enzimáticos (de 0.6 V) son similares a los reportados por Minteer [65,5] y Atanassov [66], en cuyos trabajos utilizaron ánodos con YADH. El primero, registró un OCP de 0.68 ± 0.10 V con un ánodo basado en una membrana de Nafión® modificada con sales de amonio y obtuvo valores de 0.60 a 0.62 V con un ánodo de poli(metileno verde) soportado en carbón, mientras que el segundo logró un OCP de 0.61 V usando un ánodo de poli(metileno verde) soportado en carbón vítreo reticulado.

Por otra parte, un parámetro que refleja el grado de eficiencia de una celda de combustible es la densidad de potencia, ya que relaciona la potencia generada en el electrodo con su área o volumen. Típicamente las EFC generan bajas densidades de potencia, con valores en el rango de los micros a miliwatts [6].

En la figura 3.23 se muestra la densidad de potencia que puede entregar la celda cuando funciona con cada tipo de electrodo polimérico enzimático como ánodo.



Figura 3.23. Curvas de potencia de electrodos poliméricos enzimáticos.

Como se esperaba, las densidades de potencia obtenidas de la celda están en el orden típico de las EFC, registrando un valor máximo de 26.5 μ W/cm² para el electrodo con enzima adsorbida y otro de 46.6 μ W/cm² para el electrodo con enzima entrecruzada. Una vez más se puede apreciar claramente que hay una mejor respuesta de éste último con respecto al primero.

Las densidades de potencia alcanzadas con los electrodos poliméricos enzimáticos se encuentran dentro del rango de valores que se reportan para EFC que utilizan etanol como sustrato y que van de 0.0015 a 2.04 mW/cm², siendo las de mejor desempeño aquellas celdas constituidas por sistemas enzimáticos en cascada, como son la de Soki-Lazic y Minteer [45] con 1.01 mW/cm² empleando deshidrogenasas en cascada, y la de Akers y colaboradores [65] con 2.04 mW/cm² usando alcohol y aldehído deshidrogenasas.

Los valores de densidad de potencia obtenidos se encuentran por debajo de los reportados en EFCs con la enzima alcohol deshidrogenasa en el ánodo, las cuales generaron una potencia de 0.46 mW/cm² [5] y 0.28 mW/cm² [51]; sin embargo, atendiendo al método de inmovilización enzimática aplicado, son similares a una celda en la que se utilizó una película de poli(pirrol) para contener a la enzima glucosa deshidrogenasa (el sustrato de trabajo fue glucosa) donde se obtuvo una densidad de potencia de 0.042 mW/cm²; y superiores al de la EFC elaborada con quino-hemoproteina-alcohol deshidrogenasa inmovilizada con glutaraldehído en la cual se registró una densidad de potencia de 0.0015 mW/cm² [42].

CONCLUSIONES

- El método de deposición electroquímica de poli(pirrol) fue el más conveniente para la construcción de electrodos enzimáticos por la formación directa de películas que facilitaron la incorporación de la enzima.
- La actividad enzimática en solución se demostró espectroscópica y electroquímicamente.
- El electrodo enzimático de carbón indicó que la oxidación de etanol ocurre alrededor de los 0 V_{SCE}.
- Los electrodos poliméricos enzimáticos tuvieron mejor desempeño en la oxidación de etanol generando valores de corriente en el orden de mA, a diferencia de los electrodos de carbón con los que se registraron corrientes de μA.
- El electrodo polimérico con enzima entrecruzada presentó mejores respuestas que el electrodo con enzima adsorbida debido a una mejor retención de la enzima sobre el electrodo.
- La cuantificación de la enzima inmovilizada en los electrodos poliméricos no es viable utilizando el ensayo NanoOrange®Protein Quantitation porque el poli(pirrol) genera fuerte fluorescencia en presencia del reactivo.
- Las imágenes de AFM muestran diferencias en la morfología de la superficie de los electrodos después de haber depositado la enzima, lo cual es indicativo de su presencia.
- Los valores de OCP, corriente y densidad de potencia obtenidos con los electrodos poliméricos enzimáticos probados en celda, están dentro del rango de los valores reportados con otros electrodos basados en YADH para la oxidación de etanol.
- Los electrodos poliméricos con enzima adsorbida y entrecruzada son viables para su aplicación en una celda de combustible enzimática de etanol directo.

PERSPECTIVAS

Para dar continuidad a este trabajo, se propone definir otro protocolo para la cuantificación de enzima inmovilizada utilizando agentes que se liguen a la enzima y que sean fluorescentes por sí mismos, evitando de esta manera la interacción con el polímero, esto debido a que el principio fluorométrico es relativamente sencillo y accesible de aplicar.

También se sugiere el desarrollo de estudios para optimizar las condiciones de preparación y de trabajo en celda de los electrodos poliméricos con enzima entrecruzada.

Además de profundizar los estudios empleando Microscopio de Fuerza Atómica en modalidad electroquímica sobre los electrodos poliméricos enzimáticos y la evaluación de la cinética enzimática en el electrodo.

BIBLIOGRAFÍA

- International Energy Agency. http://www.iea.org/aboutus/faqs/renewableenergy/. © 2012 OECD/IEA.
- Comisión Nacional para el Uso Eficiente de la Energía. http://www.conuee.gob.mx/wb/CONAE/CONA_2080_hidrogeno?page=2. 2012.
- 3. E. Antolini, Catalysts for direct ethanol fuel cells, Jpowsour 170, 1-12, 2007.
- 4. A. K. Jones; E. Sillery; S. P. J. Albracht; F.A. Armstrong. Direct comparison of the electrocatalytic oxidation of hydrogen by an enzyme and a platinum catalyst, *ChemComm*, 866-867, 2002.
- 5. S. Topcagic; S. D. Minteer, Development of a membraneless ethanol/oxygen biofuel cell, *Electrochem. Acta.* 51, 2168–2172, 2006.
- 6. S. A. Neto; J.C. Forti; A.R. De Andrade, An overview of enzymatic biofuel, *Electrocatal*. 1, 87-94, 2010.
- J. Kim; H. Jia; P. Wang, Challenges in bioctalysis for enzyme-based biofuel cells, *Biotech. Advan.* 24, 296-308, 2006.
- 8. Skoog; Douglas A. Principios de Análisis Instrumental, McGraw Hill, Madrid, 2001.
- 9. M.H. Osman; A.A. Shah; F.C. Walsh, Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part I: Enzymatic cells. *Biosen and Bioelectron*. 26, 3087-3102, 2011.
- 10. R. Boyer, Conceptos de Bioquímica. THOMSON, México, 2000.
- 11. B. Wingard, *Applied Biochemistry and Bioengineering*. Vol. Enzyme Technology, Academic Press, New York , 1979.
- 12. J. Ulstrup; O.Hammerich, *Bioinorganic Electrochemistry*, Springer, The Netherlands, 2008.
- 13. T. Bugg, An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry, Blackwell Science, Massachusetts, 1997.
- 14. J. P. Zanon; F.S Peres; A.L. Gattás, Colorimetric assay of ethanol using alcohol dehydrogenase from dry baker's yeast, *Enzym Micro Tech*. 40, 466-470, 2007.
- H. Jornvall, The primary structure of yeast alcohol dehydrogenase, *Eur. J. Biochem.* 3, Vol. 72, 425-442, 1977

- 16. H.E. Hayes; S.F. Velvick, Yeast alcohol dehydrogenase: molecular weight, coenzyme binding and reaction equilibria, *J. Biol. Chem.* 207, 225-244, 1954.
- M. Buhner; H. Sund, Yeast alcohol dehydrogenase: SH groups, disulfide groups, quaternary structure and reactivation by reductive cleavage of disulfide groups, *Eur. J. Biochem.* 11, 73-79, 1969.
- J.R.H. Kagi; B.L Vallee, The role of zinc in alcohol dehydrogenase, J. Biol. 235, 188-192, 1960.
- 19. C.J. Dickenson; F.M.Dickinson, The role of an essential histidine residue of yeast alcohol dehydrogenase, *Eur. J. Biochem.* 52, 595-631, 1975.
- 20. H. Sund; H. Theorell, The Enzymes. Academic Press 57-58, New York, 1963.
- C.Brändén; H. Jürnvall, H. Eklund; B. Furugren, *The Enzymes*. Cap. 3: Alcohol Dehydrogenases, 103-109, 1975.
- 22. J.R. Heitz et al. Inactivation of yeast alcohol dehydrogenase by N-alkylmaleimides, *Arch. Biochem. Biophys.* 1, 127, 627-636, 1968.
- 23. A. Lehninger, Principles of Biochemistr, 2005.
- 24. G. Inzelt, Conducting Polymers A New Era in Electrochemistry, Springer, 2008.
- 25. V. S. Bagotsky, Fundamentals of Electrochemistry, Wiley, 2006.
- 26. M.D. Shirsat, Development of PANI-PVS-GOD electrode by potentiometric method for determination of glucose, *Int. J. Electrochem. Sci.* 2, 488 497, 2007.
- 27. G. Manju, Immobilization of Lactate Dehydrogenase on Electrochemically Prepared Polyaniline Films, *Electroanal*. 11 No.6, 450-452, 1999.
- 28. D.J Shirale; V.K Gade; P.D. Gaikwad; P.A. Savale; H.J. Kharat; K.p. Kakde; A.J. Pathan; M.D. Shirsat, Studies of immobilized glucose oxidase on galvanostatically synthesized poly(N-methylpyrrole) film with PVS-NaNO3 composite dopant, *Vols. Int. J. Electrochem. Sci.*2, 62-70, 2006.
- A. Ramanavi^{*}cius, A. Ramanavi^{*}cien^{*}e , A. Malinauskas, Electrochemical sensors based on conducting polymer—polypyrrole, *Electrochimica Acta*. 51, 6025–6037, 2006.
- 30. Reynolds; T. A. Skotheim ; John R, *Conjugated polymers theory, synthesis, properties, and characterization, CRC Press, 2007.*

- 31. S. Asavapiriyanont; G.K. Chandler; G.A. Gunawardena; D. Pletcher. The electrodeposition of polypyrrole films from aqueous solutions, *J. Electroanal. Chem.* 177, 229-244, 1984.
- 32. Eggins; Brian R. Sensing Elements. *Chemical Sensors and Biosensors*, John Wiley &Sons, 2002.
- 33. M. Orschel; A. Katerkamp; M. Meusel; K. Cammann, Evaluation of several methods to quantify immobilized proteins on gold and silica surfaces. *Coll. Surf.B: Bioin.* 10, 273-279, 1998.
- 34. NanoOrange® Protein Quantitation Kit. Invitrogen. Molecular Probes, Inc.
- 35. S.V. Dzyadevych; V.N. Arkhypova; A.P. Soldatkin; A.V. El'skaya; C. Martelet; N. Jaffrezic-Renaul. Amperometric enzyme biosensors, past, present and future, *ITBM-RBM*, 29, 171-180, 2008.
- 36. P.D. Gaikwad; D.J. Shirale; V.K Gade; P.A. Savale; H.J. Kharat; K.P. Kakde; M.D. Shirsat, Immobilization of GOD on electrochemically synthesided PANI film by cross-linking via glutaraldehyde for determination of glucose, *Int. J. Electrochem. Sci.* 1, 425-434, 2006.
- 37. J. Wang, Analytical Electrochemistry, Wiley, 2006.
- 38. Y.C Tsai; J.D. Huang; C.C. Chiu, Amperometric ethanol biosensor based on poly(vinyl alcohol)-multiwalled carbon nanotube-alcohol dehydrogenase biocomposite, *Biosen. and Bioelec.* 22, 3051-3056, 2007.
- 39. K. Oshima; T. Nakamura; R. Matsuoka; T. Kuwahara; M. Shimomura; S. Miyauchi, Immobilization of alcohol dehydrogenase on poly[1-(2-carboxyethyl)pyrrole] film for fabrication of ethanol-responding electrode, *Synt. Met.* 152, 33-36, 2005.
- 40. J. Lim; P. Malati; F. Bonet; B. Dunn, *Nanostructured Sol-Gel Electrodes for Biofuel Cells*, J. *Electrochem. Soc.* 154, A140-A145, 2007.
- 41. T.L. Klotzbach; M. Watt; Y. Ansari; S.D. Minteer, Improving the microenvironment for enzyme immobilization at electrodes by hydrophobically modifying chitosan and Nafion polymers, *J. Membr. Sci.* 311, 81-88, 2008.
- 42. A. Ramanavicius; A. Kausaite; A. Ramanaviciene, Enzymatic biofuel cell based on anode and cathode powered by ethanol. *Biosens Bioelectron* 24, 761-766, 2008.

- 43. D. Sokic-Lazic; S.D. Minteer, Citric acid cycle biomimic on a carbon electrode. *Biosens. Bioelectron.* 24, 939–944, 2008.
- 44. A. Habrioux; G. Merle; K. Servat; K.B. Kokoh; C. Innocent; M. Cretin; S. Tingry, Concentric glucose/O2 biofuel cell, *J. Electroanal. Chem.* 622, 97-102, 2008.
- 45. D. Sokic-Lazic; S.D. Minteer, Pyruvate/air enzymatic biofuel cell capable of complete oxidation, *Electrochem. Sol.-St Lett.* 12(9), F26-F28, 2009.
- 46. H. Sakai; T. Nakagawa; Y. Tokita; T. Hatazawa; T. Ikeda; S. Tsujimura; K. Kano, A high-power glucose/oxygen biofuel cell operating under quiescent conditions, *Ener. Environ. Sci.* 2, 133-138, 2009.
- 47. T. Kuwahara; T. Homma; M. Kondo; M. Shimomura, Fabrication of enzyme electrodes with a polythiophene derivative and application of them to a glucose fuel cell, *Synth. Met.* 159, 1859-1864, 2009.
- 48. X. Wu; F. Zhao; J.R. Varcoe; A.E. Thumser; C. Avignone-Rossac; R.C.T Slade, A one-compartment fructose/air biological fuel cell based on direct electron transfer, *Biosens. Bioelectron.* 25, 326-331, 2009.
- T. Miyake; M. Oike; S. Yoshino; Y. Yatagawa; K. Haneda; H. Kaji; M. Nishizawa, Biofuel cell anode: NAD+ /glucose dehydrogenase-coimmobilized ketjenblack electrode, *Chem. Phys. Lett.* 480, 123-126, 2009.
- 50. Y. Choi; G. Wang; M.H Nayfeh; S.Yau, A hybrid biofuel cell based on electrooxidation of glucose using ultra-small silicon nanoparticles, *Biosens. Bioelectron.* 24, 3103-3107, 2009.
- 51. J. C. Forti; S. A. Neto; v. Zucolotto; P. Ciancaglini; A.R. De Andrade, Development of nanostructured bioanodes containing dendrimers and dehydrogenases enzymes for application in ethanol biofuel cells, *Biosens. Bioelectron.* 26, 2922-2926, 2011.
- 52. Skoog; Douglas A. Fundamentos de Química Analítica, Thomson, México, 2005.
- 53. S. Lui; C. Cai, Immobilization and characterization of alcohol dehydrogenase on single-walled carbon nanotubes and its application in sensing ethanol, *J. Electroanal. Chem.* 602, 103-114, 2007.

- A. Trivedi; M. Heinemann; A.C. Spiess; T. Daussmann; J. Büchs, Optimization of Adsorptive Immobilization of Alcohol Hydrogenases, *Soc. of Biotech.* 4, 99, 340-347, 2005.
- 55. A.A. Karyakin; S.V. Morozov; E.E. Karyakina; S.D. Varfolomeyev; N.A. Zorin; S. Cosnier, Hydrogen fuel electrode based on electrocatalysis by the enzyme hydrogenase, *Electrochem Comm.* 4, 417-420, 2002.
- 56. A. Ramanavicius; A. Kausaite; A. Ramanaviciene, Potentiometric study of quinohemoprotein alcohol dehydrogenase, *Sen. and Act.* B. 113, 435-444, 2006.
- 57. Y.D. Ivanov, N.S. Bukharina, T.T. Pleshakova, P.A. Frantsuzov, N.V. Krokhin, V.S. Ziborov, A.I. Archakov, Atomic force microscopy visualization and measurement of the activitiy and physicochemical properties of single monomeric and oligomeric enzymes, *Biophysics*, 56 (5), 892-896, 2011.
- P. L. Frederix, P.D. Bosshart, A. Engel, Atomic force microscopy of biological membranes, *Bioph. J.*, 96, 329-338, 2009.
- 59. B. Torre, C. Canale, D. Ricci, P.C. Braga, *Chapter 2 Measurement methods in atomic forcé microscopy*, A. F. M. in Biom. Reser.: Meth. and Prot. 736, 19-29, 2011.
- 60. J.A. Calderón; T.A. Marín; F. J. Isaza, Electrodeposition of Polypyrrole/Platinum films, *Port. Electrochim. Act.*, 27(3), 397-407, 2009.
- 61. B. Hauchercorne; D. Terrens; S. Verbruggen; J.A. Martens; H. Van Langenhove; K. Demeestere; S. Lenaerts, Elucidating the photocatalytic degradation pathway of acetaldehyde: An FTIR in situ study under atmospheric conditions. *Appl. Catal.* B: Environ. 106, 630-638, 2011.
- 62. S. Dong; L. Deng; L. Shang; D. Wen; J. Zhai, A membraneless biofuel cell powered by ethanol and alcoholic beverage, *Biosen. and Bioelec.* 26, 70-73, 2010.
- 63. S-M Chen, A.P. Periasamy, J-X. Wei, Alcohol dehydrogenase immobilized at cerium Hexacyanoferrate(II) nanoparticles incorporated poly-L- lysine film for voltammetric ethanol determination, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 6, 4422-4437, 2011.
- 64. I. Horcas et al. Rev. Sci. Instrum. 78, 013705 (2007).

- 65. N.L. Akers; C.M. Moore; S.D. Minteer, Development of alcohol/O₂ biofuel cells using salt-extracted tetrabutylammonium bromide/Nafion membranes to immobilize dehydrogenase enzymes, *Electrochem. Acta* 50, 2521-2525, 2005.
- 66. R.A. Rincón; C. Lau; H. R. Luckarift; K.E. Garcia; E. Adkins; G.R. Jhonson; P. Atanassov, Enzymatic fuel cells: Integrating flow-through anode and air-breathing cathode into a membrane-less biofuel cell design, *Biosen. and Bioelec.* 27, 132-136, 2011.