



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO  
EN ELECTROQUÍMICA



**“CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE  
ELECTRODOS ENZIMÁTICOS CON LACTATO OXIDASA Y  
BILIRRUBINA OXIDASA PARA SU IMPLEMENTACIÓN EN  
CELDA DE COMBUSTIBLE”**

TESIS PRESENTADA POR:

**I.Q. DIANA DECTOR ESPINOZA**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRÍA EN ELECTROQUÍMICA**

**FEBRERO, 2017**

# **Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica**

**I.Q. DIANA DECTOR ESPINOZA**  
**Autor**

**Dr. LUIS ANTONIO ORTIZ FRADE**  
**Director de tesis**

## **SINODALES**

**Dra. María Yolanda Reyes Vidal**  
Presidente

---

Firma

**Dr. José Luis Jurado Baízaval**  
Secretario

---

Firma

**Dra. Silvia Gutiérrez Granados**  
Vocal

---

Firma

**Dr. Germán Orozco Gamboa**  
Suplente

---

Firma

## RESUMEN

---

Este trabajo está dedicado a la caracterización de bioelectrodos enzimáticos para su evaluación en media celda y en celdas de combustible basadas en la oxidación de ácido láctico y reducción de oxígeno, produciendo así de energía eléctrica. La importancia de estas bioceldas, es su posible uso como fuente de poder en dispositivos portátiles médicos, utilizando moléculas que se encuentran fácilmente en los metabolitos del cuerpo humano.

Se utilizaron los electrodos enzimáticos de lactato oxidasa para el ánodo y bilirrubina oxidasa para el cátodo soportadas sobre papel conductor (papel carbón Toray®). La celda de combustible presentada en este trabajo emplea el aire del medio ambiente para obtener oxígeno que será reducido en el cátodo. Una mezcla de poli(etilenimina) lineal de dimetilferroceno-modificado (FcMe<sub>2</sub>-LPEI) (LPEI, por sus siglas en ingles), lactato oxidasa (LOx) y etilenglicol diglicidil éter (EGDGE) fue utilizada para el bioánodo (FcMe<sub>2</sub>-LPEI-LOx-EGDGE). Mientras tanto, la integración de un electrodo expuesto al aire; compuesto de una mezcla de nanotubos de carbón de pared múltiple modificados con antraceno (An-MWCNTs), bilirrubina oxidasa (BOx), una disolución amortiguadora de fosfatos a concentración de 50 mM a pH 6.5 y nafion modificado con bromuro de tetrabutilamonio (TBAB-Nafion®) fue utilizada para el biocátodo (An-MWCNTs-BOx- TBAB-Nafion®), en el cual se favorece la reacción mencionada (óxido-reducción), gracias al fácil suministro de aire que ofrece el diseño de la celda, lo cual evita tener un reactivo limitante. Para la bio-celda de combustible completa, se usaron piezas de acrílico como soporte, fabricadas mediante un CNC (controlador numérico por computadora). El rendimiento de la celda de combustible se evaluó utilizando ácido láctico en disolución amortiguadora de fosfatos con pH 6.5. Esta celda de combustible arroja una considerable entrega de potencia para una biocelda enzimática que usa ácido láctico como combustible.

## ABSTRACT

---

This work is dedicated to characterization of enzymatic bioelectrodes for evaluation in half cell and fuel cells based in acid lactic oxidation and oxygen reduction, generating electric energy. The importance of this biocells lies in their use as a possible source of power in portable medical devices with substances easily present in the metabolites of the human body.

Lactate oxidase enzyme electrodes were used anode and bilirubin oxidase cathode, supported on conductive paper (carbon paper Toray<sup>®</sup>). The air of the environment is employed within of the fuel cell, to obtain oxygen that will be reduced at the cathode. A mixture of dimethyl ferrocene modified with linear poly (ethylenimine) (FcMe<sub>2</sub>-LPEI), lactate oxidase (LOX) and ethylene glycol diglycidyl ether (EGDGE) was used for bioanode (FcMe<sub>2</sub>-LPEI-LOX-EGDGE). Meanwhile, the integration of electrodes exposed to air composed of a mixture of multiple wall carbon nanotubes modified with anthracene (An-CNTs), bilirubin oxidase (BOX), 50 mM phosphate buffer at pH 6.5 and nafion modified with tetrabutylammonium bromide (TBAB-Nafion<sup>®</sup>) used for the biocathode (An-MWCNTs-BOX-TBAB-Nafion<sup>®</sup>), in which the mentioned reaction (oxidation-reduction) is favored thanks to the easy supply of air that offers the design of cell, which avoids to have a limiting reagent. For the complete fuel biocell, acrylic pieces were used as support, fabricated by means of a CNC (computer numerical controller). The fuel cell performance was evaluated using lactic acid in phosphate buffer solution with a pH 6.5. The fuel cell to give a considerable power delivery for an enzymatic fuel biocell that use lactic acid as fuel.





**Este trabajo fue realizado en el Centro de  
Investigación y Desarrollo Tecnológico en  
Electroquímica (CIDETEQ), bajo la dirección  
del**

**Dr. Luis Antonio Ortiz Frade**



**Parte de éste trabajo fue realizado en “THE  
UNIVERSITY OF UTAH” bajo la dirección de la**

**Dra. Shelley D. Minter**





## AGRADECIMIENTOS

---

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT por la beca nacional brindada durante la realización de este trabajo en el CIDETEQ y por el apoyo de beca mixta como parte del desarrollo del proyecto.

Al Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica CIDETEQ y a quienes lo conforman les doy las gracias por la oportunidad brindada para culminar otro grado más de mi desarrollo profesional.

Al mismo tiempo a “The University of Utah” gracias Dra. Shelley Minter, por abrir las puertas de sus laboratorios y permitirme concluir con la estancia, sin la cual no habría sido posible el desarrollo de esta tesis.

A mi asesor el Dr. Luis A. Ortiz Frade agradezco enormemente el apoyo para la conclusión de esta tesis, sin el cual mi titulación no hubiera sido posible.

De igual forma a mis sinodales: la Dra. Yolanda Reyes Vidal, el Dr. José Luis Jurado Baízaval, la Dra. Silvia Gutiérrez Granados y el Dr. Germán Orozco Gamboa gracias por los aportes y tiempo invertido en la conclusión de este trabajo y a la Dra. Janet Ledesma gracias por los valiosos aportes a este proyecto.

Agradezco también a mi familia y amigos por compartir sus conocimientos tanto de ciencia como de todo a lo que moral respecta, en todas las situaciones que formaron parte de este tiempo de maestría, sin duda han sido muy divertidas.

David Ortega Díaz, mi amor, eres quien ha estado de principio a fin, de verdad ¡gracias! Principalmente por querer estar, eso es más valioso que todo lo demás y después por TODO lo que haces para mí y por mí, como esa compañía tan perfecta, esos empujones de siempre para hacer las cosas, por cómo me motivas, por esas clases de electroquímica interminables, por evitar desesperarte más de lo que podrías, entre tantas cosas que no acabaría de describir... Eres el mejor compañero, maestro y esposo que me pudo haber tocado sobre la faz de la tierra, ¡TE AMO ESPOSO!.

Andrés Déctor, GRACIAS HERMANITO, por impulsarme en estos caminos profesionales y personales que sin ti jamás hubiera conocido, por brindarme todo

tu amor, tu tiempo y esforzarte por enseñarme tantas cosas con esa gran paciencia que solo conmigo tienes, eres el mejor hermano mayor que pude haber tenido en toda mi vida (jajaja es enserio, aunque me ría). Y Diana Ma. Amaya gracias por escuchar las historias de tu cuñada favorita y hacerme ver que si se puede ser súper matada (caritas de whats lagrimeando de la risa aquí).

Ana Espinosa, mami, gracias por nunca dejarme sola, por alentarme siempre, por impulsarme a crecer y ayudarme a volar, por ser mi mamá en todos los aspectos habidos y por haber de verdad muchas gracias, nunca podré pagarte todo lo que has hecho por mí (además que no lo haría porque sería mucho jajaja), siempre te admiraré porque eres un gran ejemplo de vida para la mía, TE AMO MA'.

Mariana Déctor, gracias por tus consejos, por hacerme los días malos menos abrumadores y los buenos no tan buenos con esas peleas de siempre, "esas ocurrencias tuyas" pero bueno esas pláticas esporádicas por cel. Sin duda me alegran mis días y gracias por darme a esas dos sobrinitas mías: Valeria Glez. Déctor y Paola Glez. Déctor, siempre las recuerdo y a veces pienso que quisiera volver a ser una niña, luego recuerdo que suena muy ridículo y se me pasa (changuitos de whatss aquí)... y entonces lo único que hubiera deseado es estar cerca, pero bueno quizá estemos juntas cuando ya no estén tan pulguitas y su mamá las aviente del nido... Las quiero mucho.

Papi, sé que si estuvieras me hubieras dicho una vez más lo buena que soy y que con tus gestos hubiera entendido que estas muy orgulloso y sorprendido de mí y eso también me anima a seguir porque se lo que querías para mí.

Y ahora podría poner una lista interminable de personas que han estado a lo largo de este trabajo personas que me han apoyado en situaciones complicadas que han hecho mis días mejores con una que otra platica, con uno que otro chiste, pero no quisiera que me faltara alguno. Ustedes saben quiénes son, los aprecio y valoro mucho como las personas y amigos que han mostrado ser, ¡muchas gracias!

Finalmente GRACIAS DIOS por darme lo que necesité para lograrlo, muchas personas se preguntaron cómo lo hice después de tanta problemática que me ocasionaban, pero como decirles que tú eras la respuesta, si no saben de lo que eres capaz. Yo solo sonreía pues tus planes son perfectos. ¡Eres el mejor!

*A Dios, mi fuerza...*



# ÍNDICE

---

---

INTRODUCCIÓN .....	1
1. CELDAS DE COMBUSTIBLE Y BIOCELDAS ENZIMÁTICAS.....	4
1.1 Principios básicos de una celda combustible.....	4
1.2 Desempeño electroquímico de una celda de combustible .....	5
1.3 Funcionamiento de las celdas de combustible microfluídicas.....	7
1.4 Generalidades sobre las bioceldas de combustible enzimáticas .....	9
1.5 Transferencia electrónica enzimática.....	10
1.5.1 Transferencia electrónica de la enzima lactato oxidasa .....	12
1.5.2 Transferencia electrónica de la enzima bilirrubina oxidasa .....	13
1.6 Bioceldas enzimáticas con ácido láctico como combustible .....	14
1.6.1 Materiales electrocatalíticos empleados en bioceldas de combustible enzimáticas para la oxidación de AL .....	15
1.6.2 Oxidación completa de AL en una biocelda de combustible.....	16
1.6.3 Principios de operación de una biocelda de combustible para oxidación de AL .....	18
1.6.4 Desempeño de bioceldas de combustible enzimáticas de ácido láctico	19
1.7 Uso de bioceldas de combustible enzimáticas para la oxidación de ácido láctico.....	20
JUSTIFICACIÓN .....	22
HIPÓTESIS .....	23
OBJETIVOS .....	24
OBJETIVO GENERAL .....	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
2. CONSTRUCCIÓN DE LA BIOCELDA DE COMBUSTIBLE ENZIMÁTICA.....	27
2.1 Electrodo para la biocelda de combustible.....	27
2.1.1 Preparación de tinta catalítica y construcción del biocátodo.....	27
2.1.2 Preparación de tinta catalítica y construcción del bioánodo .....	29
2.2 Soportes para ensamble de la celda de combustible.....	31
2.3 Evaluación en media celda de bioelectrodos .....	33
2.3.1 Bioánodo de lactato oxidasa .....	33
2.3.2 Biocátodo de bilirrubina oxidasa .....	33

2.4 Evaluación en celda completa de los bioelectrodos .....	34
3. BIOCELDA DE COMBUSTIBLE ENZIMÁTICA .....	37
3.1 Evaluación en media celda del bioánodo .....	37
3.1.1 Voltametría cíclica del bioánodo de lactato oxidasa .....	37
3.1.2 Evaluación de la sensibilidad del bioánodo de lactato oxidasa.....	39
3.2 Evaluación en media celda del biocátodo .....	41
3.2.1 Voltametría cíclica para el biocátodo de la bilirrubina oxidasa.....	41
3.3 Evaluación de celda de combustible enzimática. ....	44
4. CONCLUSIONES.....	48
REFERENCIAS .....	50
Referencias de Introducción.....	50
Referencias capítulo I.....	51
Referencias capítulo II.....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Satisfacción de demanda energética en dispositivos portátiles y médicos (implantables y no implantables) empleando celdas de combustible. ....	2
<b>Figura 2.</b> Esquema de una celda de combustible de H <sub>2</sub> . ....	4
<b>Figura 3.</b> Curva de descarga característica de una celda de combustible [9]. ....	6
<b>Figura 4.</b> Curva de polarización característica de una celda de combustible [10].	7
<b>Figura 5.</b> Esquema interno de una celda de combustible. ....	8
<b>Figura 6.</b> Esquema de una biocelda de combustible [11]. ....	9
<b>Figura 7.</b> Estructura de cofactores (FAD, NAD <sup>+</sup> y PQQ) en su forma oxidada y reducida [12]. ....	10
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática de la DET y la MET en una enzima sobre un electrodo [12]. ....	11
<b>Figura 9.</b> Representación esquemática de la reacción de oxidación de ácido láctico mediante la enzima LOx. ....	13
<b>Figura 10.</b> Representación esquemática de la reacción de reducción de oxígeno mediante la enzima BOx. ....	14
<b>Figura 11.</b> Oxidación completa de AL y subproductos [41]. ....	17
<b>Figura 12</b> Representación esquemática de bioánodo de LOx y biocátodo de BOx y sus reacciones electroquímicas. ....	21
<b>Figura 13.</b> Transferencia electrónica directa a través de An-MWCNTs. ....	28
<b>Figura 14.</b> Depósito de BOx en electrodo catódico para biocelda de combustible empleado en la oxidación de AL. ....	29
<b>Figura 15.</b> Estructura química de la poli (etilenimina) lineal modificada con dimetil ferroceno. ....	30
<b>Figura 16.</b> Depósito de LOx sobre el electrodo anódico de la biocelda de combustible empleado para la oxidación de AL. ....	31
<b>Figura 17.</b> Esquema de la celda de combustible. ....	32
<b>Figura 18.</b> Esquema de los soportes la celda de combustible. ....	32
<b>Figura 19.</b> Evaluación de electrodos enzimáticos en celda completa. ....	35
<b>Figura 20.</b> Voltametría cíclica de una película de FcMe <sub>2</sub> -LPEI / LOx / EGDGE depositada sobre el electrodo de papel Toray®. El experimento fue desarrollado	

utilizando una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM a pH 6.5 y velocidad de barrido de 0.5 mVs-1.....	38
<b>Figura 21.</b> Respuesta Crono amperométrica de una película de FcMe2-LPEI / LOx / EGDGE depositado sobre el electrodo de papel Toray® el experimento fue desarrollado utilizando una disolución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 6.5.	39
<b>Figura 22.</b> Curva de respuesta corriente vs concentración de películas de FcMe2-LPEI / LOx / EGDGE depositadas sobre el electrodo de papel Toray®. El experimento fue desarrollado utilizando una disolución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 6.5.....	40
<b>Figura 23.</b> Voltamograma cíclico de BOx/Ac-MWCNTs/TBAB-Nafion® sobre papel carbón Toray® con velocidad de barrido de 1 mV s <sup>-1</sup> (disolución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 4.5).....	42
<b>Figura 24.</b> Voltamograma cíclico de BOx/Ac-MWCNTs/TBAB-Nafion® sobre papel carbón Toray® con velocidad de barrido de 1 mV s <sup>-1</sup> (disolución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 5.5) .....	42
<b>Figura 25.</b> Voltamograma cíclico de BOx/Ac-MWCNTs/TBAB-Nafion® sobre papel carbón Toray® con velocidad de barrido de 1 mV s <sup>-1</sup> (disolución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 6.5) .....	43
<b>Figura 26.</b> Voltamograma cíclico de BOx/Ac-MWCNTs/TBAB-Nafion® sobre papel carbón Toray® con velocidad de barrido de 1 mV s <sup>-1</sup> (disolución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7.4).....	43
<b>Figura 27.</b> Evaluación de biocelda de combustible enzimática. Condición I (dos flujos).....	45
<b>Figura 28.</b> Evaluación de biocelda de combustible enzimática en la condición II (un flujo). .....	46
<b>Figura 29.</b> Comparación de celdas de combustible enzimática condición I y II (uno y dos flujos). .....	47



## ÍNDICE DE TABLAS

---

---

<b>Tabla 1.</b> Datos de potencial, corriente y potencia obtenidos en bioceldas de combustible enzimáticas con ácido láctico (AL). .....	20
<b>Tabla 2.</b> Condiciones de evaluación en media celda para bioánodo. ....	33
<b>Tabla 3.</b> Condiciones de evaluación en media celda para biocátodo. ....	34
<b>Tabla 4.</b> Condiciones de evaluación para la biocelda de combustible enzimática. ....	36
<b>Tabla 5.</b> Condiciones experimentales para la celda de combustible enzimática. ....	44

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

---

FcMe <sub>2</sub> – LPEI	Poli(etilenimina) lineal modificada con dimetilferroceno
LOx	Lactato oxidasa
EGDGE	Etilenglicol diglicidil éter
An – CNTs	Nanotubos de carbón de múltiple pared modificados con antraceno
BOx	Bilirrubina oxidasa
TBAB - Nafion	Nafion modificado con bromuro de tetrabutilamonio
CNC	Controlador numérico por computadora
PowerMEMS	Sistemas Microelectromecánicos de Energía
FAD	flavina adenina dinucleótido
NAD <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleótido
PQQ	pirroloquinolina quinona
TED	Transferencia de electrones directa
TEM	Transferencia de electrones mediada
LDH	Lactato deshidrogenasa
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido hidrato
MCOs	Multicentros metálicos de cobre
TNC	Clúster tri-nuclear
AL	Ácido láctico
DI	Desionizada
PMMA	Poli metil metacrilato

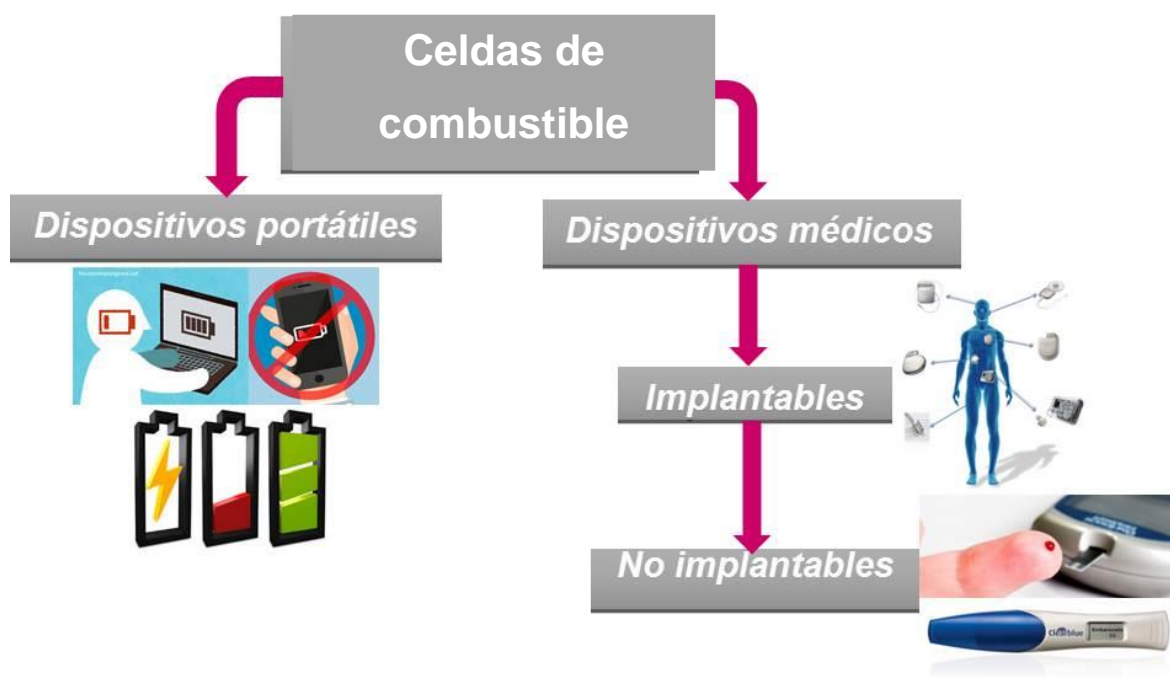
# **INTRODUCCIÓN**

## INTRODUCCIÓN

---

La fabricación masiva de dispositivos electrónicos portátiles como computadoras, teléfonos móviles, tabletas, entre otros, así como el tema de implantación de microsistemas médicos como marcapasos o sensores y el desarrollo de sistemas médicos de análisis no implantables, tales como glucómetros o sensores médicos [1-5], han propiciado la búsqueda de fuentes de alimentación energéticas eficientes, de bajo impacto ecológico y larga duración. Dichas fuentes deben ser capaces de suministrar energía de manera sostenida a estos dispositivos, ya que el rendimiento y el funcionamiento de por vida de estos aparatos electrónicos se ven limitados por la dependencia a su fuente de alimentación de energía, por lo general de una batería recargable de ion-litio [5].

En la última década, se ha generado un campo de investigación conocido a nivel mundial como powerMEMS (Sistemas Microelectromecánicos de Energía) [6]. Dentro de los powerMEMS, se encuentran actualmente en desarrollo diversos dispositivos como las celdas de combustible [6,7]. Éstas aún en fase de investigación y desarrollo, podrían satisfacer las demandas de dispositivos portátiles o médicos, además las llamadas celdas de combustibles en especial las que trabajan en el ámbito "bio" merecen actualmente un interés especial debido a sus potenciales ventajas frente a otros dispositivos y tipos de celdas [6] (Figura 1). Entre estas ventajas destacan la posibilidad de trabajar a temperatura ambiente, emisiones no contaminantes y probabilidades de eliminar las partes móviles complejas asociadas a otro tipo de dispositivos trabajando únicamente con una celda de combustible que se alimenta con flujos muy pequeños del oxidante, lo cual simplifica el proceso de fabricación y reduce las posibilidades de fallo [7].



**Figura 1.** Satisfacción de demanda energética en dispositivos portátiles y médicos (implantables y no implantables) empleando celdas de combustible.

El tipo de combustible empleado depende de la aplicación portátil para la cual sea diseñada la celda de combustible, entre los combustibles destacan: metanol [5, 6], ácido fórmico [8-11], etilenglicol [12], glucosa [13], glicerol [14] y, como una nueva propuesta, ácido láctico [15-16].

El ácido láctico está presente en el organismo, y sus concentraciones pueden indicarnos alguna deficiencia de salud en el cuerpo, se encuentra en fluidos corporales, también conocidos como metabolitos, tales como el sudor, la sangre, orina e incluso lágrimas [17]. Estos metabolitos podrían ser utilizados para llevar acabo las reacciones redox de donde podría derivarse la generación de energía eléctrica para dispositivos médicos principalmente no implantables. Por otra parte, cabe mencionar, que en este caso, al elegir al ácido láctico como combustible, los materiales catalíticos empleados deben ser capaces de llevar acabo la oxidación de ácido láctico en la celda de combustible.

En los últimos años, la investigación en bioceldas de combustible que emplean ácido láctico como combustible ha sido escasa. Pocos reportes indican el uso de ácido láctico como combustible en sensores y ninguno en celdas de combustible

como la empleada en este trabajo. Hay reportes en media celda o celdas de tres electrodos de tipo adhesivas [15-18].

Esta tesis estuvo dedicada a la elaboración de electrodos enzimáticos con lactato oxidasa y a su evaluación mediante métodos electroquímicos, para su incorporación en celdas de combustible usando una solución de ácido láctico con concentraciones similares a los fluidos corporales humanos y los electrodos enzimáticos. Lo cual representa un avance significativo para investigaciones enfocadas en aplicaciones médicas direccionadas específicamente al ácido láctico, principalmente en dispositivos no implantables.



# Capítulo I

## ANTECEDENTES



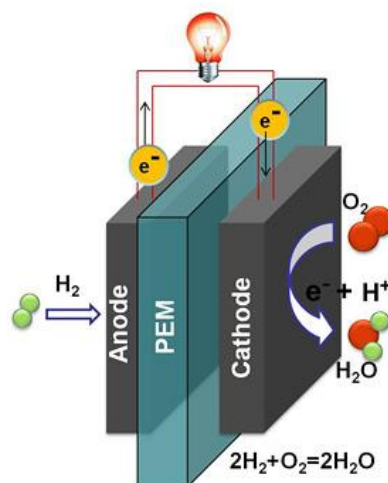
# 1. CELDAS DE COMBUSTIBLE Y BIOCELAS ENZIMÁTICAS

## 1.1 Principios básicos de una celda combustible

Una celda de combustible es un dispositivo electroquímico que convierte directamente la energía química de los combustibles en energía eléctrica. El término "directamente" indica que se evita el proceso, donde la energía química se convierte en energía térmica para después convertirse en energía eléctrica. Así, hay poca producción de calor y se obtiene una mayor eficiencia en comparación con los motores de combustión interna convencionales [1].

A pesar de que las celdas de combustible y baterías tienen una base electroquímica similar, hay varias diferencias en su rendimiento. A diferencia de las baterías, una celda de combustible funciona mientras el combustible y el oxidante sean suministrados en ella. Lo anterior quiere decir que, la energía se produce continuamente conforme el combustible y el oxidante sean proporcionados a la celda para pasar por el ánodo y cátodo respectivamente.

Los productos de las reacciones se eliminan de la celda junto con la corriente líquida del combustible agotado. Por lo tanto, es necesario disponer de un sistema que suministre continuamente el combustible y el oxidante a los electrodos. Las celdas de combustible convierten la energía química en energía eléctrica por medio de reacciones electroquímicas. A fin de obtener un flujo neto de electrones, es necesario asegurarse que la oxidación y la reacción de reducción se llevan a cabo por separado. Los elementos que conforman una celda de combustible a base de hidrógeno se muestran en la Figura 2.



**Figura 2.** Esquema de una celda de combustible de  $H_2$ .

## 1.2 Desempeño electroquímico de una celda de combustible

El rendimiento de una celda de combustible es descrito por la curva de densidad de corriente-potencial (I-E) o curva de descarga, donde puede observarse el comportamiento de la celda de combustible y obtener la potencia máxima de ésta respecto al potencial demandado con el producto de la corriente por el potencial de la propia celda.

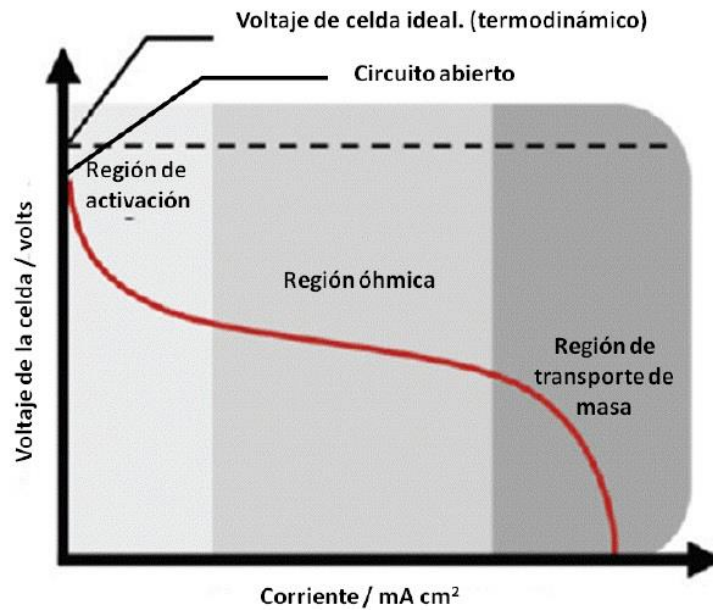
El potencial termodinámico de la celda de combustible está dado por la ecuación de Nernst, la cual describe como los potenciales reversibles de la celda electroquímica varían en función de distintos parámetros, tales como la concentración, presión, etc. La ecuación general toma la siguiente forma:

$$E = E^{\circ} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{\prod_{\text{productos}}^{v_i} a}{\prod_{\text{reactantes}}^{v_i} a}$$

Donde  $E^{\circ}$  es el potencial reversible estándar,  $R$  es la constante de los gases,  $T$  es la temperatura,  $n$  el número de moles de electrones transferidos,  $F$  la constante de Faraday,  $a$  es la actividad de las especies y  $v_i$  es el coeficiente estequiométrico de la especie en la reacción.

En tiempo real el potencial obtenido de una celda de combustible es inferior al potencial electroquímico asociado a las reacciones químicas que tienen lugar en la celda de combustible. Esto sucede por varias pérdidas irreversibles asociadas a diferentes factores físicos. Estas limitaciones dan su forma característica a la curva I-P como se muestra en la Figura 3 y se clasifican en tres tipos como función de la región de la curva donde son evidentes sus efectos:

- 1) Pérdidas de activación. Debido a la reacción electroquímica.
- 2) Pérdidas óhmicas. Debido a la conductividad iónica y electrónica.
- 3) Pérdidas de concentración. Debido al transporte de masa.



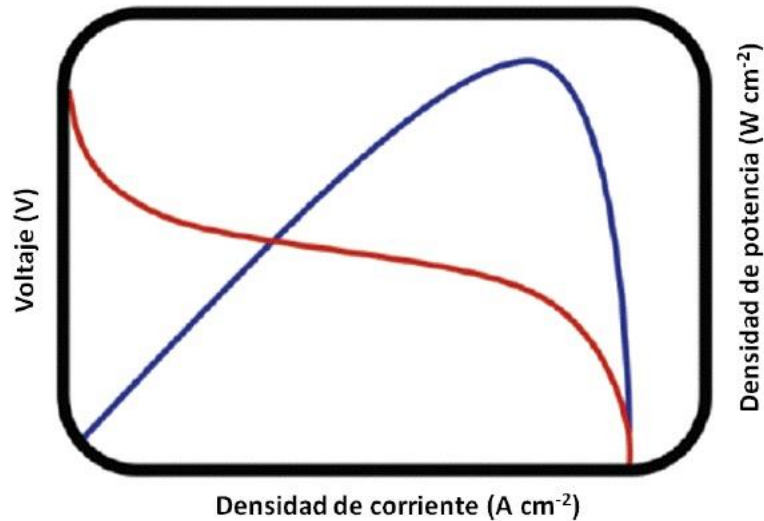
**Figura 3.** Curva de descarga característica de una celda de combustible [9].

Considerando las pérdidas en la celda de combustible anteriormente mencionadas, la fórmula que describe el potencial eléctrico obtenido es el siguiente:

$$E_{\text{eléctrico}} = E_{\text{termodinámica}} - \eta_{\text{act}} - \eta_{\text{ohm}} - \eta_{\text{conc}}$$

Donde E es el potencial de la celda de combustible correspondiente al potencial termodinámico ideal, por otra parte  $\eta_{\text{act}}$ ,  $\eta_{\text{ohmic}}$  y  $\eta_{\text{conc}}$  corresponden a las pérdidas de activación, las óhmicas y concentración, respectivamente.

Como se mencionó al principio, la potencia es uno de los aspectos principales para la evaluación de la celda de combustible. Tanto la corriente como la potencia son dadas por unidad de superficie, densidad de corriente y densidad de potencia respectivamente, con el fin de poder ser comparadas con otros dispositivos. La Figura 4 muestra las típicas curvas de polarización sobre la densidad de corriente y la densidad de potencia.



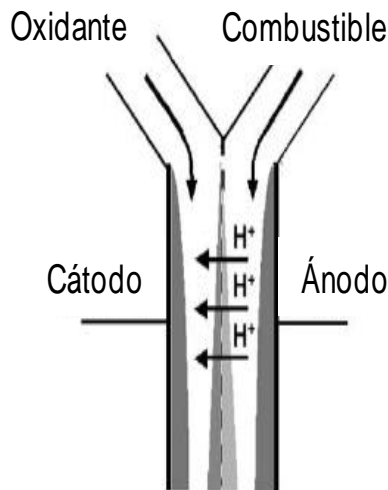
**Figura 4.** Curva de polarización característica de una celda de combustible [10].

La línea azul muestra la curva típica de densidad de potencia (W), obteniendo el valor máximo en el pico de la curva, mientras que la línea roja muestra la densidad de corriente, desarrollándose en este caso de izquierda a derecha, obteniendo el valor máximo de densidad de corriente (J) cuando el voltaje llega a cero [10].

### 1.3 Funcionamiento de las celdas de combustible microfluídicas

Las celdas de combustible a escalas cada vez menores son parte de una clasificación reciente de la tecnología de celdas de combustible capaz de funcionar en el marco de un chip de micro fluido. Las celdas de combustible, son una rama de la investigación de la generación de energía limpia [2]. Estos dispositivos aprovechan la naturaleza de flujo laminar cuando se trata de flujos pequeños, para mantener separados los fluidos de combustible y comburente que se introducen en la micro celda [3]. Esta separación es importante para confinar las reacciones de oxidación y reducción a los electrodos correspondientes [4]. El combustible y el oxidante son alimentados a la celda por conductos separados que se unen en un solo canal en las paredes de éste, el combustible interactúa con el ánodo y el oxidante con el cátodo (reacciones de oxidación y reducción respectivamente), ambos producen un potencial en la celda [2]. En la interfase de los fluidos se lleva a cabo el intercambio protónico, mientras que los electrones

liberados por la oxidación en el ánodo toman un camino alternativo al fluido, es decir, un circuito electrónico (colectores de corriente), tal como se observa en la Figura 5.



**Figura 5.** Esquema interno de una celda de combustible.

El funcionamiento de la celda depende del régimen laminar, si los flujos se cruzan en el interior se presenta un corto circuito conocido en el ámbito de celdas de combustible como “crossover” con efecto sobre la eficiencia de la celda cambiando su polaridad [2] o simplemente dejando de funcionar. Las celdas de combustible con flujos en la escala de micras se definen dentro de los fenómenos de transporte y de los flujos de fluidos como una microestructura, en la cual por lo menos uno de sus caracteres dimensionales esté dentro de un rango de 1-100 $\mu\text{m}$  [5,6]. El flujo de fluidos en estos dispositivos a micro escala puede esperarse de forma laminar caracterizados como si fueran efectos viscosos, donde dominan la inercia y las fuerzas de superficie.

La celda de combustible con estas características puede analizarse como un sistema tridimensional, ya que en el interior se presentan varias interfases; como la sólido-líquido (por el contacto del combustible y oxidante con los electrodos) y la interface líquido-líquido (por el contacto entre los reactantes). El sistema tiene un comportamiento de régimen laminar, gobernado por la influencia de números

bajos de Reynolds [3,7], donde los efectos de las fuerzas viscosas predominan sobre el sistema de fluidos en escalas micro [2,8].

#### 1.4 Generalidades sobre las bioceldas de combustible enzimáticas

Un ejemplo de un dispositivo bioelectrónico es una bio-celda de combustible, como se muestra en la Figura 6. Las bioceldas de combustible enzimáticas son un tipo de celdas de combustible que utilizan enzimas como electrocatalizadores para la oxidación del combustible y/o la reducción de oxígeno o para convertir la energía química en energía eléctrica.

Como se ha mencionado las celdas de combustible más utilizadas son las que funcionan con electrocatalizadores metálicos que pueden operar desde 40°C hasta 150°C, además de que tienen una alta estabilidad y actividad, tanto en medios altamente ácidos y básicos. Sin embargo se pasivan fácilmente teniendo que hacer uso de combustibles con alta pureza [11]. Por esta razón se requieren electrocatalizadores altamente selectivos como pueden llegar a ser las enzimas o bacterias, que son capaces de metabolizar combustibles complejos.

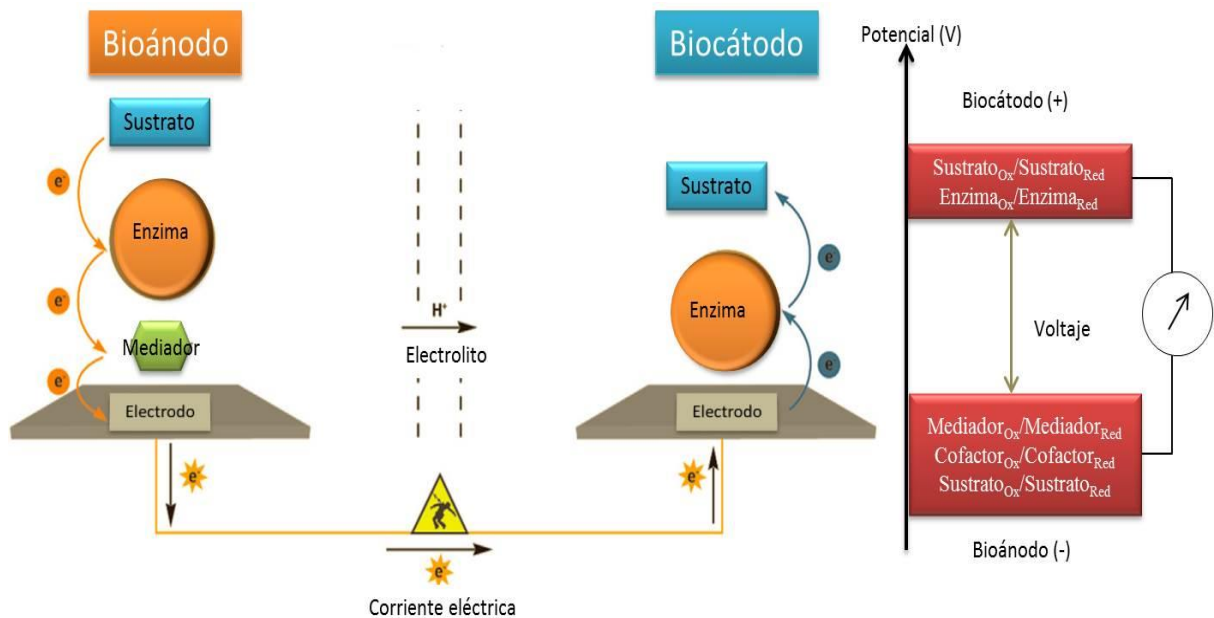
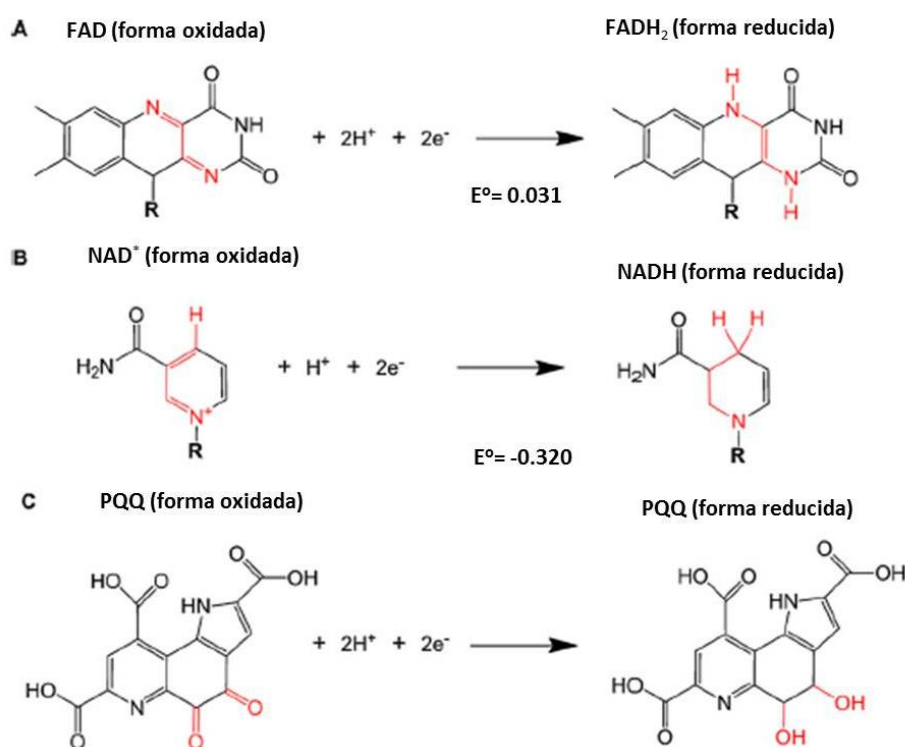


Figura 6. Esquema de una biocelda de combustible [11].

## 1.5 Transferencia electrónica enzimática

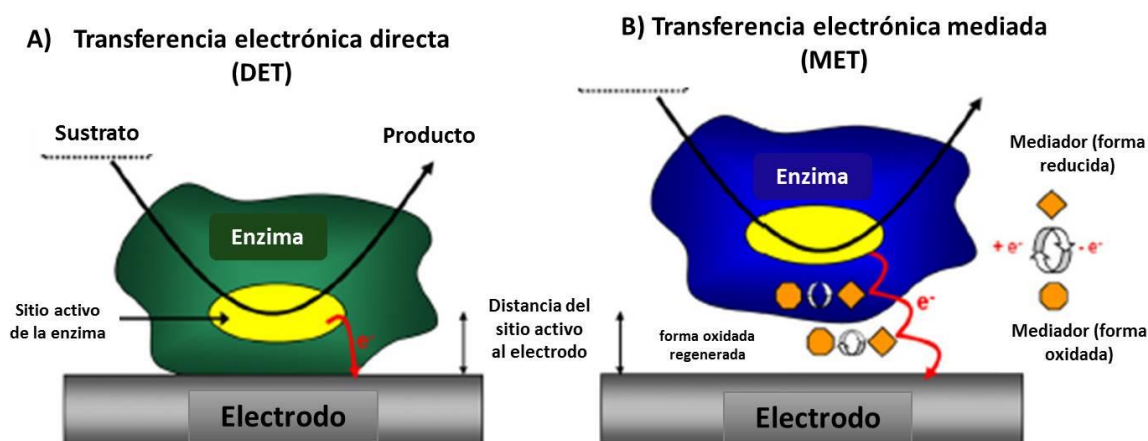
Las enzimas redox consisten en una apoenzima (el componente proteico de una enzima) y cofactor (es): especies electroactivas no proteicas. La presencia del cofactor asegura la transferencia de electrones entre la enzima y sustrato/co-sustrato. El cofactor puede estar estrechamente unido dentro de la estructura de la enzima o liberado del sitio activo de la enzima durante la reacción. Los cofactores comunes para algunas de las enzimas oxidantes incluyen flavina adenina dinucleótido (FAD), nicotinamida adenina dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ) y pirroloquinolona quinona (PQQ) (Figura 7).



**Figura 7.** Estructura de cofactores (FAD,  $\text{NAD}^+$  y PQQ) en su forma oxidada y reducida [12].

Para algunas enzimas redox que poseen cofactores estrechamente unidos en el sitio activo, los electrones pueden transferirse directamente de la enzima al electrodo, como se representa en la Figura 8A, en un proceso denominado transferencia directa de electrones (DET). Aunque la transferencia directa de electrones se ha visto en un amplio rango de enzimas [21, 28, 44, 46]. Hay varios desafíos que se deben superar para lograr tasas significativas de transferencia

directa de electrones, que den lugar a apreciables densidades de corriente, entre sitios activos y superficies de electrodo sólido. Por ejemplo, la tasa de transferencia de electrones está relacionada exponencialmente con la distancia de aproximación más cercana entre un donante de electrones y aceptor, lo que resulta en tasas despreciables para distancias superiores a 2 nm [47].



**Figura 8.** Representación esquemática de la DET y la MET en una enzima sobre un electrodo [12].

La transferencia de electrones directa “TED” o “DET” por sus siglas en inglés, sólo puede tener lugar cuando un electrodo se coloca dentro de esta distancia (2nm) a un cofactor enzimático en el sitio activo. Además, para aquellas enzimas que tienen sitios activos suficientemente expuestos para permitir la TED, se requiere la orientación correcta de cada enzima en la superficie del electrodo para mantener el sitio activo a la distancia de aproximación más cercana. Finalmente, incluso cuando un electrodo puede acercarse lo suficientemente cerca de un sitio activo para conseguir TED, usualmente tomando el lugar de un sustrato/co-sustrato redox, esto puede no necesariamente conducir a la generación de una corriente bioelectrocatalítica para la electrólisis del sustrato, ya que el electrodo puede bloquear el acceso al sitio activo del co-sustrato/sustrato [12].

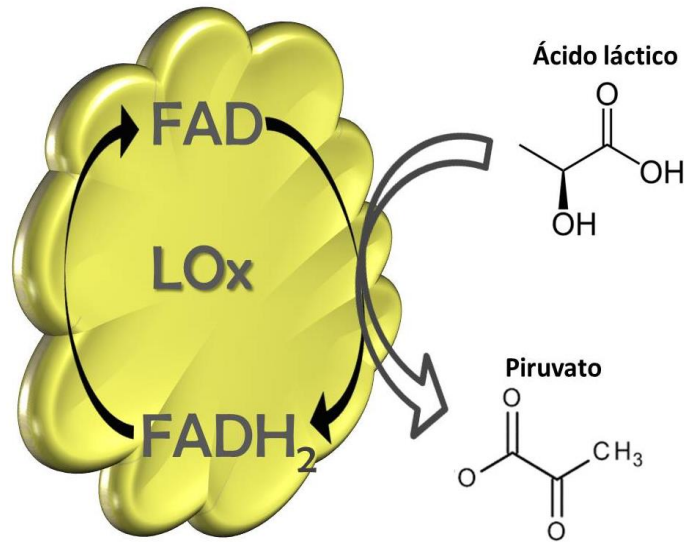
Como alternativa a la TED, se pueden usar moléculas electroactivas (mediadores) para transferir electrones entre la enzima y el electrodo (Figura 5B), en un proceso denominado transferencia de electrones mediada (MET, por sus siglas en



inglés). En la transferencia de electrones mediada “TEM” o “MET” por sus siglas en inglés, los potenciales redox termodinámicos del mediador, ahora dictan la potencia máxima. Por lo tanto, se requiere un potencial redox que sea más positivo para la biocatálisis oxidativa (en el ánodo) y más negativo para la biocatálisis reductora (en el cátodo), ambos contribuyen a las pérdidas de voltaje en una reacción electroquímica. Por lo tanto, un reto importante en TEM es lograr la mejor eficiencia entre la fuerza motriz y la corriente, con el fin de maximizar la potencia de salida [12].

### **1.5.1 Transferencia electrónica de la enzima lactato oxidasa**

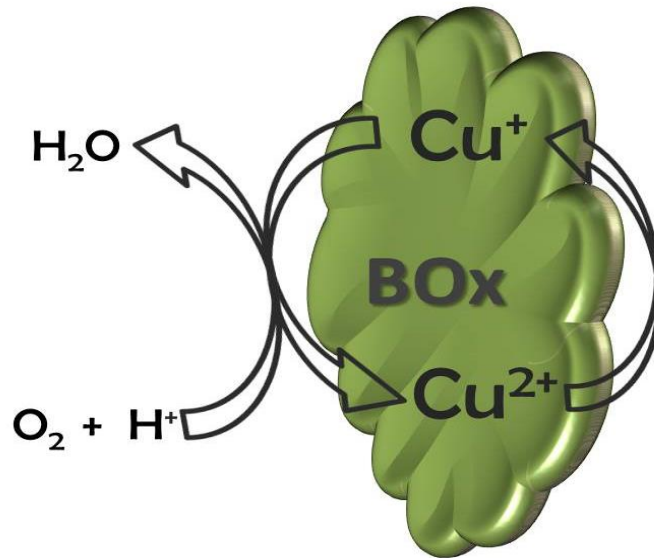
Lactato oxidasa (LOx) es una enzima de la especie de las oxidasas, la cual cataliza la oxidación del lactato para producir piruvato como subproducto. Existen trabajos que reportan métodos para la detección de lactato, en los cuales catalizan la oxidación de lactato produciendo  $H_2O_2$  que luego se detecta amperométricamente en un electrodo de platino [18,19]. Otros utilizan la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y detecta nicotinamida adenina dinucleótido hidrato (NADH), pero este enfoque requiere la adición de la forma oxidada de NADH, conocida como  $NAD^+$  [20]. Ambos métodos requieren el uso de una celda estándar de tres electrodos con un electrodo de referencia, un contraelectrodo y un electrodo de trabajo, para el cual se debe aplicar un potencial relativamente grande para facilitar la detección de peróxido o NADH. El gran potencial aplicado también da como resultado una corriente incrementada causada por la oxidación no deseada de contaminantes biológicos. Una posible solución a este problema es utilizar mediadores redox de alta densidad de corriente para facilitar la transferencia de electrones desde el sitio activo flavín adenín dinucleótido (FAD) de la LOx a la superficie del electrodo a un potencial menor que el requerido para la oxidación de  $H_2O_2$  [21]. Además, dichos materiales pueden acoplarse con un biocátodo para proporcionar la fuerza motriz electroquímica requerida en una celda de combustible enzimática, un esquema de las reacciones llevadas a cabo por el bioánodo se muestra en la Figura 9.



**Figura 9.** Representación esquemática de la reacción de oxidación de ácido láctico mediante la enzima LOx.

### 1.5.2 Transferencia electrónica de la enzima bilirrubina oxidasa

Las enzimas oxidasas con multicentros metálicos de cobre (MCOs, por sus siglas en inglés), como la bilirrubina oxidasa (BOx), se incorporan comúnmente en las bioceldas de combustible enzimáticas como responsable de la biocatálisis catódica para la reducción de O<sub>2</sub> disuelto a H<sub>2</sub>O vía 4e<sup>-</sup> [22-25] (Fig. 7). La BOx contiene 3 centros de cobre diferentes, estos son responsables de la catálisis del sustrato y se clasifican como tipo 1 (T1), tipo 2 (T2) y un centro binuclear tipo 3 (T3). Los sitios T2 y T3 se combinan en un clúster tri-nuclear (TNC) [27]. La oxidación de sustrato con un electrón tendrá lugar en el centro T1 cercano al electrodo, con la reducción de 4e<sup>-</sup> de O<sub>2</sub> que tiene lugar en el TNC. Siguiendo con la oxidación de sustratos, los 4e<sup>-</sup> se transfieren rápidamente entre el sitio T1 y el TNC (en 4x1) vía MCOs a una cadena His-Cys-His [27,28]. También se ha señalado que la BOx puede promover la reducción de O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O a través de un paso intermedio de peróxido de 2 electrones (aunque desfavorable) [29,30]. Un esquema de las reacciones llevadas a cabo por el biocátodo se muestra en la Figura 10.



**Figura 10.** Representación esquemática de la reacción de reducción de oxígeno mediante la enzima BOx.

### 1.6 Bioceldas enzimáticas con ácido láctico como combustible

El ácido láctico (AL) o lactato, con la fórmula molecular  $C_3H_6O_3$ , ácido 2-hidroxiopropanoico, es un compuesto muy versátil utilizado en las industrias químicas, farmacéuticas, de alimentos y de plásticos. Fue descubierto en 1780 por el químico sueco Scheele, quien lo aisló de leche agria, después fue reconocido como producto de fermentación por Blondeaur en 1847 y en 1881, Littleton inicia la fermentación a escala industrial [31].

La oxidación de AL genera electrones que pueden ser aprovechados para su almacenamiento o el funcionamiento directo de dispositivos o chips que requieren una cantidad mínima de energía para su funcionamiento [32]. Se puede producir fácilmente con el uso de diferentes métodos como químicos y biotecnológicos e incluso se encuentra en los metabolitos del cuerpo humano. Cabe mencionar que la electro-oxidación de ácido láctico también está siendo estudiada para la elaboración de sensores de este compuesto [33].

Las bioceldas de combustible alimentadas con AL, se clasifican en función del tipo de catalizador utilizado. El primer tipo es una celda de combustible de AL enzimática, que utiliza a las enzimas como catalizadores. Estas enzimas son; lactato oxidasa o lactato deshidrogenasa para oxidación de ácido láctico y lacasa

o bilirrubina oxidasa para reducción de oxígeno en el ánodo y cátodo respectivamente. Su estabilidad a largo plazo ha sido limitada, ya que cambios en las condiciones de temperatura y pH pueden causar fácilmente la desnaturalización de éstas. Sin embargo, las enzimas tienen una alta selectividad, en este caso al AL, provocando una alta velocidad de reacción, lo que resulta ventajoso ya que esto limita cualquier reacción secundaria [33].

El segundo tipo de celda de combustible de AL es la celda de combustible de AL abiótica, estas son celdas de combustible que usan catalizadores inorgánicos, es decir de materiales metálicos (ánodo) capaces de oxidar AL y capaces de reducir el oxígeno por el cátodo [31].

Finalmente, se indica un tercer tipo de celda de combustible de AL que surge de la combinación entre el tipo enzimático y el tipo abiótico, esta celda de combustible híbrida se caracteriza por estar conformada con un electrodo enzimático y otro metálico. La ventaja de estas celdas de combustible de AL híbridas es la estabilidad que ofrecen a la microcelda y por tanto un aumento de potencia [32].

### **1.6.1 Materiales electrocatalíticos empleados en bioceldas de combustible enzimáticas para la oxidación de AL**

Cuando es usado un catalizador abiótico para la oxidación de ácido láctico, el principal inconveniente es el envenenamiento causado por los subproductos de la oxidación de AL, lo cual reduce la superficie electrocatalítica, decreciendo así la corriente eléctrica y tiempo de vida del electrodo.

Como solución a este problema, diversos catalizadores se han evaluados con el fin de incrementar la cinética y la resistencia al envenenamiento de estos materiales al emplearse en celdas de combustible alimentadas de AL, sin embargo en la práctica al utilizarse en celdas de combustible. Estos no resisten y se pasivan fácilmente por los subproductos de la oxidación del combustible.

Por otra parte, algunas enzimas han sido empleadas en solución para llevar a cabo la oxidación en diseños de celdas de combustibles. Sin embargo, algunas de las principales limitaciones de las celdas de biocombustible enzimáticas al usar

estas enzimas en solución, es su estabilidad limitada a unos días [34] y corto tiempo de vida (8 h a 2 días) en soluciones amortiguadoras [35]. Estos periodos se han extendidos de 7 hasta 20 días por medio de inmovilizaciones sobre las superficies del electrodo, empleando diferentes métodos como; atrapamiento, enlace químico, y entrecruzamiento [35]. De acuerdo al método, se puede extender el tiempo de vida hasta 1 año a través de encapsulamiento en polímeros micelares. Estos polímeros limitan físicamente a la enzima e impiden su desnaturalización proporcionando un medio hidrofóbico bicompatible y ambientes microquímicos amortiguadores de pH [36-38]. También es necesario el cuidado de la concentración de oxígeno disuelto que tiende a ser el reactivo limitante debido a sus bajas concentraciones ( $\sim 0,2$  mM), además del bajo coeficiente de difusión de oxígeno ( $1,97 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ \text{ C}$ ) [39]. Para resolver esta problemática, algunos autores proponen el uso de cátodos que se favorecen por el suministro de oxígeno en la región catódica del diseño en las celdas de combustible [40] y/o la inmovilización de enzimas [34].

La inmovilización de enzimas sobre soportes conductores permite diseños de bioceldas de combustibles para la oxidación de ácido láctico. Las enzimas inmovilizadas empleadas por algunos autores para la oxidación de este compuesto han sido la lactato deshidrogenasa [41] y lactato oxidasa [33]. El término oxidasas es el nombre general para las enzimas que catalizan reacciones de oxidación en las que el oxígeno molecular es el aceptor de electrones aunque los átomos de oxígeno no aparezcan en el producto oxidado [42]. La enzima lactato oxidasa, oxida el lactato a ácido pirúvico y su pH óptimo es de 6.5 [33].

### **1.6.2 Oxidación completa de AL en una biocelda de combustible**

El AL puede ser completamente oxidado liberando 12 electrones por cada molécula de AL. En el caso de la oxidación completa, las reacciones que se producen en cada electrodo serán dadas como lo muestra el ciclo de Krebs en el caso del ánodo y la reducción de  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  para el caso del cátodo [41].

La oxidación completa del ácido láctico es un proceso complejo que se produce en varias etapas. La Figura 11 muestra una celda de combustible donde se

desarrolla la oxidación y productos de reacciones intermedias de la oxidación del AL mediante enzimas y cofactores participes en el ciclo de Krebs.

En la Figura 11 se muestra una cascada de enzimas y cofactores, capaces de llevar a cabo la oxidación de todos los subproductos derivados del ácido láctico.

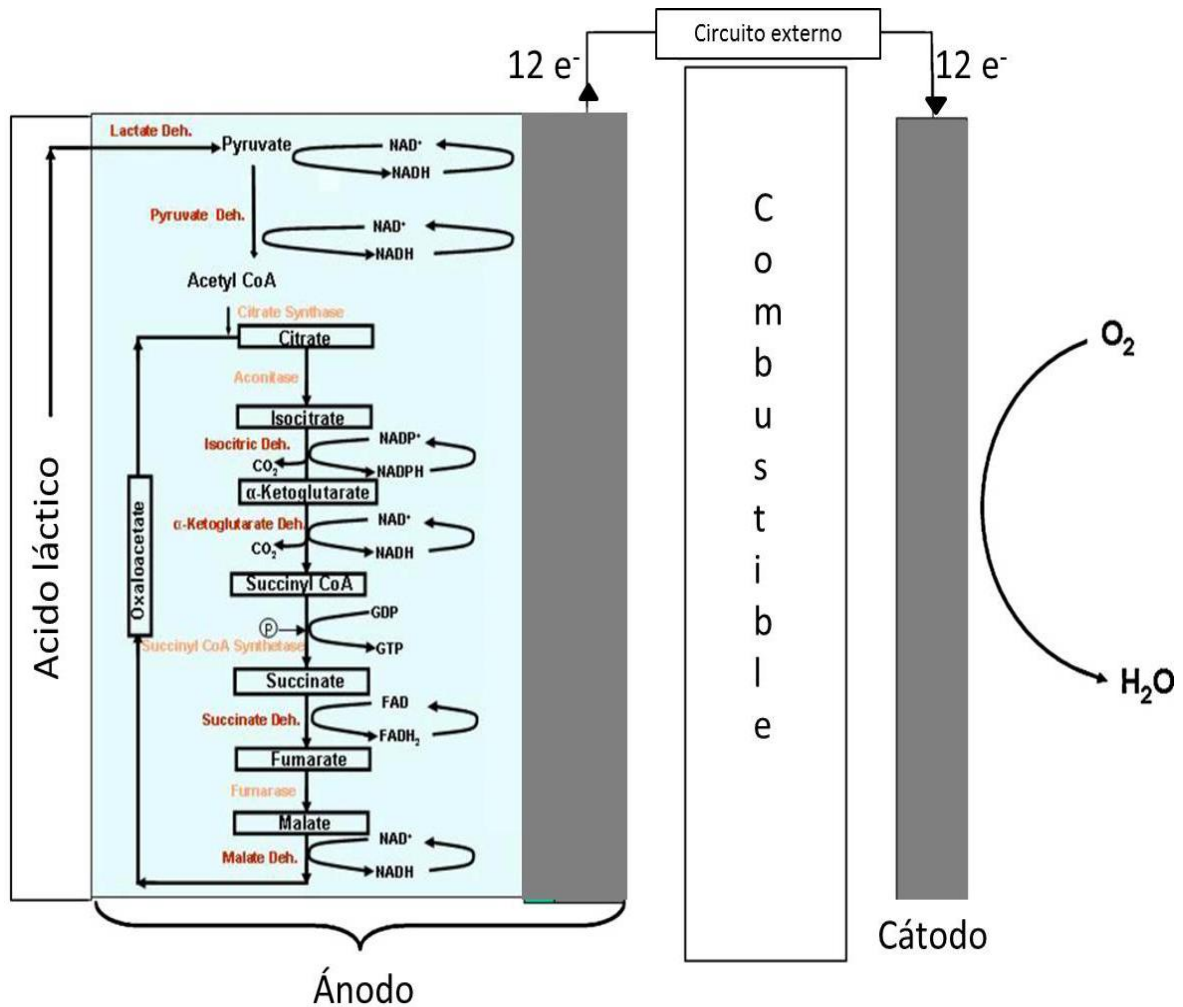
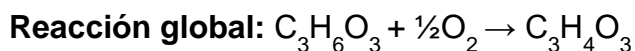
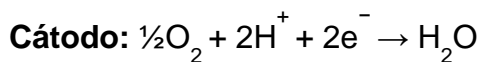
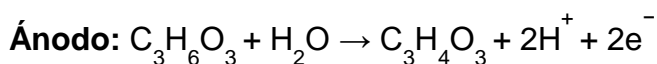


Figura 11. Oxidación completa de AL y subproductos [41].

En la práctica, con el uso de electrodos enzimáticos, es complejo llevar a cabo la oxidación completa de cada molécula de AL y transferir esos 12 electrones. Se ha identificado al ácido pirúvico o piruvato ( $C_3H_4O_3$ ), como el único producto de reacción de oxidación del AL en una solución amortiguadora de fosfatos a pH ácido [33]. La oxidación de lactato a piruvato produce dos electrones. En este hay

protones presentes en el electrolito, las reacciones de los electrodos de la celda de combustible de AL, donde el ácido pirúvico es el producto final se dan como:



### 1.6.3 Principios de operación de una biocelda de combustible para oxidación de AL

Pocos estudios informan el uso de una celda de combustible de ácido láctico, en su gran mayoría se reportan sensores de este compuesto [33, 43-45]. Generalmente, en estos reportes se indica el uso de la enzima lactato deshidrogenasa. Sin embargo, esta enzima requiere nicotinamida adenina dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ), molécula que representa varios retos, ya que este cofactor debe ser regenerado e inmovilizado sobre el electrodo sin lixiviación asegurando al mismo tiempo el acceso al sitio activo de la enzima [46-47].

Se reportan algunos trabajos en los que se muestran los datos de evaluación como celdas específicamente, la configuración de una celda de combustible híbrida para oxidación de ácido láctico que utiliza un cátodo abiótico y un ánodo enzimático [45]. Esta celda de combustible con membrana se compone de un electrodo de Pt como cátodo inorgánico y lactato oxidasa como ánodo. En este trabajo se explotó la capacidad de las celdas de combustible tipo parche para operación bajo condiciones corporales humanas en cada lado (anódico y catódico); pues se alimenta del ácido láctico presente en el sudor humano. Funcionando a un pH ácido y diferentes concentraciones de ácido láctico según el estado del cuerpo para producir este compuesto. Los autores señalan que las densidades de potencia son bajas debido a que fueron probadas en el cuerpo humano y las concentraciones de AL en el sudor son variadas además del movimiento. Por otra parte, fue realizado un estudio en el que se utilizó lactato deshidrogenasa y platino, como bioánodo y cátodo, respectivamente. En este estudio se empleó como ánodo lactato deshidrogenasa presente en una mezcla

de enzimas y cofactores capaces de llevar a una completa oxidación el ácido láctico, es decir, de todos los subproductos según el ciclo de Krebs. Los autores señalan una mejor potencia debido a la completa oxidación de AL y sus derivados y a la donación de los  $12e^-$  que es capaz de producir la reacción [41].

Es complejo ofrecer conclusiones sobre las comparaciones entre celdas de combustibles híbridas y/o enzimáticas con AL. Ya que los estudios son recientes y las investigaciones siguen en curso. Sin embargo, comparando con celdas de combustible que utilizan otros combustibles orgánicos se ha notado que con el uso de electrodos enzimáticos, la reacción es más rápida. Sin embargo, la durabilidad de éstos es baja en comparación con los electrodos metálicos, aunque éstos últimos necesitan de combustibles muy puros para no ser envenenados, es decir, manejar compuestos complejos con electrocatalizadores metálicos es ineficiente debido a la segura contaminación de electrodo debido a los subproductos que los compuestos orgánicos pueden generar al momento de la reacción de óxido reducción.

#### **1.6.4 Desempeño de bioceldas de combustible enzimáticas de ácido láctico**

La tabla 1 muestra las características de dos celdas de combustible que trabajan con ácido láctico. Los resultados obtenidos en éstas han sido muy bajos comparándolos con los resultados obtenidos en este trabajo. Cabe destacar que este tipo de investigación aún es escasa y es de los primeros trabajos reportados, donde se trabaja con una biocelda de combustible completamente enzimática para la oxidación de ácido láctico, ya que se necesita de diferentes alcances científicos y tecnológicos para lograr la incorporación de electrodos enzimáticos dentro de un dispositivo capaz de generar energía eléctrica (celda de combustible) mediante la reacción de catálisis, que es producida por las enzimas, gracias a su alta selectividad para el sustrato sin importar en que compuesto se encuentre.



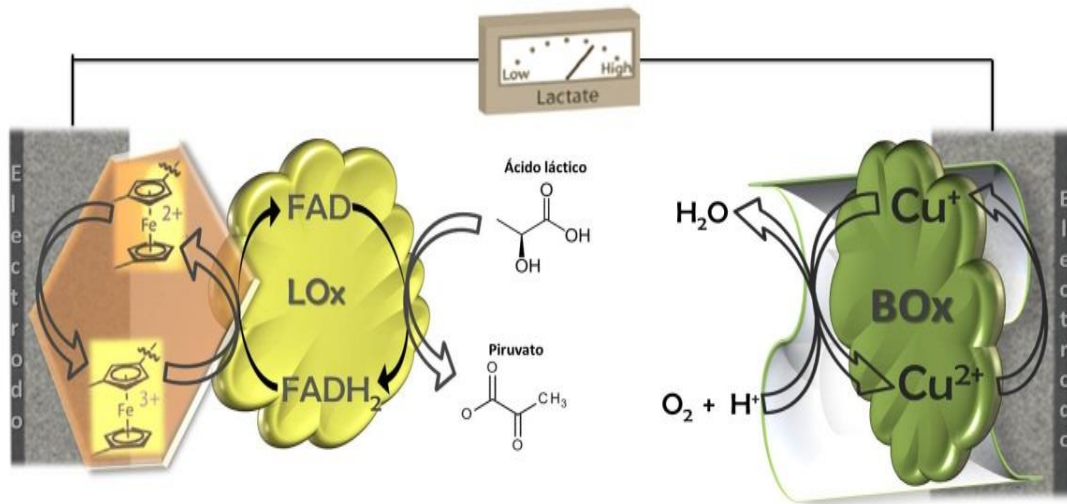
**Tabla 1.** Datos de potencial, corriente y potencia obtenidos en bioceldas de combustible enzimáticas con ácido láctico (AL).

Celdas de combustible enzimáticas con AL						
Combustible	Ánodo	Cátodo	Potencial (V)	$J_{max}$ ( $\mu A\ cm^{-2}$ )	$W_{max}$ ( $\mu W\ cm^{-2}$ )	Referencia
Ácido láctico en sudor humano	CNT/TTF/LOx/Chit	Pt/C	0.5	0.2	44	[45]
Ácido láctico en lágrimas humanas simuladas	LDH/C8-LPI/EGDGE	(An-CNTs)/BOD/TBAB-Nafion	$0.43 \pm 0.06$	$61.3 \pm 2.9$	$8.01 \pm 1.4$	[41]

### 1.7 Uso de bioceldas de combustible enzimáticas para la oxidación de ácido láctico

Las celdas de combustible para oxidación de ácido láctico con ánodos enzimáticos han cobrado auge últimamente y podrían convertirse en una importante alternativa para la producción de energía con el fin de suministrarla a dispositivos biomédicos o sensores activos, principalmente no-implantables [1,2]. Sin embargo, las celdas de combustible para oxidación de ácido láctico reportadas (Tabla 1), todavía producen bajas densidades de corriente y potencia además de poca estabilidad con un corto tiempo de vida debido principalmente a la inmovilización ineficiente, así como el uso de materiales en el cátodo con metales nobles, con costo elevado y baja bio-compatibilidad [3-5]. Las bioceldas de combustible enzimáticas son una alternativa recientemente estudiada que se conforma a partir de catalizadores enzimático, ambos electrodos deben funcionar correctamente en las condiciones de acidez que se requieran (pH 6.5 en este trabajo) [6]. En este contexto, la enzima lactato oxidasa (LOx) podría ser utilizada para fabricar el bioánodo debido a su alta selectividad y fácil manejo para llevar a cabo las inmovilizaciones sin necesidad de cofactores para la oxidación de ácido

láctico, bajo condiciones de acidez cercanas a las fisiológicas reportadas [2]. Lo antes mencionado nos motiva a estudiar en este trabajo la respuesta electroquímica de electrodos enzimáticos para la oxidación de ácido láctico y de la reducción de oxígeno con bilirrubina oxidasa y evaluar su desempeño como una biocelda enzimática en un sistema microfluídico, no reportada a la fecha (Figura 12).



**Figura 12.** Representación esquemática de bioánodo de LOx y biocátodo de BOx y sus reacciones electroquímicas.

## JUSTIFICACIÓN

---

Entre las fuentes de energía con base electroquímica, las baterías son actualmente las mejor establecidas en el mercado, lo que permite el funcionamiento de los sistemas portátiles que las incluye, con especial énfasis en aquellos de uso médico como son: analizadores de lactato, glucómetros, medidores de ácido úrico, pulsímetros, etc. Sin embargo, tales dispositivos se enfrentan a dificultades para mantenerse al día respecto a la búsqueda de su miniaturización, demanda de potencia y cuidado ambiental. En una aplicación portátil de mano, el tamaño de la fuente de alimentación de energía (batería) está generalmente ocupado por 30-50% del tamaño total del sistema, convirtiéndose en el mayor problema para sistemas implantables o de monitoreo médico no implantables.

En este sentido, las bioceldas de combustible enzimáticas prometen proporcionar un mejor tiempo de operación que las baterías, debido a la alta densidad de energía asociado a los combustibles empleados, sin depender de su tamaño en pequeñas escalas. Específicamente para el uso de estas celdas de combustible en dispositivos médicos no implantables, el uso del combustible cambia totalmente en cuanto a aplicaciones médicas portátiles se refiere, ya que la molécula orgánica a oxidar para generar energía, se encuentra en las mismas fuentes de combustible fisiológicas reales a sensor.

Por lo tanto, la investigación en este trabajo se centra en el desarrollo de bioceldas de combustible enzimáticas que generen energía mediante la oxidación de ácido láctico como combustible. A futuro es posible obtener un sensor alimentado con sudor humano para la producción de energía eléctrica, con esto, sería posible de una misma muestra se obtengan mediciones del metabolito de interés y señales electroquímicas estudiadas a diferentes concentraciones, para futuras aplicaciones médicas.

## **HIPÓTESIS**

---

Las superficies modificadas con enzimas lactato oxidasa y bilirrubina oxidasa, serán útiles como electrodos en una biocelda de combustible para la generación de energía eléctrica.

## **OBJETIVOS**

---

---

### **OBJETIVO GENERAL**

Elaborar electrodos enzimáticos de lactato oxidasa y bilirrubina oxidasa y evaluar mediante métodos electroquímicos su desempeño energético para el empleo de éstos en una celda de combustible

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Elaborar electrodos enzimáticos de lactato oxidasa.
- Elaborar electrodos enzimáticos de bilirrubina oxidasa.
- Evaluar el electrodo enzimático de lactato oxidasa mediante métodos electroquímicos.
- Evaluar el electrodo enzimático de bilirrubina oxidasa mediante métodos electroquímicos.
- Incorporar los electrodos enzimáticos de lactato oxidasa y bilirrubina oxidasa en una celda de combustible.
- Evaluar mediante métodos electroquímicos la biocelda de combustible enzimática.



# Capítulo II

**PARTE  
EXPERIMENTAL**

## **2. CONSTRUCCIÓN DE LA BIOCELDA DE COMBUSTIBLE ENZIMÁTICA**

En éste capítulo, se presenta la parte experimental de éste trabajo. Comenzando por la fabricación de cada compuesto para las tintas catalíticas, es decir las inmovilizaciones enzimáticas para ánodo y cátodo continuando con la elaboración de los bioelectrodos siguiendo con la evaluación electroquímica en media celda para cada bioelectrodo, así como la incorporación de estos en celdas de combustible y finalizando con la evaluación electroquímica de la biocelda de combustible.

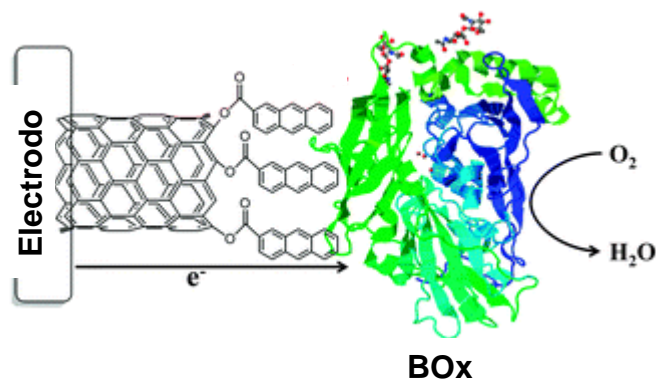
### **2.1 Electroodos para la biocelda de combustible**

Los electroodos tuvieron las mismas dimensiones que el canal de silicona de la celda de combustible de forma que estos embonaron correctamente, evitando posibles fugas; de este modo, las áreas activas (superficies catalíticas) fueron de  $0.1 \text{ cm}^2$ , pues fue la medida del canal por donde pasaron los flujos y por lo tanto fue esta el área que permitió que los electroodos hagan contacto con los flujos.

#### **2.1.1 Preparación de tinta catalítica y construcción del biocátodo**

El biocátodo enzimático de bilirrubina oxidasa se preparó empleando papel de carbón Toray<sup>®</sup> micro-poroso de  $20 \mu\text{m}$  de espesor (Technoquip Co Inc TGPH-120) como soporte, cubriendo el soporte (papel Toray<sup>®</sup>) de manera homogénea con la inmovilización enzimática preparada, de tipo tinta pastosa, mediante un pincel extra suave. La tinta catalítica para estos biocátodos consistió en una solución de nanotubos de carbono de pared múltiple de modificado con antraceno (An-MWCNTs). Los cuales sirvieron para mejorar la conductividad en el electrodo (con 83,7% de rendimiento). La Figura 13 muestra como los An-MWCNTs facilitan la transferencia directa.





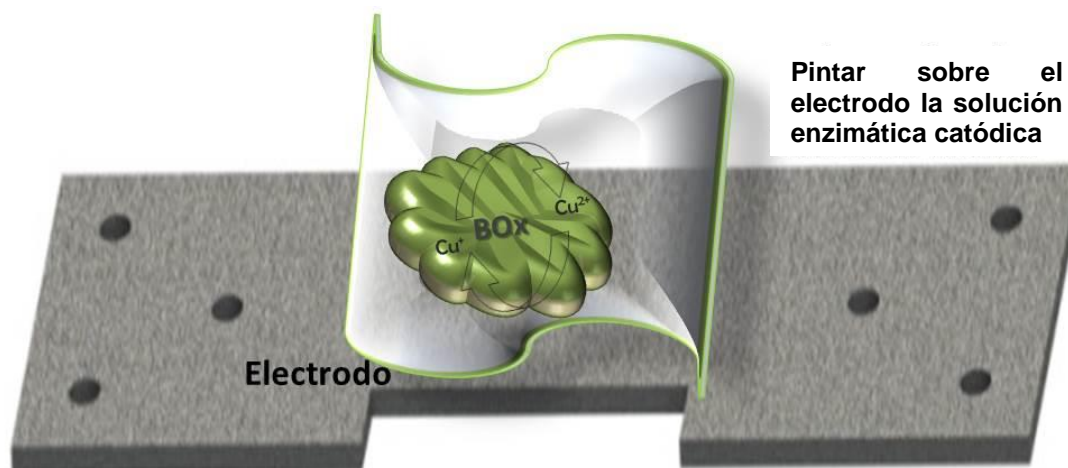
**Figura 13.** Transferencia electrónica directa a través de An-MWCNTs.

Dicha tinta se obtuvo utilizando ácido 2-antracencarboxílico (marca TCI >98%) disuelto en benceno (HPLC,  $\geq 99.9\%$  de Sigma-Aldrich), adicionado con cloruro de oxalilo (98% de ACROS ORGANICS). La mezcla se agitó y se calentó a reflujo. El benceno y exceso de oxalilo se eliminaron a presión reducida, y el producto (antraceno-2-carbonilo) se enjuagó con benceno para eliminar cualquier residuo de cloruro de oxalilo, se secó y se utilizó sin ninguna purificación adicional. Para modificar los MWCNTs (95% de cheap tubes), se añadieron los MWCNTs hidroxilados con acetonitrilo y se sonicó durante 15 min. Posteriormente se añadió cloruro de antraceno-2-carbonilo y la mezcla se agitó vigorosamente y se calentó a reflujo durante una noche. Después se enfrió la mezcla, los nanotubos se filtraron de la solución y se lavaron con cantidades generosas de acetonitrilo (de Fisher Scientific), benceno y diclorometano para eliminar restos de antracenos sin reaccionar [10].

También una solución de Nafion<sup>®</sup> fue preparada mediante membranas Nafion<sup>®</sup> modificadas que se forman en un proceso de dos pasos. El primer paso fue hacer una suspensión de Nafion<sup>®</sup> con sal de bromuro de tetrabutilamonio (Fluka) disuelto en suspensión. Se dejó secar, después se añadió agua y se dejó en remojo. El agua se retiró y las películas se enjuagaron a fondo con más agua para extraer la sal HBr, las películas se volvieron a suspender en etanol [11].

Para la preparación del electrodo se disolvió bilirrubina oxidasa (BOx) (de Amano Enzyme Inc.), una disolución amortiguadora de fosfatos 50 mM a pH 6.5, y tetrabutiamonio bromuro (TBAB –Nafion). Para preparar biocátodos con una

superficie geométrica de  $1 \text{ cm}^2$ , se disolvió  $1 \text{ mg}$  de BOx en disolución amortiguadora de fosfatos. A esta solución, se añadieron An-CNT, la mezcla se agitó en vórtex, se sonicó, se añadió el TBAB-Nafión y la solución se agitó nuevamente. Finalmente la solución se depositó sobre cada cátodo y se dejó secar (Figura 14) [12].

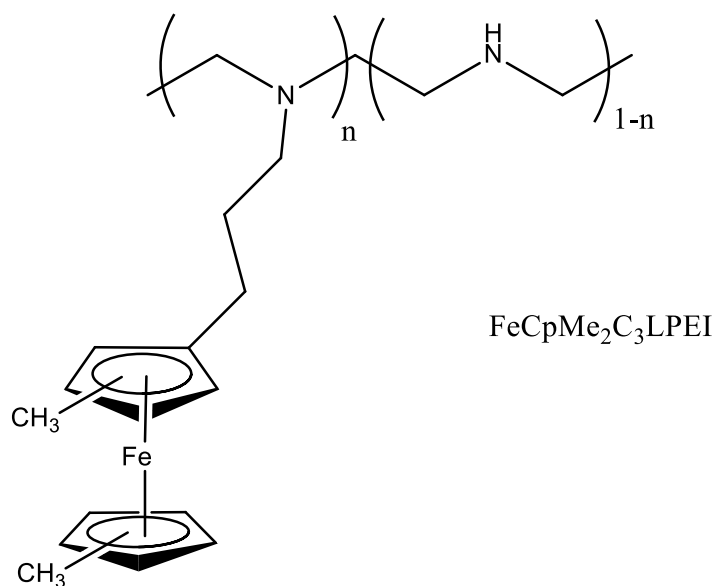


**Figura 14.** Depósito de BOx en electrodo catódico para biocelda de combustible empleado en la oxidación de AL.

### 2.1.2 Preparación de tinta catalítica y construcción del bioánodo

Las muestra de ensayo se preparó utilizando electrodos de papel carbón Toray<sup>®</sup> (ElectroChem, Inc.) con una área de depósito  $0.25 \text{ cm}^2$  para caracterizar los electrodos mediante voltamperometría (pruebas en media celda) y del mismo material, en celda completa con un área de depósito de  $1 \text{ cm}^2$ .

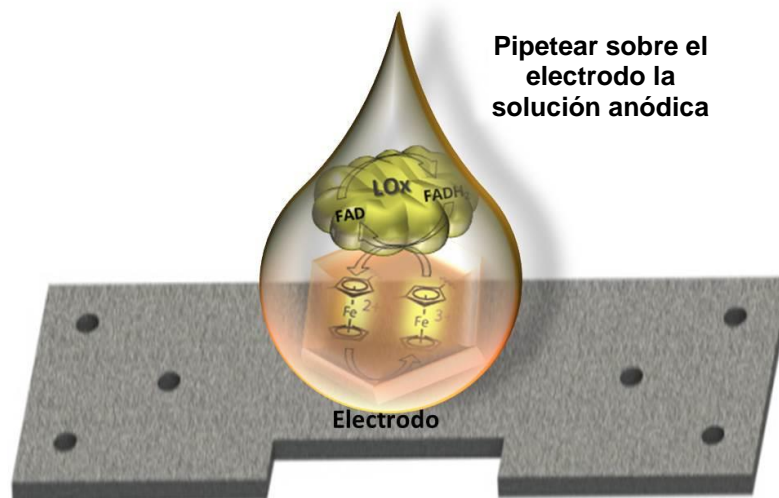
Un polímero redox se preparó previamente, este se utilizó para mediar la transferencia de electrones entre la enzima LOx y el electrodo de papel Toray<sup>®</sup>. El polímero redox que se utilizó en la inmovilización anódica es una poli (etilenimina) lineal modificada con dimetil ferroceno (FcMe<sub>2</sub>-LPEI). El cual funge como mediador en esta inmovilización de lactato oxidasa, atribuyendo la conductividad al par ferroceno ferrocino. La Figura 15 muestra la estructura química del polímero.



**Figura 15.** Estructura química de la poli (etilenimina) lineal modificada con dimetil ferroceno.

Para prepararla se utilizó una poli (etilenimina) lineal (LPEI, 11 mg), disuelta en 3 ml de una solución de acetonitrilo y metanol (10:1) en un matraz pequeño. La mezcla se calentó a reflujo para disolver el LPEI, y se añadieron 14 mg de tetra-metil-ferroceno (3- bromopropil). La mezcla se calentó a reflujo durante la noche, y el disolvente se eliminó a presión reducida. El Dietiléter se añadió al producto con el fin de eliminar cualquier impureza de ferrocenilo, y el éter residual se eliminó a presión reducida obteniendo 23 mg de FcMe<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-LPEI (92% de rendimiento) [9].

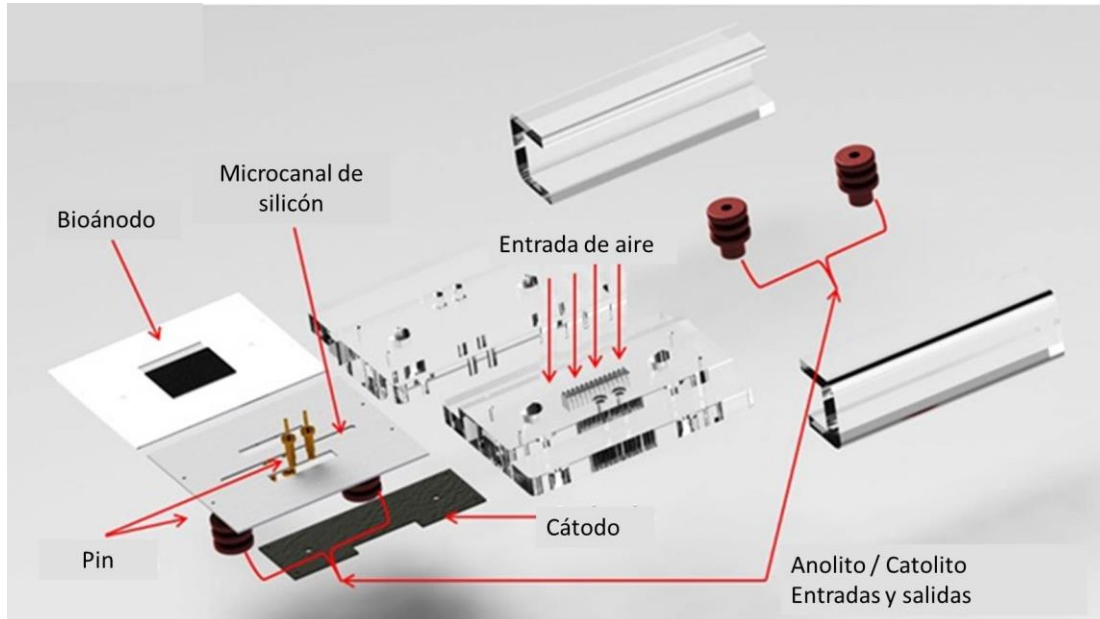
Para la preparación del electrodo, se mezcló una solución de 10 mg ml<sup>-1</sup> FcMe<sub>2</sub>-LPEI en agua desionizada (DI), 200 U ml<sup>-1</sup> de la enzima LOx en solución amortiguadora de fosfatos 100 mM de pH 6.5 y 2-6% v/v de etilenglicol diglicidil éter EGDGE (C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>), en agua DI. Estas tres soluciones se combinaron en una relación volumétrica de 56 / 24 / 3 de FcMe<sub>2</sub>-LPEI / LOx / EGDGE y se mezclaron a fondo. Para cada electrodo de papel carbón Toray se pipeteó 25 µL y 100 µL dependiendo del tamaño del electrodo, para media celda con un volumen de 0.25 cm<sup>2</sup> y para celda completa con un volumen de 1 cm<sup>2</sup>, respectivamente. Cada electrodo se dejó secar durante toda la noche. Una representación esquemática del bioanodo se muestra en la Figura 16.



**Figura 16.** Depósito de LOx sobre el electrodo anódico de la biocelda de combustible empleado para la oxidación de AL.

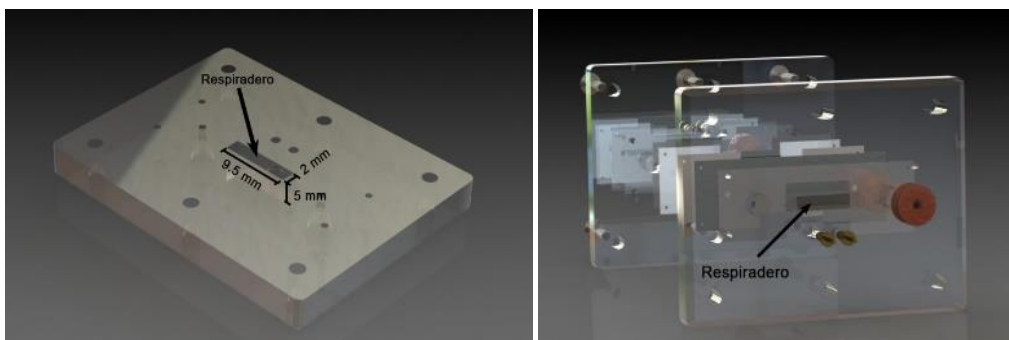
## 2.2 Soportes para ensamble de la celda de combustible

Para el dispositivo, se fabricaron dos soportes de poli (metil metacrilato) (PMMA) de una lámina de acrílico de Plaskolite<sup>®</sup> se utilizó un sistema de micro fresado de tipo Controlador Numérico por Computadora (CNC de Router Mod. 31). Para el caso del micromaquinado del acrílico soporte, fue necesario conocer las medidas de la celda. Para reducir el tamaño de la misma se utilizaron tornillos del más bajo calibre. Se abrió una ventana en la tapa de PMMA situada en el lado correspondiente al cátodo con medidas de 9.5 mm x 2 mm como una toma para flujo de aire. Un esquema del armado final de la celda de combustible empleada en este trabajo es mostrado en la Figura 17. El circuito eléctrico externo consistió en el uso de pogo pin's cubiertos de oro, los cuales se emplearon para mejorar la conductividad eléctrica, ubicados sobre los mismos soportes de PMMA, haciendo contacto con los electrodos de manera contraria al lado donde se ubican.



**Figura 17.** Esquema de la celda de combustible.

El diseño de celda de combustible, que por medio de un orificio en el soporte de acrílico del lado del cátodo, adquirió el aire del ambiente (suministro de aire catódico) lo cual favoreció las reacciones dentro de la celda. En la Figura 18 se muestran las medidas del orificio de los soportes de acrílico.



**Figura 18.** Esquema de los soportes la celda de combustible.

Esta celda de combustible con suministro de aire catódico, es ensamblada partiendo como parte central de una película de polímero de silicona definida mediante un plotter de corte (Graphtec America Inc.) de 3 micras de espesor (3,0 cm de largo, 1,0 cm de ancho). Con un microcanal, por el cual circulan los flujos, cortado en medio con medidas de 0.1 cm x 2 cm. El microcanal se situó entre los

electrodos (ánodo y cátodo), en donde son depositados los materiales catalíticos. Del mismo material del canal son elaborados dos empaques para asegurar el sellado de los soportes de PMMA.

## 2.3 Evaluación en media celda de bioelectrodos

### 2.3.1 Bioánodo de lactato oxidasa

El bioelectrodo anódico se evaluó en media celda con la ayuda de un potenciostato marca CHI600 series, (de CH instruments), se usó como electrodo de referencia un electrodo de calomel (SCE por sus siglas en ingles estándar calomel electrode) y como contraelectrodo un electrodo de malla de platino, como electrolito soporte se empleó una solución de fosfatos, que se preparó a partir de  $K_2HPO_4$  y  $KH_2PO_4$  (JT Baker®) con una concentración de 50 mM y pH 6.5. Posteriormente se añadió ácido láctico (JT Baker®) calculado a una concentración de 20 mM. Estas condiciones se eligieron a pH 6.5 por ser el óptimo para la enzima LOx según estudios realizados [2]. La velocidad de barrido que se programó fue de  $0.5 \text{ mV s}^{-1}$ .

**Tabla 2.** Condiciones de evaluación en media celda para bioánodo.

Electrodo de trabajo	Contraelectrodo	Electrodo de referencia	Electrolito soporte	Velocidad de barrido
Toray® / FcMe <sub>2</sub> -LPEI / LOx / EGDGE	Malla de Pt	SCE	Solución de fosfatos + 20mM AL	$0.5 \text{ mV s}^{-1}$

### 2.3.2 Biocátodo de bilirrubina oxidasa

El bioelectrodo catódico se evaluó en media celda utilizando voltamperometría cíclica, con la ayuda de un potenciostato (marca CHI600 series de CH Instruments), se usó como electrodo de referencia un SCE y como contraelectrodo una malla de platino, se utilizó como electrolito soporte una

solución de fosfatos que se preparó con  $K_2HPO_4$  y  $KH_2PO_4$  (JT Baker<sup>®</sup>) a una concentración de 50 mM con un pH de 6.5, por ser éste el óptimo para la enzima BOx según lo reportado en la literatura [12]. Esta evaluación se realizó bajo flujos de aire, con el propósito de suministrar oxígeno al sistema, la velocidad de barrido que se empleó fue de  $1 \text{ mV s}^{-1}$ .

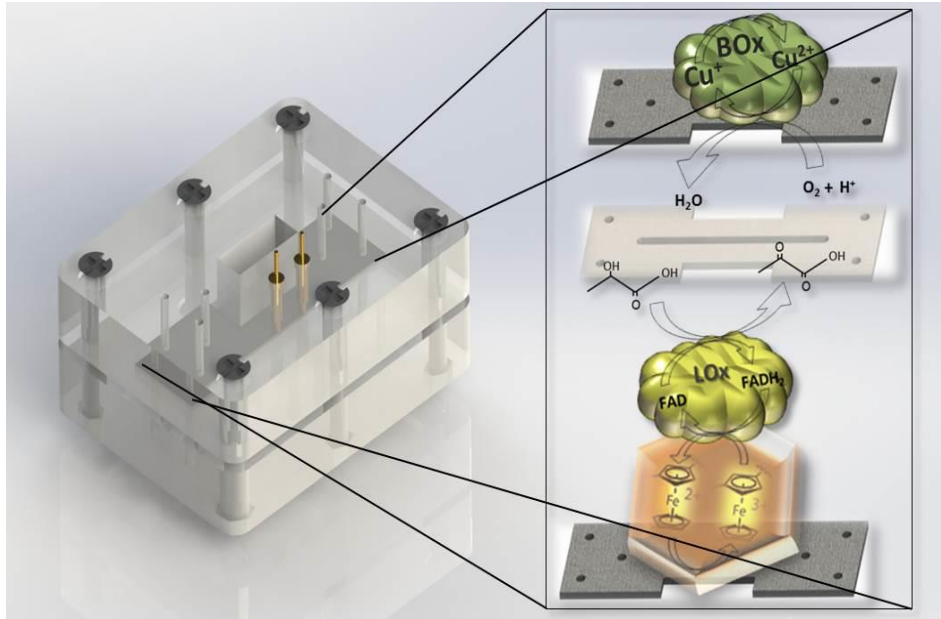
**Tabla 3.** Condiciones de evaluación en media celda para biocátodo.

<b>Electrodo de trabajo</b>	<b>Contraelectrodo</b>	<b>Electrodo de referencia</b>	<b>Electrolito soporte</b>	<b>Velocidad de barrido</b>
Toray <sup>®</sup> / BOx/Ac- MWCNTs/TBAB- Nafion	Malla de Pt	SCE	Solución de fosfatos	$1 \text{ mV s}^{-1}$

## 2.4 Evaluación en celda completa de los bioelectrodos

La celda de combustible fue evaluada utilizando los electrodos enzimáticos de lactato oxidasa y bilirrubina oxidasa como ánodo y cátodo respectivamente con dos flujos y con un solo flujo, esto con el fin de comparar el desempeño.

La biocelda enzimática para dos flujos y para uno fue evaluada en las mismas condiciones. La Figura 19 muestra un esquema representativo de lo que ocurre dentro de la celda de combustible con los electrodos de lactato oxidasa y bilirrubina oxidasa evaluados en esta biocelda de combustible. Las velocidades de flujo utilizadas fueron de  $0.8 \text{ ml h}^{-1}$  para catolito (oxidante) y de  $1 \text{ ml h}^{-1}$  para anolito (combustible) controlados electrónicamente por una bomba de jeringa (NE-4000, New Era Pump Systems Inc.). El catolito consiste en un buffer de fosfatos con una concentración de 100 mM a pH 6.5 a temperatura ambiente y el anolito fue una disolución de ácido láctico a concentración de 20 mM en buffer de fosfatos a pH 6.5.



**Figura 19.** Evaluación de electrodos enzimáticos en celda completa.

El potencial y la corriente se midieron usando un potenciostato/galvanostato de la marca CHI600 series (CH Instruments). Las densidades de corriente y densidades de potencia reportadas fueron calculadas de acuerdo con el área geoméricamente plana de los electrodos expuesta a los flujos, la cual se limita por el canal mencionado, siendo ésta de  $0.1 \text{ cm}^2$ .

La Tabla 4, muestra las condiciones en las que se evaluó la celda completa actuando como biocelda de combustible enzimática para la oxidación de ácido láctico.



**Tabla 4.** Condiciones de evaluación para la biocelda de combustible enzimática.

<b>Tipo de celda</b>	<b>Flujos</b>	<b>Anolito</b>	<b>Catolito</b>	<b>Cátodo</b>	<b>Ánodo</b>
Enzimática	1 flujo	Solución de ácido láctico 20 mM + buffer de fosfatos		Box	LOx
	2 flujos	Solución de ácido láctico 20 mM + solución de fosfatos	Solución de fosfatos 100 mM pH 6.5		



# Capítulo III

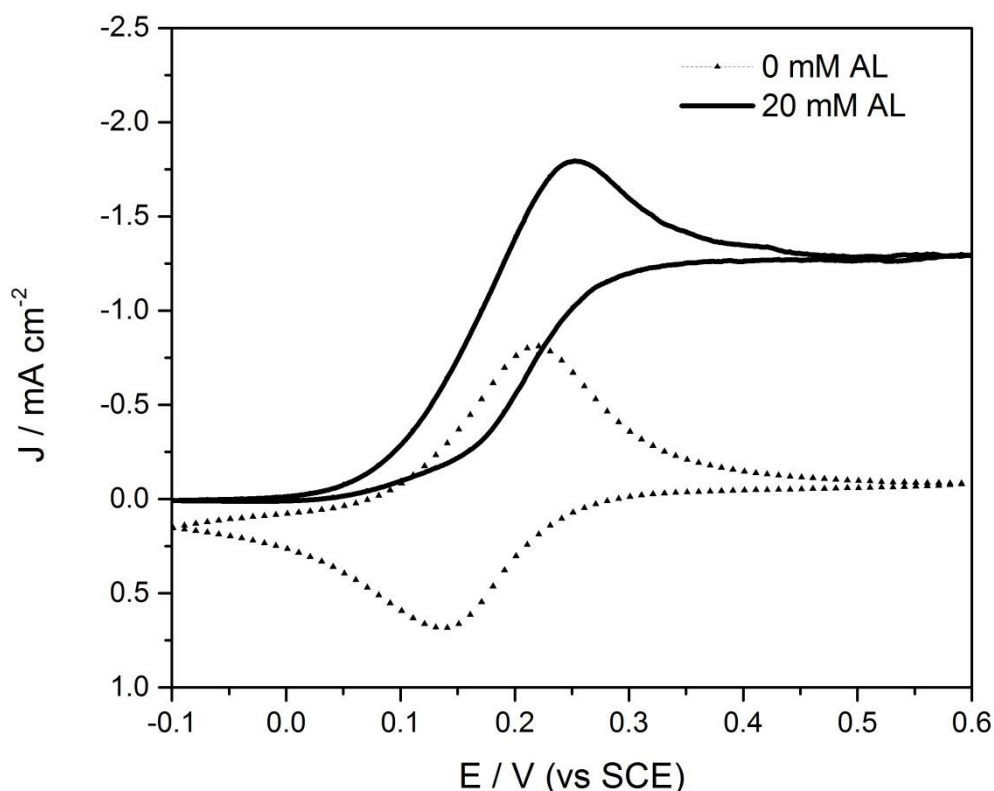
## RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 3. BIOCELDA DE COMBUSTIBLE ENZIMÁTICA

#### 3.1 Evaluación en media celda del bioánodo

##### 3.1.1 Voltametría cíclica del bioánodo de lactato oxidasa

El bioánodo FcMe<sub>2</sub>-LPEI / LOx / EGDGE se evaluó electroquímicamente mediante voltametría cíclica. En la Figura 20 se comparan los dos voltamogramas cíclicos en ausencia (línea punteada) y presencia (línea sólida) de ácido láctico (concentración del sustrato 20 mM). En la voltametría cíclica en ausencia de AL se observa un pico de oxidación con una densidad de corriente (J) de -0.76 mA cm<sup>-2</sup> y un potencial de pico 0.21 V vs SCE. Adicionalmente se observa un pico de reducción con densidad de corriente de 0.75 mA cm<sup>-2</sup> y potencial de pico de 0.14 V vs SCE. Estos resultados pueden ser atribuidos a la reacción reversible del ferroceno  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Cp-Me}_2)_2\text{-R} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}(\text{Cp-Me}_2)_2\text{-R} + 1\text{e}$ , con un potencial de media onda de  $E_{1/2} = 0.175 \text{ V vs SCE}$ , confirmando así la presencia del mediador en unido al electrodo por una cadena alifática flexible.

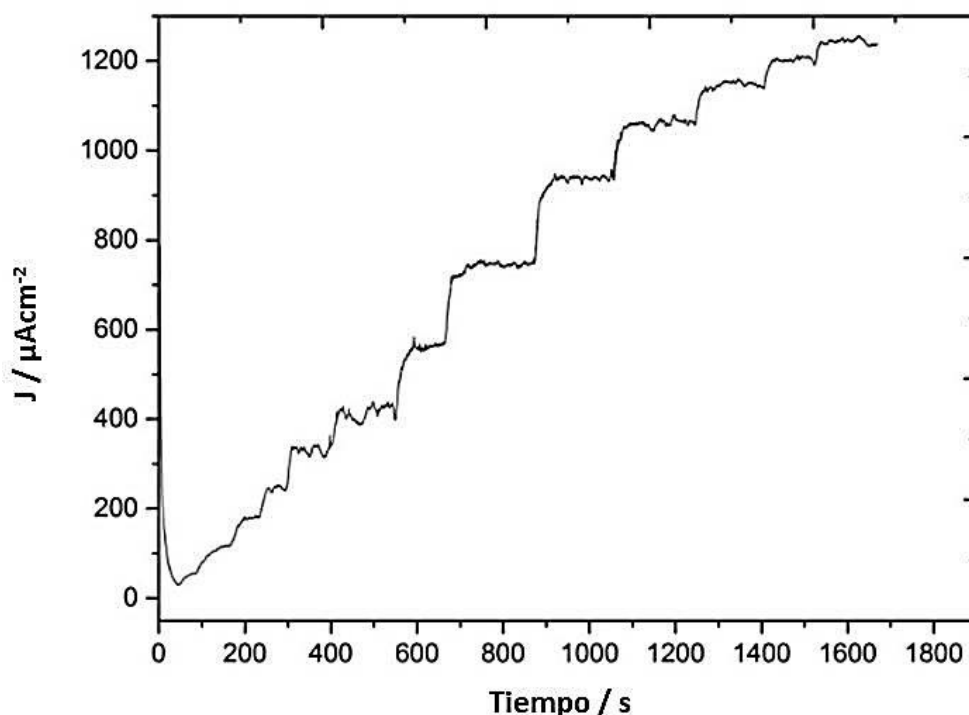


**Figura 20.** Voltametría cíclica de una película de FcMe<sub>2</sub>-LPEI / LOx / EGDGE depositada sobre el electrodo de papel Toray®. El experimento fue desarrollado utilizando una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM a pH 6.5 y velocidad de barrido de 0.5 mVs<sup>-1</sup>.

En esta misma gráfica, se observó que en el voltamograma con concentración de ácido láctico 20 mM (línea sólida), la densidad de corriente aumentó obteniendo un pico de oxidación a una densidad de corriente de  $-1.7 \text{ mA cm}^{-2}$ , así como la ausencia del pico de reducción del ferricinio. Esto se debió a que la enzima (LOx) oxida al sustrato (AL), reduciendo su centro activo de FAD a FADH<sub>2</sub>. Este último a su vez reduce al ferricinio generado al electrodo, a ferroceno, un mecanismo catalítico ECi'. Este incremento en densidad de corriente es proporcional a la constante de transferencia electrónica enzima-mediador. Se evaluó a pH 6.5, por el interés en trabajar a pH ligeramente ácidos, además como se mencionó el pH 6.5 es el ideal para lactato oxidasa.

### 3.1.2 Evaluación de la sensibilidad del bioánodo de lactato oxidasa

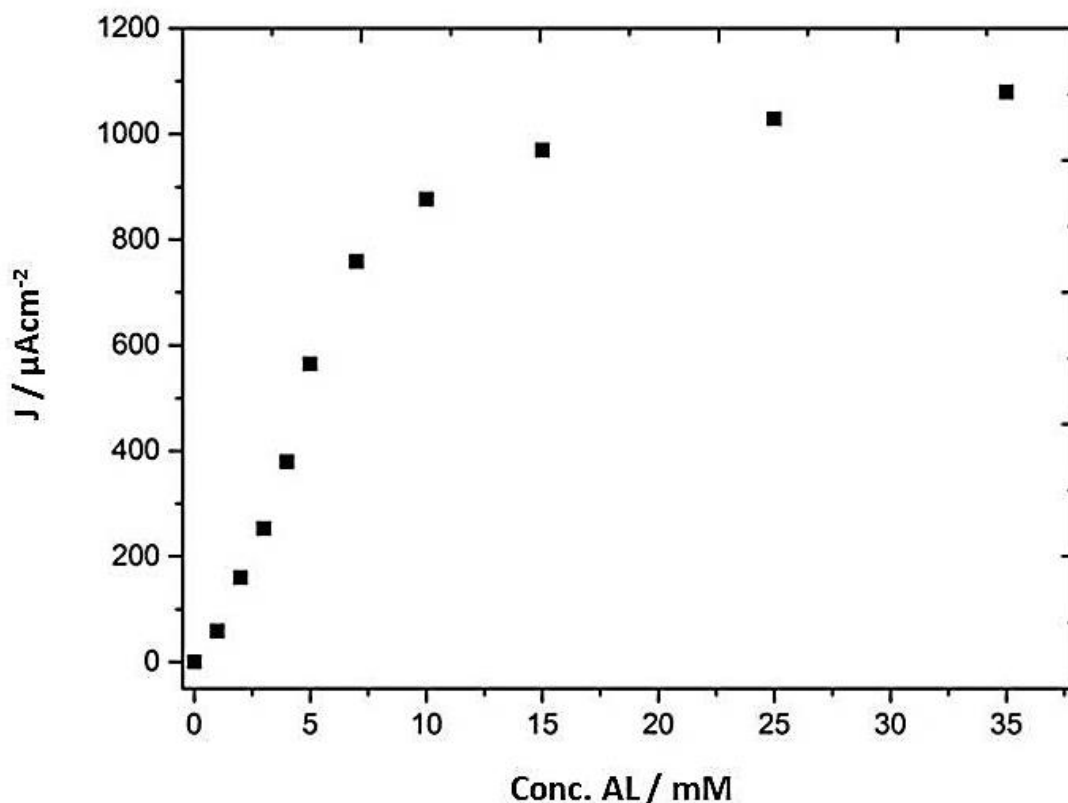
Se evaluó la sensibilidad del bioánodo (FcMe<sub>2</sub>-LPEI / LOx / EGDGE) para conocer las concentraciones de AL en las cuales la enzima (LOx) reacciona, Para esto se variaron las concentraciones de AL, se impuso un potencial de 0.35 V y se observó en la respuesta amperométrica de la Figura 21 como la densidad de corriente aumentó debido a la variación de las concentraciones.



**Figura 21.** Respuesta Crono amperométrica de una película de FcMe<sub>2</sub>-LPEI / LOx / EGDGE depositado sobre el electrodo de papel Toray® el experimento fue desarrollado utilizando una disolución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 6.5.

Como se observó en la Figura 21, se demostró que a concentraciones bajas la enzima reaccionó en la presencia de lactato y como se pudo notar a concentraciones más altas, poco a poco dejó de incrementarse la densidad de corriente. Este comportamiento resultó favorable porque no se necesitó el gasto de tanto combustible, ya que comenzó a estabilizarse a partir de una concentración de 20 mM. Además esta concentración coincidió con las concentraciones que contienen los metabolitos en el cuerpo humano. Se hizo la evaluación con concentraciones desde 1 mM hasta 35 mM, obteniendo a partir de los 15 mM densidades de corriente más constantes conforme aumentó la

concentración de ácido láctico. En la Figura 22 se muestra la curva de respuesta característica.



**Figura 22.** Curva de respuesta corriente vs concentración de películas de FcMe<sub>2</sub>-LPEI / LOx / EGDGE depositadas sobre el electrodo de papel Toray®. El experimento fue desarrollado utilizando una disolución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 6.5.

Con estos resultados se evidenció la presencia y la actividad eficiente que se llevó a cabo con la enzima lactato oxidasa, ya que fue capaz de reaccionar con el sustrato desde bajas concentraciones. Este comportamiento indicó que el arreglo puede ser útil en un detector y o sensor de ácido láctico, ya que lo que nos quiere decir ésta curva es que a las concentraciones que se señalan en la gráfica, nos dará esa densidad de corriente. Además que la inmovilización enzimática no perdió actividad debido a que, las señales que arrojó, fueron en aumentos y diferentes para cada concentración.

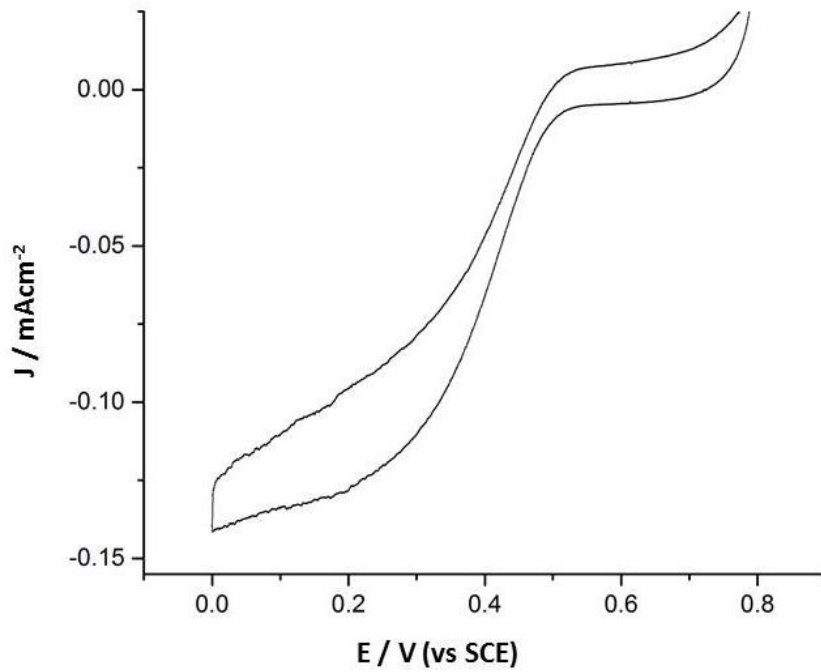
## 3.2 Evaluación en media celda del biocátodo

### 3.2.1 Voltametría cíclica para el biocátodo de la bilirrubina oxidasa

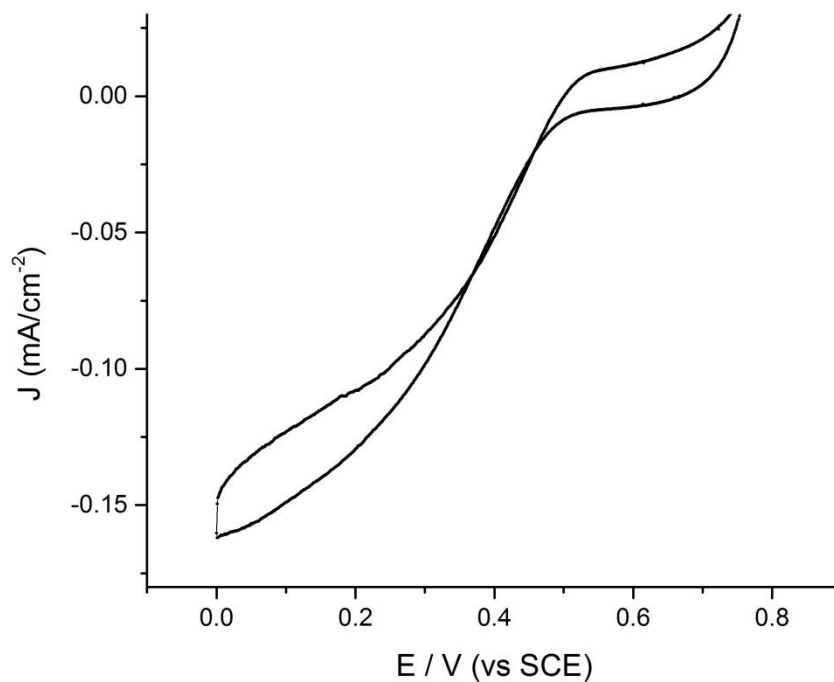
El biocátodo de BOx/Ac-MWCNTs/TBAB-Nafion se evaluó electroquímicamente. Con el fin de observar si llevó a cabo la reducción de oxígeno en el sistema. Se empleó la voltametría cíclica, técnica electroquímica que reflejó los parámetros deseados a diferentes pH. Donde mostró que el óptimo fue a pH 6.5. Este pH arrojó una densidad de corriente mayor en comparación de las demás voltametrías cíclicas realizadas a diferentes pH. El pH se incrementó de 1 en 1 a partir de un pH de 4.5 a 7.4. Las gráficas mostraron que la enzima (BOx) llevó a cabo la reducción de oxígeno. Esta enzima trabajó bien en los diferentes pH, sin embargo el mejor desempeño se mostró en la voltametría de la Figura 25 la cual corresponde al pH 6.5 (pH óptimo). En la cual se observó el aumento de la densidad de corriente, a diferencia de los otros pH evaluados, siendo de  $0.26 \text{ mA cm}^{-2}$ . Se observaron las voltametrías del pH 4.5 (Figura 23), 5.5 (Figura 24) y 7.4 (Figura 26) y se notó la disminución de la densidad de corriente con valores de  $1.35 \text{ mA cm}^{-2}$ ,  $1.52 \text{ mA cm}^{-2}$ ,  $1.82 \text{ mA cm}^{-2}$  respectivamente. El desempeño que mostro la enzima favoreció para las próximas evaluaciones en celda completa ya que ambas enzimas demostraron mejor funcionamiento en el mismo pH. La reacción en el biocátodo corresponde con su respectivo potencial de media onda se presenta a continuación:

- $\text{O}_2 + 4\text{e}^- + 4\text{H}^+ \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$
- $E_{1/2} \approx 0.4 \text{ V vs SCE}$
- $\text{pH}=7.5$

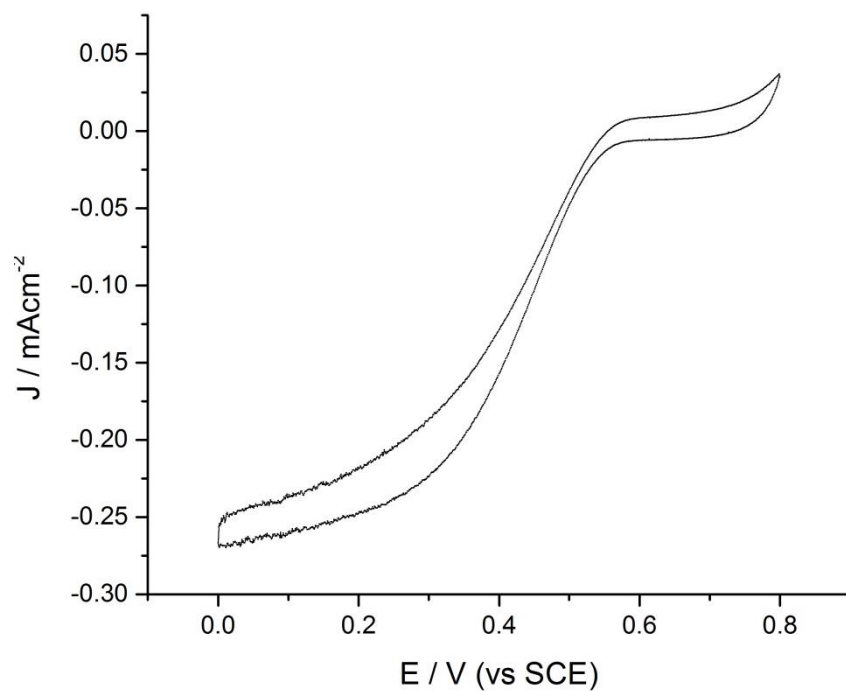




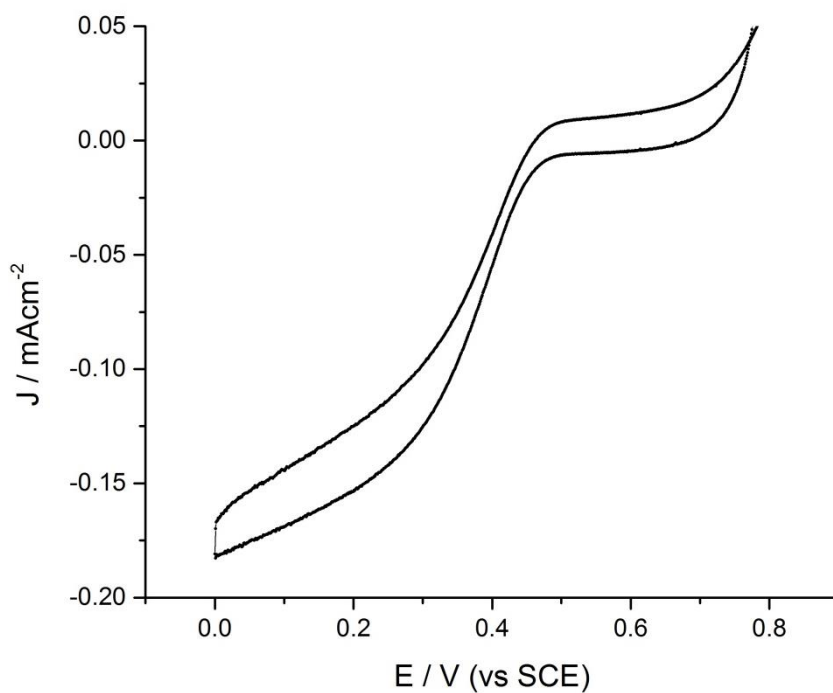
**Figura 23.** Voltamograma cíclico de BOx/Ac-MWCNTs/TBAB-Nafion<sup>®</sup> sobre papel carbón Toray<sup>®</sup> con velocidad de barrido de  $1 \text{ mV s}^{-1}$  (disolución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 4.5).



**Figura 24.** Voltamograma cíclico de BOx/Ac-MWCNTs/TBAB-Nafion<sup>®</sup> sobre papel carbón Toray<sup>®</sup> con velocidad de barrido de  $1 \text{ mV s}^{-1}$  (disolución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 5.5).



**Figura 25.** Voltamograma cíclico de BOx/Ac-MWCNTs/TBAB-Nafion<sup>®</sup> sobre papel carbón Toray<sup>®</sup> con velocidad de barrido de  $1 \text{ mV s}^{-1}$  (disolución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 6.5)



**Figura 26.** Voltamograma cíclico de BOx/Ac-MWCNTs/TBAB-Nafion<sup>®</sup> sobre papel carbón Toray<sup>®</sup> con velocidad de barrido de  $1 \text{ mV s}^{-1}$  (disolución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7.4).

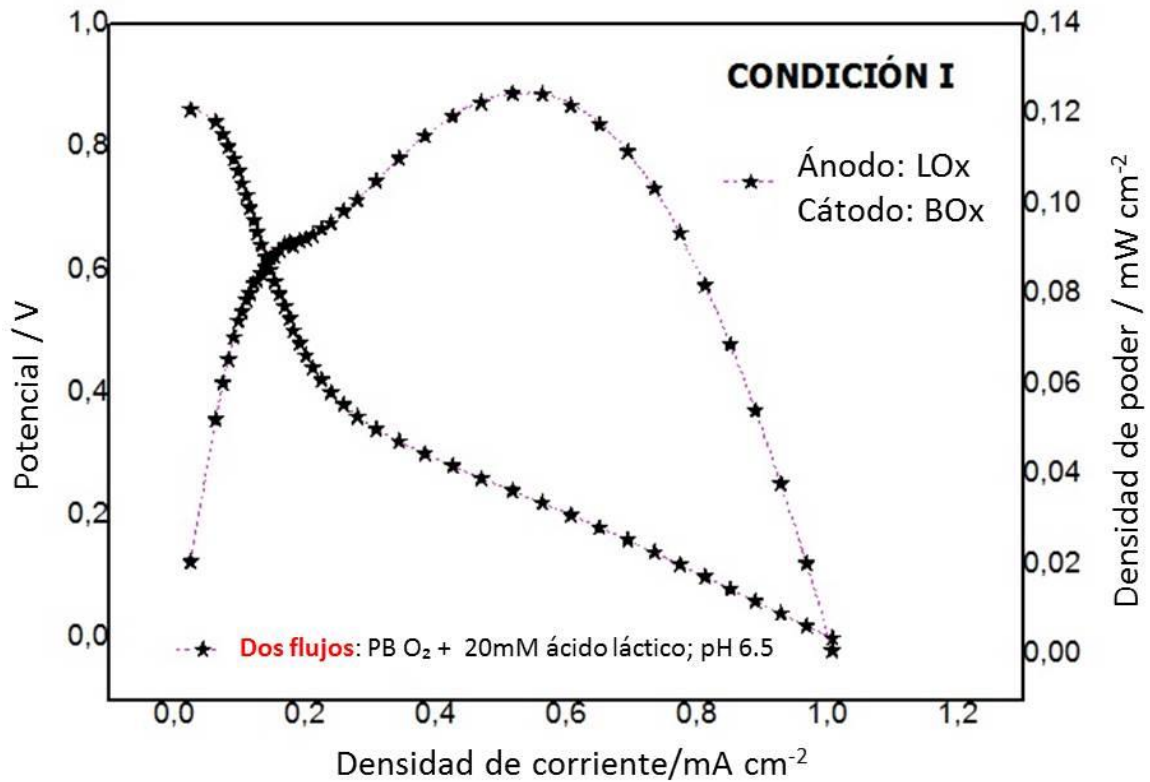
### 3.3 Evaluación de celda de combustible enzimática.

Se procedió a evaluar en celda completa, después de haber corroborado la eficiente actividad enzimática en media celda de ambas enzimas, tanto para el biocátodo como para el bioánodo. Para esto se usó la celda de combustible en donde se evaluó el bioánodo con la inmovilización de FcMe<sub>2</sub>-LPEI / LOx / EGDGE y el biocátodo con la inmovilización de BOx/Ac-MWCNTs/TBAB-Nafion con las condiciones que se muestran a continuación en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Condiciones experimentales para la celda de combustible enzimática.

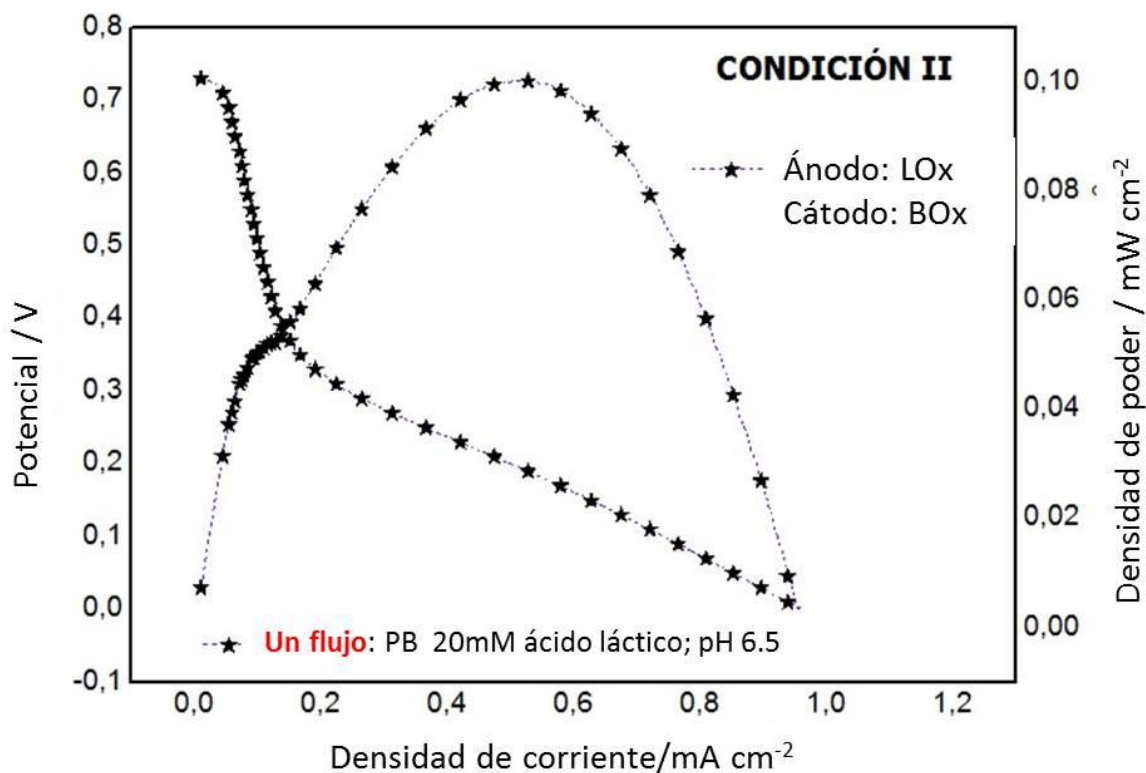
Condición	Ánodo	Cátodo	Anolito	Catolito	Velocidad de flujo ml h <sup>-1</sup>		OCP	J	W
					Anolito	Catolito	V	mA cm <sup>-2</sup>	mWcm <sup>-2</sup>
I	LOx	BOx	PB pH 6.5 + 20 mM de AL	PB pH 6.5	0.8	1	0.85	1.01	0.125
II	LOx	BOx	PB pH 6.5 + 20 mM de AL		0.8		0.73	0.96	0.10

La Figura 27 es una curva de descarga que nos mostró la evaluación electroquímica para la condición I de la celda de combustible enzimática, utilizando FcMe<sub>2</sub>-LPEI/LOx/EGDGE como ánodo y BOx/Ac-MWCNTs/TBAB-Nafion<sup>®</sup> como cátodo. En esta Figura se pudo observar que el potencial de circuito abierto fue de 0.9 V, lo cual es considerable para una celda de combustible enzimática. La corriente máxima que alcanzó nuestra celda fue de 1.0 mA cm<sup>-2</sup>, con una clara tendencia en la región de activación, mientras que la región de transporte de masa es casi nula obteniendo de igual forma, como consecuencia una prolongada región óhmica, lo cual puede atribuirse al armado del sistema. Por otra parte, se obtuvo una potencia máxima de aproximadamente 0.125 mW cm<sup>-2</sup>.



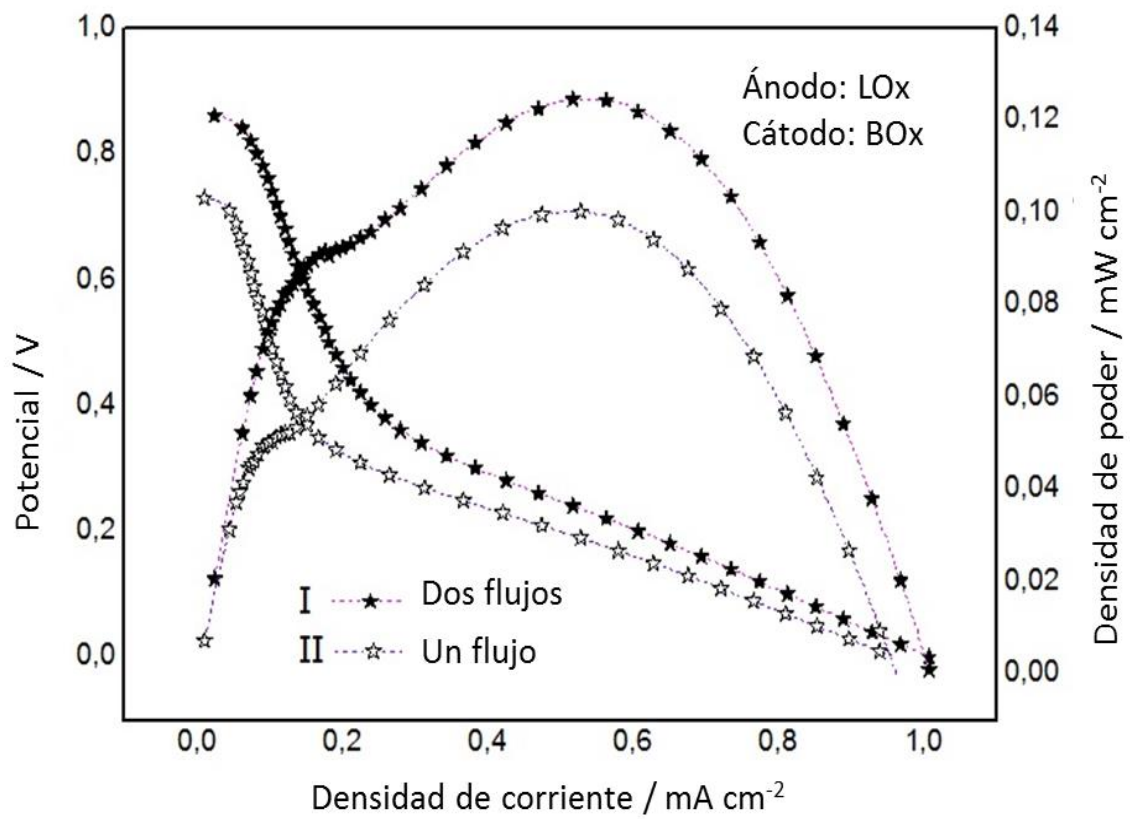
**Figura 27.** Evaluación de biocelda de combustible enzimática. Condición I (dos flujos).

De una forma similar para la condición II (1 flujo) se probó este sistema de biocelda de combustible enzimática. La Figura 28 nos mostró los resultados de la curva de descarga realizada, donde se observó un potencial de circuito abierto de 0.7 V con una densidad de corriente máxima de  $1 \text{ mA cm}^{-2}$  y una densidad de potencia máxima de  $0.1 \text{ mW cm}^{-2}$ . Es destacable que debido a la disminución del potencial del circuito abierto, se observó también una disminución en la potencia máxima generada. Sin embargo, hay que recalcar que la corriente se mantuvo casi intacta y que dicha disminución en la potencia fue ligera, en comparación con la gráfica de la Figura 27 de la condición I (2 flujos).



**Figura 28.** Evaluación de biocelda de combustible enzimática en la condición II (un flujo).

En la Figura 29 comparamos las bioceldas de combustible enzimáticas correspondientes a las condiciones I y II (dos y un flujo). En esta gráfica se observó claramente la diferencia de la breve disminución, tanto en la potencia máxima, como consecuencia de la disminución del circuito abierto, así como una densidad de corriente que se mantuvo al mismo valor máximo de  $1 \text{ mA cm}^{-2}$ . Hay que mencionar que esto es importante, principalmente para el caso, donde es evaluado un solo flujo ya que de esta manera cada uno de los materiales enzimáticos demuestra su selectividad.



**Figura 29.** Comparación de celdas de combustible enzimática condición I y II (uno y dos flujos).



# Capítulo IV

## CONCLUSIONES



#### 4. CONCLUSIONES

Se elaboraron los electrodos enzimáticos de lactato oxidasa y bilirrubina oxidasa sobre un papel conductor de carbón que facilito la conductividad en el sistema.

Se evaluó electroquímicamente el electrodo de lactato oxidasa, sin afectar la enzima. Lo cual se le atribuye a la presencia de la poli (etilenimina) lineal. Los resultados para el bioánodo fueron los esperados, se observó la presencia del ferroceno claramente y la actividad enzimática igual fue notable en la voltametría cíclica con presencia del ácido láctico.

Se evaluó electroquímicamente el electrodo de bilirrubina oxidasa, donde se logró observar la reducción de oxígeno mediante las voltametrías cíclicas, notando una densidad de corriente mayor a pH 6.5. Lo cual facilitó el empleo en la celda de combustible pues ambas enzimas mejoraron su rendimiento a este pH.

Se incorporaron los electrodos enzimáticos en una celda de combustible en la que se obtuvieron buenas entregas de potencial, potencia y densidades energéticas con valores de hasta 0.85 V, 0.125 mW cm<sup>-2</sup> y 1 mA cm<sup>-2</sup>.

Se obtuvo una biocelda de combustible enzimática capaz de oxidar ácido láctico y producir energía eléctrica. Ya que a la fecha no hay trabajos reportados con ambas enzimas dentro de una celda de combustible de este tipo, así como también abre las puertas a un nuevo tipo de combustible que resulta económico y presente en los fluidos corporales humanos.

Los resultados indican la posibilidad de desarrollar prototipos tipo biosensores y/o detectores de ácido láctico debido a que el bioánodo mostró señal desde bajas concentraciones de lactato y el biocátodo demostró su selectividad para el oxígeno.

Estas inmovilizaciones enzimáticas indican que dentro de la biocelda de combustible enzimática reportada pueden ser consideradas como futuras fuentes de alimentación para dispositivos electrónicos médicos, capaces de sensar y/o detectar y al mismo tiempo poder suministrar corriente eléctrica al dispositivo en el que se encuentren instalados los bioelectrodos para el funcionamiento del dispositivo electrónico.

Por otra parte una de las ventajas que también ofrece la biocelda de combustible, es la de proporcionar el oxígeno que necesita para beneficio de la reacción llevada a cabo dentro de la biocelda obteniéndolo del medio, evitando de esta forma tener un reactivo limitante. Esta consideración resulta atractiva pues de esta forma lo único que disminuiría su desempeño sería la falta de combustible, lo cual no es un problema en el caso de ésta biocelda que, como se demostró, funciona con pequeñas cantidades de combustible, arrojando un muy buen desempeño en comparación con las reportadas en la literatura, tanto híbridas (electrodos metálicos y enzimáticos) como enzimáticas. Todas estas ventajas que ofrecidas por la configuración del dispositivo, motivo de este trabajo, abren camino para el desarrollo de dispositivos de diagnóstico analítico médico que podrían ser fácilmente desechables, pues los compuestos no están peleados con el desarrollo sustentable del medio ambiente si se comparan con los sistemas electroquímicos usados en la actualidad y así a la vez pensar en que sean autónomos pues son capaces de generar su propio voltaje y corriente eléctrica pudiendo aumentar ambas con algunas conexiones en serie o paralelo mediante un stack de celdas. Como a su vez también podrían ser fácilmente transportables es decir portátiles.

## REFERENCIAS

### Referencias de Introducción

- [1] V. Baglio, A. S. Aricó, A. Stassi, C. D'Urso, A. Di Blasi, A. M. Castro Luna and V. Antonucci, *J. Power Sources* 159 (2006) 900.
- [2] S. Venugopalan, *Micro Fuel Cells*, Anamaya Publishers (2006), India.
- [3] E. R. Choban, J. S. Spendelow, L. Gancs, A. Wieckowski and P. J. A. Kenis, *Electrochimica Acta* 50(27) (2005) 5390.
- [4] B. D. McNicol, D. A. J Rand and K. R Williams, *J. Power Sources* 83 (1999)15.
- [5] R. Dillon, S. Srinivasan, A. S. Arico and V. Antonucci, *J. Power Sources* 127 (2004) 112.
- [6] V. Baglio, A. S. Aricó, A. Stassi, C. D'Urso, A. Di Blasi, A. M. Castro Luna and V. Antonucci, *J. Power Sources* 159 (2006) 900.
- [7] S. Venugopalan, *Micro Fuel Cells*, Anamaya Publishers (2006), India.
- [8] E. R. Choban, J. S. Spendelow, L. Gancs, A. Wieckowski and P. J. A. Kenis, *Electrochimica Acta* 50(27) (2005) 5390.
- [9] E. R. Choban, P. Wasczuk and P. J. A. Kenis, *Electrochemical and solid-state letters* 8(7) (2005) A348.
- [10] K. A. Cook-Chennault, *IOPScience* (2008) 17
- [11] J. L. Cohen, A. Westly Daron, A. Pechenik and H. D. Abruña, *Journal of Power Sources* 139 (1-2) (2005) 96.
- [12] E. R. Choban, L. J. Markoski, A. Wieckowski and P. J. A. Kenis, *Journal of power sources* 128(1) (2004) 54.
- [13] Reid, R. C.; Minter, S. D.; Gale, B. K., *Contact lens biofuel cell tested in a synthetic tear solution. Biosensors & Bbioelectronics* 2015, 68, 142-8.
- [14] Hickey, D. P.; Reid, R. C.; Milton, R. D.; Minter, S. D., *A self-powered amperometric lactate biosensor based on lactate oxidase immobilized in dimethylferrocene-modified LPEI. Biosensors & Bioelectronics* 2016, 77, 26-31.
- [15] Bandodkar, A. J.; Hung, V. W.; Jia, W.; Valdes-Ramirez, G.; Windmiller, J. R.; Martinez, A. G.; Ramirez, J.; Chan, G.; Kerman, K.; Wang, J., *Tattoo-based potentiometric ion-selective sensors for epidermal pH monitoring. The Analyst* 2013, 138 (1), 123-8.

[16] Jia, W.; Bhandodkar, A. J.; Valdes-Ramirez, G.; Windmiller, J. R.; Yang, Z.; Ramirez, J.; Chan, G.; Wang, J., Electrochemical tattoo biosensors for real-time noninvasive lactate monitoring in human perspiration. *Analytical Chemistry* 2013, 85 (14), 6553-60.

## Referencias capítulo I

- [1] D. Morales-Acosta, H. Rodríguez, L. A. Godínez and L. G. Arriaga, *Journal of Power Sources* 195 (2010)1862.
- [2] D. Morales-Acosta, L. G. Arriaga, L. Alvarez-Contreras, S. Fraire Luna and F. J. Rodríguez Varela, *Electrochem. Commun* 11 (2009)1417.
- [3] J. B. Aimy Ming, *Modelling Microscale Fuel Cells*. B.E; University of Saskatchewan (2003).
- [4] B. John McKechnie, Eng McMaster University, *Fabrication of Microfluidic Devices with Application to Membraneless Fuel Cells*, (2004).
- [5] B. Coq, J. M. Planeix and V. Brotons, *Appl. Catal. A* 173 (1998)175.
- [6] B. D. McNicol, D. A. J. Rand and K. R. Williams, *J. Power Sources* 83 (1999)15.
- [7] S. A. Mousavy Shaegh, N-T Nguyen and S. H. Chan, *International Journal of Hydrogen* 36 (2011) 5675.
- [8] E. Kjeang, B. Roesch, J. McKechnie, D. A. Harrington, N. Djilali and D. Sinton, *Microfluidic-Nanofluidic* 3 (2007) 403.
- [9] E. Kjeang, N. Djilali and D. Sinton, *Journal of Power Sources* 186 (2009) 353.
- [10] S. Thomas and M. Zalbowitz, "Fuel Cells Green Power", Los Alamos National Laboratory, USA (1999).
- [11] Rasmussen, M.; Abdellaoui, S.; Minter, S. D., *Enzymatic biofuel cells: 30 years of critical advancements*. *Biosensors & Bioelectronics* 2016, 76, 91-102.
- [12] Leech, D.; Kavanagh, P.; Schuhmann, W., *Enzymatic fuel cells: Recent progress*. *Electrochimica Acta* 2012, 84, 223-234.
- [13] J.A. Cracknell, K.A. Vincent, F.A. Armstrong, *Chemical Reviews* 108 (2008) 2439.

- [14] S.C. Barton, J. Gallaway, P. Atanassov, *Chemical Reviews* 104 (2004) 4867.
- [15] R. Ludwig, W. Harreither, F. Tasca, L. Gorton, *Chemphyschem* 11 (2010) 2674.
- [16] S. Shleev, J. Tkac, A. Christenson, T. Ruzgas, A.I. Yaropolov, J.W. Whittaker, L. Gorton, *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2005) 2517.
- [17] R.A. Marcus, N. Sutin, *Biochimica et Biophysica Acta* 811 (1985) 265.
- [18] Faridnia, M.H., Palleschi, G., Lubrano, G.J., Guilbault, G.G., 1993. Amperometric biosensor for determination of lactate in sweat. *Anal. Chim. Acta* 278(1), 35–40.
- [19] Malon, R.S.P., Chua, K.Y., Wicaksono, D.H.B., Corcoles, E.P., 2014. Cotton fabric-based electrochemical device for lactate measurement in saliva. *Analyst* 139 (12), 3009–3016.
- [20] Azzouzi S., Rotariu L., Benito A.M., Maser W.K., BenAli M., Bala C., 2015. A novel amperometric biosensor based on gold nanoparticles anchored on reduced graphene oxide for sensitive detection of l-lactate tumor biomarker. *Biosens Bioelectron.* 69(0), 280–286.
- [21] Casero, E., Alonso, C., Petit-Domínguez, M., Vázquez, L., Parra-Alfambra, A., Merino, P., Álvarez García, S., de Andrés, A., Suárez, E., Pariente, F., Lorenzo, E., 2014. Lactate biosensor based on a bionanocomposite composed of titanium oxide nanoparticles, photocatalytically reduced graphene, and lactate oxidase. *Microchim. Acta* 181 (1–2), 79–87.
- [22] J. A. Cracknell, K. A. Vincent and F. A. Armstrong, *Chem. Rev.*, 2008, 108, 2439–2461.
- [23] M. Minson, M. T. Meredith, A. Shrier, F. Giroud, D. Hickey, D. T. Glatzhofer and S. D. Minteer, *J. Electrochem. Soc.*, 2012, 159, G166–G170.
- [24] D. T. Glatzhofer and S. D. Minteer, *J. Electrochem. Soc.*, 2012, 159, G166–G170.
- [25] M. Shao, M. N. Zafar, M. Falk, R. Ludwig, C. Sygmund, C. K. Peterbauer, D. A. Guschin, D. MacAodha, P. O' Conghaile, D. Leech, M. D. Toscano, S. Shleev, W. Schuhmann and L. Gorton, *Chem Phys Chem*, 2013, 14, 2260–2269.
- [26] M. T. Meredith and S. D. Minteer, *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 2012, 5, 157–179.
- [27] L. Quintanar, C. Stoj, A. B. Taylor, P. J. Hart, D. J. Kosman and E. I. Solomon, *Acc. Chem. Res.*, 2007, 40, 445–452.

- [28] S. Shleev, J. Tkac, A. Christenson, T. Ruzgas, A. I. Yaropolov, J. W. Whittaker and L. Gorton, *Biosens. Bioelectron.*, 2005, 20, 2517–2554.
- [29] S. Brocato, C. Lau and P. Atanassov, *Electrochim. Acta*, 2012, 61, 44–49.
- [30] M. R. Tarasevich, V. A. Bogdanovskaya and L. N. Kuznetsova, *Russ. J. Electrochem.*, 2001, 37, 833–837.
- [31] Ivnitski, D.; Branch, B.; Atanassov, P.; Apblett, C., Glucose oxidase anode for biofuel cell based on direct electron transfer. *Electrochemistry Communications* 2006, 8 (8), 1204-1210.
- [32] Sema-Cock, L.; Rodriguez-de Stouvenel, A., Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 2005, 5 (1), 54-65.
- [33] Gubala, V., L. F. Harris, A. J. Ricco, M. X. Tan and D. E. Williams. 2012. Point of care diagnostics: status and future. *Anal. Chem.* 84:487–515.
- [34] Hickey, D. P.; Reid, R. C.; Milton, R. D.; Minteer, S. D., A self-powered amperometric lactate biosensor based on lactate oxidase immobilized in dimethylferrocene-modified LPEI. *Biosensors & bioelectronics* 2016, 77, 26-31.
- [35] S. C. Barton, *Electrochimica Acta* 50 (2005) 2145.
- [36] Kim, J.; Jia, H.; Wang, P., Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells. *Biotechnology Advances* 2006, 24 (3), 296-308.
- [37] Moore, C. M.; Akers, N. L.; Hill, A. D.; Johnson, Z. C.; Minteer, S. D., Improving the environment for immobilized dehydrogenase enzymes by modifying Nafion with tetraalkylammonium bromides. *Biomacromolecules* 2004, 5 (4), 1241-7.
- [38] Akers, N. L.; Moore, C. M.; Minteer, S. D., Development of alcohol/O<sub>2</sub> biofuel cells using salt-extracted tetrabutylammonium bromide/Nafion membranes to immobilize dehydrogenase enzymes. *Electrochimica Acta* 2005, 50 (12), 2521-2525.
- [39] Topcagic, S.; Treu, B. L.; Minteer, S. D., *Electrochemical Society: Pennington, NJ*, 2005.
- [40] R. S. Jayashree, L. Gancs, E. R. Choban, A. Primak, D. Natarajan, L. J. Markoski and P. J. A. Kenis (2005) *Journal of the American Chemical Society* 127 (2005) 16758.
- [41] M. Togo, A. Takamura, T. Asai, H. Kaji and M. Nishizawa, *Electrochimica Acta* 52 (2007) 4669.

- [42] Sokic-Lazic, D.; de Andrade, A. R.; Minteer, S. D., Utilization of enzyme cascades for complete oxidation of lactate in an enzymatic biofuel cell. *Electrochimica Acta* 2011, 56 (28), 10772-10775.
- [43] David L, N. M. M., Cox., *LEHINGER PRINCIPIOS DE BIOQUÍMICA. QUINTA ed.*; 2009; p 1158.
- [44] Reid, R. C.; Minteer, S. D.; Gale, B. K., Contact lens biofuel cell tested in a synthetic tear solution. *Biosensors & bioelectronics* 2015, 68, 142-8.
- [45] Bandodkar, A. J.; Hung, V. W.; Jia, W.; Valdes-Ramirez, G.; Windmiller, J. R.; Martinez, A. G.; Ramirez, J.; Chan, G.; Kerman, K.; Wang, J., Tattoo-based potentiometric ion-selective sensors for epidermal pH monitoring. *The Analyst* 2013, 138 (1), 123-8.
- [46] Jia, W.; Bandodkar, A. J.; Valdes-Ramirez, G.; Windmiller, J. R.; Yang, Z.; Ramirez, J.; Chan, G.; Wang, J., Electrochemical tattoo biosensors for real-time noninvasive lactate monitoring in human perspiration. *Analytical chemistry* 2013, 85 (14), 6553-60.
- [47] Azzouzi, S.; Rotariu, L.; Benito, A. M.; Maser, W. K.; Ben Ali, M.; Bala, C., A novel amperometric biosensor based on gold nanoparticles anchored on reduced graphene oxide for sensitive detection of l-lactate tumor biomarker. *Biosensors and Bioelectronics* 2015, 69, 280-286.

## **Referencias capitulo II**

- [1] Reid, R. C.; Minteer, S. D.; Gale, B. K., Contact lens biofuel cell tested in a synthetic tear solution. *Biosensors & bioelectronics* 2015, 68, 142-8.
- [2] Hickey, D. P.; Reid, R. C.; Milton, R. D.; Minteer, S. D., A self-powered amperometric lactate biosensor based on lactate oxidase immobilized in dimethylferrocene-modified LPEI. *Biosensors & Bioelectronics* 2016, 77, 26-31.
- [3] Rasmussen, M.; Abdellaoui, S.; Minteer, S. D., Enzymatic biofuel cells: 30 years of critical advancements. *Biosensors & Bioelectronics* 2016, 76, 91-102.
- [4] T. Beneyton, I. P. M. Wijaya, C. B. Salem, A. D. Griffiths, V. Taly, *Chem. Comm.* 49 (2013) 1094.

- [5] A. Zebda, S. Tingry, C. Innocent, S. Cosnier, C. Forano and C. Mousty, *Electrochimica Acta* 56 (2011) 10378.
- [6] S. Cosnier, A. Le Goff and M. Holzinger, *Electrochem. Commun.* 38 (2014) 19.
- [7] A. Radisic, B. M. Morcos, M. Op de Beeck, J. M. O'Callaghan and C. Van Hoof, *Microelectron. Eng.* 120 (2014) 251.
- [8] P. Trogadas, T. F. Fuller and P. Strasser, *Carbon* 75 (2014) 5.
- [9] Meredith, M. T.; Hickey, D. P.; Redemann, J. P.; Schmidtke, D. W.; Glatzhofer, D. T., Effects of ferrocene methylation on ferrocene-modified linear poly(ethylenimine) bioanodes. *Electrochimica Acta* 2013, 92, 226-235.
- [10] Meredith, M. T.; Minson, M.; Hickey, D.; Artyushkova, K.; Glatzhofer, D. T.; Minteer, S. D., Anthracene-Modified Multi-Walled Carbon Nanotubes as Direct Electron Transfer Scaffolds for Enzymatic Oxygen Reduction. *ACS Catalysis* 2011, 1 (12), 1683-1690.
- [11] Treu, B. L.; Minteer, S. D., TBAB NAFION. Isolation and purification of PQQ-dependent lactate dehydrogenase from *Gluconobacter* and use for direct electron transfer at carbon and gold electrodes. *Bioelectrochemistry* 2008, 74 (1), 73-77.
- [12] Milton, R. D.; Giroud, F.; Thumser, A. E.; Minteer, S. D.; Slade, R. C. T., Bilirubin oxidase bioelectrocatalytic cathodes: the impact of hydrogen peroxide. *Chemical Communications* 2014, 50 (1), 94-96.