

**“Estudio Electroquímico de la Adsorción de
Piocianina y su Efecto en la Transferencia
Extracelular de Electrones en una Biopelícula de
Pseudomonas aeruginosa NEJ07R y un Electrodo
de Carbono”**

TESIS PRESENTADA POR:

M. en E.Q. Jesús Alberto Pérez García

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN ELECTROQUÍMICA

Dirección: Dra. María Yolanda Reyes Vidal

Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica

REALIZADO POR:

M. en E.Q. Jesús Alberto Pérez García

DIRIGIDA POR:

Dra. María Yolanda Reyes Vidal

SINODALES:

Dr. Juan Manríquez Rocha

Presidente

Firma

Dr. Luis Antonio Ortiz Frade

Secretario

Firma

Dr. Federico Castañeda Zaldívar

Vocal

Firma

Dra. María Belen Prados

Vocal

Firma

Dra. Elisa Valenzuela Soto

Vocal

Firma

Dr. Francisco Javier Bacame Valenzuela

Suplente

Firma

Resumen

En 1911, el profesor M.C. Potter informó por primera vez la capacidad de los microorganismos para generar energía mediante la Transferencia Extracelular de Electrones (TEE), un fenómeno con aplicaciones en biotecnología y remediación ambiental. En la actualidad, *Pseudomonas aeruginosa*, bacteria formadora de biopelículas y productora de compuestos redox, se considera un modelo útil en el estudio de la TEE para su aplicación en el desarrollo de Tecnologías Electroquímicas Microbianas (TEM). *P. aeruginosa* produce un compuesto redox llamado piocianina (PIO), el cual tiene la capacidad de adsorberse sobre superficies conductoras y de actuar como mediador redox (MR) en el proceso de TEE. No obstante, a pesar del estudio de PIO en el proceso de TEE para su aplicación en TEM, a la fecha no está claro si las propiedades de adsorción de PIO tienen una función biológica adicional a la de MR en la biopelícula. Por ese motivo, en el presente estudio se realizaron análisis electroquímicos para determinar las interacciones de adsorción de PIO en el electrodo y su efecto en el transporte de carga en la biopelícula, para así explicar la participación de *P. aeruginosa* en la TEE. Los resultados mostraron que la adsorción de PIO sobre electrodos de carbono inhibe la transferencia de electrones de PIO disuelta. A concentraciones cercanas a 0.49 mM, la constante de transferencia electrónica heterogénea (k_{app}) disminuye, aumentando la resistencia de transferencia de carga (R_{ct}). La interacción π - π de PIO con el electrodo podría ser la causa de la adsorción. Para determinar si estas interacciones se encuentran presentes durante el proceso de colonización del electrodo por *P. aeruginosa* NEJ07R, se realizaron análisis electroquímicos de la TEE. Los resultados de voltamperometría cíclica (VC) y cronoamperometría (CA) confirmaron la adsorción de PIO y su contribución a la comunicación electrónica entre *P. aeruginosa* NEJ07R y electrodo. Además, se determinó el perfil de fenazinas producidas durante la TEE de *P. aeruginosa* NEJ07R mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectroscopía de masas (LC-MS) y voltamperometría de pulso diferencial (VPD). Los resultados indican que la actividad electroquímica de *P. aeruginosa* NEJ07R se ve afectada por la limitación de sustrato y O_2 en la biopelícula. Los estudios de VC revelaron que la TEE se realiza a través de fenazina-1-ácido carboxílico (PCA), ya que la limitación de O_2 inhibe la biosíntesis de PIO. Además, los resultados de VPD mostraron que una baja concentración de PIO en la biopelícula genera un gradiente de H^+ , causando acidificación en la matriz de la biopelícula. Los experimentos con PIO revelaron que este compuesto cumple una función como regulador de los gradientes de O_2 y H^+ , lo que mejora la TEE. No obstante, a medida que aumenta la concentración de PIO, se observa una disminución en el consumo de sustrato y en la producción de PCA, lo que contradice el aumento de la actividad electroquímica observado por VC. Estos resultados, sugieren que una concentración de PIO superior a 4 $\mu\text{g/mL}$, tiene un efecto tóxico para la población de *P. aeruginosa* NEJ07R que integra la biopelícula, lo que explica la disminución del porcentaje de consumo de sustrato y la disminución en la producción de PCA. Sin embargo, es probable la presencia de una fracción de la población adaptada a la alta concentración de PIO, la cual sería la responsable de sustentar la TEE al electrodo.

Abstract

In 1911, Professor M.C. Potter first reported the ability of microorganisms to generate energy through Extracellular Electron Transfer (EET), phenomenon with applications in biotechnology and environmental remediation. Currently, *Pseudomonas aeruginosa*, a biofilm-forming bacterium and producer of redox compounds, is considered a useful model in the study of EET for its application in the development of Microbial Electrochemical Technologies (MET). *P. aeruginosa* produces a redox compound called pyocyanin (PYO), which has the ability to adsorb onto conductive surfaces and act as a redox mediator (RM) in the EET process. However, despite the study of PYO in the EET process for its application in MET, it is currently unclear whether the adsorption properties of PYO have an additional biological function beyond that of an RM in the biofilm. For this reason, this study conducted electrochemical analyses to determine the adsorption interactions of PYO on the electrode and its effect on charge transport in the biofilm, aiming to explain the involvement of *P. aeruginosa* in EET. The results showed that the adsorption of PYO on carbon electrodes inhibits the transfer of electrons from dissolved PYO. At concentrations close to 0.49 mM, the heterogeneous electron transfer constant (k_{app}) decreases, increasing the charge transfer resistance (R_{ct}). The π - π interaction of PYO with the electrode could be the cause of adsorption. To determine if these interactions are present during the electrode colonization process by *P. aeruginosa* NEJ07R, electrochemical analyses of EET were performed. The results of cyclic voltammetry (CV) and chronoamperometry (CA) confirmed the adsorption of PYO and its contribution to electron communication between *P. aeruginosa* NEJ07R and the electrode. Additionally, the profile of phenazines produced during the EET of *P. aeruginosa* NEJ07R was determined by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) and differential pulse voltammetry (DPV). The results indicate that the electrochemical activity of *P. aeruginosa* NEJ07R is affected by substrate and O₂ limitation in the biofilm. CV studies revealed that EET is carried out through phenazine-1-carboxylic acid (PCA) as O₂ limitation inhibits PYO biosynthesis. Furthermore, DPV results showed that a low concentration of PYO in the biofilm generates H⁺ gradient, causing acidification in the biofilm matrix. Experiments with PYO revealed that this compound functions as a regulator of O₂ and H⁺ gradients, enhancing EET. However, as the PYO concentration increases, a decrease in substrate consumption and PCA production is observed, contradicting the increase in electrochemical activity observed by CV. These results suggest that a PYO concentration above 4 μ g/mL has a toxic effect on the population of *P. aeruginosa* NEJ07R in the biofilm, explaining the decrease in substrate consumption percentage and the reduction in PCA production. However, the presence of a population fraction adapted to the high PYO concentration is likely, which would be responsible for sustaining EET to the electrode.



Este trabajo fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica bajo la dirección de:

Dra. María Yolanda Reyes Vidal

A mis amados hijos Héctor y Samara,

Cada palabra escrita y cada esfuerzo invertido en esta tesis ha sido inspirado por ustedes. Su alegría y determinación iluminan mi camino. Que este logro les recuerde que no hay límites para sus sueños.

Siempre estaré aquí para apoyarlos.

A mis queridos padres Luis y Filadelfa,

Su amor incondicional, guía y sacrificio han sido la base de todas mis realizaciones, incluida esta tesis.

Gracias por creer en mí y por ser mi fuente constante de inspiración. Este logro también es suyo, y les dedico con gratitud cada página de este trabajo.

A mi compañera de vida, Alejandra

Tu amor ha sido mi luz en este camino académico. Gracias por tu apoyo incondicional y por impulsarme en los momentos más difíciles de esta trayectoria. Este logro también es tuyo.

Con gran cariño,

Jesús

Vive como si fueses a morir mañana. Aprende como si fueses a vivir para siempre (Gandhi)

Agradecimientos

Quiero agradecer de manera especial a CONAHCYT por la beca otorgada y por el financiamiento a través del proyecto 258159 del fondo "SEP-CONACYT-Ciencia Básica".

Agradezco sinceramente al Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ, S.C.) por brindarme la valiosa oportunidad de realizar mis estudios de posgrado en sus instalaciones.

Mi profundo agradecimiento a la Dra. M. Yolanda Reyes-Vidal por su cálida bienvenida en su equipo de trabajo, por su constante apoyo, orientación y paciencia. Juntos hemos enfrentado momentos buenos y desafiantes que han contribuido significativamente a mi crecimiento tanto profesional como personal. Su ejemplo en el ámbito profesional es una fuente constante de inspiración.

Un especial reconocimiento al Dr. Francisco Javier Bacame-Valenzuela por ser mi mentor y por motivarme a adentrarme en el mundo de la investigación. Su amistad, respaldo y confianza han sido pilares fundamentales en mi trayectoria.

Quiero agradecer al Dr. Juan Manríquez Rocha, por su apoyo, asesoría e instrucción en la discusión e interpretación de los resultados de esta tesis.

A mis hijos, Héctor Jesús Pérez Carro y María Samara Pérez Carro, son mi fuente de inspiración constante. Ustedes son la razón detrás de mis esfuerzos y la motivación para ser un mejor hombre y padre.

A mi compañera de vida, la M.C. Alejandra Xochitl Maldonado Pérez, le agradezco su constante apoyo en los momentos más difíciles, su aliento y su impulso para alcanzar este sueño. Eres un ejemplo para mí y tu paciencia incondicional refleja un amor genuino.

También quiero agradecer a la Lic. Génesis Carro Hernandez, por su apoyo desde los primeros momentos de esta trayectoria y por ser una madre ejemplar para mis hijos. Tu amistad y paciencia han sido invaluable.

A mis suegros, Alejandro Maldonado Basurto y Celina Xochitl Pérez López, les agradezco por abrirme las puertas de su hogar y por brindarme su apoyo en momentos difíciles.

No puedo dejar de agradecer a mis padres y a mi hermano, el Lic. Luis Alberto Pérez Juárez, la Lic. María Filadelfa García Fortunato y el Lic. Luis Emanuel Pérez García, por ser mi sostén principal en este largo y desafiante camino. Su confianza en mí y su ejemplo de perseverancia han sido fundamentales.

A mis compañeros que integran el laboratorio de microbiología ambiental y energética de CIDETEQ.

Agradezco al Padre Celestial por cada nuevo día y por otorgarme la fortaleza para seguir adelante.

A todos aquellos que han estado a mi lado a lo largo de esta travesía, influyendo en mi crecimiento personal y profesional, les expreso mi más sincero agradecimiento. Su contribución ha enriquecido mi personalidad y me ha impulsado a ser la persona que soy hoy.

Muchas gracias.

Tabla de contenido

1	Introducción	1
2	Marco teórico	5
2.1	Tecnologías electroquímicas microbianas.....	5
2.2	Transferencia extracelular de electrones	6
2.3	Estudio electroquímico de la transferencia extracelular de electrones	16
3	Materiales y Métodos	41
3.1	Cepa y condiciones de cultivo	41
3.2	Extracción de piocianina	41
3.3	Estudio de las reacciones redox de piocianina	42
3.4	Colonización del electrodo de trabajo y pruebas de biopelícula	42
3.5	Determinación de azúcares reductores mediante el sistema HPLC-IR	43
3.6	Determinación de fenazinas mediante el sistema HPLC-PDA-MS.....	44
4	Resultados y Discusión	45
4.1	Estudio electroquímico de piocianina: Velocidad de transferencia electrónica e interacciones intermoleculares.....	45
4.2	Proceso de transferencia extracelular de electrones de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NEJ07R sobre un electrodo de base carbono mediada por piocianina	58
4.3	Análisis de la producción de fenazinas y su efecto en la transferencia extracelular de electrones de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NEJ07R sobre un electrodo de tela de carbono	72
	Conclusión	87
	Anexos	89
	Anexo 1: Caracterización cromatográfica	89
	Anexo 2: Cálculo de los parámetros cinéticos de PIO.....	91
	Anexo 3: Obtención del parámetro Γ mediante el análisis de cronocoulombimetría	92
	Anexo 4: Cálculo de los parámetros de interacción a partir del teorema de Laviron	93
	Anexo 5: Perfil voltamperométrico de un electrodo de tela de carbono colonizado	95
	Anexo 6: Selección del sustrato para la medición de la TEE en electrodos colonizados por <i>P. aeruginosa</i> NEJ07R.....	96
	Anexo 7: Curva E vs. pH de piocianina.....	102
	Bibliografía	103

1 Introducción

A principios del siglo XX, el científico británico M.C. Potter en su publicación "*Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds*" en 1911, reveló la capacidad de los microorganismos para generar energía mediante la transferencia de electrones a electrodos [1]. En sus conclusiones, Potter postuló por primera vez que:

"La desintegración de compuestos orgánicos por microorganismos es acompañada por la liberación de energía eléctrica" (Potter, 1911).

Esta conclusión condujo al estudio de la transferencia extracelular de electrones (TEE), un fenómeno biológico presente en diversas especies microbianas [2–4]. La TEE es un mecanismo metabólico que permite a los microorganismos “electrogénicos” transferir los electrones resultantes de la respiración hacia un aceptor de electrones externo alternativo al oxígeno. De este modo, la TEE ha surgido como una herramienta con aplicaciones potenciales en biotecnología y remediación ambiental [5–7]. En el ámbito de la biotecnología, la comprensión de la TEE permite el desarrollo de Tecnologías Electroquímicas Microbianas (TEM). Las TEM se han orientado a aplicaciones prácticas, como la generación de electricidad en Celdas de Combustible Microbianas (CCM) y la producción sostenible de productos químicos a partir de residuos mediante procesos electroquímicos microbianos, como la electrofermentación [8–11]. Desde una perspectiva ambiental, la TEE se destaca como una herramienta para descontaminar suelos y aguas afectadas, donde los microorganismos electrogénicos pueden oxidar contaminantes contribuyendo a eliminar o transformar sustancias tóxicas [10, 12–14].

Actualmente, la comprensión de la TEE mejora debido que ha sido posible identificar los procesos biológicos y moleculares involucrados. Un ejemplo de ello es el descubrimiento de nanocables microbianos, estructuras conductoras que conectan células vivas con un electrodo y que son importantes para impulsar la TEE [15, 16]. Estos nanocables, compuestos principalmente por proteínas como los citocromos y subunidades llamadas *pili*, actúan como puentes biológicos que permiten la conducción directa de electrones desde el interior de las células hasta los electrodos. Este tipo de TEE se conoce como Transferencia Extracelular de Electrones Directa (TEED), siendo el ejemplo más destacado la bacteria *Geobacter sulfurreducens*. Esta bacteria forma estructuras conductoras de nanocables a base del citocromo OmcS y OmcZ, así también a partir de la proteína PilA [17–19]. Por otro lado, las proteínas de membrana también son clave en la TEE. Los citocromos de la membrana celular actúan como transportadores de electrones, conectando rutas metabólicas intracelulares con electrodos externos a través del empleo de mediadores redox (MR),

Introducción

moléculas que transportan electrones aprovechando la difusión en el medio. Un conjunto de proteínas de membrana puede formar estructuras conocidas como complejos respiratorios, las cuales pueden contener múltiples sitios activos que promueven la comunicación entre microorganismos y electrodos a través de interacciones electrostáticas con MR's. Esto permite la transferencia de electrones desde distancias superiores a 50 μm desde la superficie de la célula sin necesidad de contacto directo con el electrodo. Este tipo de TEE se llama Transferencia Extracelular de Electrones Indirecta (TEEI), siendo el ejemplo más importante la bacteria *Shewanella oneidensis*. Esta bacteria presenta en su membrana externa al complejo respiratorio MtrCAB, el cual intercambia electrones con MR's derivados de flavinas, para después transferirlos a un electrodo [20–23].

No obstante, estos no son los únicos casos donde puede ocurrir la TEE. Un modelo de estudio potencial es *Pseudomonas aeruginosa*. Esta bacteria ha mostrado tener la capacidad para formar biopelículas electroactivas y producir compuestos con actividad electroquímica que cumplen la función de MR [24]. Entre estos compuestos, piocianina (PIO) ha sido uno de los MR's de *P. aeruginosa* que más ha sido estudiado. Descubierta por M. Fordos en 1859, PIO se ha convertido en un compuesto de interés debido a que posee un ciclo redox reversible y presenta la capacidad de interactuar con superficies eléctricamente conductoras [25–27]. Estas propiedades le permiten a PIO llevar a cabo reacciones redox de uno o dos electrones, interactuando así con una amplia variedad de sustancias que reaccionan en múltiples procesos redox biológicos [26, 28, 29]. De este modo, la producción de PIO en el entorno de la biopelícula, además de cumplir la función de MR, también está vinculada con la adquisición de oxígeno, equilibrio redox extra e intracelular, adquisición de hierro, consumo de fuentes de carbono, formación de especies reactivas de oxígeno, Quorum Sensing y recientemente descubierto, regulación de ADN [30–36].

Por otro lado, una propiedad menos explorada de PIO es su capacidad de interactuar con superficies de carbono al adsorberse específicamente sobre ellas, dando lugar a polímeros conductores. Este proceso es importante ya que *P. aeruginosa* podría aprovechar esta propiedad para impulsar la TEE en una biopelícula [28, 37–39]. En este sentido, la adsorción de PIO en un entorno poroso como el de la biopelícula, implicaría cambios físicos del ambiente como la capacidad hidrofílica de la biopelícula y el electrodo, equilibrio redox y electrostático, así también como en el transporte de iones, masa y carga. Sin embargo, los avances en el entendimiento de la TEE de *P. aeruginosa*, donde se destaca a PIO como el principal MR se han centrado en los procesos biológicos y moleculares, dejando a un lado las implicaciones potenciales que podría tener la adsorción específica de PIO en el proceso de TEE. Por tal motivo, existe una falta de estudios que investiguen la adsorción de PIO sobre superficies, especialmente las de carbono, las cuales son ampliamente utilizadas en TEM. Esta carencia de investigación dificulta la comprensión de la participación de *P.*

Introducción

aeruginosa en los procesos electroquímicos efectuados en las TEM. Por lo tanto, el desarrollo de TEM se ve limitado y, de continuar con esta tendencia, existirá un déficit en la correcta aplicación de la TEE que genere innovación en TEM. Por lo tanto, este trabajo propone el estudio del proceso de adsorción de PIO sobre un electrodo de carbono considerando el entorno poroso de la biopelícula. Para ello, se utilizarán técnicas electroquímicas aplicadas bajo condiciones fuera y dentro del equilibrio, como una estrategia que permitirá comprender mejor la TEE de *P. aeruginosa*, y así, determinar la dinámica del transporte de iones, masa y carga en la biopelícula en presencia de PIO como principal MR. De este modo, se sugiere que interacciones de atracción entre PIO y electrodos de carbono que pudieran favorecer la adsorción específica, podrían ser aprovechadas por *P. aeruginosa* para llevar a cabo la TEE en la biopelícula, al reducir la resistencia vinculada al transporte iónico y de carga, especialmente si las características estructurales del electrodo de carbono son tomadas en cuenta [40–42]. En este sentido, la pregunta de investigación que surge es: ¿Cómo afecta la adsorción de PIO al transporte de masa vinculado a los gradientes de concentración de O_2 , H^+ y sustrato en la biopelícula, así como su impacto en la TEE de *P. aeruginosa*? Para abordar esta pregunta, se plantea la siguiente hipótesis:

Hipótesis

La adsorción de piocianina sobre un electrodo de carbono favorece la transferencia extracelular de electrones de Pseudomonas aeruginosa NEJ07R, al regular los gradientes de concentración de O_2 , H^+ y sustrato al interior de la biopelícula.

Objetivo general

Evaluar el efecto de la adsorción de PIO en la regulación de los gradientes de concentración de O_2 , H^+ y sustrato dentro de la biopelícula de Pseudomonas aeruginosa NEJ07R, para determinar su posible impacto favorable en la transferencia extracelular de electrones.

Objetivos específicos

- Caracterizar el ciclo redox de piocianina y sus interacciones con un electrodo a base de carbono, utilizando los criterios de reversibilidad e interacción establecidos por las leyes de Laviron, para identificar los procesos de interacción y sus efectos en la velocidad de transferencia de electrones.
- Analizar el proceso de transferencia extracelular de electrones (TEE) entre *Pseudomonas aeruginosa* NEJ07R y un electrodo de carbono, mediado por piocianina, mediante el análisis de las alteraciones fisicoquímicas en el electrodo colonizado y el ciclo redox de piocianina, para determinar si *P. aeruginosa* NEJ07R se favorece de las interacciones de piocianina con el electrodo facilitando la TEE.

Introducción

- Determinar la producción de fenazinas en una biopelícula de *P. aeruginosa* NEJ07R unida a un electrodo de carbono utilizando la aplicación de un estímulo eléctrico externo, para determinar el papel de las fenazinas y de la pirocianina en la regulación de la transferencia de masa en la biopelícula, así como su impacto en el proceso de TEE.

2 Marco teórico

2.1 Tecnologías electroquímicas microbianas

Las TEM se basan en el conocimiento y las técnicas relacionadas con la capacidad de los microorganismos para transferir electrones a electrodos como parte de sus procesos metabólicos, proceso conocido como TEE. Estos principios incluyen el estudio de los mecanismos biológicos de intercambio de electrones en microorganismos electrogénicos, el diseño de electrodos conductores, la comprensión de las rutas metabólicas en la TEE y la aplicación práctica en áreas como la generación de energía y la biotecnología ambiental [6, 43]. Por lo tanto, las TEM abarcan un conjunto interdisciplinario de conocimientos y técnicas que permiten la aplicación práctica de los principios biológicos y electroquímicos para diversas finalidades tecnológicas [44, 45]. En las TEM, un elemento fundamental es el biocatalizador representado por microorganismos electrogénicos que colonizan electrodos. Estos microorganismos establecen un anclaje físico con el electrodo mediante la formación de biopelículas electroactivas (Figura 1a) [46]. Las biopelículas están compuestas por comunidades complejas de microorganismos y consisten en microcolonias o cúmulos celulares inmersos en una matriz de polisacárido extracelular [16]. Los microorganismos presentes en la biopelícula presentan la capacidad de alterar las superficies a las que se adhieren. De este modo, son capaces de activar diversas vías metabólicas que les permiten acondicionar el electrodo al que se unen, asegurando así su supervivencia, lo que da lugar a la TEE [47].

Durante la TEE, los microorganismos pueden establecer reacciones redox con el sustrato y el electrodo, originando procesos que pueden clasificarse como anódicos y catódicos (Figura 1b y c). Durante un proceso de TEE anódico (Figura 1b), los microorganismos oxidan el sustrato (S), transfiriendo los electrones resultantes al electrodo, lo que induce su reducción [48, 49]. Por otro lado, en el proceso catódico (Figura 1c) ocurre lo contrario, los microorganismos toman electrones del electrodo, provocando su oxidación y posteriormente la reducción de S [50, 51]. Tanto la TEE anódica y catódica han sido empleadas con éxito para degradar contaminantes tóxicos y metales pesados [52]. Esto es determinante en el desarrollo de TEM, como las Celdas de Combustible Microbianas (CCM) que generan energía a partir de reacciones redox, y las Celdas de Electrólisis Microbianas (CEM) que requieren energía para estas reacciones. La importancia de las CCM y las CEM en el tratamiento ecológico de aguas residuales se refleja en el creciente número de investigaciones, con aproximadamente 16,000 trabajos sobre CCM y 2,000 sobre CEM, según datos de Scopus durante el periodo de 1980 a 2023. La TEE anódica y catódica ha demostrado éxito en la degradación de contaminantes emergentes tóxicos como el Naftaleno, Sulfametoxazol, Cloranfenicol, Tetraciclina; metales pesados como Cr(VI), Cu(II), Ag(II), aguas residuales industriales como residuos de aceite de motor, procesamiento del maíz, biodiesel, entre otros [41, 53–59]. Además, las CEM han sido

eficaces en la producción de hidrógeno, eliminación de fármacos y generación de metano y metanol [50, 60–63]. En resumen, la TEE impulsa el desarrollo de TEM para abordar desafíos ambientales y energéticos. La investigación continua en este campo es crucial para comprender mejor las interacciones electroquímicas y mejorar las tecnologías existentes. Estudiar la TEE en nuevas TEM ofrece perspectivas prometedoras para aplicaciones biotecnológicas y ambientales, contribuyendo a soluciones para problemas sociales urgentes.

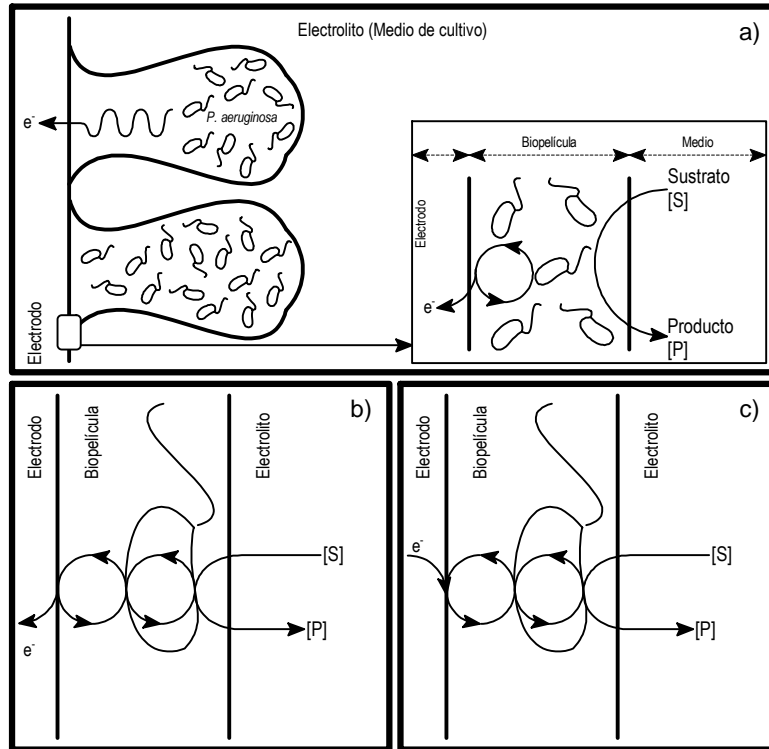


Figura 1. a) Representación de una biopelícula electroactiva adherida a un electrodo conductor y de los procesos de transferencia de electrones (e^-) a partir de un sustrato (S) para la generación de diversos productos (P). Representación del proceso de TEE entre una biopelícula y una superficie conductora (electrodo). b) Proceso anódico y c) proceso catódico [49, 50].

2.2 Transferencia extracelular de electrones

Entender los mecanismos de TEE llevados a cabo por microorganismos electrogénicos es decisivo para mejorar procesos biotecnológicos con aplicaciones ambientales e industriales. Este conocimiento impulsa el desarrollo de nuevas TEM, como las CCM y CEM, para la obtención de energía, valorización de residuos y biosíntesis de compuestos de interés biotecnológico [2, 12]. Es por ese motivo que investigadores se enfocan en desentrañar los medios físicos y químicos utilizados por los microorganismos en el proceso

de TEE [64]. Esta investigación permite proponer dos vías de TEE en la interfaz electrodo-microorganismo-electrolito: la transferencia extracelular electrónica directa (TEED), que implica contacto físico, y la transferencia extracelular electrónica indirecta (TEEI), realizada a través de MR's solubles [65]. En el proceso de TEED, la TE se efectúa mediante conexión extracelular al electrodo. En este caso, las células utilizan filamentos transmembranales llamados nanocables. Estudios confirman la presencia de dichos nanocables en especies del género *Geobacter* y *Shewanella*, de los cuales *Geobacter sulfurreducens* es el microorganismo más estudiado. Dependiendo el tipo de *nanocables* el flujo de electrones puede ser a través de saltos electrónicos incoherentes (*incoherent electron hopping* - IEH) o por conducción electrónica de tipo metálico (CMET) [15].

Por otro lado, la TEEI involucra la presencia de un MR que cumpla la función de transportador de electrones entre los microorganismos y el electrodo sin necesidad de conectarse físicamente. Tales MR pueden añadirse de forma artificial (exógenos) o pueden producirse de forma natural (endógenos). Es importante señalar que, para que se lleve a cabo la TEEI, los microorganismos deben tener receptores en sus membranas que puedan oxidar o reducir a los MR [66]. Estos receptores son proteínas de membrana como los citocromos tipo c (*cyt c*). Las especies del género *Shewanella sp.* son los principales modelos bacterianos en este caso. Estas bacterias poseen al complejo respiratorio MtrCAB y al complejo MtrFDE. Incluso, pueden tener otros *cyt c* especializados para realizar la TEE [22, 67, 68]. Todos estos receptores pueden reducir diferentes MR como los derivados de flavina y de fenazina [69–72].

2.2.1 Fundamentos bioquímicos de transferencia extracelular de electrones

2.2.1.1 Nanocables microbianos en *Geobacter*

A diferencia de la TEEI, la TEED en microorganismos requiere un contacto físico directo entre las células y la superficie del electrodo. Esta interacción se logra mediante la formación de una biopelícula que se adhiere al electrodo, permitiendo establecer una conexión eléctrica. En el caso de la TEED en *Geobacter sulfurreducens*, se han identificado diversas estrategias que involucran citocromos c y nanocables para facilitar el flujo de electrones a un electrodo [73]. Durante el proceso de TEED en *G. sulfurreducens*, el citocromo c peroxidasa MacA, presente en la membrana interna, transfiere los electrones generados durante la respiración celular al citocromo c trihemo periplasmático PpcA. Posteriormente, PpcA se difunde en el periplasma para entregar los electrones a los citocromos c de la membrana externa, entre los cuales se encuentran OmcB, OmcC, OmcS y OmcZ. Estos citocromos c son los encargados de establecer la TEE con el electrodo. Además, *G. sulfurreducens* presenta vías alternas para llevar a cabo la TEED. Por ejemplo, el citocromo c OmcF también puede estar presente en la membrana externa, al igual que PpcA, PpcB, PpcD

Marco teórico

y PpcE, que pueden localizarse en el periplasma, lo que sugiere la existencia de rutas adicionales para la TEE en este microorganismo. En cuanto a los nanocables, *G. sulfurreducens* muestra la capacidad de utilizarlos como una vía alterna para la TEED. Estos nanocables, generalmente reconocidos como *pili* tipo IV, consisten en un ensamblaje polimérico de la proteína PilA y presentan una conductividad similar a la de los semiconductores [74]. Además, se ha demostrado que los nanocables también pueden estar formados por el ensamblaje de citocromos c multi-hemo como OmcS o el citocromo c OmcZ. En estos nanocables, la TEE ocurre a través de grupos hemo apilados estrechamente a lo largo de su longitud, lo que puede permitir el flujo de electrones a través de un proceso de IEH o mediante CMET [17].

2.2.1.2 Proteínas de membrana y mediadores redox en *Shewanella* sp.

Shewanella sp. es el modelo microbiano más estudiado para entender la TEEI. Esto se debe a su capacidad de producir moléculas derivadas de flavinas tales como flavin mononucleótido (FMN), flavin adenín dinucleótido (FAD) y riboflavina (RF), las cuales cumplen la función de MR. Estos MR extracelulares son reducidos por proteínas de membrana externa de *Shewanella*, las cuales pertenecen al complejo de proteínas MtrCAB y MtrFDE [75]. En *Shewanella*, las proteínas del complejo de membrana externa MtrCAB y el complejo MtrFDE son las responsables de catalizar la reducción de los MR's extracelulares. Dichos complejos de proteínas de membrana están conformados por las proteínas MtrA, MtrC y MtrB para el caso de MtrCAB, mientras que para MtrFDE está conformado por las proteínas MtrF, MtrE y MtrD.

2.2.1.3 Características químicas de los mediadores redox y su participación en la transferencia extracelular de electrones

Analizar el rol de los mediadores redox (MR) es esencial en las reacciones redox durante la TEE. Estos actúan como intermediarios al aceptar y donar electrones de forma reversible, estableciendo conexiones entre biomoléculas intracelulares y electrodos conductores [64]. Un ejemplo destacado es el humus soluble en suelos, presente como ácidos húmicos en los sedimentos [76, 77]. Los microorganismos sedimentarios reducen estos ácidos húmicos, permitiendo la TEE hacia aceptores de electrones alternativos como óxidos de hierro y nitratos [78]. En este caso, se atribuye la propiedad de MR a los grupos funcionales derivados de quinonas en los ácidos húmicos [79], manteniendo un ciclo redox reversible para el intercambio continuo de electrones entre microorganismos y el ambiente [78, 80] (ver Figura 2a) .

Los MR's incluyen flavinas (FMN, RF y FAD), moléculas que a menudo son encontradas en las enzimas y cumplen la función de cofactores. Su capacidad para aceptar y donar electrones se deriva de grupos químicos reactivos como anillos isoaloxazínicos, quinonas y fosfatos en su estructura [81]. Los grupos

electronegativos permiten a las flavinas participar en ciclos redox reversibles, actuando como portadores de electrones. La afinidad entre complejos respiratorios y MR's puede variar según el radical enlazado al centro de isoaloxazina, impactando la eficiencia de la TEE (Figura 2b) [82]. Estas diferencias se atribuyen a cambios en el potencial redox (E^0), densidad electrónica, polaridad y energía libre de reacción [83]. Investigaciones previas han demostrado que el ciclo redox en las flavinas es similar en todas ellas (ver reacción redox en la Figura 2c) [84–86]. En flavinas, la reacción reversible de dos electrones ocurre en el centro de isoaloxazina debido al sistema π ampliamente extendido, lo que genera múltiples posiciones capaces de formar enlaces de hidrógeno, alterando la distribución de densidad de electrones y el E^0 de la flavina [81].

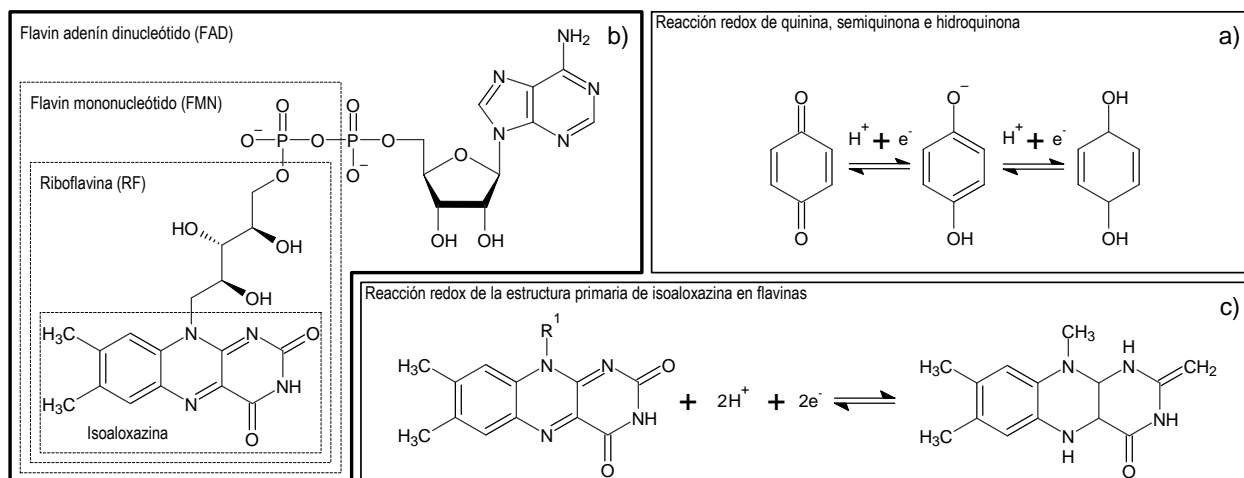


Figura 2. a) Ciclo redox en dos pasos de quinonas y grupos funcionales quinoides a través del radical semiquinona, b) estructura molecular de flavinas y c) ciclo redox de la estructura primaria de isoaloxazina.

En relación con las conversiones entre los estados oxidado de semiquinona (SQ) e hidroquinona (HQ) asociados a la estructura de isoaloxazina, estas ocurren mediante la adquisición de electrones. La semiquinona existe en dos estados de protonación, es decir, como radical semiquinona aniónico (ASQ, FAD^-) o como radical semiquinona neutro (NSQ, $FADH$). De manera similar, el estado hidroquinona puede existir en formas aniónicas (AHQ , $FADH^-$) o neutras (NHQ , $FADH_2$, en el caso de FAD). Es importante destacar que los valores de pK_a asociados a los sitios de protonación varían con el estado de oxidación de la flavina, lo que modula el E^0 de la flavina a través de su protonación [81]. La relevancia de estos aspectos radica en su impacto en la TE con flavinas, dado que la eficiencia de dicha transferencia depende en gran medida del E^0 del MR, como sucede entre el citocromo MtrF y FMN [23].

Marco teórico

Dentro del grupo de los MR naturales es relevante considerar a las fenazinas. Estas moléculas, mayormente producidas por bacterias del género *Pseudomonas*, son un conjunto de compuestos químicos heterocíclicos pertenecientes a las aminas aromáticas. Están caracterizadas por su estructura tricíclica, compuesta por tres anillos de carbono y nitrógeno fusionados, y reciben su nombre debido al sistema de tres anillos y la presencia de un átomo de nitrógeno en el anillo central, que muestra similitudes con la estructura de las fenantridinas. La funcionalidad primordial de las fenazinas radica en su capacidad para aceptar y donar electrones, lo cual les habilita para desempeñar un papel crucial en reacciones redox. Estas moléculas poseen propiedades colorantes inherentes y su estructura tricíclica conjugada con la presencia de átomos de nitrógeno confiere propiedades electrónicamente activas, otorgándoles aplicaciones en diversos contextos químicos y biológicos [29]. Entre las fenazinas producidas por esta bacteria se encuentran la piocianina (PIO), el fenazina-1-ácido carboxílico (PCA), la fenazina-1-carboxamida (PCN), la 5-metilfenazina-1-ácido carboxílico (5-MCA), la 1-hidroxifenazina (1-HP), y otras como el aeruginosin A y el aeruginosin B. Estas fenazinas tienen un papel destacado en la patogenicidad de *P. aeruginosa*, ya que su participación en reacciones redox contribuye a la generación de radicales libres que resultan perjudiciales para un hospedador [87] (Figura 3).

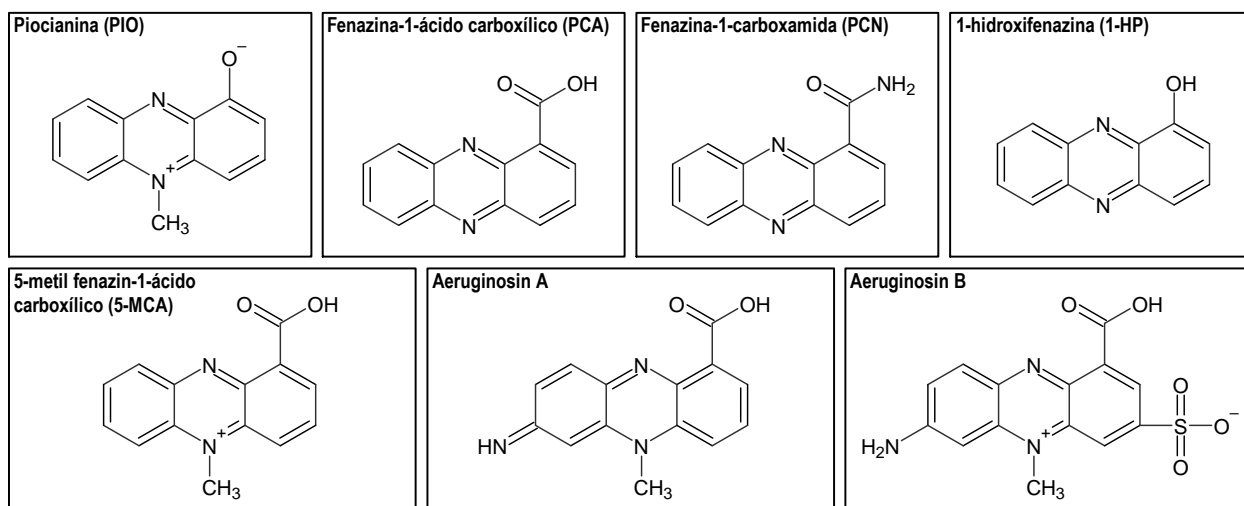


Figura 3. Estructura molecular de las principales fenazinas producidas por bacterias del género *Pseudomonas*.

Las fenazinas poseen un ciclo redox reversible (Figura 4) [30]. La estructura tricíclica conjugada confiere a estas moléculas una densidad electrónica que facilita interacciones con otras especies químicas. Se ha observado que el orbital molecular ocupado más alto π (π -HOMO) de las fenazinas puede establecer interacciones metal- π , permitiendo la coordinación con metales, lo que a su vez influye en el E^0 de las fenazinas [88]. Esta propiedad puede ser empleada en interacciones con proteínas de membrana bacteriana,

tal como se ha estudiado en el caso de la proteína MtrC de *S. oneidensis* MR-1 y PIO, estudio que demostró que PIO y las proteínas de membrana asociadas a TEE pueden intercambiar electrones, mediante interacción en sus centros metálicos [71]. El ciclo redox de la mayoría de las fenazinas se lleva a cabo mediante la transferencia de dos electrones y está altamente influenciado por la concentración de protones (H^+), de forma similar que en las flavinas. Por tal motivo, el pH del medio regula el E^0 de estas moléculas.

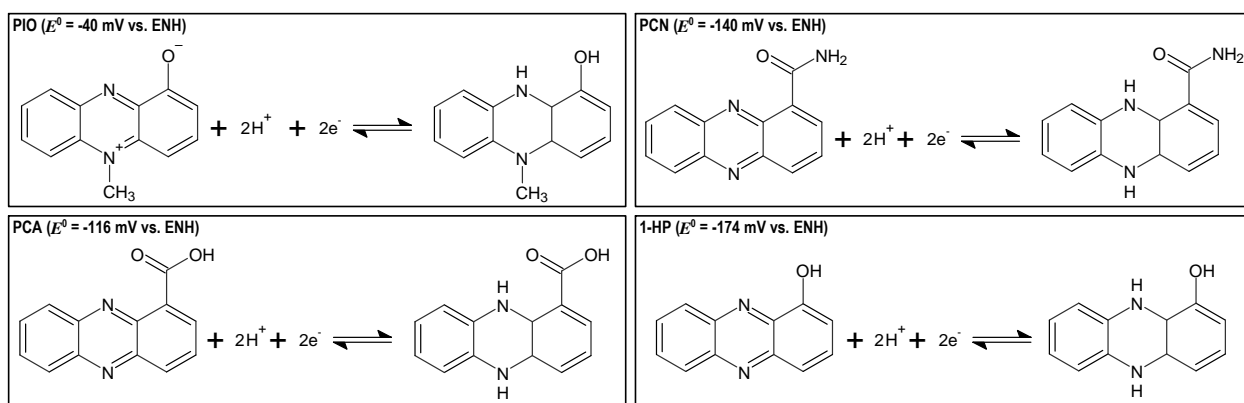


Figura 4. Reacciones redox de las principales fenazinas producidas por *P. aeruginosa*. Reacciones propuestas por Wang & Newman (2008), y Bellin et al. (2014) [30, 89].

Esta característica permite a *P. aeruginosa* utilizar las fenazinas para regular su supervivencia en entornos adversos, almacenando energía y oxígeno según sea necesario. Además, la reversibilidad de los ciclos redox les confiere la capacidad de intercambiar electrones con diversos materiales, incluyendo electrodos basados en carbono y metales como el oro y el acero inoxidable [30, 90]. Una de las fenazinas que más llama la atención es PIO. Desde su descubrimiento en 1859 por Fordos, PIO ha sido la fenazina más investigada debido que es sensible al cambio de pH, donde al reaccionar puede presentar cambios de color característicos [25]. En 1931, Friedheim y Michaelis, casi simultáneamente con Elema, caracterizaron por primera vez sus propiedades redox, identificando los cambios de color y describiendo el mecanismo redox asociado [26, 91]. A lo largo de los años, diversos estudios han enriquecido la comprensión de las propiedades electroquímicas de PIO, investigando sus mecanismos de protonación y desprotonación en diferentes solventes, y su interacción al formar complejos con metales [27, 92]. De acuerdo con estos estudios, a valores de pH inferiores a su valor de pKa ($pKa \approx 4.77 \pm 0.12$) PIO se encuentra en su estado oxidado, presentando una reacción redox dielectrónica dependiente del pH, de este modo, se propone que bajo estas condiciones ocurre la reacción $PIO_{Ox} + 2H^+ + 2e^- \rightarrow PIO_{Red}$. Por otro lado, por debajo de su valor de pKa, PIO presenta una protonación en el centro heterocíclico, lo que da lugar a dos reacciones redox monoelec-

trónicas consecutivas, una en el dominio de potencial anódico que es dependiente del pH, y donde se propone la reacción $\text{PIOH}_{\text{Ox}} + \text{H}^+ + e^- \rightarrow \text{PIOH}_{2,\text{Red}}$, mientras que en el dominio catódico se presenta la reacción $\text{PIOH} + e^- \rightarrow \text{PIOH}_{\text{Red}}$ (Figura 5a) [29].

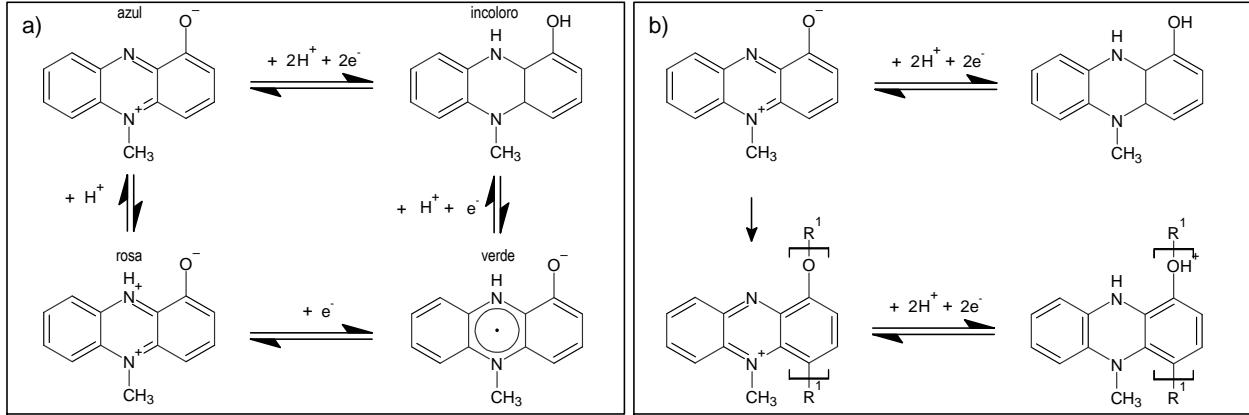


Figura 5. a) Ciclo redox de PIO [29]. b) Ciclo redox de PIO durante el proceso de polimerización [37].

Actualmente, se ha demostrado que PIO puede adsorberse sobre electrodos y, en algunos casos, incluso polimerizarse formando monocapas [37, 93–95]. La polimerización de PIO ha sido documentada en superficies de carbono. En un estudio realizado por Sharp et al. (2010), se observó la polimerización en fibra de carbono laminada [37]. Los autores indicaron que la oxidación fenólica de PIO facilita la formación de cadenas moleculares a partir de este grupo funcional, resultando en una acumulación monomolecular de la sustancia (Figura 5b) [37, 95]. En este contexto, la polimerización de PIO exhibe conductividad, siguiendo un ciclo redox similar al obtenido en solución, como se ilustra en la Figura 5b. Este fenómeno también fue investigado por Oziat et al. (2017) en carbón vitreo, aunque con una acumulación de PIO menor en el electrodo [28, 38]. Bacame-Valenzuela et al. (2020) sugirieron que la menor acumulación podría deberse a interacciones moleculares débiles entre la PIO y el electrodo de carbón vitreo [93]. Oziat et al. (2023) respaldan esta afirmación, estudiando la adsorción de PIO sobre una superficie recubierta con PEDOT:PSS. Compararon la respuesta de la adsorción de PIO con la del complejo $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$. Encontraron que el complejo $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$ tiene una mayor atracción con la superficie de PEDOT:PSS, cargada positivamente. Dado que la PIO es zwitteriónica y neutra en el rango de pH estudiado (entre 5.5 y 8), y ambas especies tienen masas moleculares y coeficientes de difusión similares, la adsorción de PIO parece ser el resultado de interacciones moleculares con la estructura del PEDOT y/o con cadenas principales de poliestireno que de interacciones electrostáticas [96]. Este proceso de adsorción y polimerización de PIO puede ocurrir en dos pasos. Primero, bajo condiciones de potencial catódico bajo (-0.04 V vs. ENH), se produce

Marco teórico

el ciclo redox característico de la $\text{PIO}_{\text{Ox}} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{PIO}_{\text{Red}}$. Luego, la PIO_{Ox} experimenta una oxidación fenólica a potenciales anódicos altos (+0.628 V vs. ENH), generando un radical OH^\bullet o O^\bullet que facilita el ensamblaje de más moléculas de PIO oxidadas [37]. De este modo, de forma hipotética se puede proponer que dada la conductividad y polaridad del polímero de PIO, su presencia en la biopelícula podría afectar la transferencia de carga y masa en los mesoporos, microporos y la matriz, especialmente considerando los posibles gradientes de pH en la biopelícula [97]. La naturaleza anfótera de la PIO podría contrarrestar estos efectos, manteniendo gradientes de pH estables. De este modo, resulta esencial investigar las implicaciones físicas y químicas de la adsorción de la PIO en una biopelícula, especialmente en relación con la TEE. La comprensión de las interacciones moleculares en este proceso es crucial para su entendimiento. Sin embargo, aún falta información sobre las interacciones moleculares específicas entre la PIO y los electrodos que favorecen la adsorción y la posterior polimerización, así como sobre cómo *P. aeruginosa* puede beneficiarse de esta adsorción. En resumen, la TEE desempeña un papel fundamental en microorganismos electrogénicos, facilitando la respiración celular. Los MR's, como las flavinas y fenazinas, son ejemplos destacados de moléculas que participan en estos procesos. A medida que se profundiza en el estudio de propiedades electroquímicas y la dinámica de los MR's, como se evidencia en la investigación sobre la PIO, se abren nuevas perspectivas para aplicaciones biotecnológicas y ambientales.

2.2.1.4 Transferencia extracelular mediada por fenazinas en *Pseudomonas aeruginosa*

El proceso bioquímico de TEE de *P. aeruginosa* empleando fenazinas como MR's, ha sido investigado de forma intensiva, centrándose en el proceso de reducción microbiana de los MR's por enzimas metabólicas transmembranales o intracelulares. Investigaciones sugieren que la reacción de reducción de PIO durante el proceso de TEE de *P. aeruginosa* podría ser catalizada por *flavo* y *hemo*-proteínas tales como *piruvato deshidrogenasa* y *α -ketoglutarato deshidrogenasa*. Glasser, et al., (2017a), proponen que dichas enzimas tienen la capacidad de reducir PIO y PCA durante el proceso de TEE [29]. De acuerdo con Glasser et al., (2017b), la enzima intracelular *α -ketoglutarato deshidrogenasa* (LpdG) reduce a PIO como consecuencia del transporte electrónico para la síntesis de ATP. Posteriormente, el complejo MexGHI-OpmD, el cual es una porina transmembranal, conduce a PIO reducida hacia el espacio extracelular (Figura 6a) [98]. Por otro lado, en un estudio realizado por Chukwubuike et al. (2021), se sugiere que la oxidación de glucosa a gluconato mediado por la enzima periplasmática *glucosa deshidrogenasa* (Gcd), favorece el flujo de electrones extracelular, aprovechando el ciclo redox de pirroloquinolona quinona (PQQ). Esta molécula reduce al transportador de membrana ubiquinona (UQ), la cual difunde por la membrana para entregar electrones al citocromo *bc₁*, y así, integrarlos a la cadena de transporte de electrones. Durante este proceso, las fenazinas, pueden funcionar como aceptores de electrones en el ciclo de la PQQ, para después, favorecer

la reducción de oxígeno o bien, emplearse para la TEE. En este caso, una vez que las fenazinas se oxidan en el entorno extracelular, retornan al periplasma para reducirse y continuar el ciclo (Figura 6b) [34].

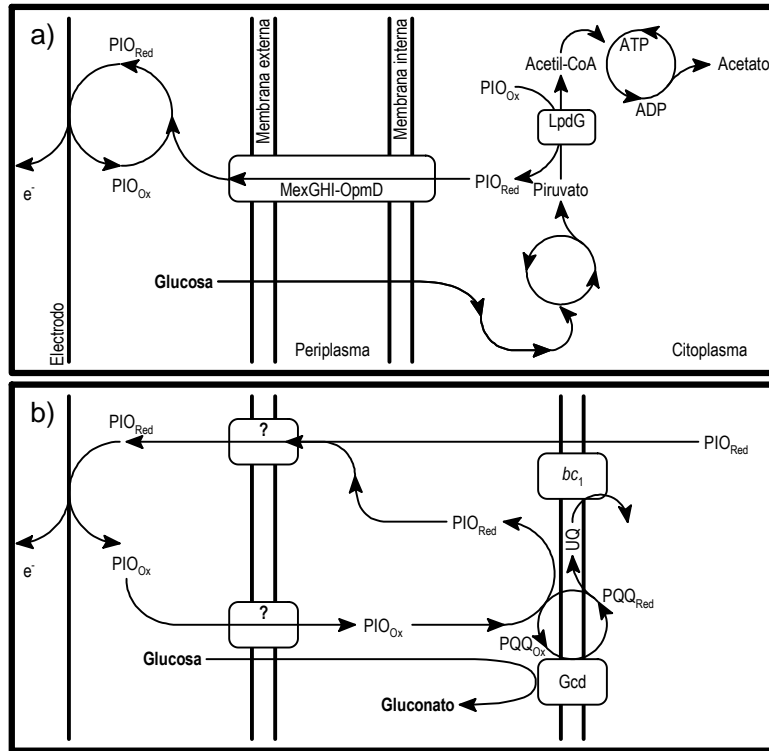


Figura 6. Mecanismos bioquímicos de TEE propuestos para *P. aeruginosa* en presencia de PIO como principal MR. a) Proceso de TEE propuesto por Glasser et al., 2017 [98]. b) Proceso de TEE propuesto por Chukwubuikem et al. (2021) [34].

Un punto clave a tener en cuenta es que en el contexto de la biopelícula, las condiciones que enfrentan los microorganismos son diversas, cambiantes y desafiantes [99]. Para contrarrestar estas condiciones, las biopelículas definen el microambiente extracelular inmediato de los microorganismos, y su composición y propiedades pueden influir en la movilidad y reactividad de los MR's. En este entorno extracelular, la difusión acuosa compite con interacciones superficiales, como componentes de biopelículas, minerales, materia orgánica o tejido huésped, determinando así el flujo de los MR's. Las características de estos entornos, como el estado redox, pH, fuerza iónica y temperatura, afectarán el comportamiento de los MR's, impactando su utilidad para la célula que los produce. En el caso específico de *P. aeruginosa*, se produce PIO, que se une al ADN extracelular en la biopelícula. Esta unión acelera la transferencia de electrones mediada por PIO a través de la biopelícula, creando un gradiente de concentración de PIO favorable hacia la profundidad de esta (Figura 7). Este mecanismo retiene a PIO en la biopelícula, evitando su pérdida al exterior. La transferencia de electrones mediada por fenazinas unidas al ADN extracelular puede ser una estrategia

eficaz para aliviar el estrés reductivo en la profundidad anóxica de la biopelícula, que permite contrarrestar la baja disponibilidad de oxígeno (Figura 7) [31, 100].

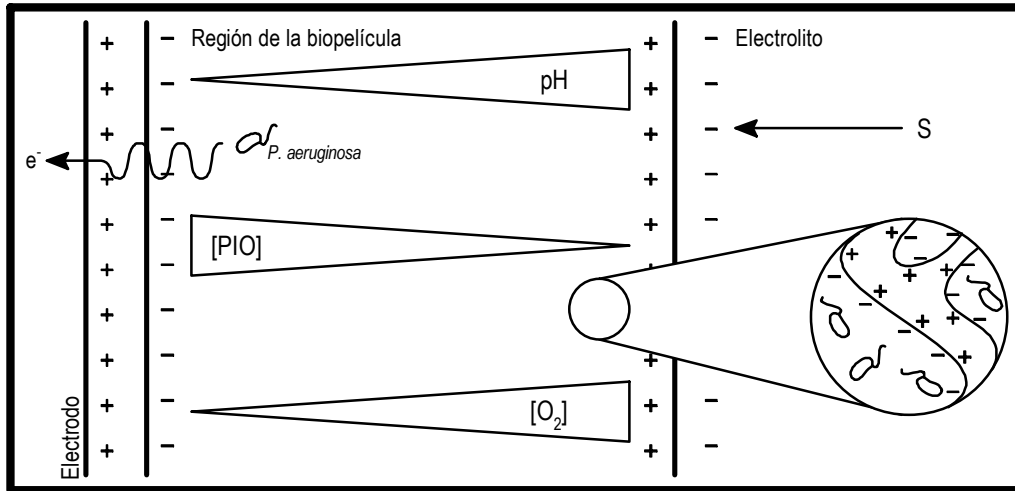


Figura 7. Representación de las interfaces presentes en la biopelícula, gradientes de concentración, pH y O_2 . Acercamiento muestra una representación de la porosidad y de la distribución de las cargas en la biopelícula.

Otra consideración importante es que en las biopelículas de *P. aeruginosa*, el pH puede variar en escalas micrométricas. Los gradientes de pH desde la profundidad hasta el borde de la biopelícula podrían inducir cambios electrostáticos que afectan la penetración de moléculas pequeñas (Figura 7) [101, 102]. En este sentido, la capacidad de adsorción de PIO y otras fenazinas sobre las superficies podría inducir cambios electrostáticos beneficiosos en los mesoporos, microporos y la matriz de la biopelícula. Estos cambios podrían regular la dinámica del transporte de masa, influyendo en el pH, oxígeno, difusión de iones y sustratos [97]. La mejora en la TEE de *S. oneidensis* cuando PCA se adsorbe en el entorno de la biopelícula, incluso en concentraciones bajas ($\leq 1 \mu M$) (62), sugiere que la adsorción podría desempeñar un papel importante, aunque esta propiedad ha sido poco explorada hasta la fecha [72]. A pesar de ello, es decisivo investigar a fondo la adsorción, ya que comprenderla podría revelar la función biológica de las fenazinas en el entorno de la biopelícula, contribuyendo así a una comprensión más profunda de la participación de *P. aeruginosa* en la TEE. En este sentido, los métodos electroquímicos pueden desempeñar un papel importante en la exploración de la TEE. Mediante estas técnicas, es posible analizar las interacciones interfaciales de los MR's en la biopelícula. Al examinar las respuestas electroquímicas en diversas condiciones experimentales es factible inferir los procesos redox y su interrelación con los procesos celulares. Es relevante destacar que estos estudios no solo tienen el potencial de revelar los aspectos moleculares de la TEE, sino que también

presentan aplicaciones prácticas. La comprensión de cómo las fenazinas y otros MR participan en la transferencia de electrones no solo amplía el conocimiento de los procesos biológicos esenciales, sino que también proporciona información para aplicaciones como la producción de energía, la biotecnología y la restauración ambiental.

2.3 Estudio electroquímico de la transferencia extracelular de electrones

La TEE desempeña un papel esencial en microorganismos electrogénicos y ofrece aplicaciones biotecnológicas valiosas. Para comprender mejor sus mecanismos, las técnicas electroquímicas son herramientas de gran importancia para su estudio. La voltamperometría cíclica (VC) y la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE) aportan información fundamental al estudiar la TEE, permitiendo explorarla bajo diferentes condiciones. La VC examina procesos fuera del equilibrio, revelando cómo los MR's, facilitan la transferencia de electrones en microorganismos como *P. aeruginosa*. Esta técnica dinámica proporciona detalles sobre tasas de transferencia electrónica, cinética de reacciones y mecanismos de reacción, ofreciendo información de la TEE en sistemas biológicos.

En contraste, la EIE estudia la TEE en el equilibrio, analizando propiedades electroquímicas en condiciones estáticas. En microorganismos como *P. aeruginosa*, esta técnica ofrece información detallada sobre resistencias al flujo de electrones y cinética de reacciones redox, así también la transferencia de masa y iónica en las biopelículas. Al integrar esta técnica con la VC se obtiene una comprensión completa de los procesos de transferencia de electrones, al abordar tanto las condiciones fuera del equilibrio como las condiciones en el equilibrio. Por lo tanto, la aplicación de estas técnicas en el proceso de TEE revelan información esencial para aplicaciones biotecnológicas, ambientales y energéticas.

2.3.1 Estudio de la transferencia extracelular de electrones bajo condiciones fuera del equilibrio

2.3.1.1 Estudio de la cinética de transferencia extracelular de electrones directa por voltamperometría cíclica

La TEED se realiza por contacto físico entre proteínas respiratorias celulares y la superficie de un electrodo. Este proceso se lleva a cabo en una biopelícula adherida al electrodo [66, 103] realizándose a través de complejos respiratorios de membrana o de cadenas de proteínas conocidas como nanocables [6, 104]. Durante la TEED, se considera que el nanocable microbiano está en contacto directo con la superficie. Una representación de este ciclo de transporte de electrones se muestra en la Figura 8., donde los electrones obtenidos del sustrato siguen una cascada de reacciones a través de 3 pasos. Según lo indicado por Strycharz

et al. (2011), el primer paso consiste en la TE entre el sustrato (donante de electrones) y las células microbianas. En el segundo paso, los electrones se incorporan al ciclo metabólico para la síntesis de ATP y posteriormente son transportados a los complejos respiratorios presentes en la membrana celular. En este punto, los electrones son entregados al nanocable microbiano que actúa MR, donde el nanocable se reduce en el extremo conectado al microorganismo. Finalmente, en el tercer paso, los electrones son transferidos desde el MR al electrodo, ocurriendo la oxidación del MR en el electrodo. De acuerdo con el modelo TEED propuesto por Strycharz, al estudiar el mecanismo de transferencia de electrones mediante VC, es esencial tener en cuenta las siguientes consideraciones: a) los MR se encuentran en forma de nanocables microbianos adsorbidos sobre la superficie del electrodo, b) la TE entre los MR y el electrodo debe ser reversible, siguiendo los criterios de equilibrio establecidos por la ley de *Nernst*, y c) los catalizadores (células) consumen el sustrato [S] de acuerdo con el modelo cinético de *Michaelis-Menten*, lo que mantiene una cinética de pseudoprimer orden [105].

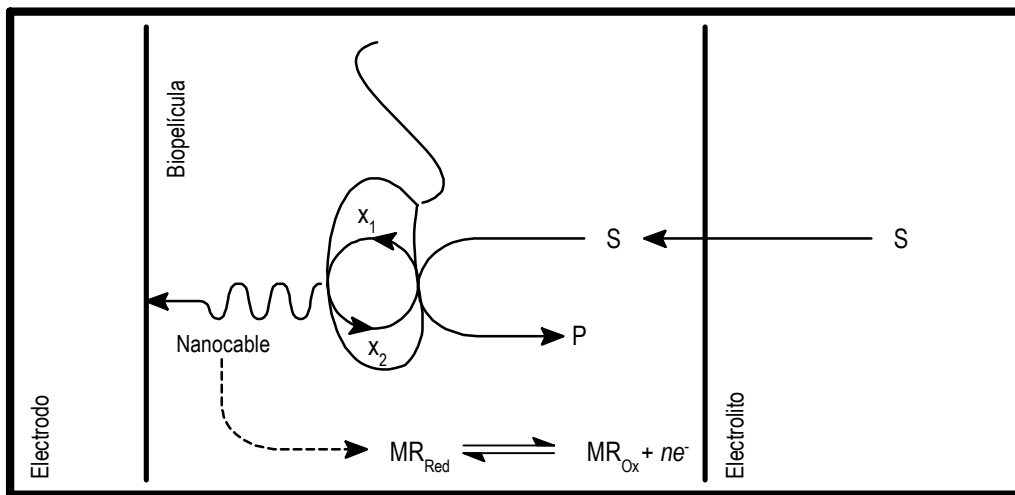
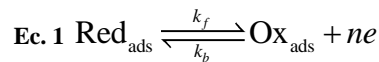


Figura 8. a) Ciclo de TEED que considera el *nanocable* microbiano como MR en la superficie.

Además, es fundamental lograr una alta densidad de células inmovilizadas en una biopelícula sobre la superficie del electrodo. De esta manera, al ocurrir la adhesión del MR y el catalizador al electrodo, se favorece una transferencia de electrones y una velocidad de reacción metabólica que se ajustan al modelo de capa fina establecido por *Laviron* [106]. En consecuencia, la reacción para un MR reversible que se adsorbe en el electrodo se describe mediante la siguiente reacción:



Marco teórico

Donde Ox representa al MR en su estado oxidado y Red en su estado reducido. En el modelo electroquímico de capa fina de *Laviron*, se puede considerar que los MR tienen una monocapa sobre el electrodo con concentraciones similares y uniformes de Red y Ox, alcanzando un estado de equilibrio que parte de la ley de *Nernst*, y cuyo comportamiento está representado por la ecuación:

$$\text{Ec. 2 } \frac{C_{\text{Ox}}}{C_{\text{Red}}} = \exp \left[\frac{nF(E_i - E_{1/2})}{RT} \right]$$

Aquí, n es el número de electrones implicados en una reacción al electrodo, F es la constante de Faraday (96485.3321 c/mol), E_i es el potencial inicial del electrodo, $E_{1/2}$ es el potencial de media onda, el cual está relacionado con el potencial estándar E^0 de la especie adsorbida, R es la constante del gas ideal (8.314 J/mol*K) y T es la temperatura absoluta. Para este caso, la corriente (velocidad de electrólisis) se define por la variación de la cantidad de Ox producido por Red consumido con respecto al tiempo, y deriva de las leyes de *Faraday* según la ecuación:

$$\text{Ec. 3 } -\frac{\partial \Gamma_{\text{Ox}}(t)}{\partial t} = \frac{\partial \Gamma_{\text{Red}}(t)}{\partial t} = \frac{i}{nFA_e}$$

Siendo A_e el área electroactiva y el parámetro Γ corresponde a la cantidad de MR que está distribuida sobre el electrodo en unidades de mol/m². Así, considerando la condición donde:

$$\text{Ec. 4 } \Gamma_{\text{Ox}}(t) + \Gamma_{\text{Red}}(t) = \Gamma^*(t)$$

Entonces, la solución de la Ec. 3 es:

$$\text{Ec. 5 } i = \frac{n^2 F^2}{RT} \left\{ \frac{vA_e \Gamma^* \left[\frac{b_{\text{Ox}}}{b_{\text{Red}}} \right] \varepsilon_1}{\left[1 + \left(\frac{b_{\text{Ox}}}{b_{\text{Red}}} \right) \varepsilon_1 \right]^2} \right\}$$

Siendo el parámetro ε_1 dado por:

$$\text{Ec. 6 } \varepsilon_1 = \exp \left[\frac{nF(E - E_{1/2})}{RT} \right]$$

Donde el parámetro b relaciona la energía libre de adsorción con la cobertura del MR en el electrodo en estado de saturación superficial (Γ^*) [107, 108]. De este modo, la Ec. 5 da como resultado el perfil voltamperométrico mostrado en la Figura 9a (Parámetros de simulación empleados: $n = 1$, $A_e = 1 \text{ cm}^2$, $T = 25^\circ \text{ C}$, $\Gamma^* = 1 \times 10^{-7} \text{ mol cm}^{-2}$), que, de acuerdo con el modelo de Strycharz et al., (2011), se produce cuando los nanocables se encuentran adheridos al electrodo y no hay consumo de sustrato [105]. Así, siguiendo el modelo de monocapas de Laviron [109], la Ec. 5 deriva en diferentes criterios de análisis para especies adsorbidas, tales como la corriente de pico (i_p), la cual es linealmente proporcional con v , y está determinada por la ecuación:

$$\text{Ec. 7 } i_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} A_e \Gamma^* v$$

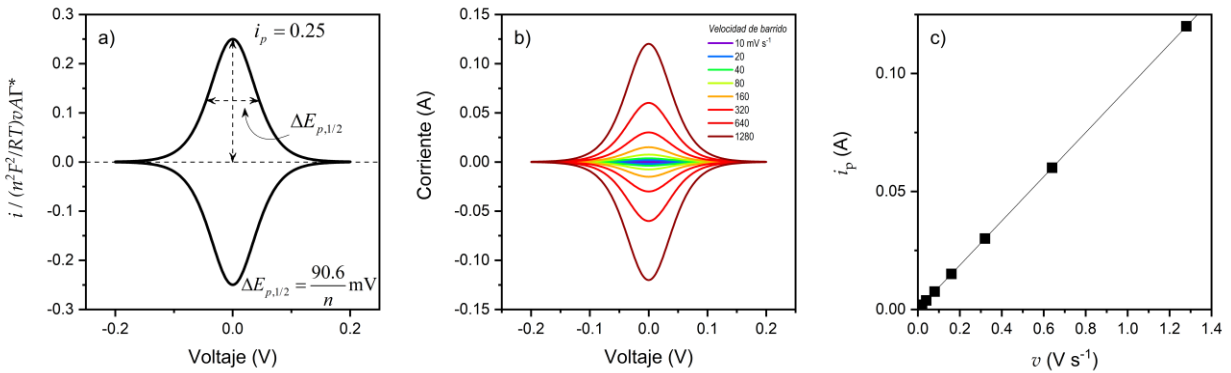
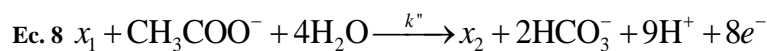


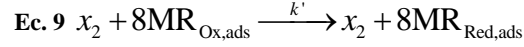
Figura 9. a) Perfil voltamperométrico característico de un MR adsorbido. b) Comportamiento electroquímico del MR adsorbido a diferentes valores de v . c) Análisis i_p vs. v para un MR adsorbido. Curvas adaptadas del modelo de Laviron (1974) para monocapas adsorbidas [109].

Aquí, se indica que el criterio i_p es proporcional a la velocidad de barrido v , lo que da lugar a los perfiles voltamperométricos de la Figura 9b, mientras que la Figura 9c muestra la verificación del análisis lineal i_p frente a v con pendiente $m = (9.38 \times 10^5) A_e n^2 \Gamma^*$ [109]. En presencia de un sustrato (S), los perfiles voltamperométricos cambian de forma significativa. De acuerdo con el modelo de Strycharz et al., (2011), si se considera la reacción de la Ec. 8, donde el acetato es la fuente de electrones (S), se puede asumir que las células oxidan a S liberando hasta 8 electrones, los cuales son transferidos al MR absorbido en el electrodo a través de reacciones bimoleculares monoelectrónicas [105]. De este modo se considera la reacción:

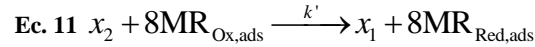
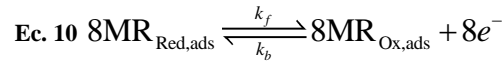


Marco teórico

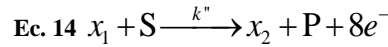
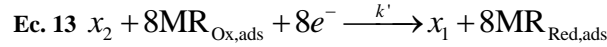
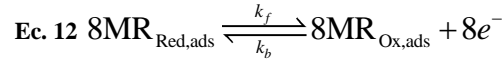
De manera consecutiva en presencia de MR ocurre la reacción:



Este proceso corresponde al segundo paso descrito en la Figura 8, donde x es el catalizador (microorganismo) y se encarga de entregar los electrones al MR. A continuación, se puede analizar un tercer paso para la TE reversible del MR al electrodo mediante dos reacciones consecutivas. La primera ecuación corresponde a una reacción electroquímica, mientras que la segunda es una reacción química entre el MR y x . De este modo se obtiene el grupo de reacciones:



Tras la transferencia de carga del MR al electrodo, la especie $\text{MR}_{\text{Red,ads}}$ se transforma en $\text{MR}_{\text{Ox,ads}}$. Posteriormente, $\text{MR}_{\text{Ox,ads}}$ intercambia electrones con x , regenerando así a la especie $\text{MR}_{\text{Red,ads}}$, obteniéndose un proceso cíclico. Para el primer paso, se considera que S es el donador de electrones para x de este modo, el mecanismo global esta dado por:



Donde S representa al acetato, o en su defecto a otro donador de electrones en su estado inicial, mientras que P representa a los productos obtenidos de la oxidación microbiana del S. Savéant & Vianello [110] identificaron este tipo de mecanismos cíclicos como catalíticos y, según Rousseau et al. (2014) [106], el flujo de materia hacia el electrodo en este proceso esta descrito por:

$$\text{Ec. 15 } \frac{i}{nFA_e} = -D \left[\frac{\partial C_{\text{Red}}(x,t)}{\partial x} \right]_{x=0} - \frac{d\Gamma_{\text{Red}}}{dt} - \mathbf{V}$$

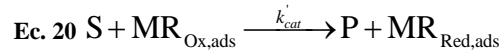
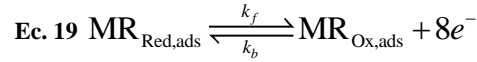
$$\text{Ec. 16 } \frac{i}{nFA_e} = D \left[\frac{\partial C_{\text{Ox}}(x,t)}{\partial x} \right]_{x=0} + \frac{d\Gamma_{\text{Ox}}}{dt} + \mathbf{V}$$

$$\text{Ec. 17 } \frac{i}{nFA_e} = D \left[\frac{\partial C_s(x,t)}{\partial x} \right]_{x=0} + V$$

Aquí, V es la velocidad de reacción en la transferencia de electrones de S y esta descrito por la ecuación 18:

$$\text{Ec. 18 } V = k'' x C_s$$

De forma similar a la electrocatálisis enzimática, la tasa de conversión de S a P por el catalizador coincide con el modelo cinético de *Michaelis-Menten*, y está parametrizada por la afinidad microbiana por el sustrato (K_s) y la constante de velocidad (k'_{cat}). Aquí, k'_{cat} es la suma de k' y k'' dadas en los pasos 2 y 3 del mecanismo cíclico. De este modo, de acuerdo con Rousseau et al., (2014), el sistema de reacción de las ecuaciones Ec. 12 a 13 se reduce a un sistema de 2 pasos descritos por el mecanismo de las ecuaciones 19 y 20:



Aquí, el mecanismo catalítico está controlado por la cinética de transformación del MR, es decir, la velocidad con la que el catalizador x puede transformar S para entregar los electrones al MR [106]. De acuerdo con este modelo cinético, la concentración de S debe ser mucho mayor que la concentración del MR para que se lleve a cabo la electrocatálisis. De este modo, se obtiene la condición $C_s \gg C^*$ en la biopelícula (sustrato en exceso). Entonces, de acuerdo con Strycharz et al., (2011) [105], la corriente de una voltamperometría cíclica bajo estas condiciones viene dada por la Ecuación 21:

$$\text{Ec. 21 } i = \frac{nFA_e \Gamma_M k'_{cat} \Gamma_{Red} \epsilon_1}{1 + \epsilon_1} + \frac{n^2 F^2}{RT} \left\{ \frac{\nu A_e \Gamma^* \left[\frac{b_{Ox}}{b_{Red}} \right] \epsilon_1}{\left[1 + \left(\frac{b_{Ox}}{b_{Red}} \right) \epsilon_1 \right]^2} \right\}$$

Donde Γ_M es el espesor de la biopelícula.

La interpretación de la Ec. 21 indica que la forma del perfil catalítico del sistema microbiano se produce mientras disminuye ν , ya que, a valores bajos de ν , el transporte de materia al electrodo no es el paso

que determina la reacción, (paso 1) de tal modo que la velocidad de regeneración del MR (paso 2) es el paso determinante. Así, a valores bajos de ν y a valores altos de k'_{Cat} , la corriente i origina el perfil voltamperométrico característico de la catálisis en forma sigmoideal. Por el contrario, si ν aumenta y k'_{cat} disminuye, entonces el perfil voltamperométrico perderá su forma sigmoideal debido que la corriente dada por la adsorción es superior a la corriente catalítica [110, 111]. El efecto de ν sobre la forma del perfil catalítico se muestra en la Figura 10a. Siguiendo el modelo de Strycharz et al., (2011), el aumento de k'_{Cat} es un factor determinante en el proceso de electrocatálisis, ya que valores elevados de este parámetro dominan sobre la respuesta electroquímica del MR. La Ec. 21 predice que al aumentar k'_{Cat} el perfil voltamperométrico no perderá su forma sigmoideal ya que predomina el control cinético (Figura 10c, curva obtenida para $n = 1$, $A_e = 1 \text{ cm}^2$, $k'_{\text{cat}} = 1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$, $\Gamma_M = 1 \times 10^{-5} \text{ mol/m}^2$, $\Gamma^* = 1 \times 10^{-7} \text{ mol/cm}^2$). Algunos estudios experimentales como el de Marsili et al., (2008) apoyan este argumento [112]. Tales autores realizaron un estudio electroquímico de la TEED de *Geobacter sulfurreducens* mediante VC. Experimentos a diferentes concentraciones demostraron que cuando se mantenían condiciones de exceso de S (concentraciones superiores a 3 mM) el perfil voltamperométrico mantenía sus valores de corriente máxima.

La Figura 10b muestra el efecto del aumento de k'_{Cat} sobre el comportamiento electroquímico del MR adsorbido (curva simulada para $n = 1$, $A_e = 1 \text{ cm}^2$, $\nu = 1 \text{ mV/s}$). Se observa que a valores bajos de k'_{Cat} , el perfil electroquímico retorna a la forma de pico característico de un proceso reversible. Por otro lado, a medida que aumentan los valores de k'_{Cat} , el proceso comienza a ser controlado por la cinética de regeneración del MR. Entonces, el perfil voltamperométrico recupera la forma sigmoideal. De acuerdo con la Ec. 21, cuando el proceso está controlado por la cinética química la corriente no depende de ν . Por lo tanto, no se muestran cambios significativos en el perfil voltamperométrico con respecto a ν , dando lugar a un valor de corriente constante i_{lim} cuyo valor esta descrito por la ecuación 22:

$$\text{Ec. 22 } i_{\text{lim}} = nFA_e\Gamma_M k'_{\text{cat}}\Gamma^*$$

La cual indica que, el parámetro i_{lim} es proporcional al espesor de la biopelícula (Γ_M) y a k'_{cat} . La Figura 10d (curva obtenida para $n = 1$, $A_e = 1 \text{ cm}^2$, $k'_{\text{cat}} = 1 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$, $\Gamma^* = 1 \times 10^{-6} \text{ mol/cm}^2$, $\nu = 1 \text{ mV/s}^1$) demuestran la proporcionalidad de i_{lim} con tales parámetros, mientras que en la Figura 10b se observa la dependencia del perfil voltamperométrico con el parámetro Γ_x , donde la señal pasa de ser un pico en valores bajos de biomasa en el electrodo a una onda catalítica cuando la biopelícula tiene una densidad celular adecuada. El mismo efecto se observa en la Figura 10b. De este modo se puede afirmar que, la cantidad de electrones obtenidos de S disponibles para la reducción de MR_{ox} es proporcional a densidad celular Γ_x en el electrodo.

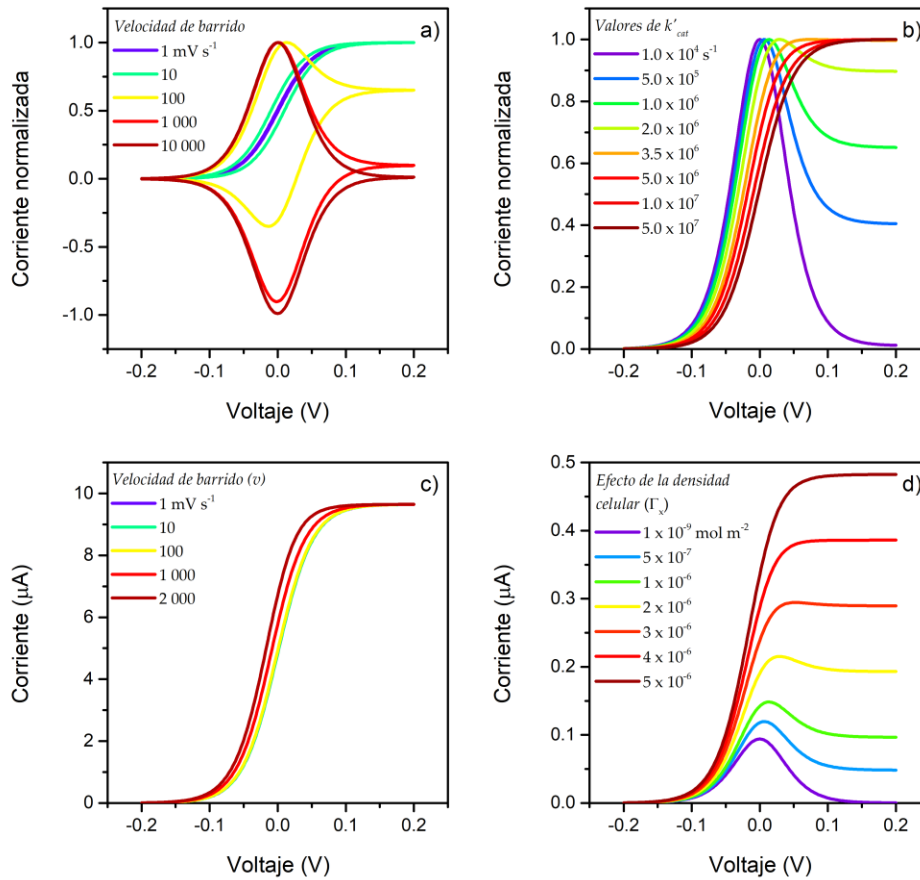


Figura 10. a) Efecto de la velocidad de barrido (v) sobre la respuesta electroquímica del MR en presencia de x y S. b) Efecto de k'_{cat} en el perfil voltamperométrico del MR c) Efecto de v en la onda catalítica del MR bajo condiciones de control cinético d) Efecto de x en el perfil electroquímico del MR. Adaptado de Strycharz et al., (2011) [105].

2.3.1.2 Estudio de la cinética de transferencia extracelular de electrones indirecta

Al igual que en la TEED, en la TEEI se pueden identificar tres pasos principales. No obstante, en este caso, el catalizador x no dispone de las herramientas moleculares necesarias para establecer un contacto físico directo con el electrodo. Por lo tanto, se requiere la introducción de un MR soluble que pueda difundir libremente en el electrolito y en la biopelícula (Figura 11). Este MR debe tener la afinidad adecuada para interactuar con los complejos respiratorios presentes en la membrana de los microorganismos o con los complejos intracelulares capaces de reducirlo. Posteriormente, se lleva a cabo la TEE entre el MR y el electrodo mediante la reacción de oxidación. Es crucial que este proceso sea continuo, lo que implica que el ciclo redox del MR debe ser rápido como para ser considerado reversible, y que a su vez sea estable para

Marco teórico

así no generar reacciones acopladas, lo que le permitirá interactuar nuevamente con el catalizador x para reducirse.

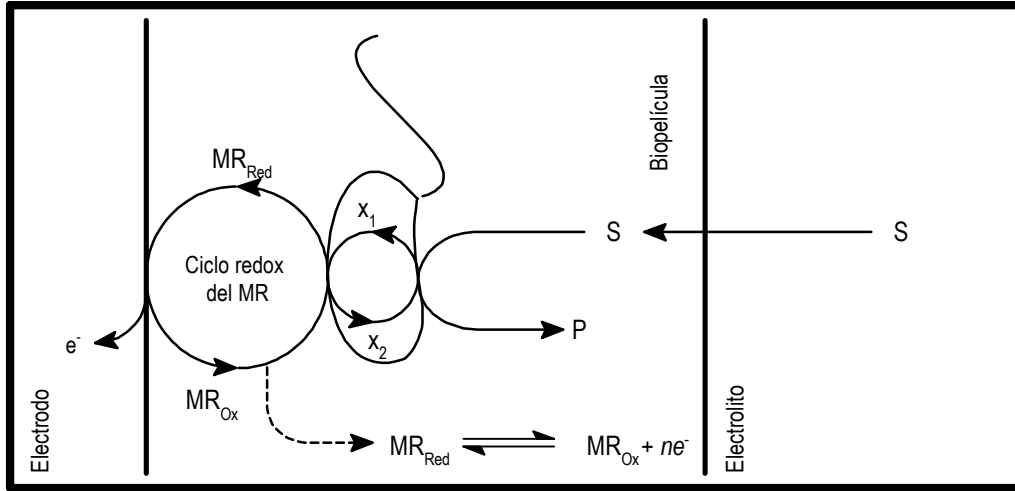
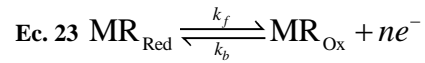


Figura 11. Representación del ciclo de TEEI con MR.

Bajo estas consideraciones, para el análisis de la TEEI entre el MR y el catalizador x es necesario estudiar el comportamiento electroquímico del MR en ausencia de x . Durante un experimento de VC, se inicia un barrido de voltaje desde un valor E_i hasta el voltaje de inversión E_λ o E_1 (Figura 12a). En el voltaje de inversión E_λ el voltaje se invierte hasta alcanzar E_2 , el cual puede tener el mismo valor que E_i [111]. Para una reacción de oxidación reversible al electrodo en la que los procesos faradaicos del MR dominan la TE y no se tienen efectos importantes por limitación del sustrato, entonces se considera la reacción de primer orden:



Donde, de acuerdo con *Randles y Ševčík* (1948), la corriente i del proceso analizado se puede describir mediante la ecuación:

$$\text{Ec. 24 } i = nFA_e C^* \sqrt{\pi D \sigma} \chi(\sigma t)$$

Siendo el término $\sigma = nF/RT$.

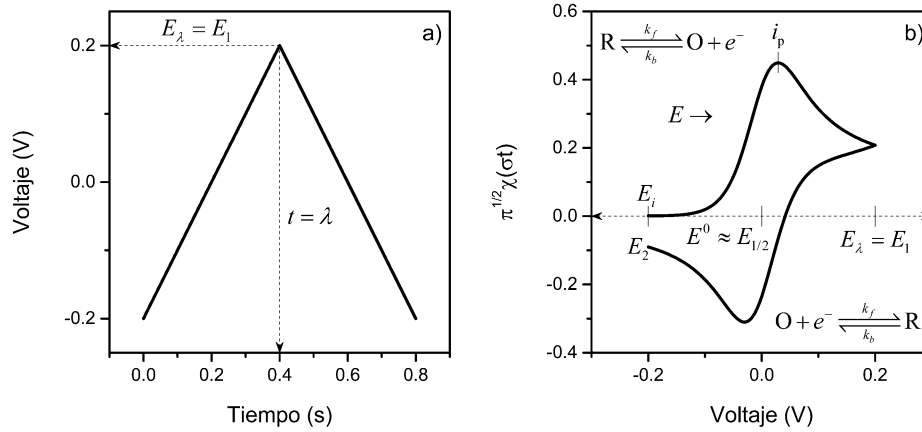


Figura 12. a) Barrido de potencial en función del tiempo (t), el parámetro λ representa el valor de tiempo en el que se invierte el barrido. b) Perfil voltamperométrico característico de un ciclo redox reversible. Adaptado de *Randles & Ševčík (1948)* [113, 114].

A partir de esta ecuación es posible obtener el perfil i vs. E que se presenta en la Figura 12b, siendo la función $\pi^{1/2}\chi(\sigma t)$ la que da forma a este perfil característico [113, 114]. En este punto, la función $\pi^{1/2}\chi(\sigma t) = i / nFA_eC^*D^{1/2}(nF/RT)^{1/2}v^{1/2}$, alcanza un máximo cuando $\pi^{1/2}\chi(\sigma t) = 0.446$. De acuerdo con Matsuda y Ayabe (1955) el valor i_p puede expresarse como:

$$\text{Ec. 25 } i_p = 0.4463 \sqrt{\frac{F^3}{RT}} A_e C^* \sqrt{Dv} \sqrt[3]{n}$$

Para $T = 25^\circ \text{C}$ y reduciendo los términos constantes se obtiene la ecuación 26:

$$\text{Ec. 26 } i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A_e D^{1/2} C^* v^{1/2}$$

Esta expresión matemática es conocida como ecuación de *Randles – Ševčík* [111], y predice que para un experimento electroquímico con valores conocidos de A_e , C^* y D , i_p , y la corriente a lo largo de la curva i vs. E son proporcionales a $v^{1/2}$ [113–115]. En la Figura 13a se presenta el comportamiento de la curva i vs. E como una función de $v^{1/2}$. Utilizando este perfil electroquímico, Matsuda y Ayabe (1955) plantearon diferentes criterios para el análisis y diagnóstico de las curvas i vs. E mediante el estudio del voltaje [115]. Algunos de estos criterios se muestran en la Figura 13b. Tales autores propusieron que el voltaje de pico E_p de una onda reversible cumple con los criterios descritos por la ecuación de *Nernst*, por lo tanto, coincide con la ecuación:

$$\text{Ec. 27 } E_p = E_{1/2} - 1.109 \frac{RT}{nF} = \frac{28.5}{n} \text{ mV, } 25^\circ \text{ C}$$

Así como el voltaje a la mitad del pico $E_{p/2}$ corresponde a la ecuación:

$$\text{Ec. 28 } E_{p/2} = E_{1/2} + 1.09 \frac{RT}{nF} = E_{1/2} + \frac{28}{n} \text{ mV, } 25^\circ \text{ C}$$

Además, como se muestra en la Figura 13b, $E_{1/2}$ se encuentra centrado entre la posición de E_p y $E_{p/2}$, por lo que un diagnóstico adecuado para una onda reversible es:

$$\text{Ec. 29 } |E_p - E_{p/2}| = 2.2 \frac{RT}{nF} = \frac{56.5}{n} \text{ mV, } 25^\circ \text{ C}$$

Para un proceso reversible, E_p es independiente de la v . Algún cambio en la tendencia de este criterio podría indicar complicaciones en el electrodo tales como reacciones acopladas o limitación por la velocidad de transferencia de electrones del MR [111]. De acuerdo con Bard & Faulkner (2002), una constante adecuada para el estudio de la voltamperometría es $i_p/v^{1/2}C^* = b$, conocida también como función voltamperométrica, la cual depende de $n^{3/2}$ y $D^{1/2}$ donde “b” es el valor de una constante [108].

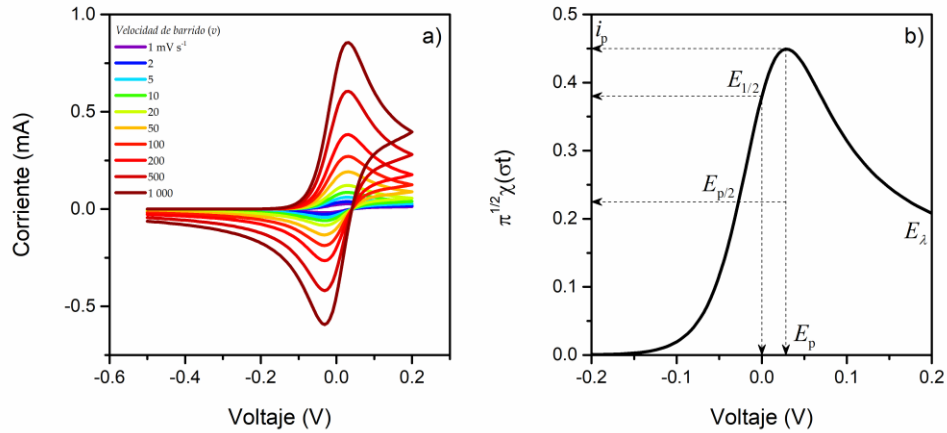
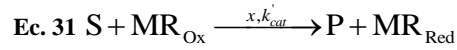
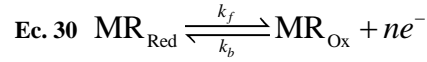


Figura 13. a) Curvas voltamperométricas de un MR a diferentes valores de v para $C^* = 1$ mM, $D = 1 \times 10^{-5}$ cm²/s¹, $n = 1$, $A_e = 1$ cm². b) Onda voltamperométrica reversible en la que la corriente adimensional es función de $\pi^{1/2}\chi(\sigma t)$. Adaptado de Matsuda & Ayabe (1955) [115].

Al igual que en la teoría de la capa fina, la forma del perfil voltamperométrico del MR cambia en presencia del catalizador x , dando lugar a un perfil con una típica forma sigmoideal, la cual es característica de un proceso catalítico [110]. Como se dijo al principio de esta sección, en la TEEI el MR se encuentra

Marco teórico

soluble en el electrolito y, por lo tanto, se puede considerar que difunde libremente por la biopelícula y el electrolito, descartando así posibles complicaciones como la adsorción sobre el electrodo. Por lo tanto, las reacciones para este proceso están determinadas por:



De acuerdo con Rousseau et al., (2014) [106], el flujo en el electrodo para este mecanismo está determinado por las ecuaciones:

$$\text{Ec. 32 } \frac{\partial C_{\text{Red}}}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_{\text{Red}}}{\partial x^2} + k_{cat}' C_S$$

$$\text{Ec. 33 } \frac{\partial C_{\text{Ox}}}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_{\text{Ox}}}{\partial x^2} - k_{cat}' C_S$$

Así, considerando que la oxidación del MR ocurre en el electrodo, y que la reducción es un proceso llevado a cabo por x , entonces la ecuación que representa a la corriente cinética i_k de acuerdo con Torres et al., (2008) [116] es:

$$\text{Ec. 34 } i_k = i_{\text{lim}} \left\{ \frac{1}{1 + \exp \left[\frac{nF(E - E^0)}{RT} \right]} \right\}$$

Según lo indican Rousseau et al., (2014), si se considera que el MR difunde libremente en la biopelícula y que S corresponde al acetato, entonces i_{lim} esta descrito por la ecuación:

$$\text{Ec. 35 } i_{\text{lim}} = nFA \sqrt{8 \left(\frac{k_{cat}' C_M \Gamma_M A_e}{DC_{\text{Red}}^*} \right)}$$

Por lo tanto, si Ec. 35 se sustituye en Ec. 34, la corriente catalítica para un proceso de difusión se describe por:

$$\text{Ec. 36 } i = \frac{nFA_e \sqrt{8 \left(\frac{k'_{cat} C_x \Gamma_x A_e}{DC_{Red}^*} \right)}}{1 + \exp \left[\frac{nF(E - E^0)}{RT} \right]}$$

De este modo, cuando la velocidad de regeneración del MR (reacción de la Ec. 31) es más rápida que la velocidad de TE al electrodo (reacción de la Ec. 32) el perfil voltamperométrico corresponde al de la Figura 14a (línea en color claro), mientras que en ausencia de x o de S , el perfil voltamperométrico coincide con el perfil de un proceso reversible (Figura 14a, línea en color oscuro). Al igual que en el perfil de la capa delgada, la respuesta de la electrocatálisis microbiana se ve afectada a medida que aumenta el valor de ν . Esto se debe a que, a valores altos de ν , la velocidad de TE del MR domina el proceso. Esto ocurre cuando k'_{cat} mantiene valores relativamente bajos, provocando que el perfil voltamperométrico pierda su forma sigmoideal y retornando a la forma típica de un proceso reversible. Sin embargo, si el valor de k'_{cat} aumenta de tal modo que la relación $k'_{cat} / \nu = \gamma$ es mayor a 0, se recupera el perfil catalítico debido a que la velocidad de regeneración del MR domina el proceso. Según Rountree et al., (2014) al dominar el proceso cinético, el mecanismo se mantiene en la región cinética pura. En esta región, la corriente i no depende de ν , tal como lo indica la Ec. 36 [117]. De este modo, el modelo de Rousseau et al., (2014) descrito por Ec. 36, predice que la corriente catalítica y la velocidad de regeneración del MR son proporcionales a k'_{cat} y C_M , de tal modo que el perfil voltamperométrico tendría el comportamiento de la Figura 14c y d (parámetros de simulación para la curva de la Figura 14c: $n = 1$, $A_e = 1 \text{ cm}^2$, $T = 25^\circ \text{ C}$, $C^* = 1 \text{ mM}$, $C_M = 5 \times 10^7 \text{ UFC}$, $C_S = 100 \text{ mM}$, $\nu = 1 \text{ V/s}$.; para la Figura 14d: $n = 1$, $A_e = 1 \text{ cm}^2$, $T = 25^\circ \text{ C}$, $C^* = 1 \text{ mM}$, $C_S = 100 \text{ mM}$, $k'_{cat} = 1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $\nu = 1 \text{ mV/s}$) [106].

La Figura 14c muestra el comportamiento de la curva voltamperométrica como una función de k'_{cat} . En la Figura se puede apreciar el cambio en la forma del perfil voltamperométrico a medida que k'_{cat} aumenta. Esto coincide con lo descrito por Rountree et al., (2014) y por Savéant & Vianello (1963), para un proceso catalítico, donde el consumo del sustrato no determina la velocidad de TE. Es decir, que la concentración de S en la superficie del electrodo es igual a la concentración global. Según lo afirman los autores, para lograr acceder a esta región se debe evitar a toda costa el agotamiento de S en el electrodo [117]. Del mismo modo, es posible acceder a esta región si se tienen concentraciones altas de S en relación con el MR, de tal modo que C_S se mantiene en estado estacionario [110]. Nótese que, para valores conocidos de C_x , experimentos a diferentes valores de ν podrían conducir a los valores experimentales de k'_{cat} mediante el análisis de i_{lim} . Además, si se mantiene la condición de estado estacionario para C_S , entonces i_{lim} es proporcional a C_x . El perfil voltamperométrico de la variación de C_x se muestra en la Figura 14d. En experimentos

reales, el modelo de Rousseau et al., (2014) tiene complicaciones debido a que altos valores de x demandan un consumo alto de S [106]. Sin embargo, un sistema de alimentación continua podría prevenir dicho problema. Además, mantener valores altos de x sin interferir con la difusión del MR podría ayudar a mejorar el proceso catalítico.

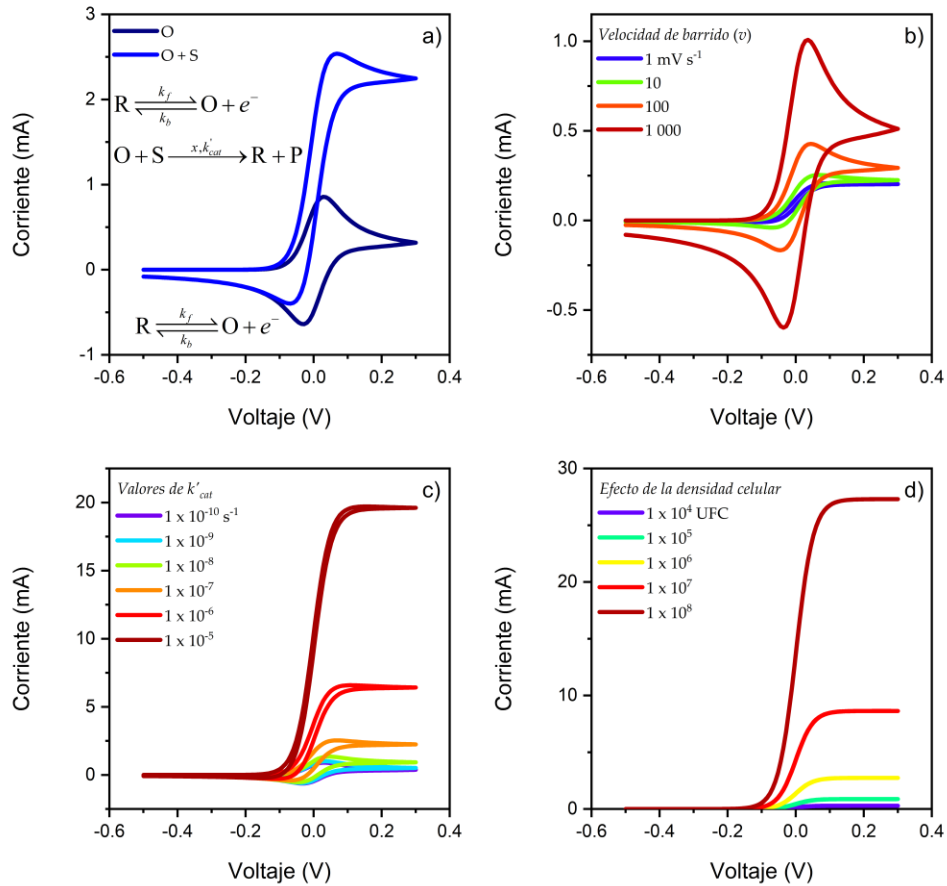


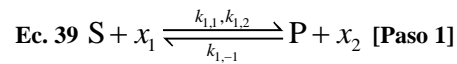
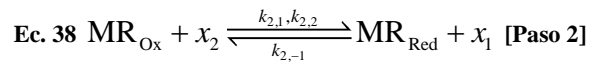
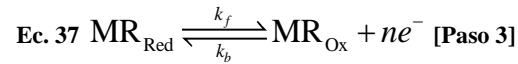
Figura 14. a) Respuesta electroquímica del MR soluble en presencia y ausencia de x . b) Efecto de v en el perfil voltamperométrico de un MR en presencia de S y de x . c) Efecto de la constante de velocidad catalítica k^{cat} sobre el perfil voltamperométrico del MR. d) Efecto de C_x en el perfil voltamperométrico del MR.

2.3.1.3 Efectos del agotamiento del sustrato, mediadores redox y desgaste del catalizador

Bajo condiciones experimentales reales, el proceso de TEE a menudo presenta complicaciones que dificultan la obtención de perfiles voltamperométricos que coincidan con los perfiles teóricos, lo que complica la comparación entre mediciones experimentales y ajustes. Estas complicaciones se deben principalmente a contribuciones adicionales en la corriente, derivadas de procesos de adsorción, agotamiento de

sustrato, densidad celular y afinidad microbiana por el sustrato. Además, el crecimiento celular y la velocidad de reducción u oxidación microbiana del MR también pueden aportar a estas complicaciones. Estas contribuciones deben ser consideradas para una interpretación detallada y correcta de los procesos de TEE obtenidos en mediciones de VC. Así, las aportaciones científicas de Saveant y su equipo de trabajo, quienes se dedican principalmente a la explicación de procesos electroquímicos moleculares, pueden ser un punto de partida para el desarrollo de modelos que permitan explicar los perfiles voltamperométricos obtenidos en procesos electroquímicos microbianos.

Esto es especialmente válido debido a las similitudes encontradas en los perfiles electroquímicos, sobre todo aquellos que son aplicados para la explicación de la cinética enzimática, cuyos modelos de VC se basan en la consideración de la cinética de *Michaelis-Menten*. Derivado de estas consideraciones, varios investigadores han desarrollado modelos voltamperométricos para aplicaciones electroquímicas moleculares, teniendo en cuenta diferentes mecanismos de reacción. En la revisión bibliográfica previa, se abordó el proceso electrocatalítico microbiano y su mecanismo de reacción (Figura 8 y Figura 11). En este mecanismo, el MR se regenera gracias al catalizador x , que obtiene electrones del sustrato S, mostrando una cinética de pseudoprimer orden cuando hay exceso de S. Este mecanismo se conoce como ECC, y para procesos microbianos se puede describir mediante las siguientes reacciones:



En el estudio de reacciones biológicas, la aproximación del estado estacionario se aplica generalmente debido a la rapidez de estas reacciones y al mantenimiento del exceso de S. Sin embargo, es importante reconocer que esta aproximación no siempre es válida en todos los sistemas [118]. El agotamiento de S puede llevar a una interpretación errónea del orden de reacción en S y x [119], siendo especialmente relevante en procesos electroquímicos microbianos donde sustratos de alta afinidad pueden ser consumidos rápidamente por los microorganismos, generando así un agotamiento importante. Cuando no hay consumo de S, la respuesta electroquímica sigue el comportamiento clásico sigmoidal (Figura 15b). Sin embargo, la respuesta puede desviarse de esta forma debido a fenómenos secundarios. Por ejemplo, en la Figura 15a y 15b, se observa que la influencia del consumo de S aumenta a medida que disminuye su concentración [117]. La corriente de meseta muestra un aumento inicial proporcional a la concentración de S antes de

alcanzar un límite, donde el control cinético cambia de la reacción del paso 2 a la reacción del paso 3, siguiendo así un comportamiento similar al modelo de *Michaelis-Menten* para la velocidad de reacción [119].

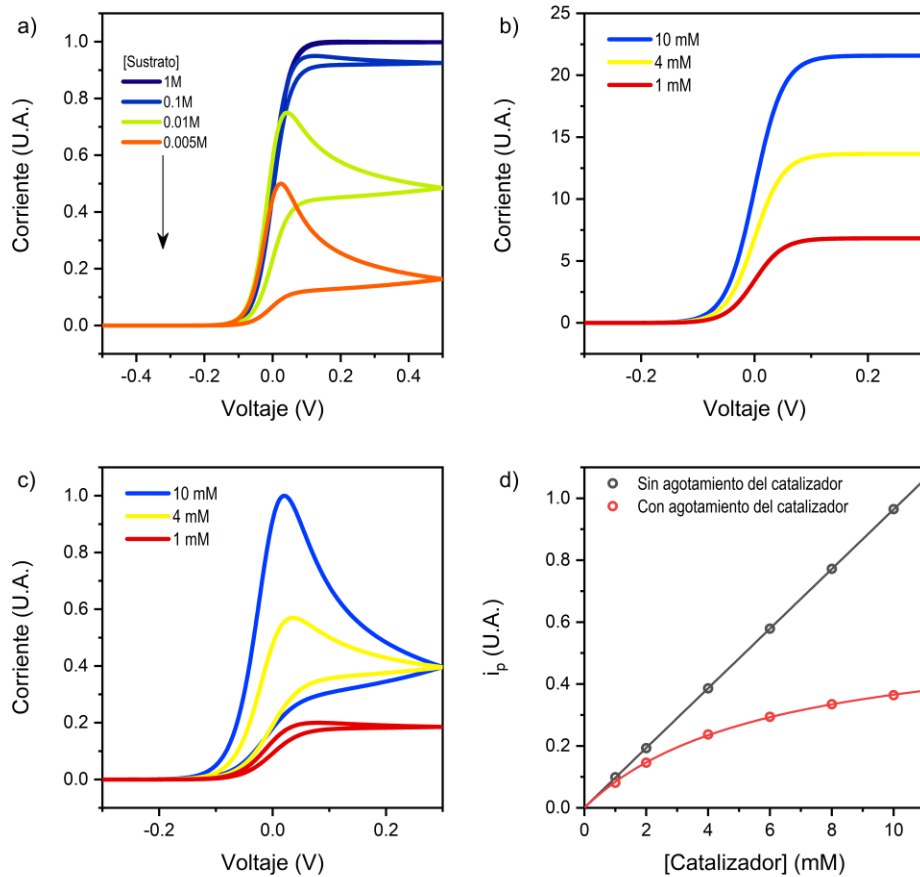


Figura 15. a) Curvas voltamperométricas obtenidas por Rountree et al., (2014), donde se observa el efecto del agotamiento de S en la respuesta electroquímica del proceso catalítico. b) Voltamperogramas cíclicos que muestran el efecto de la concentración del catalizador bajo condiciones de no agotamiento de sustrato y c) bajo condiciones de agotamiento de sustrato. d) Dependencia de la corriente de pico de la concentración del catalizador con y sin agotamiento de sustrato [117].

Previamente se mencionó que este comportamiento ha sido observado en estudios experimentales. Por ejemplo, Marsili et al. (2008) estudiaron una biopelícula de *G. sulfurreducens* y observaron que, al reducir las concentraciones de sustrato de acetato, la corriente anódica limitante aumentaba linealmente cuando el acetato era $< 200 \mu\text{M}$. Sin embargo, a concentraciones superiores a 3 mM, la corriente anódica limitante no cambió, sugiriendo un cambio en el mecanismo de reacción dependientes de la concentración del acetato

[112]. Además, Yang et al. (2017) reportaron observaciones similares en biopelículas de *S. oneidensis* al variar la concentración del co-sustrato o MR bajo condiciones de exceso de S. En este caso, la corriente de salida aumentaba proporcionalmente con el incremento de la concentración del MR, pero una vez que la concentración superó los 300 nM, el aumento se suprimió significativamente [71]. Por otro lado, Hamelers et al. (2011) realizaron observaciones acerca de la dependencia de la corriente máxima en función de la concentración de S, y propusieron un modelo matemático denominado *Butler-Volmer-Monod* para explicarlo. Mediante el ajuste de la ecuación de *Monod* a las curvas experimentales de corriente versus la concentración de S, pudieron determinar la K_S aparente (constante de afinidad por el sustrato). Los valores obtenidos para la K_S aparente fueron de 0.37 mM a un potencial de -0.4 V vs. Ag|AgCl, y de 2.2 mM a -0.3 V vs. Ag|AgCl, destacando la importancia del potencial del electrodo sobre la variabilidad del parámetro K_S [120].

Adicionalmente, se ha sugerido que el proceso de electrocatálisis microbiana puede estar limitado por la concentración del catalizador x . Esto puede deberse al ciclo de vida celular, donde la electrocatálisis podría estar limitada por la fase lag de los microorganismos, y por la muerte celular al final de su ciclo de vida. Para abordar la descomposición de x , Marsili et al. (2008) realizaron experimentos con diferentes valores de x en el electrodo inmovilizando las células de *G. sulfurreducens* con pectina, la cual podría cumplir con una función adicional como MR. Observaron que la corriente de meseta aumentó con el incremento de x en los recubrimientos, pero se aproximó a valores de saturación al agregar cantidades superiores a 1×10^9 células/cm² [121]. Sin embargo, los valores de corriente de meseta mostraron una correlación lineal con respecto a x , lo que coincide con el comportamiento observado en la Figura 15d, el cual se cumple cuando no se presenta agotamiento de S [117]. Asimismo, Zheng et al. (2015) estudiaron biopelículas de *P. aeruginosa* PAO1 con modificación genética, lo cual resultó en un comportamiento catalítico diferente comparado con las biopelículas sin modificación. La corriente aumentó significativamente en la variante genética, aunque no logró alcanzar el comportamiento sigmoidal, lo que sugiere una mejora en el transporte de masa del sustrato, lo que permitiría una mayor asimilación de sustrato y, por lo tanto, una mayor densidad celular en el electrodo, llevando al agotamiento del sustrato y generando el perfil observado [122]. Rountree et al. (2014) propusieron que el impacto de la descomposición del catalizador puede disminuir a mayores valores de v , sugiriendo la necesidad de realizar experimentos a diferentes velocidades de barrido para confirmar este mecanismo [117]. En mediciones voltamperométricas experimentales de biopelículas electroactivas, es común observar un fenómeno denominado "*cruce de curvas voltamperométricas*". A pesar de su frecuencia, la explicación de este efecto ha pasado por alto en varias ocasiones. De acuerdo con Saveant y Costentin, (2019), este cruce de curvas catalíticas en procesos enzimáticos puede atribuirse a

Marco teórico

fenómenos de histéresis y cruce de trazas, debido a la complejidad de los procesos biológicos. Estos expertos realizaron simulaciones considerando estos fenómenos, como se muestra en la Figura 16, la cual, muestra el comportamiento de histéresis un proceso catalítico que contenía $20 \mu\text{M}$ $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{pyCl}]^{2+}$ como MR, $0.2 \mu\text{M}$ peroxidasa de rábano picante como catalizador y 1 mM H_2O_2 como sustrato, y notaron un incremento en el cruce de curvas al aumentar los valores de ν [118]. La histéresis es un efecto de no linealidad que representa la tendencia de un material a conservar una de sus propiedades en ausencia del estímulo que la originó. En el contexto de un proceso electroquímico microbiano, esto podría deberse a la acumulación de carga en la biopelícula o a la presencia de especies químicas que contribuyen a la reacción redox, así como la adsorción de otros compuestos o la existencia de intermediarios.

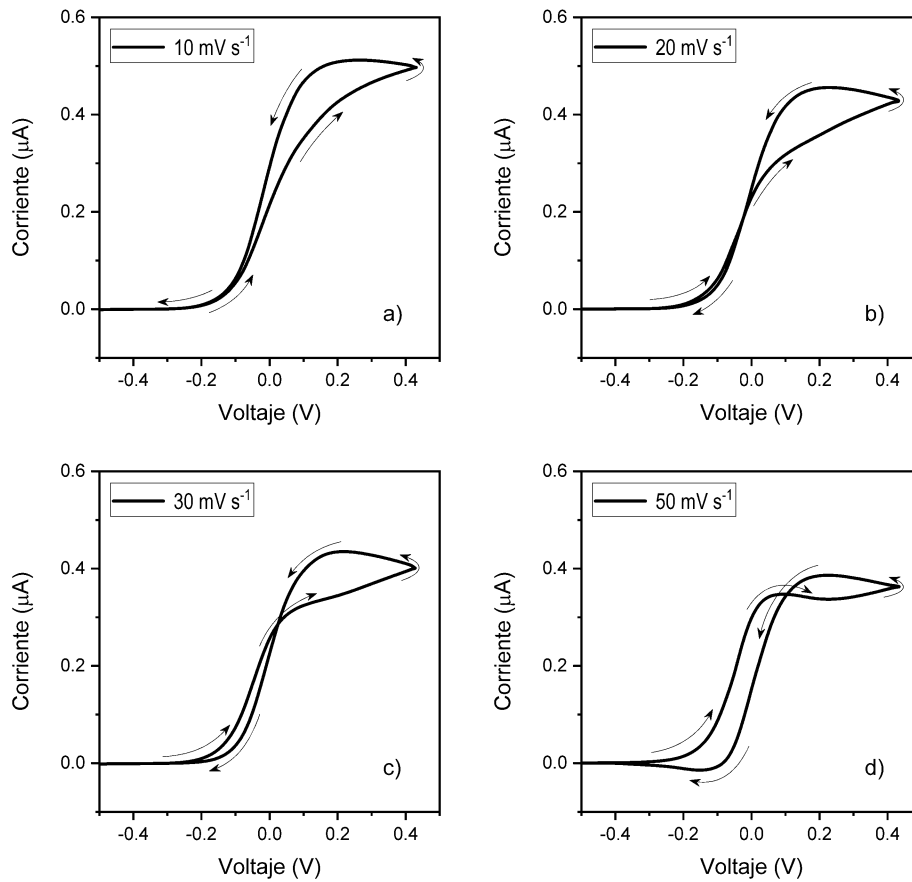


Figura 16. Voltamperogramas cíclicos que muestran el efecto de histéresis en función de la velocidad de barrido (ν) para un proceso de catálisis enzimática de la peroxidasa de rábano picante, en presencia de H_2O_2 como sustrato y $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{pyCl}]^{2+}$ como MR [118].

Algunos trabajos experimentales como los de Torres et al., (2008); Fricke et al., (2008); y Richter et al., (2009) han mostrado perfiles catalíticos en biopelículas de ciertos microorganismos con el efecto de

cruce, sin embargo, una explicación exhaustiva de este fenómeno aún no ha sido proporcionada [116, 123, 124]. Además de las complicaciones cinéticas, otros factores pueden influir en la caracterización y análisis electroquímico de la TEE. A menudo se asume que la biopelícula es una capa uniforme; sin embargo, en realidad, estas biopelículas suelen ser porosas y generar diferentes vías de transporte de especies químicas, lo que afecta la transferencia de masa en la cercanía del electrodo y depende de las interacciones que S, M y el MR puedan tener en la matriz de la biopelícula.

2.3.1.4 Identificación de procesos de adsorción acoplada a difusión de mediadores redox en el electrodo

La adsorción de los MR es un proceso frecuente en la TEE. Este comportamiento se debe a que la mayoría de los MR utilizados en TEE son moléculas orgánicas y compuestos de coordinación que contienen ligantes aromáticos, cuyas estructuras moleculares presentan afinidad con la estructura cristalina de los electrodos. Dado que los electrodos más comunes son aquellos basados en materiales de carbono, estos suelen contener porciones grafiticas que propician interacciones del tipo π -stacking con los MR. El π -stacking es una interacción no covalente que se produce entre moléculas con sistemas π conjugados, como anillos aromáticos o dobles enlaces, alineándose de manera paralela y apilándose una sobre otra. Esta configuración resulta en una fuerza atractiva de *Van der Waals*, lo que conduce a una interacción estable entre las moléculas. Estas interacciones facilitan la adsorción de los MR sobre la superficie del electrodo, aumentando la disponibilidad de sitios de transferencia de electrones y mejorando la cinética de la reacción.

La formación de interacciones π -stacking entre los MR y el electrodo promueve la transferencia de electrones a través de la interfaz electrodo-mediador. Cuando los MR se adsorben en la superficie del electrodo mediante interacciones π -stacking, los electrones pueden transferirse de manera más eficiente entre los orbitales π de la molécula y los estados electrónicos del electrodo. Previamente, la adsorción mediada por interacciones intermoleculares entre los MR y los electrodos ha sido documentada. Por ejemplo, Wei y Omanovic (2008) demostraron que el FAD, un MR común en TEE de especies del género *Shewanella*, mostraba una fuerte adsorción espontánea en un electrodo de carbón vítreo debido a posibles interacciones electrostáticas con el electrodo [84]. Posteriormente, se propuso que la adsorción no específica de FAD con el electrodo de carbón vítreo era consecuencia de interacciones de tipo π -stacking [125]. Además, las interacciones *intramoleculares* de tipo π -stacking entre la estructura de isoalloxazina y sus grupos funcionales también pueden tener un papel relevante en el mecanismo de TEE entre las flavinas y los electrodos [82, 126, 127]. Además de los procesos de adsorción, procesos químicos pueden alterar el ciclo redox del MR. Tan et al. (2013) reportaron que el comportamiento atípico del ciclo redox del FMN y el FAD se debía a reacciones de TE acopladas a H^+ , derivadas de interacciones de puente de hidrógeno entre el solvente y la

región electronegativa de la estructura de isoalloxazina de las flavinas [85]. Estos comportamientos también se han observado en otras flavinas, como en el caso de la RF [86].

Por otro lado, se ha reportado la adsorción de fenazinas sobre electrodos de carbono, aunque el origen y mecanismo preciso de esta adsorción aún no han sido completamente esclarecidos [93, 128]. Además, se ha observado evidencia probable de este proceso en fenazinas importantes en el metabolismo de *P. aeruginosa*, como el PCA y PIO, a través del análisis de perfiles electroquímicos obtenidos por otros investigadores [129, 130]. Es importante tener en cuenta que la adsorción en el electrodo puede contribuir a la corriente de difusión del MR, lo que puede alterar el comportamiento electroquímico esperado para un MR reversible. Esto puede ocasionar complicaciones en la interpretación de los perfiles electroquímicos obtenidos. Por ejemplo, Shen et al. (2017) observaron un aumento en la generación de bioelectricidad en una celda de combustible microbiana inoculada con *P. aeruginosa*, atribuyendo este incremento a una mayor producción de PIO relacionada con un aumento en la permeabilidad de la membrana de *P. aeruginosa* por la producción de soforolípidos. A pesar de que los autores realizaron mediciones de VC, no pudieron esclarecer el mecanismo de TEE en la superficie del electrodo [131].

En otra investigación, Yong et al. (2014) obtuvieron resultados similares, donde los autores informaron sobre la manipulación de cofactores esenciales en el proceso intracelular de transporte de electrones, como el par NADH/NAD⁺. Este incremento en los cofactores mejoró significativamente la generación de bioelectricidad en la celda inoculada con *P. aeruginosa* debido al aumento en la concentración de PIO. Sin embargo, a pesar de realizar mediciones de VC, los autores no pudieron obtener información detallada sobre el mecanismo de TEE en la superficie del electrodo [132]. Casos similares también han sido reportados por Yong et al. (2014, 2017) en estudios con *P. aeruginosa*, donde manipularon cofactores esenciales en el proceso intracelular de transporte de electrones para mejorar la generación de bioelectricidad, pero sin lograr obtener información detallada sobre el proceso en la superficie del electrodo [133, 134]. En todos estos casos, el perfil electroquímico observado para PIO fue similar al esperado para una adsorción. Los investigadores utilizaron electrodos de tela de carbono, los cuales, debido a su naturaleza porosa y la presencia de secciones gráficas en las fibras, podrían propiciar la adsorción de PIO, controlando así el mecanismo por la adsorción del MR y evitando visualizar el proceso catalítico esperado.

Además, se ha observado que en estudios de TEE mediada por flavinas en cultivos de *Shewanella*, los perfiles electroquímicos de la RF producida por *Shewanella* fueron similares a los reportados para la adsorción [21]. Estudios similares realizados por Baron et al. (2009) también obtuvieron desviaciones en el perfil catalítico de RF, que podrían estar asociadas a dicho proceso [135]. Los perfiles electroquímicos obtenidos en la adsorción dependen en gran medida al tipo de interacción formada entre el electrodo y el

Marco teórico

MR. De acuerdo con Laviron (1964), se pueden tener interacciones repulsivas y atractivas en la superficie del electrodo. Estas interacciones provocan que la forma de la curva de VC (dada por el parámetro Ψ) se vea afectada [136]. La deducción de la ecuación que define este perfil electroquímico parte de una isoterma tipo *Frumkin* que considera las interacciones atractivas y repulsivas, y esta a su vez, está basada en la aproximación de *Bragg-Williams* la cual está dada por la ecuación:

$$\text{Ec. 40 } C_{\text{Red}} = \frac{\Gamma_{\text{Red}}/\Gamma_s}{\beta(1-\Gamma_{\text{Red}}/\Gamma_s)} \exp(-g' \Gamma_{\text{Red}}/\Gamma_s)$$

Donde los parámetros β y g' caracterizan la magnitud de las interacciones entre la especie Red u Ox con el electrodo [137]. De este modo, de acuerdo con la aproximación de *Laviron*, la ecuación que describe el perfil voltamperométrico está dada por:

$$\text{Ec. 41 } \Psi = \frac{f(1-f)}{1-2v'g\theta_T f(1-f)}$$

Donde:

$$\text{Ec. 42 } f = \frac{\theta_{\text{Ox}}}{\theta_T}$$

$$\text{Ec. 43 } \theta_T = \theta_{\text{Ox}} + \theta_{\text{Red}}$$

Siendo los parámetros θ_{Ox} y θ_{Red} la fracción total de superficie recubierta por las especies Ox y Red respectivamente. La solución del parámetro Ψ conduce a los perfiles mostrados en la Figura 17a, siendo el valor máximo de este perfil Ψ_{pico} determinado por la ecuación:

$$\text{Ec. 44 } \Psi_{\text{pico}} = \frac{1}{4-2v'g\theta_T}$$

Además, el ancho de los picos (FWHM por sus siglas en inglés, full-width-half-maximum) está determinado por el parámetro $v'g\theta_T$, de acuerdo con la relación:

$$\text{Ec. 45 } n(\text{FWHM}) = \frac{2RT}{F} \left| \ln \frac{1+\beta}{1-\beta} - v'g\theta_T \beta \right|$$

De este modo, el parámetro $v'g\theta_T$ es conocido como el *parámetro de interacción de Laviron*, y su valor, indica la existencia de interacciones repulsivas o atractivas entre las especies redox Ox y Red con el electrodo. De acuerdo con Laviron, cuando $v'g\theta_T < 0$, las interacciones repulsivas se hacen presentes, provocando que la curva VC sea más ancha (Figura 17a). Por el contrario, cuando $v'g\theta_T > 0$, las interacciones atractivas dominan, lo que provoca que el perfil VC se vuelva más estrecho (Figura 17a). En el caso de que $v'g\theta_T = 0$ se determina que la adsorción es independiente de las interacciones, es decir, no existe interacción entre las especies redox adsorbidas y el electrodo. Bajo esta condición, la respuesta electroquímica cumple con una isoterma de adsorción de tipo *Langmuir* en lugar de una de tipo *Frumkin* [109].

Bajo condiciones experimentales reales, las interacciones entre el MR y el electrodo son frecuentes. Generalmente, los MR empleados son solubles y difunden en el electrolito. De este modo, se hacen presentes procesos difusivos y de adsorción combinados. Kurapati et al. (2018) han estudiado estos procesos electroquímicos, y han desarrollado modelos matemáticos que después son comparados con respuestas electroquímicas experimentales [137]. En la Figura 17b se presenta el caso del complejo $FcTMA^+$. Para el caso de esta molécula, el valor del parámetro de interacción es de -0.3 ± 0.2 , lo que puede interpretarse como una atracción repulsiva de baja energía. Los autores asignan este comportamiento a la presencia del enlace con H y del ligante $CH_2N^+(CH_3)_3$, lo que podría conferir mayor carga positiva al complejo. Cuando el ligante $CH_2N^+(CH_3)_3$ es sustituido por CH_2OH (complejo $FcCH_2OH$), la presencia de cargas positivas mejora la interacción de atracción con el electrodo, lo que da lugar a la presencia de interacciones de atracción débiles, esto como consecuencia de la carga del enlace con H, lo que interfiere en el total de la energía de interacción entre el complejo $FcCH_2OH$ y el electrodo. Esto da lugar a un valor del parámetro de interacción sea de $+1.2 \pm 0.6$, lo que se considera como una interacción de atracción débil y da lugar al perfil electroquímico observado en la Figura 17c.

Nótese que el pico de oxidación se vuelve más estrecho como consecuencia del cambio en los valores del parámetro de interacción de *Laviron* y del aumento en la densidad electrónica en la molécula. Posteriormente, el enlace con H se sustituye por el ligante CH_2OH (complejo $Fc(CH_2OH)_2$), lo que mejora la densidad electrónica en la molécula, dando lugar a una interacción más fuerte con el electrodo. Este fenómeno origina el perfil electroquímico sea el observado en la Figura 17d, mostrando una señal más estrecha. En este caso, el valor del parámetro de interacción es de $+3.2 \pm 0.3$, lo que se considera una adsorción fuerte. Pese a que aún no se ha reportado, este comportamiento ya se ha observado en PIO. Recientemente, Bacame-Valenzuela et al., (2020a,b) reportaron el perfil electroquímico de PIO producida por *P. aeruginosa* NEJ01R y NEJ03R. Los autores indicaron que la reacción redox de PIO no era la esperada para un

proceso redox reversible sin complicaciones, asegurando que existía una contribución a la corriente de la reacción redox, posiblemente como consecuencia de la adsorción al electrodo [93, 128].

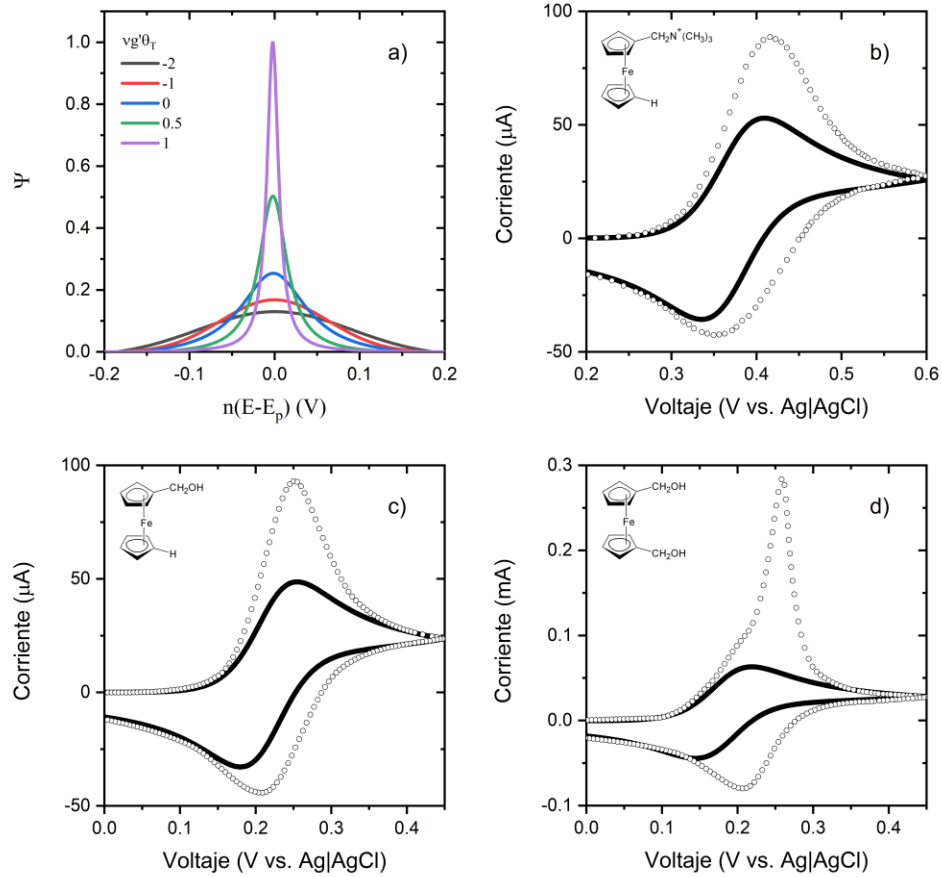


Figura 17. Perfiles electroquímicos obtenidos para una adsorción del MR con interacción al electrodo. a) Variación de la función Ψ con el parámetro $v'g^0_T$ a 25°C según el modelo propuesto por Laviron (1974) [136]. Voltamperogramas cíclicos para diferentes compuestos redox sobre grafito pirolítico altamente orientado en presencia de 1M de KCl y a obtenidos a una velocidad de barrido (v) de 1 V/s: b) 3 mM de FcTMA⁺, c) 3 mM de FcCH₂OH y d) 3 mM de Fc(CH₂OH)₂. Las líneas continuas representan el proceso redox sin adsorción mientras que las líneas punteadas representan la respuesta con adsorción [137].

Los autores demostraron el proceso de adsorción empleando la función voltamperométrica, la cual está dada por la ecuación:

$$\text{Ec. 46 } \pi^{1/2} \chi(\sigma t) = \frac{i}{nFAC_{\text{Red}}^* D_{\text{Red}}^{1/2} \left(\frac{nF}{RT} \right)^{1/2} v^{1/2}}$$

Donde i representa la corriente experimental obtenida de la medición voltamperométrica [108]. Como se mencionó anteriormente, el parámetro $\pi^{1/2}\chi(\sigma t)$ define la forma del perfil electroquímico, y en un proceso redox sin complicaciones la aplicación de esta función en experimentos a diferentes valores de ν da como resultado que todos los perfiles encajen perfectamente uno sobre otro debido a que $\pi^{1/2}\chi(\sigma t)$ es constante. Sin embargo, como se muestra en la Figura 18a, la corriente de oxidación aumenta en función de ν [93]. La aparición de estos procesos afecta directamente a los perfiles observados en procesos electroquímicos microbianos. Yang et al., (2017), estudiaron la TEE de *S. oneidensis* MR-1 sobre un electrodo de tela de carbono, empleando PIO como MR. Los autores realizaron experimentos a diferentes concentraciones de PIO y demostraron la TEE de *S. oneidensis* mediada por dicha molécula, obteniendo perfiles electroquímicos característicos de una catálisis al electrodo. Sin embargo, se observó que, al emplear una concentración de PIO superior de 300 mM, se hace presente un pico con la forma característica de una adsorción sumado a la catálisis (Figura 18b). Por lo que concentraciones altas de PIO podrían afectar la catálisis observada en un proceso de TEE. Esto podría explicar los resultados obtenidos por Yong, donde no es posible observar el proceso catalítico de *P. aeruginosa*, debido a que la concentración de PIO es lo suficientemente alta como para que el proceso de adsorción domine el mecanismo.

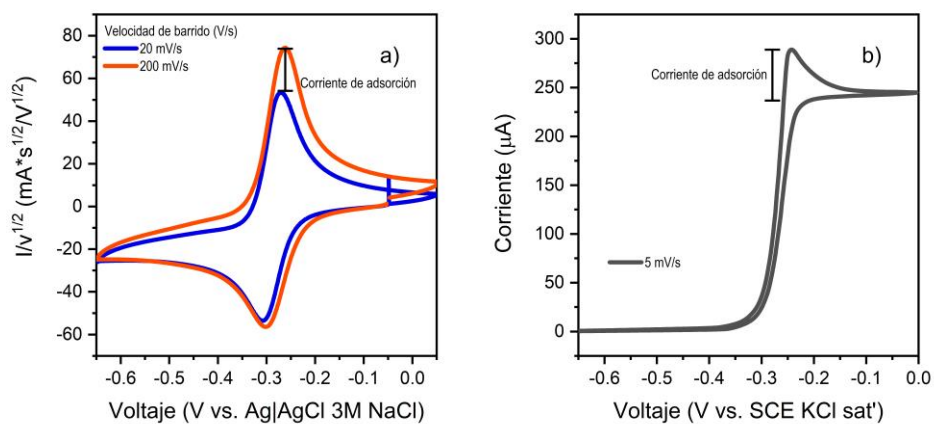


Figura 18. a) Voltamperograma cíclico de PIO (0.14 mM) a corriente normalizada de acuerdo con la Ec. 46 a diferentes valores de ν , empleando una solución de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0.2 M a pH 7 como electrolito soporte y una superficie de carbón vítreo como electrodo de trabajo [93]. b) Voltamperograma cíclico de PIO (1 μM) obtenido de un electrodo de tela de carbono colonizado con *S. oneidensis* MR-1, se usó medio mineral M9 (95%) + medio LB (5%) como electrolito soporte y 10 mM de lactato como sustrato [71].

Los perfiles electroquímicos obtenidos durante la TEE dependen en gran medida de las interacciones establecidas entre el electrodo y el MR. El estudio de estas interacciones mediante la aproximación de

Marco teórico

Laviron ha proporcionado una comprensión más profunda de los mecanismos subyacentes en los procesos electroquímicos de los MR. Los parámetros de interacción de Laviron, $v'g\theta_T$, han demostrado ser útiles para caracterizar la naturaleza atractiva o repulsiva de las interacciones entre los MR y el electrodo. La presencia de interacciones repulsivas o atractivas entre el MR y el electrodo puede tener un impacto significativo en la forma de los perfiles voltamperométricos. Asimismo, la adsorción del MR al electrodo puede ser un factor relevante en la interpretación de respuestas electroquímicas, especialmente en sistemas electroquímicos microbianos. Los estudios de casos como el complejo FcTMA⁺ y la PIO han ilustrado cómo cambios en la estructura molecular y las cargas pueden influir en las interacciones y, en consecuencia, en la respuesta electroquímica observada. En resumen, la comprensión de las interacciones entre el electrodo y el MR es decisivo para un diseño efectivo de procesos electroquímicos microbianos y para interpretar adecuadamente las respuestas experimentales en el estudio de la TEE, lo que podría abrir nuevas oportunidades en el desarrollo de aplicaciones en diversos campos de la electroquímica y la microbiología.

3 Materiales y Métodos

3.1 Cepa y condiciones de cultivo

Se utilizó una cepa de *P. aeruginosa* NEJ07R (GenBank: MZ835664.1), aislada de las aguas residuales de la industria del procesamiento de maíz. La cepa se cultivó en caldo Luria – Bertani (LB), cuya composición fue peptona de caseína 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 0.5 g/L. Las células fueron recuperadas por centrifugación y posteriormente re-suspendidas en una solución de glicerol:cultivo (50:50) para después ser resguardadas en ultracongelación (-80 °C) en alícuotas de 2 mL. Antes de cada prueba biológica se seleccionó una alícuota de *P. aeruginosa* NEJ07R y se inoculó en caldo LB. El cultivo resultante se incubó durante 24 horas a 30° C en agitación (200 rpm). Después se inoculó el cultivo en agar LB (peptona de caseína 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 0.5 g/L y 15 g/L de agar bacteriológico) mediante siembra por estría para la obtención del preinóculo fresco. Éste se incubó durante 24 horas a 30° C y después se empleó una asada del césped celular obtenido en caldo LB como inóculo fresco. Este inóculo se incubó a 30° C, 200 rpm durante 4 horas o hasta obtener una densidad óptica (DO600) aproximada de 0.8 UA. Se utilizó 1 mL del caldo bacteriano obtenido para inocular 50 mL de medio LB estéril. Los estudios de consumo de sustrato utilizaron 3 fuentes de carbono: glucosa, fructosa y galactosa (PM: 180.16 g/mol). El medio de cultivo incluyó 3 soluciones: a) Na₂HPO₄ 25.6 g/L, KH₂PO₄ 6 g/L, NaCl 1 g/L NH₄Cl 2 g/L; b) fuente de carbono 200 mM; y c) MgSO₄ * 7H₂O 1 M. Se utilizaron 25 mL de la solución a), 25 mL de la solución b) y 50 µL de la solución c). El medio de cultivo obtenido fue nombrado M9-1. Las pruebas para la selección de la fuente de carbono fueron realizadas con agitación (200 rpm) y sin agitación, incubadas a 30° C durante 48 horas. En los análisis electroquímicos se emplearon 10 mL de caldo LB para la colonización de los electrodos. Después de la colonización, la biopelícula fue adaptada a la presencia de la fuente de carbono empleando medio M9-1 suplementado con 10% v/v de caldo LB, designando a este medio como M9-2. Posteriormente, se realizaron pruebas electroquímicas en presencia de una fuente de carbono y de nitrógeno. Para estos análisis se emplearon 10 mL de medio M9-1 en la celda electroquímica. Por último, se realizaron evaluaciones electroquímicas en ausencia de la fuente de carbono y nitrógeno, usando 10 mL de cada una de las siguientes dos soluciones: a) Na₂HPO₄ 12.8 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, NaCl 0.5 g/L y b) MgSO₄ * 7H₂O 1 M. El medio de cultivo obtenido fue designado como M9-3. Las celdas fueron incubadas a 30° C sin agitación entre 60 y 72 horas, o hasta que la corriente eléctrica de respuesta fuera constante.

3.2 Extracción de piocianina

PIO se extrajo de un cultivo de 72 horas de *P. aeruginosa* utilizando una modificación del método de Kurachi (1958) [138]. Se centrifugó el caldo de cultivo, se retiró la biomasa y se recuperó el sobrenadante.

El sobrenadante se filtró en una membrana de 0.22 μm (Nylon). El sobrenadante filtrado se mezcló con cloroformo en una proporción de 1:1. Se añadieron 10 g de Na_2SO_4 a la mezcla para eliminar los sólidos formados. La fracción orgánica obtenida se mezcló con HCl (0.2 N) en una proporción 1:1. La fracción ácida se recuperó y neutralizó con NaOH (0.1 M). La etapa de extracción con cloroformo se repitió al menos 2 veces para obtener la fracción orgánica final. La fracción orgánica final se mezcló con hexanos en una relación 1:1 y se dejó evaporar al aire libre. Al final se obtuvo un polvo azul oscuro, que se almacenó en un recipiente color ámbar a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. La caracterización cromatográfica acoplada a espectrometría UV-Vis y espectrometría de masas (UPLC®-PDA-MS) del extracto resultante se muestra en el Anexo 1.

3.3 Estudio de las reacciones redox de piocianina

Los estudios electroquímicos se llevaron a cabo utilizando las mismas condiciones descritas por Baccame-Valenzuela et al. (2020) [93]. Para los estudios cinéticos y de interacción se utilizaron diferentes concentraciones de PIO (0.49, 0.25 y 0.14 mM), que fueron disueltas en un electrolito que contenía solución buffer de fosfato sódico (0.1 M) a pH 7. El estudio se realizó mediante VC y cronoculombimetría (CC) en un potenciostato/galvanostato BioLogic® VSP. Se utilizó como electrodo de trabajo un disco de carbón vítreo aislado (3 mm de diámetro), que se pulió entre cada experimento con un paño de pulido (Buehler) y polvo de diamante (Buehler 1 μm), seguido de un acabado con polvo de alúmina (Buehler, 0,3 μm). Posteriormente, el electrodo se lavó y se sonicó en agua destilada durante 60 segundos. Se utilizó Ag|AgCl 3M NaCl como electrodo de referencia y un alambre de platino como contraelectrodo. Los electrodos se integraron en una celda de vidrio con un tapón de teflón hidrofóbico. Todos los experimentos se saturaron en N_2 para eliminar el exceso de O_2 , manteniendo inerte la atmósfera experimental. Antes de cada experimento, se realizó una compensación del 85% del decaimiento óhmico mediante EIE. Para ello, se midió el primer punto del espectro de impedancia, correspondiente a la resistencia de la solución (R_{sol}), y se fijó en el valor de voltaje de circuito abierto durante 60 segundos hasta que la variación de voltaje se mantuvo por debajo de 10 mV.

3.4 Colonización del electrodo de trabajo y pruebas de biopelícula

Se llevó a cabo la colonización de un electrodo de tela de carbono (ETC) mediante un procedimiento basado en las metodologías de Ross et al., (2009), Baron et al., (2009) y Yang et al., (2017) [22, 71, 135]. Para ello se empleó una celda electroanalítica de 3 electrodos, usando el ETC desnudo (7 mm de diámetro aproximadamente) como electrodo de trabajo (E_w), un alambre de Ti como contraelectrodo (E_c) y un electrodo de $\text{Hg}|\text{Hg}_2\text{Cl}_2|\text{KCl sat}'$ (ECS) - BioLogic, cat n° A-013430 como electrodo de referencia. Como electrolito soporte se empleó caldo LB estéril ajustado a pH 7. Las mediciones se realizaron en un potenciostato BioLogic® Mod. VSP. Se empleó la técnica de cronoamperometría (CA) de pulso directo para el control

del potencial de la celda, manteniéndose en 0 V vs. ECS, a fin de favorecer las reacciones de oxidación de las fenazinas producidas por *P. aeruginosa* NEJ07R en la interfaz y estimular la formación de la biopelícula. El potencial se mantuvo fijo durante 72 horas o hasta alcanzar la corriente límite, lo que sugiere la adhesión de las células sobre el ETC [135]. Al alcanzar esta condición, el caldo LB gastado fue sustituido por caldo M9-1 fresco, y el electrodo de trabajo colonizado se lavó con solución buffer de fosfato sódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 10 mM, pH = 7) estéril para eliminar las células remanentes del cultivo líquido, fenazinas no adsorbidas y restos de medio de cultivo. Una vez más, al alcanzar la corriente límite, el caldo gastado fue sustituido por medio M9-1 en 3 ocasiones más, asegurando que las mediciones electroquímicas fueran reproducibles. Una vez completado el proceso de colonización, el electrolito M9-1 fue sustituido por M9-2 o M9-3, según las condiciones de sustrato a emplear. El efecto de la adición de PIO también fue estudiado, añadiendo diferentes concentraciones de PIO (8, 4 y 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a los electrolitos M9-2 y M9-3, registrando el comportamiento del sistema mediante mediciones electroquímicas. Los estudios en la interfaz se realizaron mediante VC y voltamperometría de pulso diferencial (VPD). Los estudios de VC se llevaron a cabo a una velocidad de barrido (v) de 10 mV/s. En cuanto a la VPD, los criterios de medición empleados fueron a una longitud de paso inicial (PW) de 100 ms seguido de una altura de paso (PH) de 2.5 mV. Posteriormente, el voltaje se prolongó por un periodo de paso (ST) de 400 ms a una altura (SH) de 5 mV. La velocidad de barrido alcanzada bajo estas condiciones fue de 10 mV/s. Las curvas de VPD fueron ajustadas empleando funciones gaussianas mediante el software OriginPro® 2018 b9.5.1.195.

3.5 Determinación de azúcares reductores mediante el sistema HPLC-IR

La determinación de azúcares reductores (glucosa, fructosa y galactosa) se llevó a cabo mediante HPLC, midiendo de forma simultánea con el método del ácido-3,5-dinitrosalílico (DNS). Las determinaciones cromatográficas se realizaron utilizando un sistema HPLC Acquity® clase H de Waters®, el cual dispone de un sistema de bomba cuaternaria, muestreador, inyector automático y horno de columna. Para la detección de azúcares reductores se empleó como fase estacionaria una columna Shodex® SP-0810 Column, 7 μm , 8 mm x 300 mm, C8 de fase reversa, en un detector de índice de refracción (IR). Como fase móvil se utilizó agua ultrapura grado MS obtenida de un sistema de filtración MilliporeSigma™ Simplicity™. El flujo de trabajo fue de 0.6 mL/min manteniendo una presión de 980 psi, el volumen de inyección se estableció en 20 μL y la temperatura del horno se mantuvo a 60° C. Para la cuantificación de azúcares reductores por el método del DNS, se prepararon 400 mL de solución de NaOH (0.5 N). A continuación, se añadieron 5 g de ácido 3,5-dinitrosalílico manteniendo una agitación constante. Una vez homogénea la mezcla, se añadieron 150 g de tartrato sódico y potásico. La mezcla se dejó en agitación durante toda la noche y se reservó en un recipiente aislado de la luz (4° C). Para la cuantificación de los azúcares reductores, se tomaron 500 μL de la preparación DNS y se introdujeron 10 μL de la muestra a cuantificar. La mezcla

se agitó vigorosamente durante 1 minuto. A continuación, la mezcla resultante se calentó en un sistema de control de temperatura a 100 °C durante 10 minutos. Una vez realizada la reacción se añadió 1 mL de agua fría a la mezcla y luego se midió la absorbancia a 540 nm [139].

3.6 Determinación de fenazinas mediante el sistema HPLC-PDA-MS

Para la separación de fenazinas se utilizó una columna de fase reversa Supelcosil™ LC-ABZ, 25 cm x 4 mm, 5 µm como fase estacionaria, a una temperatura de 25 °C. Como fase móvil se utilizó agua (grado MS) con ácido fórmico al 0.1% (solución A) y acetonitrilo (solución B) en modo de elución gradiente, cuya proporción se muestra en la Tabla 1. El flujo se mantuvo en 0.7 mL/min, el volumen de inyección fue de 10 µL y la temperatura del automuestreador se mantuvo a 15 °C. Cuatro fenazinas fueron identificadas por este método a partir del análisis de los espectros de masas: PIO, PCN, PCA y 1-HP.

Tabla 1. Gradiente de fase móvil empleado para la separación y detección de fenazinas.

Tiempo (min)	Agua + 0.1% Ac. Fórmico (A)	Acetonitrilo (B)
0	90	10
10	50	50
12	50	50
12	90	10
20	90	10

Se empleó un sistema de detección integrado por un detector de matriz de fotodiodos (PDA) y detector de espectrometría de masas (QDa). El detector PDA se programó para adquirir datos en el intervalo de 200-600 nm. Para la detección de masas, el detector QDa se operó en modo electrospray de iones positivo. La temperatura de desolvatación se fijó en 600 °C. Se utilizó el modo MS Scan para obtener el espectro de masas completo con relaciones m/z entre 100 y 400, adquirido con una velocidad de muestreo de 5 puntos/s y el análisis de masas posicionado para diferentes fenazinas. Para la identificación de PIO se ajustó el modo SIR en el ion $[M+H]^+ = 211$ m/z, para PCN fue ajustado en 224 m/z, PCA se ajustó en 225 m/z y para 1-HP se ajustó en 197.15 m/z. La energía de ionización del cono se varió entre mediciones, ajustando el parámetro entre 10 y 50 V, registrando los espectros observados. El análisis de datos y la integración de los cromatogramas se realizó en Empower 3®.

4 Resultados y Discusión

4.1 Estudio electroquímico de piocianina: Velocidad de transferencia electrónica e interacciones intermoleculares

4.1.1 Proceso redox de piocianina

Se investigó el proceso de adsorción de PIO sobre un electrodo de carbón vítreo y sus efectos sobre la resistencia a la transferencia de carga (R_{ct}) hacia la superficie bajo diferentes concentraciones de PIO. Se realizaron estudios de VC a diferentes valores de ν , para determinar las diferencias entre los perfiles electroquímicos obtenidos y comprobar las variaciones en los criterios de reversibilidad típicos observados en estudios previos [93]. Además, al analizar el parámetro i_p , la ecuación de *Randles – Ševčík* (Ec. 26) muestra una visión más amplia de los efectos de la adsorción sobre i_p .

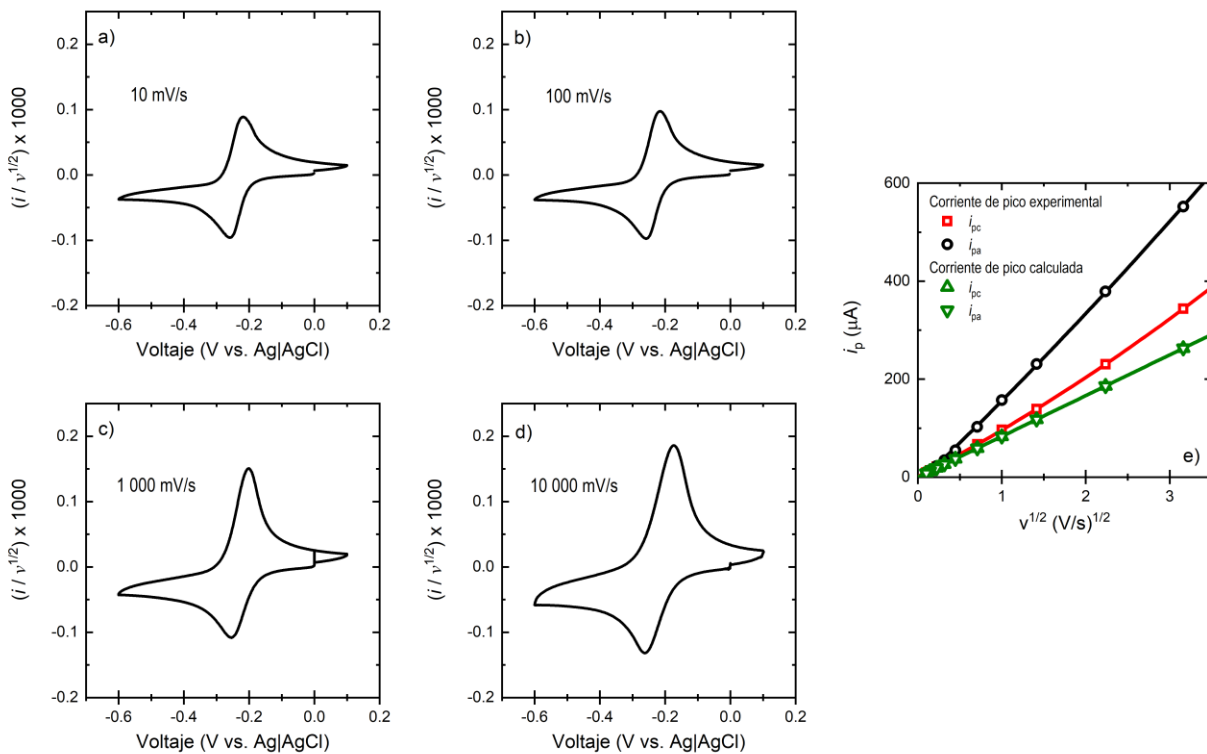


Figura 19. Estudios de VC para PIO (0.49 mM). a) 10 mV/s, b) 100 mV/s, c) 1000 mV/s, d) 10000 mV/s y e) Curva i_p vs. $\nu^{1/2}$ para la respuesta anódica y catódica de PIO.

Resultados y Discusión

En dicha ecuación, el parámetro C_{O^*} corresponde a la concentración de PIO, por convención en esta sección dicho parámetro será definido como C^* . Para un proceso reversible sin complicaciones en el electrodo, i_p debe ser linealmente proporcional a $v^{1/2}$. Cualquier proceso redox acoplado que tenga una contribución a la corriente se mostrará como un aumento o disminución anormal en la tendencia de i_p . Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 19. Los resultados muestran diferencias notables bajo condiciones de electrólisis rápida ($v > 1000$ mV/s). Una de las diferencias más importantes es la dependencia de la corriente pico anódica (i_{pa}) en función del parámetro $v^{1/2}$, reportada previamente [93] (Figura 19e), mostrando un incremento mayor que los valores de corriente pico catódica (i_{pc}) y de los valores calculados esperados para un proceso redox sin complicaciones.

Tabla 2. Criterios de reversibilidad para PIO obtenidos a partir del análisis VC (0.49 mM).

v (mV/s)	ΔE_p (mV)	i_{pa}/i_{pc}	$i_{pa}/v^{1/2*}$	$i_{pc}/v^{1/2*}$
10	40.03	1.04	9.75×10^{-5}	9.35×10^{-5}
100	40.86	1.15	1.05×10^{-4}	9.12×10^{-5}
1000	52.46	1.59	1.54×10^{-4}	9.61×10^{-5}
10000	85.03	1.57	1.74×10^{-4}	1.11×10^{-4}

*Función voltamperométrica $i/v^{1/2}$.

Estudios previos reportaron que el incremento de i_p en sistemas similares es consecuencia de la adsorción al electrodo, tomando como referencia los valores del criterio i_{pa}/i_{pc} , que indica la relación de los picos del ciclo redox. Zuaznabar-Gardona y Fragoso (2022) obtuvieron resultados similares utilizando $FcCH_2OH$ sobre un electrodo de carbón vítreo modificado con nano-cebollas (*nano-onions*) de carbono (GCE/CNO) [140]. En este estudio, bajo condiciones de electrólisis lenta ($v < 1000$ mV/s - Figura 19a y b) a una concentración de 0.49 mM, los valores del criterio i_{pa}/i_{pc} permanecen cercanos a 1, por lo que no hay efectos importantes de la adsorción u otras complicaciones sobre la superficie (Tabla 2). Del mismo modo, los valores del criterio dado por la *función voltamperométrica* ($i_{pc}/v^{1/2}$) permanecen cercanos, indicando que la reacción de reducción es más estable. Mientras tanto, el criterio $i_{pa}/v^{1/2}$ permanece variable, indicando que la reacción de oxidación afecta en mayor medida a la reacción redox de PIO, permaneciendo inestable (Tabla 2). Esto se debe a que los valores de $i_p/v^{1/2}$ pueden ser dependientes de v cuando existen procesos acoplados (Tabla 2), destacando así las contribuciones de i_{pa} a la corriente del ciclo redox. La Figura 19e muestra la contribución de i_{pa} a la corriente total calculada esperada para un proceso sin adsorción, mostrando también su tendencia no lineal debido al probable proceso de adsorción al electrodo. De forma similar para la corriente catódica, donde se revela que i_{pc} también tiene una contribución al electrodo, aunque en menor medida que i_{pa} (Figura 19e). Por otro lado, se analizaron los valores del criterio ΔE_p , que puede tomarse como indicador de la cinética a la transferencia de carga entre PIO y el electrodo. Los efectos sobre

Resultados y Discusión

la cinética a la transferencia de carga son evidentes porque se muestra una dependencia del parámetro ΔE_p en función de ν a valores superiores a 1,000 mV/s. Probablemente porque en condiciones de electrólisis rápida ($\nu > 1000$ mV/s), la transferencia de electrones podría estar limitada por la resistencia a la transferencia de carga (Figura 19c y d).

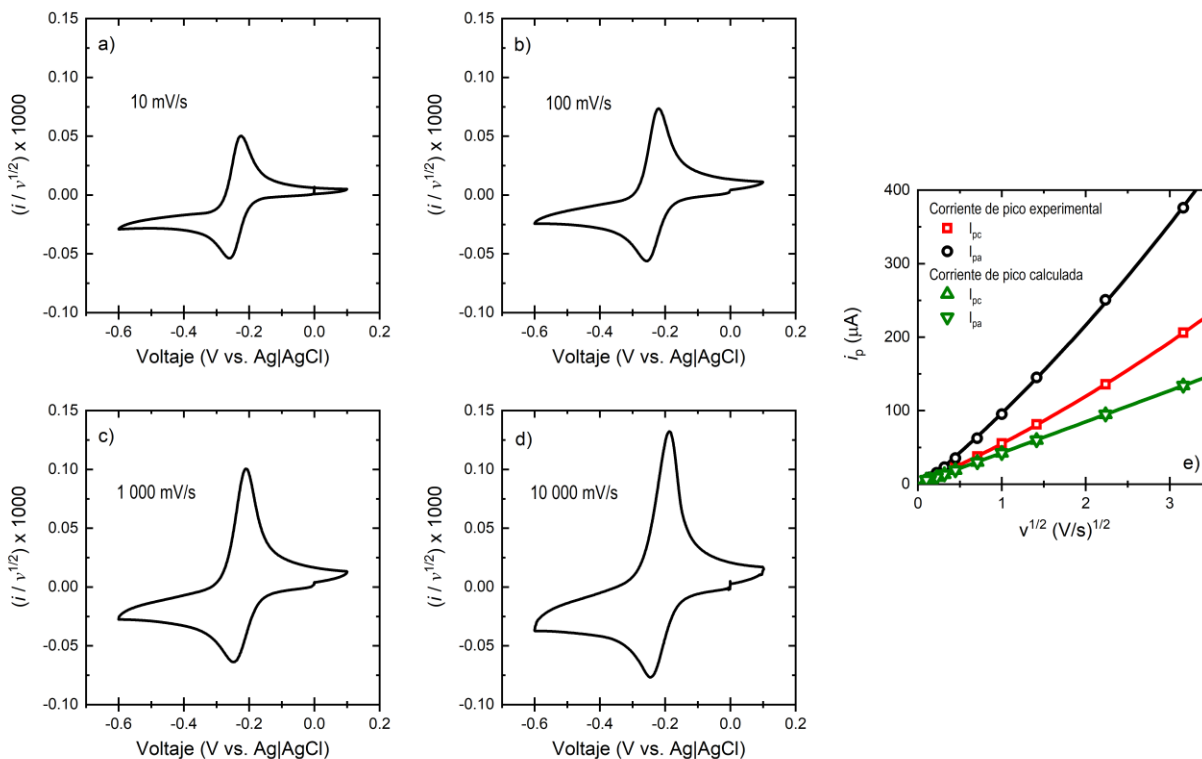


Figura 20. Estudios de VC para PIO (0.25 mM). a) 10 mV/s, b) 100 mV/s, c) 1000 mV/s, d) 10000 mV/s y e) Curva i_p vs. $\nu^{1/2}$ para la respuesta anódica y catódica de PIO.

De forma similar, se estudió el ciclo redox de PIO a una concentración de 0.25 mM. Al igual que en las condiciones anteriores, los efectos de adsorción son notables bajo condiciones de electrólisis rápida (Figura 20c y d). Sin embargo, a partir de condiciones de electrólisis lenta, es posible observar contribuciones de corriente asociadas a la adsorción (Figura 20a y b). En este caso, el criterio i_{pa}/i_{pc} se mantiene por encima de 1 a valores bajos de ν (ver Tabla 3), indicando que la corriente anódica es superior a la catódica. Los valores del criterio $i_p/\nu^{1/2}$ muestran variaciones en el perfil de la VC para ambas reacciones. La dependencia de $i_{pa}/\nu^{1/2}$ con respecto a ν era la esperada para la oxidación, ya que los mayores efectos de adsorción están presentes en este proceso. Sin embargo, la dependencia del criterio $i_{pc}/\nu^{1/2}$ para la reacción de reducción muestra también variaciones (Tabla 3). Este efecto puede interpretarse como un indicador de contribuciones a la corriente relacionadas con la adsorción [93, 128]. Las contribuciones de corriente bajo la

Resultados y Discusión

condición $C^* = 0.25$ mM se visualizan en la Figura 20e. Los resultados mostrados son similares a los obtenidos bajo la condición $C^* = 0.49$ mM. Por otro lado, los valores del criterio ΔE_p (Tabla 3) sólo son significativos a valores de $\nu > 1000$ mV/s, por lo que los efectos de la resistencia a la transferencia de carga podrían ser menores que en la condición $C^* = 0.49$ mM.

Tabla 3. Criterios de reversibilidad de PIO obtenidos a partir del análisis VC (0.25 mM).

ν (mV/s)	ΔE_p (mV)	i_{pa}/i_{pc}	$i_{pa}/\nu^{1/2*}$	$i_{pc}/\nu^{1/2*}$
10	35.7	1.23	6.13×10^{-5}	4.97×10^{-5}
100	35.4	1.47	7.30×10^{-5}	4.94×10^{-5}
1000	36.5	1.73	9.53×10^{-5}	5.51×10^{-5}
10000	53.8	1.82	1.19×10^{-4}	6.50×10^{-5}

*Función voltamperométrica $i/\nu^{1/2}$.

El ciclo redox de PIO a una concentración de 0.14 mM también fue estudiada (Figura 21). Al igual que bajo la condición donde $C^* = 0.25$ mM, los efectos de adsorción sobre el perfil de la VC también son notables desde la condición de electrólisis lenta (Figura 21a y b). Los VCs de PIO mostraron los mayores efectos de adsorción bajo la condición donde $\nu \geq 500$ mV/s (Figura 21c y d). El efecto de la adsorción en la superficie disminuyó a medida que ν se acercaba a las condiciones de electrólisis lenta. Sin embargo, el criterio i_{pa}/i_{pc} indica que los valores de i_{pa} no se redujeron lo suficiente como para asegurar que no hay contribuciones de corriente procedentes de la adsorción bajo estas condiciones (ver Tabla 4). Kurapati et al., (2018) informaron que la mejora de la corriente en sistemas similares se debe al proceso de transferencia de carga en la esfera externa del electrodo acoplado a un proceso de adsorción y desorción localizado en la esfera interna [137]. De forma similar, la interpretación de los valores del criterio $i_p/\nu^{1/2}$ para la corriente catódica indica contribuciones a la corriente en las condiciones de electrólisis rápida (Figura 21c y d), un efecto también observado en los experimentos a $C^* = 0.25$ mM y 0.49 mM.

Los resultados obtenidos sugieren que la cobertura de saturación del electrodo por el adsorbato (Γ_s) podría estar directamente relacionada con la concentración C^* . Con base en esto se sugiere que, en concentraciones elevadas, existe un efecto más pronunciado de la resistencia a la transferencia de carga, ocasionado por el bloqueo del electrodo debido a la inhibición de sitios activos. En este caso, la transferencia de electrones al electrodo por parte de PIO en la solución se ve comprometida. Esta situación explica las variaciones en el criterio ΔE_p , las cuales solo son notables en la condición donde $\nu > 2000$ mV/s. A medida que la concentración de C^* aumenta, se observa una mayor variación en ΔE_p , lo que podría respaldar la hipótesis del bloqueo del electrodo. En este contexto, el criterio ΔE_p se convierte en un indicador clave de la limitación impuesta por la resistencia a la transferencia de carga. Es interesante destacar el impacto de la

Resultados y Discusión

adsorción en el ciclo redox de PIO, ya que un mayor valor de C^* se traduce en un mayor número de especies adsorbidas (Γ^*) en la superficie del electrodo de carbón vítreo.

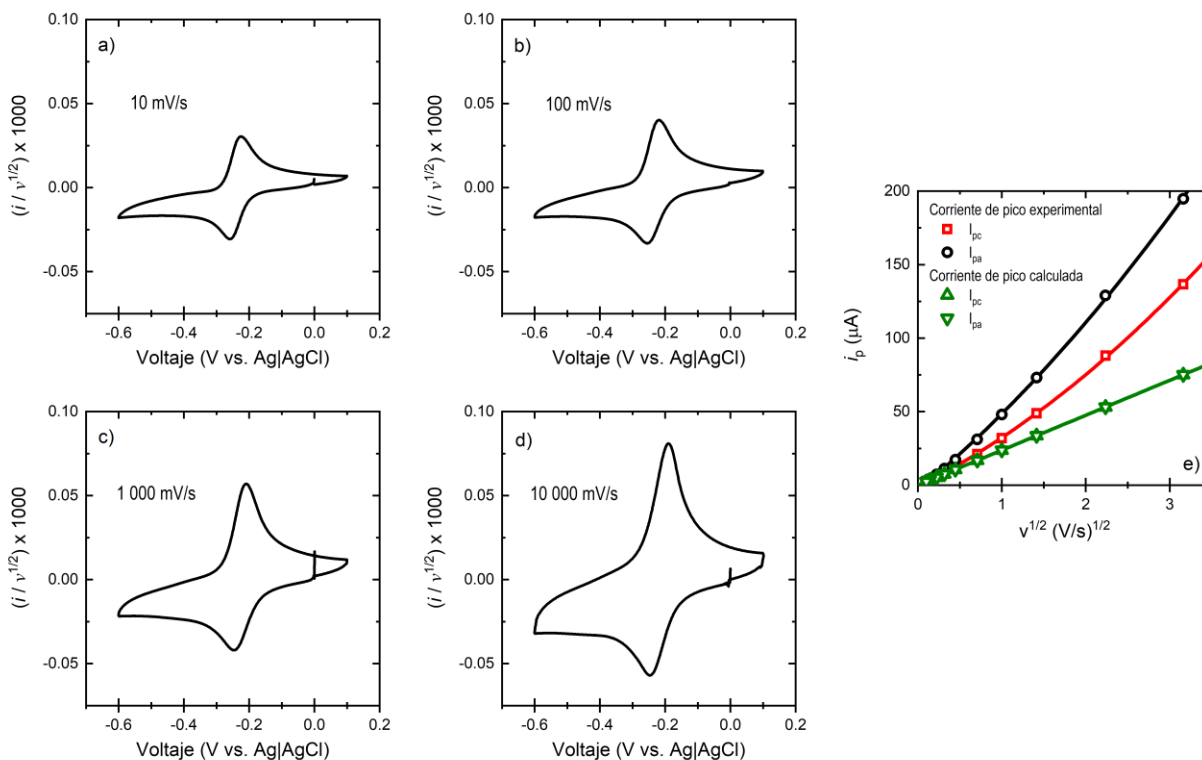


Figura 21. Estudios VC de PIO (0.14 mM) a diferentes velocidades de barrido. a) 10 mV/s, b) 100 mV/s, c) 1000 mV/s, d) 10000 mV/s y e) Curva i_p vs. $v^{1/2}$ para la respuesta anódica y catódica de PIO.

Sin embargo, cuanto más se aproxima la cantidad de adsorbato (Γ) a la cantidad máxima de saturación (Γ_s), los efectos sobre el perfil de la VC parecen ser menores porque Γ_s tiende a conservar valores relativamente bajos. Además, los efectos de Γ_s son mayores sobre la cinética a la transferencia de carga porque el criterio ΔE_p se ve más afectado a valores más altos de C^* . Los resultados del análisis de la corriente con el criterio de *Randles – Ševčík* muestran efectos similares a los obtenidos a otras concentraciones (Figura 21e). La contribución de la adsorción a la corriente anódica es mayor que en la corriente catódica. Como se informó en un reporte anterior, los resultados de la VC sugieren que PIO se adsorbe en la superficie de carbón vítreo, probablemente debido a la interacción electrostática con el electrodo. Posteriormente, durante el barrido directo (barrido catódico) PIO se acumula en la superficie y se adsorbe debido a la reacción de reducción. Además, las moléculas de PIO que ya estaban adsorbidas antes del barrido se reducen por efecto del escaneo de voltaje. Al invertir el barrido en dirección anódica, las moléculas adsorbidas se oxidan al

Resultados y Discusión

mismo tiempo que las moléculas de la esfera exterior de la interfase, lo que hace que la corriente anódica aumente considerablemente al haber una mayor acumulación de moléculas de PIO en la superficie del electrodo. A partir de estos resultados, surge la hipótesis del bloqueo del electrodo, ya que, a medida que se adsorben más moléculas de PIO específicamente sobre el electrodo, disminuye el número de sitios activos disponibles para llevar a cabo las reacciones redox de PIO disuelta en el electrolito. Esto provocaría que la velocidad de transferencia de electrones disminuyera porque la adsorción específica podría hacer que los parámetros cinéticos k_{app} y R_{ct} tuvieran variaciones.

Tabla 4. Criterios de reversibilidad obtenidos a partir del análisis VC de PIO (0.14 mM).

ν (mV/s)	ΔE_p (mV)	i_{pa}/i_{pc}	$i_{pa}/\nu^{1/2*}$	$i_{pc}/\nu^{1/2*}$
10	32.2	1.16	2.99×10^{-5}	2.58×10^{-5}
100	31.8	1.32	3.49×10^{-5}	2.65×10^{-5}
1000	31.5	1.49	4.73×10^{-5}	3.18×10^{-5}
10000	53.8	1.59	6.28×10^{-5}	4.22×10^{-5}

*Función voltamperométrica $i/\nu^{1/2}$.

4.1.2 Efecto de la concentración sobre la velocidad de transferencia electrónica

Para validar la hipótesis de la sección 4.1.1, se calcularon los parámetros cinéticos por VC y se cuantificó el número de especies adsorbidas (Γ) mediante CC de doble paso. El cálculo de k_{app} se realizó en experimentos de VC bajo condiciones de electrólisis rápida ($\nu > 1000$ mV/s) evaluando la variación del voltaje del pico (ΔE_p) en función de ν (Anexo 2, ver Figura A2-1). Para este fin, el criterio ΔE_p fue empleado para obtener el parámetro adimensional ψ , el cual está dado por la ecuación:

$$\text{Ec. 47 } \psi = k^0 \left(\frac{\pi D n F \nu}{RT} \right)^{-1/2}$$

Asimismo, se calcularon los valores de α a partir del parámetro $E_p - E_{p/2}$ a diferentes valores de ν para cada valor de concentración. El parámetro $E_p - E_{p/2}$ se determina mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Ec. 48 } \left| E_p - E_{p/2} \right| = \frac{47.7}{\alpha} \text{ mV a } 25^\circ \text{ C}$$

Para el cálculo de Γ , se empleó la ley de *Cottrell*, la cual indica que, para un sistema reversible, la carga de pulso directo Q_d se expresa como:

$$\text{Ec. 49 } Q_d(t \leq \tau) = \frac{2nFA_e D_{\text{Ox}}^{1/2} C_{\text{Ox}}^* t^{1/2}}{\pi^{1/2}} + Q_{s,d}$$

donde $Q_{s,d} = Q_{dl} + Q_{\text{Ox,ads}}$

Mientras que la carga del pulso inverso Q_r está dada por:

$$\text{Ec. 50 } Q_r(t > \tau) = \frac{2nFA_e D_{\text{Red}}^{1/2} C_{\text{Red}}^* \varphi}{\pi^{1/2}} + Q_{s,r}$$

donde $Q_{s,r} = Q_{dl} + Q_{\text{Red,ads}}$

donde:

$$\text{Ec. 51 } \varphi = \left[\tau^{1/2} + (t - \tau)^{1/2} - t^{1/2} \right]$$

siendo t el tiempo del experimento, C_{Ox}^* la concentración de PIO en su estado oxidado, C_{Red}^* la concentración de PIO en su estado reducido, τ es el tiempo que dura el período de cada paso de potencial, Q_{dl} corresponde a la carga de la doble capa mientras que $Q_{\text{Ox,ads}}$ y $Q_{\text{Red,ads}}$ corresponden a la carga de las especies Ox y Red adsorbidas en el electrodo, donde Q_{ads} está dado por la relación:

$$\text{Ec. 52 } \begin{aligned} Q_{\text{Ox,ads}} &= nFA_e \Gamma_{\text{Ox}} \\ Q_{\text{Red,ads}} &= nFA_e \Gamma_{\text{Red}} \end{aligned}$$

Así, al llevar a cabo la linealización de la carga del experimento CC en función del parámetro temporal $t^{1/2}$ para el pulso directo, y φ para el pulso inverso mediante un gráfico de Anson, es posible obtener los valores experimentales de Γ a partir de la Ec. 52, ya que esta ecuación correspondería a la intersección de la recta en x (ver Anexo 3, Figura A3-1). Estos valores pueden graficarse en función del voltaje impuesto. Los resultados se muestran en la Figura 22 y confirman las observaciones realizadas en los experimentos por VC. De acuerdo con los resultados, la carga en la superficie del electrodo aumenta como función de la concentración inicial C^* para ambos procesos redox, siendo la carga de la reacción anódica la que contribuye en mayor medida a este aumento. Estos resultados indican un incremento en la concentración de PIO en la superficie del electrodo. De acuerdo con estos resultados, se puede establecer que el aumento del parámetro Γ es proporcional a la concentración C^* .

Resultados y Discusión

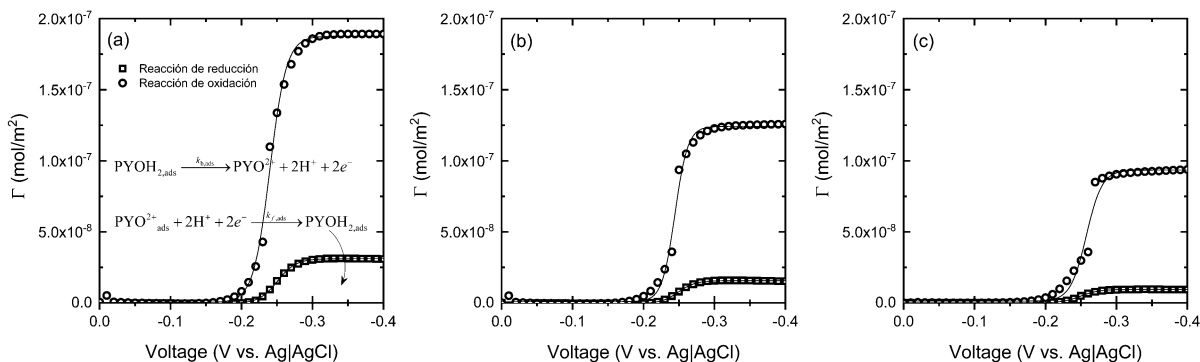


Figura 22. Parámetro Γ como función del potencial a diferentes valores de C^* . a) 0.49 mM, b) 0.25 mM y c) 0.14 mM.

Dados los datos obtenidos en las mediciones VC, es probable que las desviaciones cinéticas observadas estén relacionadas con C^* , y a su vez, con Γ . Por lo tanto, la velocidad de la TE podría ser dependiente de C^* y Γ para ambas reacciones. Los parámetros cinéticos experimentales calculados mediante mediciones de VC se muestran en la Tabla 5. Los resultados muestran que el electrodo puede bloquearse a altos valores de C^* . Los valores de k_{app} disminuyen cuando C^* aumenta, de tal modo que $k_{app} = 1.97 \times 10^{-1}$ cm/s cuando $\Gamma^* = 9.41 \times 10^{-12}$ mol/cm² y disminuyen a $k_{app} = 2.79 \times 10^{-2}$ cm/s cuando $\Gamma^* = 1.88 \times 10^{-11}$ mol/cm².

Tabla 5. Parámetros cinéticos obtenidos a diferentes concentraciones de PIO.

C^* (mM)	Γ^* (mol/cm ²)	k_{app} (cm/s)	i_0 (A)	R_{ct} (Ω)	α
0.49	1.88×10^{-11}	2.79×10^{-2}	1.87×10^2	6.89×10^{-5}	0.13
0.25	1.25×10^{-11}	8.47×10^{-2}	2.89×10^2	4.44×10^{-5}	0.39
0.14	9.41×10^{-12}	1.97×10^{-1}	3.77×10^2	3.41×10^{-5}	0.63

Por esta razón, los valores de R_{ct} aumentan de 3.41×10^{-5} Ω cuando $C^* = 0.14$ mM a 6.89×10^{-5} Ω cuando el valor de $C^* = 0.49$ mM. Chen et al., (2018) obtuvieron resultados similares al estudiar el par redox Co (III)/Co (II) asociado con compuestos de coordinación, encontrando la existencia de una dependencia lineal de k_{app} como función de Γ^* . Los autores atribuyen este efecto a la autoinhibición del electrodo debido a la adsorción, justificando la relación lineal con el modelo de Amatore para electrodos parcialmente bloqueados (Figura 23d) [141]. Por otro lado, los valores del coeficiente de transferencia α también muestran una dependencia de Γ^* . El criterio α es un parámetro que mide la simetría de las barreras de energía libre de las reacciones redox (ΔG^0). Por lo tanto, α es un parámetro que permite identificar la relación de la energía libre entre la reacción de oxidación y la reacción de reducción. Una simulación de las barreras de energía empleando valores experimentales de α se muestra en la Figura 23.

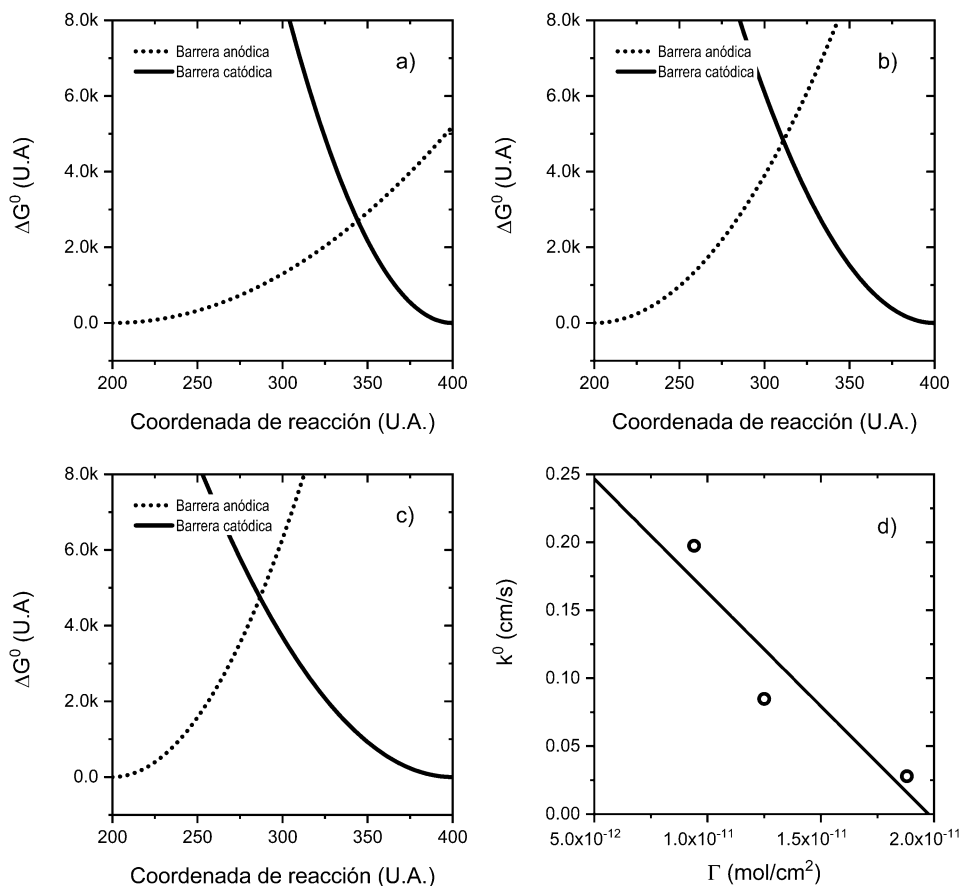


Figura 23. Barreras de energía libre teóricas para diferentes valores de α y de C^* bajo condiciones de TE rápida: a) $C^* = 0.49$ mM, $\alpha = 0.13$, b) $C^* = 0.25$ mM, $\alpha = 0.39$, c) $C^* = 0.14$ mM, $\alpha = 0.63$. d) Gráfico de k_{app} como una función del parámetro Γ . U.A = Unidades arbitrarias.

Los resultados de este análisis mostraron una desproporción entre las barreras de energía teóricas en función de C^* revelando que la contribución energética para la reacción anódica disminuye notablemente cuando la condición es $C^* = 0.49$ mM (Figura 23a). Este criterio explica la disminución de k_{app} en esta condición, lo que indica interferencias energéticas, posiblemente debido a la energía libre de adsorción (ΔG^0_{Ads}). Este fenómeno es evidente a concentraciones más bajas, como se muestra en la Figura 23b y c para las condiciones $C^* = 0.25$ mM y $C^* = 0.14$ mM, respectivamente. La teoría de *Marcus* predice que la TE en la esfera externa de la interfaz se vuelve lenta debido a la lenta reorganización del espín del electrón por el efecto de una reacción acoplada, en este caso la adsorción, la cual demanda electrones de la reacción redox difusional. Esto concuerda con la aparición de una constante de velocidad de adsorción k_{ads} que depende de k_{app} [142]. Por otro lado, Chen et al. (2018) afirman que k_{app} depende de Γ^* debido al efecto de autoinhibición. [141].

4.1.3 Interacciones intermoleculares entre PIO y el electrodo

Para evaluar la interacción entre PIO y el electrodo de carbón vítreo, se realizó el cálculo experimental del parámetro de interacción de *Laviron* ($v'g\theta_T$), el cual indica el tipo de interacción entre el adsorbato y el electrodo y cuyo valor muestra que la interacción con el electrodo tendrá mayor atracción a medida que los valores de este parámetro sean mayores. De acuerdo con el análisis de VC, se obtuvieron los valores experimentales de $v'g\theta_T$ [136]. Así, $v'g\theta_T$ se calculó a partir de la solución matemática de la ecuación Ec. 45 y de la curva trabajo mostrada en el Anexo 4 (Figura A4-2). De este modo, para el cálculo del parámetro FWHM (full-width-half-maximum, por sus siglas en inglés) se realizó una substracción de la corriente VC de difusión calculada matemáticamente a la corriente VC experimental obtenida como se muestra en el Anexo 4 (ver Figura A4-1). Una vez obtenido el valor de FWHM, este se extrapoló en la curva trabajo del Anexo 4 (ver Figura A4-2), conduciendo directamente al valor de $v'g\theta_T$ [136, 140]. El término β , el cual está relacionado con la energía libre de adsorción ΔG_{ads}^0 , puede ser calculado a partir del parámetro $v'g\theta_T$ mediante la solución matemática de la ecuación:

$$\text{Ec. 53 } \beta = \sqrt{\frac{2 - v'g\theta_T}{4 - v'g\theta_T}}$$

Mientras que el parámetro ΔG_{ads}^0 puede ser calculado mediante la ecuación:

$$\text{Ec. 54 } \beta = \exp\left(-\frac{\Delta G_{\text{ads}}^0}{RT}\right)$$

Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros de interacción obtenidos a diferentes concentraciones de PIO.

C* (mM)	Γ^* (mol/cm ²)	$\Delta G_{\text{ads, Red}}^0$ (kJ/mol)	$v'g\theta_{T, \text{Red}}$	$\Delta G_{\text{ads, Ox}}^0$ (kJ/mol)	$v'g\theta_{T, \text{Ox}}$
0.49	1.88×10^{-11}	-1.62 ± 0.02	0.60 ± 0.05	-1.71 ± 0.02	0.30 ± 0.07
0.25	1.25×10^{-11}	-1.59 ± 0.01	0.68 ± 0.03	-1.69 ± 0.03	0.36 ± 0.10
0.14	9.41×10^{-12}	-1.55 ± 0.02	0.79 ± 0.05	-1.75 ± 0.01	0.12 ± 0.04

Los datos indican que las moléculas de PIO en la reacción anódica bajo la condición de $C^* = 0.49$ mM crean interacciones intermoleculares de atracción con el electrodo, obteniendo valores de $v'g\theta_{T, \text{Red}} = 0.60 \pm 0.05$ y $v'g\theta_{T, \text{Ox}} = 0.30 \pm 0.07$ (Tabla 6). Una interacción de este tipo explicaría las variaciones de α bajo esta condición. Asimismo, los resultados de $v'g\theta_T$ indican que, tanto para la reacción de oxidación como de

Resultados y Discusión

reducción, las interacciones de atracción entre PIO y el electrodo son las dominantes. Además, es interesante destacar que los valores de $v'g\theta_T$ muestran una dependencia de C^* y Γ^* , siendo un indicador de que las interacciones entre PIO son dependientes de estos parámetros. Sin embargo, en cuanto a ΔG^0_{Ads} , se puede observar que sus valores son relativamente similares e independientes de C^* y Γ^* . Asimismo, los valores de ΔG^0_{Ads} son relativamente bajos, por lo que se puede decir que se trata de una adsorción débil [143]. Con base en estos resultados, se propone que la adsorción al electrodo probablemente ocurre por efecto de un apilamiento π - π , debido al acercamiento de los anillos que componen PIO con los anillos aromáticos de la matriz del electrodo (Figura 24).

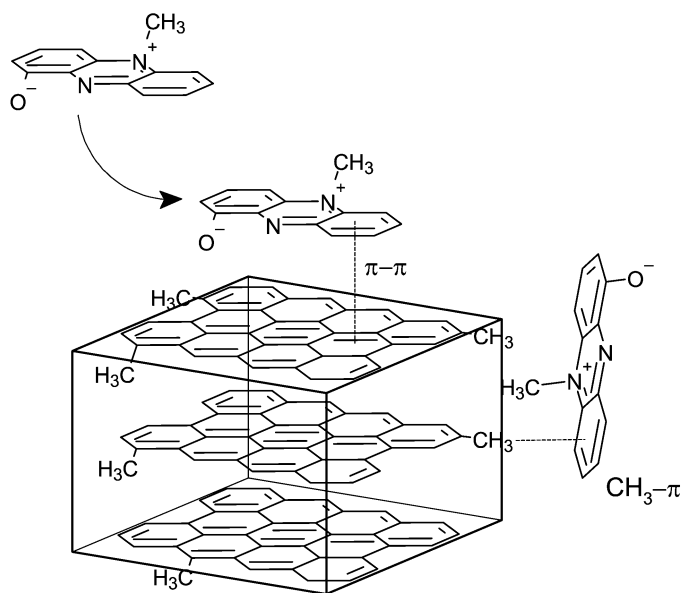


Figura 24. Representación de las posibles interacciones (apilamiento π - π o CH_3 - π) entre PIO y la superficie del electrodo de carbón vítreo.

Kurapati et al. (2018) informaron sobre la adsorción de compuestos de coordinación de Fe^+ en un electrodo de grafito pirolítico altamente orientado (OHPG) y obtuvieron procesos similares a los reportados en este estudio [137]. Los autores explican que la adsorción en el electrodo se puede atribuir a apilamientos intermoleculares π - π o bien CH_3 - π . De manera similar, para este estudio, se pueden considerar tanto apilamientos π - π como interacciones laterales CH_3 - π debido a la estructura del electrodo de carbón vítreo y PIO. Siguiendo el modelo de Jenkins & Kawamura [144], la estructura del carbón vítreo está compuesta por dominios gráfiticos similares a cintas de átomos de carbono. Estas cintas de carbono tienen una hibridación sp^2 y se apilan en capas (microfibrillas) torcidas e irregularmente entrelazadas [145]. Esto hace que las cintas ordenadas en el plano basal queden expuestas al electrolito, así como los grupos funcionales $-CH_3$ del plano de borde. Por lo tanto, ambas partes podrían estar en constante interacción con PIO.

4.1.4 Proceso de adsorción de PIO sobre un electrodo de carbón vitreo

De acuerdo con los resultados de este estudio, se puede afirmar que existe una dependencia entre la tasa de transferencia de electrones k_{app} y el número de especies adsorbidas en la superficie del electrodo Γ . Se propone que la disminución del parámetro k_{app} se debe a la acumulación de especies redox adsorbidas en el plano interno de Helmholtz (IHP). La Figura 25 muestra una representación de este proceso basándose en el modelo extendido de Amatore.

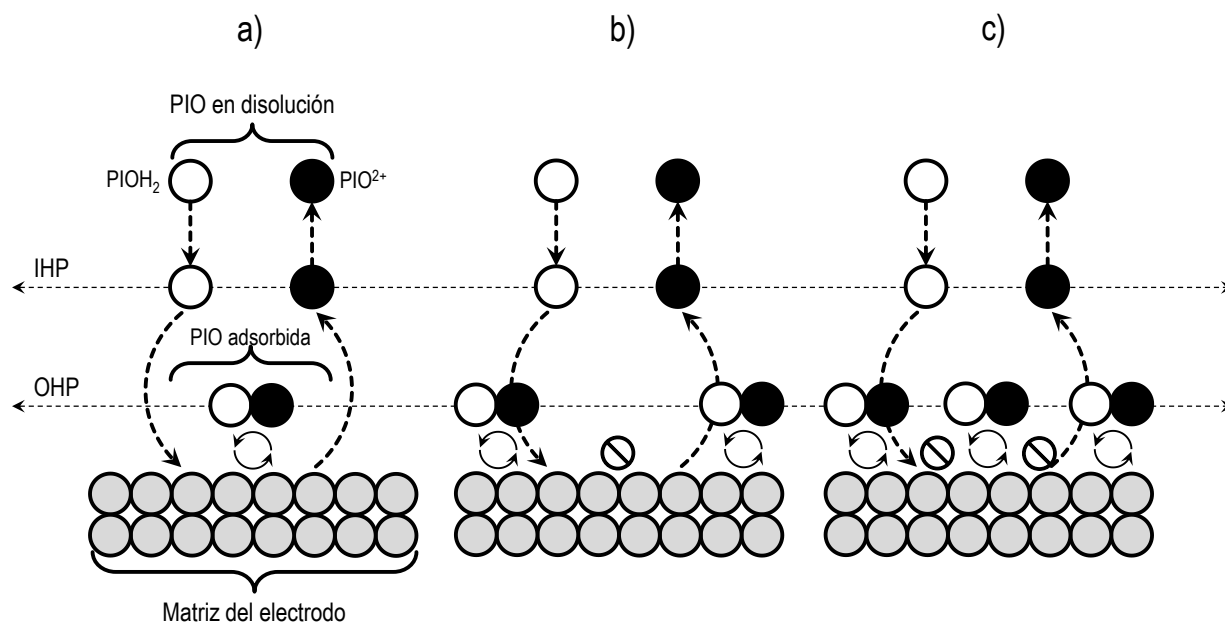


Figura 25. Representación de la adsorción de PIO sobre la superficie del electrodo. Modelo esquemático basado en el modelo extendido de Amatore para la transferencia de electrones en el plano interno de Helmholtz (IHP) y el plano externo de Helmholtz (OHP). Representación de la adsorción a $C^* = 0.14$ mM (a), $C^* = 0.25$ mM (b) y $C^* = 0.49$ mM (c).

La adsorción bajo la condición $C^* = 0.14$ mM está relacionada con valores más bajos de Γ ($\Gamma = 9.41 \times 10^{-12}$ mol/cm²), y la existencia de moléculas de PIO presentes en el IHP. Esto hace que las moléculas de PIO que se encuentran en la solución (plano externo de Helmholtz - OHP) interactúen con el electrodo únicamente a través de los espacios ubicados entre las moléculas de PIO adsorbidas (Figura 25a). En contraste, a medida que C^* y Γ aumentan, hay un mayor número de moléculas de PIO presentes en el IHP. Por esta razón, el número de sitios activos en la matriz del electrodo disminuye, lo que hace que las moléculas presentes en la solución no puedan interactuar con la superficie (Figura 25a y b). Esto provoca que la corriente de intercambio i_0 disminuya, pasando de un valor de 3.77×10^2 A, a 2.89×10^2 A cuando C^* aumenta de 0.14 mM a 0.25 mM, respectivamente (ver Tabla 5). En cuanto a las interacciones intermoleculares entre

Resultados y Discusión

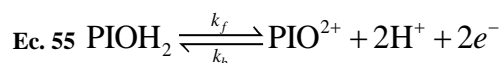
PIO y el electrodo, las interacciones de atracción son dominantes. Una posible explicación es una afinidad entre PIO y el electrodo debido a la presencia de anillos aromáticos en su estructura molecular, favoreciendo las interacciones de apilamiento π - π . Los resultados de este estudio proporcionan información importante sobre el comportamiento electroquímico de PIO en superficies a base de carbono. Esta información será la base para la comprensión de sistemas complejos, donde los procesos de adsorción podrían favorecer o inhibir la transferencia de electrones, siendo las celdas electroquímicas – microbianas el objetivo a alcanzar. Los valores de ΔG^0_{Ads} calculados para el proceso de adsorción de PIO indican una adsorción de baja energía ($\Delta G^0_{\text{Ads, Red}} = -1.62 \pm 0.02$ kJ/mol, $\Delta G^0_{\text{Ads, Ox}} = 0.36 \pm 0.10$ kJ/mol, ver Tabla 6).

Sin embargo, el parámetro *Laviron* para el proceso de oxidación indica una interacción de atracción hacia el electrodo ($v'g\theta_T > 0$, ver Tabla 6). Esto es posible debido a las interacciones de apilamiento π y CH_3 - π entre PIO y los grupos funcionales presentes en la superficie de carbón vítreo, siendo de especial interés para el desarrollo de celdas electroquímicas – microbianas, ya que la mejora de estas interacciones permitirá mantener una mayor ΔG^0_{Ads} , favoreciendo la estabilidad de la adsorción y con ello, mejorando las interacciones de los microorganismos con el electrodo. Una de las principales aplicaciones de este fenómeno es la modificación de electrodos manteniendo el MR adsorbido. En general, el carbono es un material hidrofóbico que conduce a una deficiente adherencia de las colonias bacterianas, lo que resulta en una falta de capacidad de transferencia de electrones. Sin embargo, la modificación de la superficie con nanocompuestos de óxidos metálicos o polímeros conjugados conductores tiene ventajas para mejorar la adherencia y biocompatibilidad de los microorganismos, lo que favorece la velocidad de TE, esto se debe a la presencia de grupos funcionales polares y cargados [4]. En particular, la adsorción específica de PIO en la superficie del electrodo podría mejorar significativamente las propiedades hidrofílicas del electrodo debido a su naturaleza polar, lo que podría favorecer el transporte de iones y la adherencia de las células de *P. aeruginosa* a los electrodos.

4.2 Proceso de transferencia extracelular de electrones de *Pseudomonas aeruginosa* NEJ07R sobre un electrodo de base carbono mediada por piocianina

4.2.1 Validación del ciclo redox de piocianina

La Figura 26 presenta el perfil VC de PIO bajo la condición de $v = 0.01$ V/s. Durante el escaneo directo en la dirección catódica, PIO manifestó su primer proceso redox (I_c), el cual fue asignado a la reacción de reducción $\text{PIO}^{2+} + 2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow \text{PIOH}_2$ (ver Ec. 55), presentando un valor de $E_{pc} = -0.308$ V vs. ECS. Mientras que el escaneo inverso manifestó el proceso complementario (I_a), el cual fue asignado a la reacción de oxidación $\text{PIOH}_2 \rightarrow \text{PIO}^{2+} + 2\text{H}^+ + 2e^-$, presentando un $E_{pa} = -0.271$ V vs. ECS. Un análisis del criterio de reversibilidad $\Delta E_p = 0.059\text{V}/n$ confirma un ciclo redox de dos electrones, ya que la diferencia en los picos ΔE_p para PIO da como resultado un valor de 0.034 V. Por lo tanto, es razonable considerar el siguiente sistema de reacciones:



La función voltamperométrica $i/v^{1/2}$ se utilizó para obtener un perfil comparativo preciso (Figura 26b). Según esta función, si la corriente del VC se divide entre la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ($v^{1/2}$), el cociente obtenido debe tener un valor constante. La condición para este criterio es que no haya complicaciones relacionadas con reacciones acopladas u otros fenómenos que contribuyan a la corriente total " i " del sistema. El análisis de PIO bajo este criterio muestra que la corriente del proceso redox asociada con la oxidación (I_a) depende de v a medida que se acerca a las condiciones de electrólisis rápida.

Por otro lado, la corriente del proceso redox (I_c) asociada con la reducción se mantiene en valores relativamente constantes bajo condiciones de electrólisis lenta. Aunque también aumenta su valor cuando el experimento se acerca a las condiciones de electrólisis rápida. Wopschall & Shain, (1967) habían predicho estos fenómenos teóricamente, indicando un efecto de adsorción de especies redox reversibles en el electrodo, lo que causó cambios en el perfil del VC. Estos autores describieron dos tipos principales de adsorciones: adsorción de alta energía (adsorción fuerte) y adsorción de baja energía (adsorción débil) [143]. El perfil de VC de PIO es similar al descrito para una adsorción de baja energía, también conocida como adsorción débil. Sharp et al., (2010) y Oziat et al., (2017) informaron que PIO podría adsorberse en un electrodo formando una monocapa de polímero. Ambos autores indicaron que esta polimerización requería una oxidación fenólica de PIO, la cual ocurre a potenciales anódicos cercanos a 0.803 V vs. ECS [28, 37]. Además, demostraron un comportamiento no ideal que podría estar relacionado con la adsorción

Resultados y Discusión

de PIO sobre electrodos de carbono. Por otro lado, Wang & Newman, (2008), informaron que este comportamiento no ideal no solo ocurre en electrodos a base de carbono, sino también en electrodos de metal. En ese caso, los autores utilizaron una superficie de oro como electrodo de trabajo y encontraron que también eran visibles alteraciones en el ciclo redox para la corriente anódica [30]. Una forma de identificar el comportamiento no ideal del ciclo redox es realizando un análisis exhaustivo de los criterios diagnósticos que describen las moléculas reversibles. Por ejemplo, analizar la corriente máxima tanto en los procesos catódicos (i_{pc}) como anódicos (i_{pa}) con la ecuación de *Randles - Ševčík* (ver Ec. 26) se puede tener una perspectiva más clara acerca de los posibles procesos que pudieran estar alterando el ciclo redox de PIO. La ecuación de *Randles - Ševčík* indica que el parámetro i_p de un sistema reversible sin reacciones acopladas es proporcional a $v^{1/2}$.

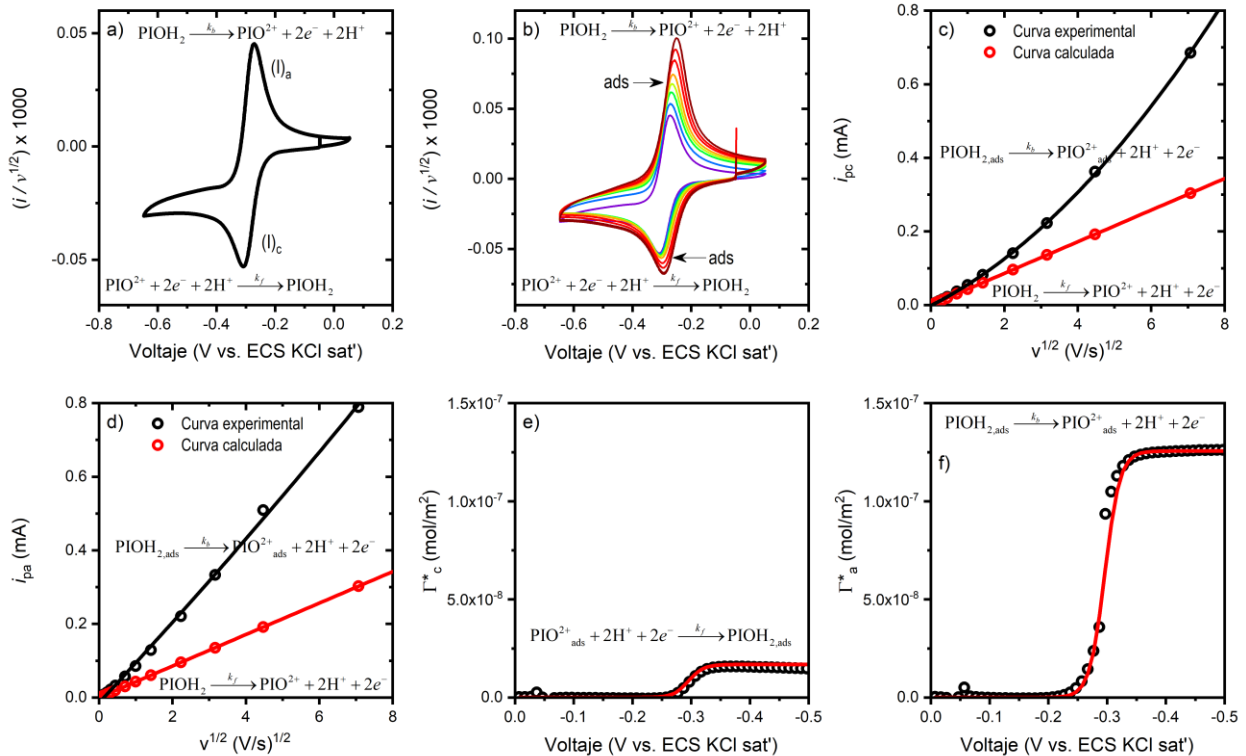


Figura 26. Caracterización electroquímica de PIO en electrodo de carbón vítreo: (a) VC de PIO (0.25 mM) a 25°C, $v = 0.01$ V/s; (b) VC de PIO con respecto a la corriente normalizada (función voltamperométrica = $i/v^{1/2}$) a diferentes valores de v (entre 10 a 5000 mV/s); (c) análisis de distribución lineal de la corriente catódica basado en la ecuación de *Randles - Ševčík*; (d) análisis de distribución lineal de la corriente anódica basado en el criterio de difusión de *Randles - Ševčík*; (e, f) Curvas de Γ^* vs. Voltaje de la adsorción de PIO en el electrodo de carbón vítreo para las reacciones de adsorción catódicas y anódicas, respectivamente.

Resultados y Discusión

Por lo tanto, este análisis se considera un criterio diagnóstico efectivo y útil para determinar si el sistema presenta complicaciones debido a reacciones acopladas. Para realizar el análisis utilizando el criterio de *Randles - Ševčík*, se presenta una comparación de datos experimentales con datos calculados correspondiente con un sistema reversible controlado por difusión, es decir, sin complicaciones por reacciones redox acopladas. Así, al realizar el análisis de i_p se confirmó que bajo condiciones de baja escala de tiempo (valores pequeños de ν), la corriente de reducción i_{pc} corresponde a un proceso controlado por difusión, ya que cumple linealmente con el comportamiento estimado por la ecuación de *Randles - Ševčík* (Figura 26c). Sin embargo, bajo condiciones de escala rápida de tiempo, el valor de i_{pc} comienza a presentar una contribución a la corriente que desvía los resultados esperados. En el caso de la corriente anódica, se puede observar un mayor aumento en i_{pa} en comparación con i_{pc} . Como indicaron Cuharuc et al., (2016) y Zuaznabar-Gardona & Fragoso, (2020), el aumento en i_{pa} (Figura 26d) se produce por acumulación de la especie química en su estado reducido u oxidado [140, 146].

Aplicado al par redox $\text{PIO}^{2+}/\text{PIOH}_2$, esto ocurriría durante la reacción anódica de $\text{PIOH}_2 \rightarrow \text{PIO}^{2+} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$, donde el aumento en la corriente de oxidación podría estar asociado con la acumulación de PIOH_2 sobre la superficie del electrodo después de la electrólisis. De manera similar, para la reacción catódica $\text{PIO}^{2+} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{PIOH}_2$, estaría ocurriendo un acumulamiento antes de realizar la reacción, lo cual podría sugerir que el reactante PIO^{2+} ya está adsorbido en la superficie antes de iniciar el barrido VC [137]. Entonces, previo a la exploración electroquímica, el catión PIO^{2+} ya se encuentra adsorbido en el electrodo, lo que da lugar al parámetro $\Gamma_{\text{PIO},2+}$ (concentración de PIO^{2+} adsorbida). De manera análoga, durante la reacción de oxidación, se forma el parámetro Γ_{PIOH_2} (concentración de PIOH_2 adsorbida). Por lo tanto, se propone la existencia de una fracción de PIO^{2+} proveniente del total presente en $x = 0$, la cual se adsorbe al electrodo cuando $t = 0$. Tras la electrólisis, se produce una acumulación de PIOH_2 en $x = 0$ debido a la reacción $\text{PIO}^{2+} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{PIOH}_2$, lo que aumenta la concentración de Γ_{PIOH_2} y genera los incrementos de corriente observados en el perfil de VC durante la reacción $\text{PIOH}_2 \rightarrow \text{PIO}^{2+} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$.

Para validar esta hipótesis, se llevaron a cabo mediciones mediante la técnica de CC de doble paso. Esta técnica se emplea para el estudio de procesos de adsorción, ya que permite separar las contribuciones de difusión y adsorción al analizar la dependencia temporal de la carga medida, $Q(t)$. Así, es factible cuantificar la cantidad de PIO adsorbida y obtener parámetros vinculados con la adsorción [147]. Primero, se estableció un valor τ de 1 segundo, por lo que la duración total de la medición fue de 2 segundos. Para un sistema reversible, la carga del paso directo Q_d ($t \leq \tau$) se calcula mediante la ecuación Ec. 49, mientras que la carga del paso inverso Q_r ($t > \tau$) está definido por la ecuación Ec. 50. A partir de Ec. 49 y Ec. 50, es posible obtener la carga de la especie adsorbida Q_{ads} , y así, sustrayendo Q_{dl} de un experimento en ausencia

Resultados y Discusión

de PIO y resolviendo Ec. 52 se puede obtener el parámetro Γ . La linealización de las curvas CC para el paso directo e inverso se muestran en el Anexo 3 (ver Figura A3-1). Por otro lado, el término Γ es dependiente del gradiente de concentración en el tiempo t , $C(0, t)$ de acuerdo con las ecuaciones:

$$\text{Ec. 56 } \Gamma_{\text{PYO}^{2+}}(t) = \frac{\beta_{\text{PYO}^{2+}} \Gamma_{\text{PYO}^{2+},s} C_{\text{PYO}^{2+}}(0, t)}{1 + \beta_{\text{PYO}^{2+}} C_{\text{PYO}^{2+}}(0, t)}$$

$$\text{Ec. 57 } \Gamma_{\text{PYOH}_2}(t) = \frac{\beta_{\text{PYOH}_2} \Gamma_{\text{PYOH}_2,s} C_{\text{PYOH}_2}(0, t)}{1 + \beta_{\text{PYOH}_2} C_{\text{PYOH}_2}(0, t)}$$

Donde el parámetro β es una variable que está relacionada con el equilibrio químico de las especies químicas adsorbidas, y es una función del potencial E ya que depende de la energía libre de Gibbs (ΔG^0) de la reacción (ver Ec. 54); $\Gamma_{\text{PIO},2+,s}$ y $\Gamma_{\text{PIOH}_2,s}$ son las coberturas de saturación del electrodo por el adsorbato para las especies PIO^{2+} y PIOH_2 respectivamente, y $C_{\text{PIO},2+}(0, t)$ y $C_{\text{PIOH}_2}(0, t)$ son las concentraciones de las especies redox en la solución en función del tiempo y el potencial del electrodo. Como se mencionó anteriormente, Γ_s para PIO^{2+} y PIOH_2 depende de $C(0, t)$, y este parámetro es dependiente del potencial según la ecuación de *Nernst*:

$$\text{Ec. 58 } E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{\text{PYO}^{2+}}(0, t)}{C_{\text{PYOH}_2}(0, t)}$$

Donde E^0 corresponde al potencial termodinámico estándar del par redox $\text{PIO}^{2+}/\text{PIOH}_2$. Por lo tanto, la cantidad de PIO adsorbida (Γ) depende de $C(0, t)$ y del potencial E impuesto. Así, al obtener los valores experimentales de Γ mediante la linealización de las mediciones de CC, es posible obtener una curva de Γ en función de E (Figura 26e y f). Se observa que $\Gamma_{\text{PIO},2+} < \Gamma_{\text{PIOH}_2}$, demostrando el aumento en la concentración de PIOH_2 en la superficie del electrodo, observado en la medición por VC. Este resultado demuestra que durante la reacción $\text{PIO}^{2+} + 2e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{PIOH}_2$, las moléculas de PIO^{2+} que estaban específicamente adsorbidas antes de la reacción catódica permanecieron en la esfera interna después de la reacción $\text{PIOH}_2 \rightarrow \text{PIO}^{2+} + 2e^- + 2\text{H}^+$, de modo que, durante la oxidación también se estaría generando la reacción $\text{PIO}^{2+}_{\text{ads}} + 2e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{PIOH}_{2,\text{ads}}$ en la esfera interna del electrodo. Esto resultó en el aumento de la concentración de PIOH_2 en la esfera interna, de modo que $\text{PIOH}_2 \rightarrow \text{PIOH}_{2,\text{ads}}$. El aumento de la carga de $\text{PIOH}_{2,\text{ads}}$ observada en el perfil de CC coincide con la obtenida en las mediciones de VC. De manera similar, la presencia del parámetro $\Gamma_{\text{PIO},2+}$ relacionado con PIO^{2+} en el perfil de CC también se corresponde con lo observado en las mediciones de VC y en el análisis de *Randles - Ševčík*. Según estos resultados, se propone

la existencia de interacciones atractivas entre PIO y el electrodo de base de carbono. Para confirmar esto, se llevó a cabo un análisis detallado de los perfiles de VC y los datos experimentales del criterio Γ obtenido por CC utilizando el método descrito por Laviron. [136].

4.2.2 Análisis de la adsorción de piocianina

Las interacciones de las especies adsorbidas y la energía libre de adsorción fueron estimadas a través del análisis del perfil de VC mediante las ecuaciones Ec. 45, Ec. 53 y Ec. 54. Los datos obtenidos del análisis se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Valores del parámetro de Laviron y de energía libre de interacción para la adsorción de PIO.

	Γ_{\max} (mol/cm ²)	β (m ³ /mol)	ΔG_{ads}^0 (kJ/mol) *	$v'g\theta_T$
PIO ²⁺ (catódica)	1.83×10^{-12}	1.88 ± 0.01	-1.59 ± 0.01	0.68 ± 0.03
PIOH ₂ (anódica)	1.25×10^{-11}	1.96 ± 0.02	-1.69 ± 0.03	0.36 ± 0.10

Para PIO²⁺_{ads} (reacción de reducción), los valores de ΔG_{ads}^0 se estiman en -1.59 ± 0.01 kJ/mol, mientras que para PIOH_{2,ads} (reacción de oxidación), los valores de ΔG_{ads}^0 son de -1.69 ± 0.03 kJ/mol. Dados los valores de ΔG_{ads}^0 , la adsorción puede ser categorizada como de baja energía, es decir, una adsorción débil. Esta propuesta está basada en la similitud de los resultados con otras moléculas redox, como el caso de Kurapati et al. (2018, 2019), quienes presentaron la adsorción de varios derivados de ferroceno en un electrodo de grafito pirolítico altamente orientado (HOPG) [137, 148]. Los valores de energía libre de estos compuestos químicos se estimaron en -21 kJ/mol para el (FcTMA)⁺. Por otro lado, Cuharuc et al., (2016) obtuvieron resultados similares para el mismo compuesto adsorbido en HOPG ($\Delta G = -14.2$ kJ/mol) [146].

Para describir el tipo de interacción entre PIO y el electrodo de carbón vítreo se realizó un análisis de las mediciones VC siguiendo los criterios establecidos por Laviron (1974) [136]. En este trabajo, para la reacción de reducción, se obtuvieron valores del parámetro $v'g\theta_T$ de 0.68 ± 0.03 . Entonces se propone que $\text{PIO}^{2+} \rightarrow \text{PIO}^{2+}_{\text{ads}}$. Por otro lado, para la reacción de oxidación, se alcanzaron valores de $v'g\theta_T$ de 0.36 ± 0.10 , proponiendo que $\text{PIOH}_2 \rightarrow \text{PIOH}_{2,\text{ads}}$. Estos resultados indicaron la presencia de interacciones de atracción entre PIO y el electrodo. Este resultado confirma la hipótesis de la interacción. Zuaznabar-Gardona & Fragoso (2020) proponen que estas interacciones de atracción podrían estar relacionadas con la presencia de interacciones π - π de los anillos aromáticos con la superficie del electrodo cuando los compuestos orgánicos interactúan con la red aromática de los electrodos de carbono [140]. Se propone que el grupo polar de PIO podría tener una participación significativa. Sin embargo, debido a la presencia de

Resultados y Discusión

anillos aromáticos en la estructura molecular de PIO, es probable que haya interacciones del tipo apilamiento π - π . Estudios realizados por Kurapati et al., (2018) podrían respaldar la suposición de este apilamiento [137], debido a que atribuyen la existencia de este tipo de interacciones (apilamiento π - π) a la presencia de anillos en la estructura molecular de los derivados de ferroceno. Por lo tanto, en este estudio se propone la formación de una interacción intermolecular del tipo apilamiento π - π entre PIO y la superficie del electrodo (Figura 27). La presencia de estas interacciones podría ser consecuencia de la estructura molecular del carbón vítreo. De acuerdo con el modelo de Jenkins y Kawamura (1971), la estructura del carbón vítreo está compuesta por dominios grafiticos similares a cintas de átomos de carbono. Tales cintas de carbono tienen hibridación sp^2 y sp^3 y están apiladas en capas (microfibrillas), torcidas y entrelazadas irregularmente. Esto permitiría la exposición al electrolito de un plano basal compuesto de anillos aromáticos en la parte superior de las microfibrillas, y la exposición de un plano de borde compuesto de terminaciones CH_3 unidas por enlaces de tipo sigma y grupos funcionales $C=O$ y $O-C=O$ [144, 149]. Sin embargo, más adelante serán necesarios estudios de dinámica molecular que permitan tener una mejor comprensión de este tipo de interacción y confirmarla.

Aunque las interacciones electrostáticas con grupos electronegativos en sp^2 también podrían tener una contribución, debido a presencia de grupos funcionales eléctricamente cargados ($C-OH$ o $C=O$), las energías de interacción son demasiado bajas para considerar tal efecto. Bajo estas consideraciones, y en relación con los resultados, se propone que el proceso de adsorción de PIO se lleva a cabo en 3 etapas. Durante la primera etapa (Figura 27a), predominan las interacciones entre PIO y el electrodo. PIO^{2+} se adsorbe en la superficie del carbón vítreo, probablemente a través de interacciones de apilamiento π - π o conjunta con interacciones de tipo CH_3 - π . Estas fuerzas de atracción conducen a la adsorción de $PIO^{2+} \rightarrow PIO^{2+}_{ads}$ en condiciones de voltaje de circuito abierto. La segunda etapa (Figura 27b) ocurre después de llevar a cabo la reacción catódica, aquí las moléculas de PIO^{2+} presentes en la esfera externa, así como las de PIO^{2+}_{ads} presentes en la esfera interna, se reducen. Así, $PIO^{2+} + 2e^- + 2H^+ \rightarrow PIOH_2$ y $PIO^{2+}_{ads} + 2e^- + 2H^+ \rightarrow PIOH_{2,ads}$. Además, dado que en este estudio el parámetro $v'g\theta_T = 0.68 \pm 0.03$ para la reacción catódica, es probable que las moléculas de $PIOH_2$ en la esfera externa mantengan interacciones de atracción con el electrodo, de modo que $PIOH_2 \rightarrow PIOH_{2,ads}$. La tercera etapa (Figura 27c) ocurre después de la reacción anódica. Aquí, las moléculas de $PIOH_2$ y $PIOH_{2,ads}$ se oxidan en la superficie. Así, $PIOH_2 \rightarrow PIO^{2+} + 2e^- + 2H^+$ y $PIOH_{2,ads} \rightarrow PIO^{2+}_{ads} + 2e^- + 2H^+$. En este caso, dado que los valores del parámetro $v'g\theta_T$ (0.36 ± 0.10) son menores que los de la reacción catódica, es probable que existan interacciones repulsivas débiles entre PIO y el electrodo que estén compitiendo con las interacciones de atracción, lo que llevaría al desprendimiento de algunas de las moléculas de PIO del electrodo. Una vez conocido el proceso de adsorción de PIO en el electrodo, se estudió el efecto de la adsorción en la TEE de *P. aeruginosa* NEJ07R. En esta sección, se

Resultados y Discusión

propone que *P. aeruginosa* NEJ07R aprovecha la adsorción específica de PIO para llevar a cabo la TEE. Así, la hipótesis propuesta es que *P. aeruginosa* puede establecer una cadena de conducción de electrones a través de PIO adsorbido cuando se mantiene un sistema sin limitación sustrato. Para confirmar esto, se requerirá la colonización de un electrodo basado en carbono y se estudiará la TEE en presencia y ausencia de PIO.

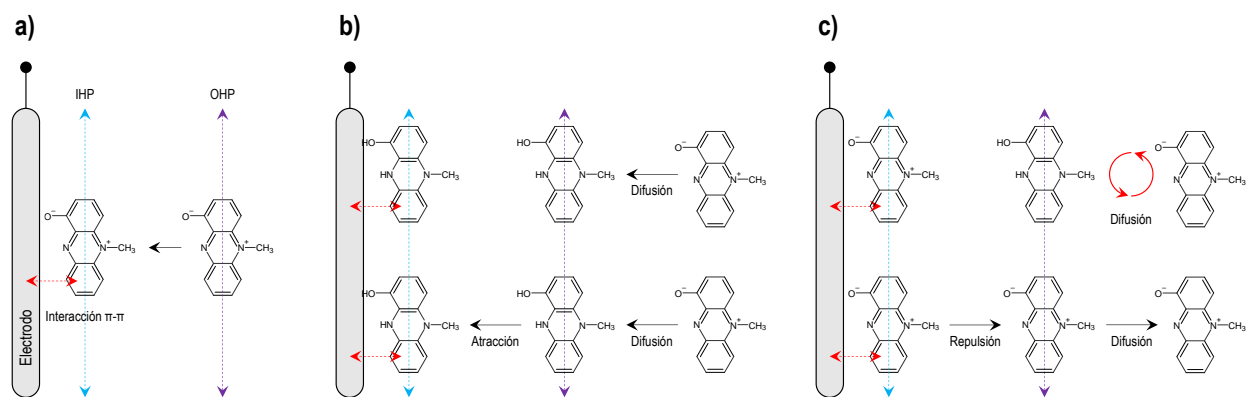


Figura 27. Interacción propuesta de PIO con la superficie del carbono vítreo: (a) condiciones de voltaje a circuito abierto, (b) después de la reacción catódica y (c) después de la reacción anódica.

4.2.3 Transferencia extracelular de electrones de *P. aeruginosa* NEJ07R

Para estudiar la transferencia de electrones de *P. aeruginosa* NEJ07R en presencia de PIO, primero se llevó a cabo la colonización de un electrodo de tela de carbono mediante la aplicación de un voltaje ajustado a 0 V vs. ECS, y se registró la corriente obtenida utilizando la técnica de CA. Los resultados de este estudio se presentan en la Figura 28a. Durante la fase de colonización, se observó un aumento típico en la corriente, relacionado con el crecimiento celular de microorganismos electrogénicos en la interfaz. [129, 130, 150]. La medición de la VC al final de la fase de colonización muestra el desarrollo de señales relacionadas con la presencia de MR en las proximidades de la superficie, entre ellas, PIO (Figura 28b), que fue detectado a una concentración de $1.39 \pm 0.21 \mu\text{g/mL}$ (detección mediante UPLC®) en el medio de cultivo y a un $E_{\text{pa}}(\text{II})_{\text{a}} \approx -0.291 \text{ V vs. ECS}$. Después de la fase de colonización, el electrodo colonizado fue recuperado e insertado en una celda electroanalítica con glucosa ($\sim 100 \text{ mM}$) en ausencia de MR. La medición inicial de VC en este ciclo mostró que se mantuvo la señal asignada a PIO (Anexo 5, ver Figura A5-1) a un valor de $E_{\text{pa}} \approx -0.305 \text{ V vs. ECS}$, lo que indica que la PIO producida durante la fase de colonización permaneció unida en la interfaz del electrodo.

Resultados y Discusión

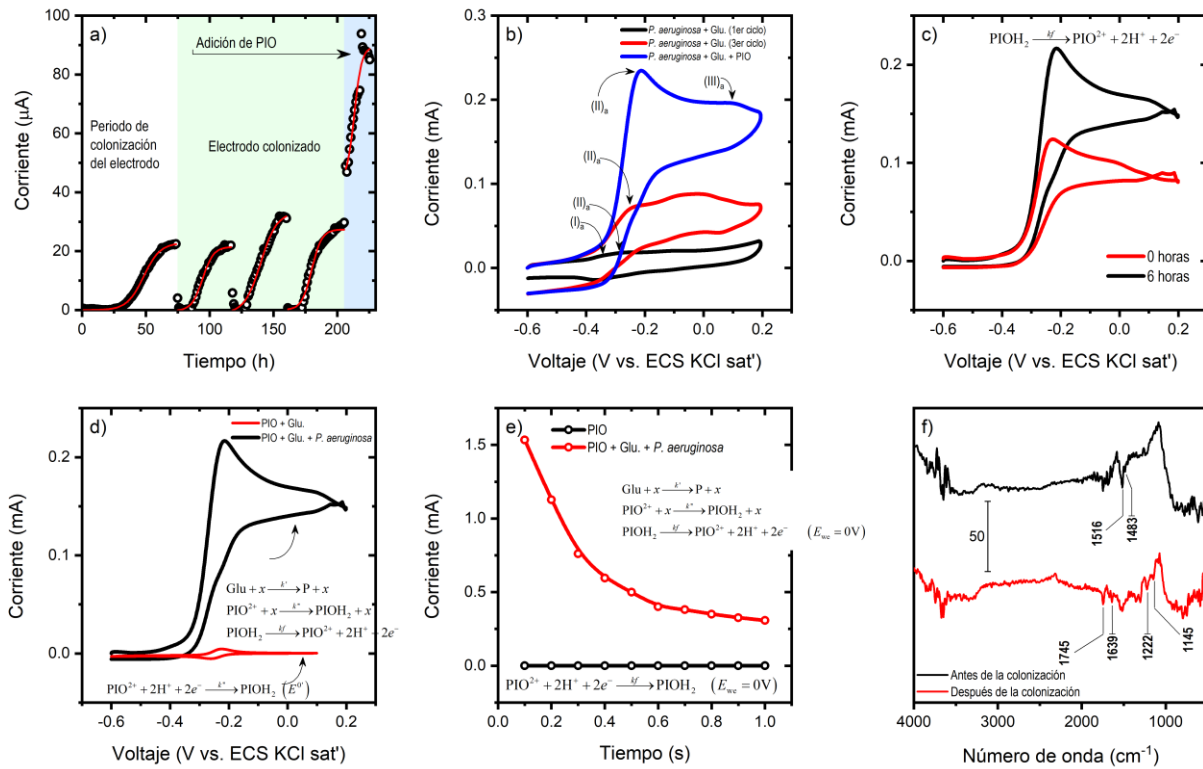


Figura 28. Curva CA de la TEE durante la fase de colonización (región en color blanco), electrodo colonizado en presencia de glucosa (región en color verde) y en presencia de PIO (región en color azul); (b) curva VC de la TEE al final de la fase de colonización (curva negra), del electrodo colonizado (curva roja) y en presencia de PIO; (c) Perfil VC de la TEE en presencia de PIO en tiempo inicial y después de incubación (6 h); (d) Perfil VC de PIO + glucosa en presencia y ausencia de *P. aeruginosa* NEJ07R; (e) Perfil CA de PIO + glucosa en presencia y ausencia de *P. aeruginosa* NEJ07R; (f) Espectros FT-IR obtenidos para los electrodos de tela de carbono antes (línea negra) y después (línea roja) de la colonización con *P. aeruginosa* NEJ07R.

Del mismo modo, el par redox (I)_a/(I)_c, que podría ser asignado al PCA, fue detectado a un E_{pa} ≈ -0.346 V vs. ECS, y el par redox (III)_a/(III)_c fue detectado a un E_{1/2} ≈ 0.069 V vs. ECS (Figura 28b). De forma parecida al presente estudio, Bosire & Rosenbaum (2017) obtuvieron resultados similares en un electrodo colonizado con *P. aeruginosa* [130]. Estos autores reportaron la presencia de dos pares redox en la superficie cuando el electrodo fue colonizado a voltajes catódicos inferiores a 0.047 V vs. ECS (*datos obtenidos frente a un electrodo Ag/AgCl sat'*, mientras que, en este estudio, los valores se convirtieron a ECS). En ese trabajo, la primera señal de VC se detectó a E_{1/2} = -0.287 V vs. ECS y se asignó a la presencia de fenazina adsorbida en la superficie del electrodo y disuelta en el medio. De manera similar, Yong et al.,

Resultados y Discusión

(2017) obtuvieron señales de VC iguales a $E_{1/2} = -0.247$ V vs. ECS en un bioánodo colonizado por *P. aeruginosa*, donde el par redox detectado se asignó al ciclo redox de PIO [134].

Bosire & Rosenbaum (2017) también detectó un segundo par redox a $E_{1/2} \approx 0.005$ vs. ECS y se asignó a otro compuesto adsorbido que solo estaba presente en el electrodo colonizado [130]. En esta etapa del estudio, solo es posible proponer que las señales encontradas en el dominio de voltaje anódico podrían ser complejos respiratorios de la membrana. Kracke et al., (2015) ya habían reportado que algunos de los compuestos detectados en este dominio de voltaje podrían ser citocromos tipo c. Sin embargo, se requieren estudios proteómicos y de biología molecular para confirmar esto en *P. aeruginosa* NEJ07R [66]. Para visualizar los cambios en los electrodos de tela de carbono hechos por *P. aeruginosa* NEJ07R antes y después de la colonización, se obtuvieron espectros FT-IR en los electrodos. Una revisión de la Figura 28f reveló señales vibracionales de estiramiento para grupos aromáticos C=C hacia 1516 y 1483 cm^{-1} con intensidades medias y débiles, respectivamente. Estos resultados confirmaron la estructura aromática de la superficie de tela de carbono antes de llevar a cabo el procedimiento de colonización, lo que concuerda con los resultados experimentales publicados por Pötschke et al. (2019) y Jenkins et al. (1972) [149, 151, 152].

Después de la colonización se mostró que las intensidades de las señales vibracionales asignadas a los grupos aromáticos C=C en los electrodos de tela de carbono disminuyeron significativamente, lo que sugiere la adsorción de moléculas de PIO en la superficie colonizada. Una revisión detallada reveló un par de nuevas bandas vibracionales de estiramiento hacia 1222 y 1145 cm^{-1} (para aminas ternarias alifáticas), así como otras señales vibracionales de estiramiento ubicadas en 1639 cm^{-1} (para grupos C=N de aminas cíclicas insaturadas) y 1745 cm^{-1} (para grupos O=C de cetonas cíclicas alifáticas), lo que podría ser indicio de la presencia de PIO en el electrodo colonizado [153]. Las bandas observadas en las muestras después de la colonización mostraron ser similares con los informes previamente publicados por DeBritto et al., (2020) para muestras estándar de PIO [154]. Para la medición y determinación de la TEE, se observó que al utilizar glucosa (~ 100 mM) como única fuente de electrones, la TEE se mantuvo, obteniendo una corriente máxima de 25.68 μA durante el primer ciclo del electrodo colonizado y teniendo un consumo aproximado de glucosa de 5.85 ± 0.67 mM después de 43.03 horas de incubación (Figura 28a, área verde). Una vez alcanzada la corriente máxima, el electrodo colonizado fue transferido a un medio de cultivo fresco con glucosa (~ 100 mM) hasta alcanzar nuevamente la corriente máxima. Durante el segundo y tercer ciclo del electrodo colonizado, la corriente máxima se alcanzó en un tiempo promedio de 43.9 ± 1.22 h, obteniendo un promedio de corriente máxima de 31.4 ± 5.21 μA . En cuanto al consumo del sustrato, durante el segundo ciclo se consumieron 6.09 ± 1.79 mM de glucosa, mientras que en el tercer ciclo se consumieron 10.63 ± 1.25 mM, mejorando gradualmente el consumo del sustrato. Al final del tercer ciclo (Figura 28a, región verde), los

Resultados y Discusión

estudios de VC mostraron que la señal de oxidación de PIO se mantuvo a un $E_{pa} \approx -0.248$ V vs. ECS. El perfil de VC para PIO mostró un notable aumento en la corriente de oxidación, mientras que la corriente de reducción prácticamente no es visible (Figura 28b, línea roja). Después de 6 h, la corriente del pico aumentó y los valores de E_{pa} se desplazaron hacia voltajes anódicos, manteniendo valores de $E_{pa} \approx -0.214$ V vs. ECS. Probablemente, el cambio de potencial observado se deba a que las condiciones de pH en la interfaz se acidificaron, desplazando el valor de E_{pa} de PIO. Además, según Rountree et al., (2014) y Constenin et al., (2012), el potencial del pico depende del grado de agotamiento del sustrato, por lo que a medida que el proceso redox se acerca a condiciones de catálisis completa, el potencial del pico (E_{pa}) se desplaza hacia valores anódicos. [117, 155]. La forma de este perfil VC indica que *P. aeruginosa* NEJ07R está llevando a cabo la reducción de PIO^{2+} , de modo que se puede proponer la reacción $PIO^{2+} + x \rightarrow PIOH_2 + x$, donde x representa la densidad celular de *P. aeruginosa* NEJ07R. Como se mencionó anteriormente, es probable que la reacción de reducción de PIO sea llevada a cabo por interacción intermolecular de los complejos respiratorios de la membrana celular. Además, los resultados de consumo de glucosa indican que el paso limitante de la TEE no es la velocidad de consumo. Por lo tanto, se propone que el paso limitante podría ser la TE entre las células y PIO, es decir, la reducción microbiana de PIO.

Para confirmar este proceso, se agregó exógenamente PIO al medio de cultivo fresco que contenía el electrodo colonizado y glucosa (~100 mM). La concentración de PIO en el medio fresco se estableció en 0.25 mM. El estudio de VC a partir de la hora 0 de incubación mostró un aumento significativo en la corriente de oxidación de PIO (Figura 28c, línea roja). La forma del perfil VC se mantuvo hasta después de 6 h de incubación, aumentando significativamente sus valores de corriente máxima (Figura 28c, línea negra). Estos resultados coinciden con los obtenidos en los estudios de CA (Figura 28a, área de color azul), donde se obtuvo una corriente de 47.96 μ A después de la primera hora de incubación en presencia de PIO. Después de 6 h de incubación, la corriente de oxidación obtenida por CA aumentó a 74.60 μ A. La corriente máxima asociada con la TEE medida por CA se obtuvo después de 7 h de incubación y alcanzó 93.83 μ A. La comparación de los perfiles VC al final de los ciclos de trabajo (Figura 28b) también muestra el aumento de la corriente de oxidación de PIO después de su adición exógena al medio de cultivo. Estos resultados muestran que *P. aeruginosa* NEJ07R puede llevar a cabo de forma continua la reacción $PIO^{2+} + x \rightarrow PIOH_2 + x$. Yang et al., (2017), obtuvieron resultados similares al estudiar el ciclo redox de PIO en presencia de *S. oneidensis* [71]. Los autores demostraron la reducción microbiana de PIO al conseguir aumentos considerables en la corriente de oxidación obtenida por VC, mientras que la corriente de reducción no fue visible en la medición, dando lugar a un perfil sigmoidal que puede estar relacionado con el proceso de catálisis electroquímica [117]. Del mismo modo, Zheng et al., (2015) obtuvieron perfiles similares para *P. aeruginosa* PAO1-rhIA en presencia de PIO y relacionaron el aumento de la concentración de PIO con una mejora

Resultados y Discusión

en la TEE [122]. En ambos estudios se concluyó que los microorganismos electrogénicos llevan a cabo la reacción de reducción de PIO, con la reacción de oxidación desarrollada en la superficie. Esto implica que la reacción $\text{PIO}^{2+} + x \rightarrow \text{PIOH}_2 + x$ es realizada por el microorganismo electrogénico, seguida por la reacción $\text{PIOH}_2 \rightarrow \text{PIO}^{2+} + 2e^- + 2\text{H}^+$ la cual se lleva a cabo en el electrodo, lo que explica los aumentos en la corriente anódica ya que se mantiene la regeneración de la especie PIOH_2 . De igual manera, el análisis del ciclo redox de PIO en ausencia de *P. aeruginosa* NEJ07R demostró el proceso de electrocatálisis microbiana, ya que no se observaron cambios en el perfil de VC que pudieran ser atribuidos a la catálisis (Figura 28d). Mientras tanto, los perfiles de VC en presencia de *P. aeruginosa* NEJ07R mantuvieron el aumento en la corriente anódica y la disminución en la corriente catódica, lo que sugiere que este comportamiento puede ser atribuido a la reacción $\text{PIO}^{2+} + x \rightarrow \text{PIOH}_2 + x$, seguida por la reacción $\text{PIOH}_2 \rightarrow \text{PIO}^{2+} + 2e^- + 2\text{H}^+$.

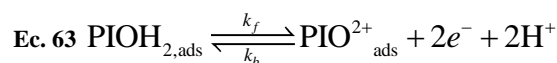
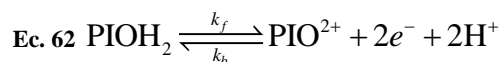
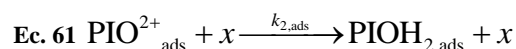
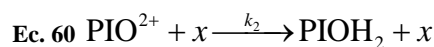
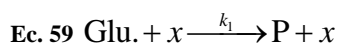
Para complementar los resultados obtenidos por VC, se realizaron mediciones por CA comparando la corriente obtenida en ausencia y presencia de *P. aeruginosa* NEJ07R aplicando un paso de voltaje a 0 V vs. ECS (Figura 28e). Los resultados de las mediciones por CA demostraron el aumento catalítico de la corriente anódica observada por VC, respaldando la evidencia de la reducción microbiana de PIO y la mejora del proceso de oxidación de dicho metabolito en la superficie. Por otro lado, los resultados de la caracterización de la tela de carbono por FT-IR y estudios previos de PIO en carbón vítreo permiten considerar la adsorción para el proceso catalítico microbiano. En un estudio realizado por Rountree et al., (2014), en el que se presenta la electrocatálisis con MR se menciona que los perfiles de la VC similares a los de este estudio están relacionados con la competencia cinética entre el consumo del sustrato y la difusión de MR hacia el electrodo [117]. De acuerdo con los resultados del presente estudio, el consumo del sustrato no limita la tasa de TE al electrodo a través de PIO. Por lo tanto, la cinética de la transformación del sustrato al producto dada por la reacción $\text{Glu} + x \rightarrow \text{P} + x$ no dificulta la transferencia de electrones de *P. aeruginosa* NEJ07R. En cambio, el perfil de VC está influenciado por una corriente en exceso que resulta del paso de adsorción de PIO al electrodo. Los resultados de la caracterización del ciclo redox de PIO en carbón vítreo y la evidencia de la adsorción de PIO en tela de carbono respaldan la propuesta de que la forma del perfil de VC está influenciada por este proceso de adsorción. Como mencionaron Pérez-García et al. (2021), cuando PIO se encuentra adsorbida en la superficie de un electrodo de carbono puede generar contribuciones adicionales a la corriente en un proceso electroquímico microbiano. Este paso de adsorción contribuye al perfil sigmoideal VC observado y al aumento de la corriente de oxidación, ya que PIO se vuelve más disponible para el proceso de reducción microbiana, lo que podría promover el comportamiento electrogénico de *P. aeruginosa* NEJ07R. [156]. Por lo tanto, considerando la adsorción de PIO en el electrodo, se propone que la reacción anódica tendría la contribución de la reacción $\text{PIO}^{2+}_{\text{ads}} + x \rightarrow \text{PIOH}_{2,\text{ads}} + x$ seguida

Resultados y Discusión

de la reacción $\text{PIOH}_{2,\text{ads}} \rightarrow \text{PIO}^{2+}_{\text{ads}} + 2e^- + 2\text{H}^+$. Sin embargo, es importante señalar que la afinidad microbiana por el sustrato también podría ser un parámetro limitante en la TEE. Se necesitan estudios más profundos para confirmar tal propuesta.

4.2.4 Análisis del mecanismo de transferencia extracelular de electrones

De acuerdo con los resultados obtenidos se propone el siguiente mecanismo de reacción en la TEE de *P. aeruginosa* NEJ07R:



Los resultados sugieren que las interacciones de atracción originadas por apilamiento π - π entre PIO y la red aromática de los electrodos de carbono podrían ser aprovechadas por *P. aeruginosa* NEJ07R para mejorar el proceso de TEE. En la parte superior de la Figura 29 se muestra un esquema que representa el proceso catalítico propuesto de TEE cuando PIO está adsorbido en el electrodo. Una orientación paralela de PIO con respecto al plano basal del electrodo podría permitir la interacción de los grupos C=O con estructuras en el periplasma de *P. aeruginosa* NEJ07R. Sin embargo, una baja interacción de PIO con el electrodo no permitiría una comunicación electrónica estable entre *P. aeruginosa* NEJ07R y el electrodo. En el futuro, se requerirán estudios electroquímicos para determinar el tipo de interacción entre PIO y *P. aeruginosa* NEJ07R, así como análisis biológicos para determinar las enzimas periplásmicas o citosólicas de *P. aeruginosa* que podrían estar interactuando con PIO. En la parte inferior de la Figura 29 se muestra un mecanismo propuesto para el caso de la difusión libre de PIO en la biopelícula. El proceso de difusión permitiría que PIO alcance las células más alejadas de la superficie del electrodo. Sin embargo, de acuerdo con los resultados, se propone que solo las células que son electroquímicamente activas en la superficie del electrodo podrán lograr la TEE a través de la interacción intermolecular, ya que las células libres en el medio de cultivo, que no son electroquímicamente activas, no podrían llevar a cabo la TEE con éxito. Esto

Estas páginas fueron eliminadas debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública 2021, y con el Artículo 116 de la Ley General de Transparencia y Acceso a la Información Pública 2021.

Bibliografía

- strain KN400. *Energy Environ Sci* 2011; 4: 896–913.
- [106] Rousseau R, Délia ML, Bergel A. A theoretical model of transient cyclic voltammetry for electroactive biofilms. *Energy Environ Sci* 2014; 7: 1079.
- [107] Laviron E, Roullier L. General expression of the linear potential sweep voltammogram for a surface redox reaction with interactions between the adsorbed molecules. *J Electroanal Chem Interfacial Electrochem* 1980; 115: 65–74.
- [108] Bard AJ, Faulkner LR. *Electrochemical methods - Fundamentals and applications*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 2001.
- [109] Laviron E. Adsorption, autoinhibition and autocatalysis in polarography and in linear potential sweep voltammetry. *J Electroanal Chem Interfacial Electrochem* 1974; 52: 355–393.
- [110] Savéant JM, Vianello E. Potential-sweep chronoamperometry theory of kinetic currents in the case of a first order chemical reaction preceding the electron-transfer process. *Electrochim Acta* 1963; 8: 905–923.
- [111] Nicholson RS, Shain I. Theory of stationary electrode polarography. Single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems. *Anal Chem* 1964; 36: 706–723.
- [112] Marsili E, Rollefson JB, Baron DB. Microbial biofilm voltammetry: Direct electrochemical characterization of catalytic electrode-attached biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 7329–7337.
- [113] Ševčík A. Oscillographic polarography with periodical triangular voltage. *Collect Czechoslov Chem Commun* 1948; 13: 349–377.
- [114] Randles JEB. A cathode ray polarograph. Part II.—The current-voltage curves. *Trans Faraday Soc* 1948; 44: 327–338.
- [115] Matsuda H, Ayabe Y. Zur Theorie der Randles-Sevčíkschen Kathodenstrahl-Polarographie. *Zeitschrift für Elektrochemie, Berichte der Bunsengesellschaft für Phys Chemie* 1955; 59: 494–503.
- [116] Torres CI, Marcus AK, Parameswaran P. Kinetic experiments for evaluating the Nernst–Monod model for anode-respiring bacteria (ARB) in a biofilm anode. *Environ Sci Technol* 2008; 42: 6593–6597.
- [117] Rountree ES, McCarthy BD, Eisenhart TT. Evaluation of homogeneous electrocatalysts by cyclic voltammetry. *Inorg Chem* 2014; 53: 9983–10002.
- [118] Savéant J, Costentin C. Enzymatic catalysis of electrochemical reactions. En: *Elements of Molecular and Biomolecular Electrochemistry*. Wiley, pp. 383–437.

Bibliografía

- [119] Wang VCC, Johnson BA. Interpreting the electrocatalytic voltammetry of homogeneous catalysts by the foot of the wave analysis and its wider implications. *ACS Catal* 2019; 9: 7109–7123.
- [120] Hamelers HVM, ter Heijne A, Stein N. Butler–Volmer–Monod model for describing bio-anode polarization curves. *Bioresour Technol* 2011; 102: 381–387.
- [121] Srikanth S, Marsili E, Flickinger MC. Electrochemical characterization of *Geobacter sulfurreducens* cells immobilized on graphite paper electrodes. *Biotechnol Bioeng* 2008; 99: 1065–1073.
- [122] Zheng T, Xu YS, Yong XY. Endogenously enhanced biosurfactant production promotes electricity generation from microbial fuel cells. *Bioresour Technol* 2015; 197: 416–421.
- [123] Fricke K, Harnisch F, Schröder U. On the use of cyclic voltammetry for the study of anodic electron transfer in microbial fuel cells. *Energy Environ Sci* 2008; 1: 144–147.
- [124] Richter H, Nevin KP, Jia H. Cyclic voltammetry of biofilms of wild type and mutant *Geobacter sulfurreducens* on fuel cell anodes indicates possible roles of OmcB, OmcZ, type IV pili, and protons in extracellular electron transfer. *Energy Environ Sci* 2009; 2: 506–516.
- [125] Wei HZ, Van De Ven TGM, Omanovic S. Adsorption behavior of dinucleotides on bare and ru-modified glassy carbon electrode surfaces. *Langmuir* 2008; 24: 12375–12384.
- [126] Valenti G, Iurlo M, Claramunt RM. Redox properties and interchromophoric electronic interactions in isoalloxazine–anthraquinone dyads. *ChemElectroChem* 2018; 5: 985–990.
- [127] Staab HA, Kanellakopulos J, Kirsch P. $\pi \dots \pi$ interactions of flavins, 5. Syntheses, structures and physical properties of flavin systems with covalent bonding to π donors and π acceptors (quinones). *Liebigs Ann* 1995; 1995: 1827–1836.
- [128] Bacame-Valenzuela FJ, Pérez-García JA, Castañeda-Zaldívar F. Pyocyanin biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* using a biodiesel byproduct. *Mex J Biotechnol* 2020; 5: 1–16.
- [129] Bosire EM, Blank LM, Rosenbaum MA. Strain- and substrate-dependent redox mediator and electricity production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 2016; 82: 5026–5038.
- [130] Bosire EM, Rosenbaum MA. Electrochemical potential influences phenazine production, electron transfer and consequently electric current generation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* 2017; 8: 892.
- [131] Shen HB, Yong XY, Chen YL. Enhanced bioelectricity generation by improving pyocyanin production and membrane permeability through sophorolipid addition in *Pseudomonas aeruginosa*-inoculated microbial fuel cells. *Bioresour Technol* 2014; 167: 490–494.

Bibliografia

- [132] Yong XY, Feng J, Chen YL. Enhancement of bioelectricity generation by cofactor manipulation in microbial fuel cell. *Biosens Bioelectron* 2014; 56: 19–25.
- [133] Yong XY, Shi DY, Chen YL. Enhancement of bioelectricity generation by manipulation of the electron shuttles synthesis pathway in microbial fuel cells. *Bioresour Technol* 2014; 152: 220–224.
- [134] Yong XY, Yan ZY, Shen HB. An integrated aerobic-anaerobic strategy for performance enhancement of *Pseudomonas aeruginosa*-inoculated microbial fuel cell. *Bioresour Technol* 2017; 241: 1191–1196.
- [135] Baron D, LaBelle E, Coursolle D, et al. Electrochemical measurement of electron transfer kinetics by *Shewanella oneidensis* MR-1. *J Biol Chem* 2009; 284: 28865–28873.
- [136] Laviron E. Surface linear potential sweep voltammetry. *J Electroanal Chem Interfacial Electrochem* 1974; 52: 395–402.
- [137] Kurapati N, Pathirathna P, Chen R. Voltammetric measurement of adsorption isotherm for ferrocene derivatives on highly oriented pyrolytic graphite. *Anal Chem* 2018; 90: 13632–13639.
- [138] Kurachi M. Studies on the biosynthesis of pyocyanine. (II) : Isolation and determination of pyocyanine. *Bull Inst Chem Res Kyoto Univ* 1958; 36: 174–187.
- [139] Lam HH, Nguyen TMT, Do TAS. Quantification of total sugars and reducing sugars of dragon fruit-derived sugar-samples by UV-Vis spectrophotometric method. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* 2021; 947: 012041.
- [140] Zuaznabar-Gardona JC, Frago A. Electrochemical characterisation of the adsorption of ferrocenemethanol on carbon nano-onion modified electrodes. *J Electroanal Chem* 2020; 871: 114314.
- [141] Chen R, Najarian AM, Kurapati N. Self-inhibitory electron transfer of the Co(III)/Co(II)-complex redox couple at pristine carbon electrode. *Anal Chem* 2018; 90: 11115–11123.
- [142] Marcus RA. On the theory of electron-transfer reactions. VI. Unified treatment for homogeneous and electrode reactions. *J Chem Phys* 1965; 43: 679–701.
- [143] Wopschall RH, Shain I. Effects of adsorption of electroactive species in stationary electrode polarography. *Anal Chem* 1967; 39: 1514–1527.
- [144] Jenkins GM, Kawamura K. Structure of Glassy Carbon. *Nature* 1971; 231: 175–176.
- [145] Szeluga U, Pusz S, Kumanek B. Influence of unique structure of glassy carbon on morphology and properties of its epoxy-based binary composites and hybrid composites with carbon nanotubes. *Compos Sci Technol* 2016; 134: 72–80.

Bibliografía

- [146] Cuharuc AS, Zhang G, Unwin PR. Electrochemistry of ferrocene derivatives on highly oriented pyrolytic graphite (HOPG): quantification and impacts of surface adsorption. *Phys Chem Chem Phys* 2016; 18: 4966–4977.
- [147] Shayani-jam H. Electrochemical study of adsorption and electrooxidation of 4,4'-biphenol on the glassy carbon electrode: Determination of the orientation of adsorbed molecules. *Monatshefte für Chemie - Chem Mon* 2019; 150: 183–192.
- [148] Kurapati N, Pathirathna P, Ziegler CJ. Adsorption and electron-transfer mechanisms of ferrocene carboxylates and sulfonates at highly oriented pyrolytic graphite. *ChemElectroChem* 2019; 6: 5651–5660.
- [149] Jenkins GM, Kawamura K, Ban LL. Formation and structure of polymeric carbons. *Proc R Soc London A Math Phys Sci* 1972; 327: 501–517.
- [150] Askitosari TD, Boto ST, Blank LM. Boosting heterologous phenazine production in *Pseudomonas putida* KT2440 through the exploration of the natural sequence space. *Front Microbiol* 2019; 10: 1990.
- [151] Fedoseeva Y V., Lobiak E V., Shlyakhova E V. Hydrothermal activation of porous nitrogen-doped carbon materials for electrochemical capacitors and sodium-ion batteries. *Nanomaterials* 2020; 10: 2163.
- [152] Pötschke L, Huber P, Schriever S. Rational selection of carbon fiber properties for high-performance textile electrodes in bioelectrochemical systems. *Front Energy Res* 2019; 7: 100.
- [153] Cross AD, Jones RA. An introduction to practical infra-red spectroscopy. 3rd ed. Boston, MA: Springer US. 1969.
- [154] DeBritto S, Gajbar TD, Satapute P. Isolation and characterization of nutrient dependent pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* and its dye and agrochemical properties. *Sci Rep* 2020; 10: 1542.
- [155] Costentin C, Drouet S, Robert M. Turnover numbers, turnover frequencies, and overpotential in molecular catalysis of electrochemical reactions. Cyclic voltammetry and preparative-scale electrolysis. *J Am Chem Soc* 2012; 134: 11235–11242.
- [156] Pérez-García JA, Bacame-Valenzuela FJ, Palomares-Hernández A. Microbial electrochemical technologies for wastewater treatment. Elsevier. 2021.
- [157] Daddaoua A, Krell T, Alfonso C. Compartmentalized glucose metabolism in *Pseudomonas putida* is controlled by the PtxS repressor. *J Bacteriol* 2010; 192: 4357–4366.
- [158] Jo J, Price-Whelan A, Cornell WC. Interdependency of respiratory metabolism and phenazine-associated physiology in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* 2020; 202.

Bibliografía

- [159] Norman RS, Moeller P, McDonald TJ. Effect of pyocyanin on a crude-oil-degrading microbial community. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 4004–4011.
- [160] Zhou L, Jiang HX, Sun S. Biotechnological potential of a rhizosphere *Pseudomonas aeruginosa* strain producing phenazine-1-carboxylic acid and phenazine-1-carboxamide. *World J Microbiol Biotechnol* 2016; 32: 50.
- [161] Peng H, Zhang P, Bilal M. Enhanced biosynthesis of phenazine-1-carboxamide by engineered *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *Microb Cell Fact* 2018; 17: 117.
- [162] Zhao Q, Hu HB, Wang W. Novel three-component phenazine-1-carboxylic acid 1,2-dioxygenase in *Sphingomonas wittichii* DP58. *Appl Environ Microbiol* 2017; 83.
- [163] Ren Y, Zhang M, Gao S. The novel amidase PcnH initiates the degradation of phenazine-1-carboxamide in *Sphingomonas histidinilytica* DS-9. *Appl Environ Microbiol* 2022; 88.
- [164] Meirelles LA, Newman DK. Both toxic and beneficial effects of pyocyanin contribute to the lifecycle of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 2018; 110: 995–1010.
- [165] Dietrich LEP, Price-Whelan A, Petersen A. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 2006; 61: 1308–1321.
- [166] Oickle AM, Tom J, Andreas HA. Carbon oxidation and its influence on self-discharge in aqueous electrochemical capacitors. *Carbon N Y* 2016; 110: 232–242.
- [167] Pérez-García JA, Bacame-Valenzuela FJ, Manríquez J. Electrochemical analysis of extracellular electron transfer process of *Pseudomonas aeruginosa* NEJ07R using pyocyanin on a carbon electrode. *J Environ Chem Eng* 2023; 110708.
- [168] Yu S, Lai B, Plan MR. Improved performance of *Pseudomonas putida* in a bioelectrochemical system through overexpression of periplasmic glucose dehydrogenase. *Biotechnol Bioeng* 2018; 115: 145–155.
- [169] Schmitz S, Nies S, Wierckx N. Engineering mediator-based electroactivity in the obligate aerobic bacterium *Pseudomonas putida* KT2440. *Front Microbiol* 2015; 6: 284.
- [170] Du Q, Li T, Li N. Protection of electroactive biofilm from extreme acid shock by polydopamine encapsulation. *Environ Sci Technol Lett* 2017; 4: 345–349.
- [171] Popat SC, Torres CI. Critical transport rates that limit the performance of microbial electrochemistry technologies. *Bioresour Technol* 2016; 215: 265–273.

Bibliografia

- [172] Chong P, Erable B, Bergel A. Effect of pore size on the current produced by 3-dimensional porous microbial anodes: A critical review. *Bioresour Technol* 2019; 289: 121641.
- [173] Yang P, Gao Y, Wang N. The restricted mass transfer inside the anode pore channel affects the electroactive biofilms formation, community composition and the power production in microbial electrochemical systems. *Sci Total Environ* 2023; 898: 165448.
- [174] Wei Q, Ma L. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 20983–21005.
- [175] Nicholson RS. Theory and Application of cyclic voltammetry for measurement of electrode reaction kinetics. *Anal Chem* 1965; 37: 1351–1355.
- [176] Lavagnini I, Antiochia R, Magno F. An extended method for the practical evaluation of the standard rate constant from cyclic voltammetric data. *Electroanalysis* 2004; 16: 505–506.
- [177] Randviir EP. A cross examination of electron transfer rate constants for carbon screen-printed electrodes using electrochemical impedance spectroscopy and cyclic voltammetry. *Electrochim Acta* 2018; 286: 179–186.
- [178] Anson FC. Innovations in the study of adsorbed reactants by chronocoulometry. *Anal Chem* 1966; 38: 54–57.
- [179] Dolan SK, Kohlstedt M, Trigg S. Contextual flexibility in *Pseudomonas aeruginosa* central carbon metabolism during growth in single carbon sources. *MBio* 2020; 11.
- [180] Nguyen AV, Lai B, Adrian L. The anoxic electrode-driven fructose catabolism of *Pseudomonas putida* KT2440. *Microb Biotechnol* 2021; 14: 1784–1796.
- [181] Lian Y, Yang Y, Guo J. Electron acceptor redox potential globally regulates transcriptomic profiling in *Shewanella decolorationis* S12. *Sci Rep* 2016; 6: 31143.
- [182] Korth B, Harnisch F. Spotlight on the energy harvest of electroactive microorganisms: The impact of the applied anode potential. *Front Microbiol* 2019; 10: 1352.
- [183] Nguyen VK, Park Y, Yu J. Microbial selenite reduction with organic carbon and electrode as sole electron donor by a bacterium isolated from domestic wastewater. *Bioresour Technol* 2016; 212: 182–189.