



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS  
*"Francisco García Salinas"*

Unidad Académica de Ciencias Químicas  
Maestría en Ciencia y Tecnología Química

TESIS

**Estudio de inmovilización enzimática, sobre sustratos de carbono modificados con Porfirina y Quantum dots para su empleo en celdas de combustible de carbohidratos.**

Para Obtener el Grado de  
Maestro en Ciencia y Tecnología Química

Presenta:

**Jairo Daniel Lozano López**

Director de Tesis: Dr. en C. Sergio Miguel Durón Torres

Co-Directora de Tesis: Dra. en C. Marisol Galván Valencia

Asesor Externo: Dr. en C. Ricardo Antonio Escalona Villalpando

Mayo 2019

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo investigación, se realizó en el Laboratorio de Electroquímica de la Maestría en Ciencia y Tecnología Química (MCTQ) de la Unidad Académica de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas, contando con los apoyos financieros otorgados por la Secretaría de Energía (SENER) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca de maestría con registro No. 639436.

Se agradece así mismo al personal académico y administrativo asociado al programa de Maestría en Ciencia y Tecnología Química por su disposición y enseñanza, así como por las facilidades y orientación brindadas para la realización de este trabajo.

## DEDICATORIA

A Quien creó el Cielo, la Tierra, el Mar, y todo lo que en Ellos hay, por permitirme éste nuevo logro por sustentarme a lo largo del Sendero, y proveer de mil formas para cada una de mis necesidades y de Quien sin duda me considero Hijo.

A mis amados padres Noé Lozano Villegas y Consuelo López Bocanegra, por ser ese pilar indestructible que con su apoyo y motivación me ha mantenido a flote y con un rumbo fijo.

A mis hermanos Isaí y William, por brindarme ese ápice de juventud y esperanza cuando parece que no hay por qué seguir.

A mis inigualables amigos y compañeros de laboratorio Ivone, Alejandra, Josua, Arturo, Nicté, Alan, Jerry, Aldo y un sinfín de etcéteras, sin los cuales las horas de trabajo hubieran sido eternas e insufribles.

A mis amigos externos José Carlos, Edith, Nahum, Mitchel, Giovanni, y a todos aquellos que si por nombre no menciono, en mi mente y corazón están escritos.

Al Lic. Psic. Alejandro Baltazar Ibarra por su invaluable compañía, consejo, apoyo y dirección, fundamentales para mantenerme en pie aún en los momentos más oscuros de este trayecto, por invertir parte de su tiempo afecto y comprensión en ayudarme a ser una mejor persona.

Al Q. F. B. Pedro Antonio González por iluminar el camino con esa chispa de motivación y ánimo en momentos de crisis.

A todos aquellos que directa o indirectamente han contribuido para que pueda llevar a buen término este trabajo, muchas gracias.

## ÍNDICE

LISTA DE TABLAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS .....	iv
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Celdas y bioceldas de combustible.....	3
2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN .....	7
2.1 Enzimas utilizadas en la fabricación de bioceldas de combustible .....	7
2.2 Quantum dots .....	11
2.3 5,10,15,20-Tetrakis(1-metil-4-piridinio) porfirina .....	12
2.4 Inmovilización de enzimas diferentes a GOx .....	14
2.5 Técnicas electroquímicas.....	17
2.6 Detalles del estudio .....	18
3. HIPÓTESIS .....	20
4. OBJETIVOS .....	20
4.1 Objetivo General .....	20
4.2 Objetivos específicos .....	20
5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	22
5.1 Primera etapa: Comparación entre GSH-CdTeQD y GSH-CQD depositados sobre Porfirina para la inmovilización de GOx .....	22
5.1.1 Síntesis y caracterización óptica de GSH-CdTeQD y GSH-CQD.....	22
5.1.2 Preparación y caracterización de los soportes de carbón antes y después de su modificación .....	23
5.1.3 Comparación de los electrodos enzimáticos por su respuesta a la glucosa .....	25
5.2 Segunda etapa: Caracterización fisicoquímica.....	26
5.2.1 Adsorción de los materiales de soporte .....	26
5.2.2 Determinación de tamaño teórico y carga de partícula .....	27
5.2.3 Análisis espectroscópico del complejo Porfirina/GSH-CdTeQD .....	27
5.2.4 Microscopías .....	28
5.3 Tercera etapa: Ensayos en celda microfluídica .....	29

5.4 Cuarta etapa: Inmovilización de enzimas diferentes a GOx sobre el sistema Porfirina/GSH-CdTeQD.....	32
5.4.1 Evaluación de la adsorción enzimática. ....	32
5.4.2 Evaluación electroquímica de la actividad enzimática .....	32
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	35
6.1 Primera Etapa: Comparación entre GSH-CdTeQD y GSH-CQD depositados sobre Porfirina para la inmovilización de GOx .....	35
6.1.1 Síntesis y caracterización de los QD .....	35
6.1.2 Evaluación voltamperométrica de la Porfirina.....	36
6.1.3 Evaluación voltamperométrica de los QD.....	37
6.1.4 Evaluación voltamperométrica de la adsorción de GOx.....	40
6.1.5 Sensibilidad a glucosa de los electrodos enzimáticos: caracterización como sensor .....	43
6.1.6 Curvas de polarización en media celda de los electrodos modificados con Porfirina/QD/GOx.....	45
6.2 Segunda etapa: Caracterización fisicoquímica.....	47
6.2.1 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica de Porfirina y GSH-CdTeQD.....	47
6.2.2 Análisis del sistema Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx por DLS y Potencial zeta .....	50
6.2.3 Análisis espectroscópico del sistema Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx .....	52
6.2.4 Microscopía electrónica de Transmisión y Barrido .....	58
6.2.5 Microscopía electroquímica de barrido.....	62
6.3 Tercera etapa: Ensayos en celda microfluídica.....	64
6.3.1 Depósito de Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx sobre diferentes sustratos de carbono. ....	64
6.3.2 Curvas de polarización de biocelda completa en el arreglo microfluídico. ....	66
6.4 Cuarta etapa: Inmovilización de otras enzimas sobre Porfirina/GSH-CdTeQD .....	70
6.4.1 Demostración de la adsorción enzimática en la superficie de los electrodos .....	70
6.4.2 Evaluación de la actividad de las enzimas inmovilizadas.....	73
7. CONCLUSIONES.....	80
8. REFERENCIAS .....	82

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.-** Enzimas comúnmente utilizadas en la construcción de ánodos para bioceldas enzimáticas

**Tabla 2.-** Cantidad teórica de GOx depositada sobre electrodos modificados con Porfirina/QD/GOx

**Tabla 3.-** Valores obtenidos al analizar los espectros de impedancia con el circuito equivalente de Randles con CPE.

**Tabla 4.-** Potencial zeta y tamaño teórico obtenido por DLS de la Porfirina, los GSH-CdTeQD y una mezcla de ambos materiales.

**Tabla 5.-** Asignación de grupos funcionales a las vibraciones del espectro de Raman

**Tabla 6.-** Asignación de grupos funcionales a las vibraciones de los espectros obtenidos para Porfirina y Porfirina/GSH-CdTeQD.

**Tabla 7.-** Sensibilidad a glucosa de los electrodos de los distintos tipos de carbono modificados con el arreglo enzimático.

**Tabla 8.-** Comparación de los valores de OCP,  $I_{max}$  y  $W$  obtenidos al evaluar diferentes flujos y concentraciones de glucosa en una celda de combustible microfluídica.

**Tabla 9.-** Comparación del desempeño de diferentes celdas de combustible enzimáticas reportadas en la literatura.

**Tabla 10.-** Valores de impedancia de los electrodos enzimáticos comparados con el tamaño y peso de las enzimas con las que fueron modificados.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.-** Esquema de una celda de combustible sencilla.

**Figura 2.-** Representación gráfica de una biocelda enzimática.

**Figura 3.-** Esquema de la reducción de O<sub>2</sub> catalizada por una Lacasa.

**Figura 4.-** Estructura tridimensional de la GOx.

**Figura 5.-** Reacción de reducción del co-factor Flavin adenin dinucleótido (FAD).

**Figura 6.-** Principales tipos de inmovilización enzimática sobre superficies conductoras.

**Figura 7.-** Esquema de la adsorción física de una enzima a un material cargado negativamente.

**Figura 8.-** Esquema general y muestra real de los GSH-CQD reportados en la literatura.

**Figura 9.-** Estructura química de la 5,10,15,20-Tetrakis(1-metil-4-piridinio) porfirina.

**Figura 10.-** Esquema del posible sistema de Porfirina/GSH-QD/GOx depositado sobre grafito.

**Figura 11.-** Cascada de detección de la sacarosa en un electrodo multienzimático.

**Figura 12.-** Diferentes diseños para celdas de combustible microfluídicas reportados en la literatura.

**Figura 13.-** Posible acomodo de un arreglo microfluídico.

**Figura 14.-** Potenciostato y celda utilizados para las mediciones electroquímicas.

**Figura 15.-** Imagen del equipo utilizado para las mediciones de DLS y Potencial zeta.

**Figura 16.-** Microscopio Raman utilizado para el análisis de los electrodos modificados con Porfirina/GSH-CdTeQD.

**Figura 17.-** Potenciostato y brazo de soporte móvil, y arreglo de la celda utilizados para el análisis de SEQM.

**Figura 18.-** Acomodo de las piezas en una celda microfluídica como la utilizada en este trabajo.

**Figura 19.-** Celda de microflujo ensamblada y acoplada a las jeringas de alimentación.

**Figura 20.-** Esquema del arreglo microfluídico empleado para la evaluación de la actividad de Gal

**Figura 21.-** QD observados bajo luz UV360.

**Figura 22.-** Espectros de absorbancia de los GSH-CQD y los GSH-CdTeQD obtenidos.

**Figura 23.-** VC de un electrodo de grafito limpio y uno modificado con Porfirina.

**Figura 24.-** Respuesta voltamperométrica de un electrodo de grafito modificado con GSH-CdTeQD.

**Figura 25.-** Respuesta voltamperométrica de un electrodo modificado con GSH-CQD.

**Figura 26.-** Huella voltamperométrica de los electrodos de grafito modificados con Porfirina y QD.

**Figura 27.-** Respuesta voltamperométrica de los electrodos modificados con Porfirina/QD/GOx.

**Figura 28.-** Evaluación de los electrodos modificados con Porfirina/QD/GOx a diferentes velocidades de barrido.



**Figura 29.-** Respuesta de los electrodos modificados con Porfirina/GSH-CQD/GOx a las adiciones de glucosa.

**Figura 30.-** Respuesta de los electrodos modificados con Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx a las adiciones de glucosa.

**Figura 31.-** Ensayo de reproducibilidad del experimento descrito anteriormente.

**Figura 32.-** Respuesta cronoamperométrica de un electrodo modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx.

**Figura 33.-** Comparación de las curvas de polarización obtenidas al usar un ánodo de Porfirina/CQD/GOx y uno de Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx.

**Figura 34.-** Circuito equivalente utilizado para el análisis de EIS.

**Figura 35.-** Espectros de impedancia obtenidos del análisis de electrodos de grafito (a) y GC (b) sin material (azul) y luego de ser modificados con Porfirina (naranja) y Porfirina/GSH-CdTeQD (gris).

**Figura 36.-** Gráfico del potencial zeta medido a los GSH-CdTeQD en PBS 0.1 M pH 7.4.

**Figura 37.-** Espectros de Raman obtenidos para un electrodo de papel Toray sin modificaciones, y un electrodo modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD.

**Figura 38.-** Interacción propuesta por Aly y colaboradores (2015) de la 5,10,15,20-Tetrakis(1-metil-4-piridinio) Porfirina con TGA-CdTeQD a través de los grupos amino del anillo tetrapirrólico

**Figura 39.-** Espectros FT-IR obtenidos del análisis de un electrodo modificado con Porfirina (línea negra) y Porfirina/GSH-CdTeQD (línea roja).

**Figura 40.-** Espectro FT-IR del sistema autoensamblado Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx.

**Figura 41.-** HR-TEM de los GSH-CdTeQD a diferentes escalas y gráfico de la distribución porcentual en los tamaños de partícula.

**Figura 42.-** SEM de superficies de grafito modificadas con a) GSH-CdTeQD, b) Porfirina/GSH-CdTeQD y c) Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx.

**Figura 43.-** Espectro EDS del sistema Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx depositado sobre carbono

**Figura 44.-** Micrografías electroquímicas de barrido de una superficie de grafito modificada únicamente con Porfirina/GSH-CdTeQD, y modificada con Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx.

**Figura 45.-** Curvas de polarización en celda completa de ánodos de papel Toray modificados con Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx con diferentes concentraciones de glucosa.

**Figura 46.-** Curvas de polarización en celda completa de ánodos de papel Toray modificados con Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx a diferentes velocidades de flujo.

**Figura 47.-** VC en PBS 0.1 M pH 7.4 en presencia de Ferro-Ferri para electrodos de grafito con Porfirina/GSH-CdTeQD modificados con las enzimas: a) GOx, b) Lc, c) GDH y d) Gal.

**Figura 48.-** Evaluación por EIS a electrodos de grafito modificados con Porfirina/GSH-CdTeQD y las enzimas a) GOx, b) Lc, c) GDH y d) Gal.

**Figura 49.-** Circuito equivalente empleado para el análisis por EIS de los electrodos modificados con Porfirina/GSH-CdTeQD/Enzima.

**Figura 50.-** VC en PBS 0.1 M pH 5.6 de un electrodo de grafito modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD y uno modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD/Lc.

**Figura 51.-** VC en PBS 0.1 M pH 7.4 de un electrodo modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD/GDH en ausencia (azul) y presencia (naranja) de 20 mM de glucosa.

**Figura 52.-** VC en PBS 0.1 M pH 7.4 FcMeOH 0.5 mM para un electrodo de grafito modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD/GOxGal antes y después de la adición de lactosa 8 mM y glucosa 8 mM.

## RESUMEN

La inmovilización de enzimas sobre materiales conductores, es un tema de investigación ampliamente estudiado para el desarrollo de biosensores y bioceldas de combustible. Los métodos más comunes para el anclaje de estas moléculas (enlace covalente, cross-linking, o inclusión en geles y membranas) a menudo interfieren con la catálisis enzimática debido a la oclusión de sitios activos, desnaturalización de la enzima o problemas de difusión del sustrato. El uso de Quantum dots como matriz de soporte para la inmovilización enzimática ha sido reportada como una alternativa viable para el anclaje de macromoléculas, disminuyendo en gran medida los problemas antes mencionados. En este trabajo se presenta una comparación entre Quantum dots de carbono (GSH-CQD) y de CdTe (GSH-CdTeQD) ambos recubiertos con glutatión (GSH), para la inmovilización de la enzima Glucosa oxidasa (GOx) así como de las enzimas Lacasa (Lc) Glucosa deshidrogenasa (GDH) y  $\beta$ -Galactosidasa (Gal). La superficie de electrodos de grafito, nanoesponja y papel de fibra de carbono (Toray) fue modificada con 5,10,15,20-Tetrakis (1-metil-4-piridinio) Porfirina, luego se depositó una capa de Quantum dots (GSH-CQD o GSH-CdTeQD) para finalmente anclar la GOx. Los electrodos modificados fueron evaluados por diversas técnicas tanto electroquímicas como fisicoquímicas. Los resultados obtenidos muestran que los GSH-CQD y GSH-CdTeQD tienen una mayor capacidad de inmovilización que el electrodo de grafito sin modificaciones sin embargo los electrodos modificados con GSH-CdTeQD son más sensibles a la glucosa. Esto sugiere que el sistema Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx es adecuado para implementarse en el desarrollo de una biocelda de combustible.

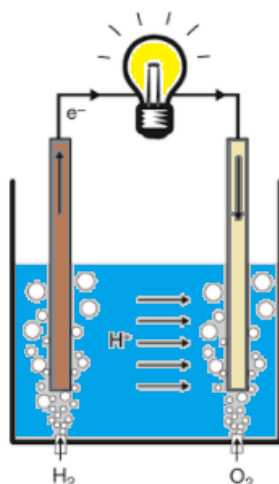
## ABSTRACT

The enzyme immobilization on conductive materials is a topic research for the development of biosensors and biofuel cells. The most common anchoring methods (covalent binding, cross-linking or inclusion in gels and membranes), often interfere with enzymatic catalysis due to active sites occlusion, enzyme denaturation or substrate diffusion problems. The use of Quantum dots (QD) as support matrix for the enzyme immobilization, has been reported as a viable alternative for the macromolecules anchoring, diminishing to a great extent the most well-known problems. In this work, a comparison between Graphene QD's (GSH-CQD) and CdTe QD's (GSH-CdTeQD) coated with glutathione is presented for the immobilization of the enzyme Glucose oxidase (GOx) as well as enzymes Lacasse (Lc), Glucose dehydrogenase (GDH) and  $\beta$ -galactosidase (Gal). The surfaces of graphite electrodes, carbon nanofoam and Toray paper was modified, with 5,10,15,20-Tetrakis (1-methyl-4-pyridinium) Porphyrin, a layer of QD was deposited to finally anchor GOx. The modified electrodes were evaluated by various electrochemical and physicochemical techniques. The results obtained show that QD's modified electrodes have a greater immobilization capacity than graphite electrode and electrodes modified with GSH-CdTeQD are more sensitive to glucose. This suggests that the Porphyrin/GSH-CdTeQD/GOx system is suitable to be implemented in the development of a biofuel cell.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Celdas y bioceldas de combustible

Ante la creciente demanda energética, y la necesidad de fuentes de energía ecológicas, sustentables y amigables con el medio ambiente, el desarrollo de celdas de combustible se ha convertido en un campo de amplio interés en la investigación enfocada a las fuentes alternas para generar electricidad <sup>(1)</sup>. Una celda de combustible podría definirse como un dispositivo que aprovecha las reacciones de óxido-reducción para sustraer electrones a partir de la transformación química de una de las moléculas que participan en la reacción. A diferencia de una batería, en una celda de este tipo la producción de electricidad es continua, en tanto se supla el combustible de manera constante. Como se aprecia en la Figura 1, el esquema general de una celda de combustible es relativamente sencillo, consta de un ánodo en el cual ocurren reacciones de oxidación y un cátodo para efectuar la reducción correspondiente. Éstos se encuentran en contacto electroquímico por un electrolito, y a su vez están interconectados mediante un circuito externo a través del cual fluyen los electrones resultantes del proceso redox, generando así una diferencia de potencial entre ambos electrodos y, por ende, una corriente eléctrica que fluye a través del circuito externo <sup>(2)</sup>.



**Figura 1.-** Esquema general de una celda de combustible sencilla; se muestran el ánodo a la izquierda y el cátodo a la derecha, así como el sentido de flujo iónico y electrónico.

Mucho se ha investigado sobre estos dispositivos, su implementación en la década de los 60's para la provisión de agua y energía en los proyectos espaciales y, con el fin de mejorar el desempeño abaratando costos, permitieron realizar diversos arreglos en los ánodos y cátodos, así como combinaciones de éstos, pues dependiendo de su configuración pueden ser utilizados en distintos entornos <sup>(2)</sup>. Sin embargo, en la actualidad existe un marcado interés por desarrollar celdas de combustible que sean cada vez más compatibles con criterios de sustentabilidad y más amigables con el medio ambiente.

Los principales reservorios energéticos en los organismos vivos son los carbohidratos, principalmente la glucosa, ya sea libre o en forma de polímeros, es uno de los compuestos orgánicos más abundantes en el planeta <sup>(3, 4)</sup>. De esta manera una de las líneas de investigación en celdas de combustible es el aprovechamiento de carbohidratos u otras biomoléculas presentes en fluidos del cuerpo humano como la sangre, la orina o las lágrimas, para la obtención de energía con el fin de proveer energía a dispositivos electrónicos como marcapasos, sensores implantables e inclusive órganos artificiales <sup>(5)</sup>.

Una celda que utiliza sustratos bioquímicos como combustible o incorpora componentes biológicos en su estructura, comúnmente se denomina "biocelda". Existe una amplia variedad de bioceldas de combustible. Algunas de ellas utilizan microorganismos como bacterias con características específicas para efectuar las reacciones de óxido-reducción necesarias en la generación de una diferencia de potencial <sup>(6)</sup>; sin embargo, estos dispositivos tienen dimensiones geométricas grandes, y su enfoque en la obtención de energía a partir de compuestos presentes en el cuerpo humano no es viable.

Por otro lado, se ha descrito el uso de metales de transición tales como platino, oro, cobre y níquel en la construcción o modificación de electrodos para la oxidación de carbohidratos, permitiendo su uso como ánodos en celdas de combustible. Los trabajos asociados con la oxidación principalmente de glucosa a partir de nanopartículas de estos metales evidencia la capacidad de los mismos para efectuar tales reacciones. Si bien, los resultados observados son bastante

favorables, este tipo de electrodos presenta una serie de desventajas que los vuelve poco apropiados para su implementación en un sistema biológico real. El platino por ejemplo, en sus diferentes formas tiene una gran capacidad para oxidar glucosa en un rango de potencial de  $-0.76$  a  $+0.46$  V vs. Hg/HgO, OH<sup>-</sup>, sin embargo su afinidad por otras moléculas como proteínas, ácido úrico, ácido ascórbico o incluso iones Cl<sup>-</sup> -presentes en los organismos vivos- lo convierte en un electrodo fácil de “envenenar” debido a la adhesión de estos “contaminantes” a la superficie del metal, lo cual disminuye o incluso anula su actividad catalítica frente a la glucosa. En el caso del oro y el cobre, la problemática sigue siendo la misma, si bien estos electrodos se ven afectados únicamente por algunos aminoácidos y los iones Cl<sup>-</sup>.

El níquel por su parte, posee baja sensibilidad a los “contaminantes”, de hecho su principal interferente descrito en estudios encaminados a la medición de glucosa es el etanol. Si bien esto se convierte en un obstáculo al monitorear las concentraciones de dicho carbohidrato, no representa problema alguno para la construcción de una celda de combustible, ya que la corriente obtenida de la oxidación de ambos compuestos (etanol y glucosa), no se ve disminuida. El inconveniente con el níquel, es que aparentemente es indispensable una muy alta concentración de iones OH<sup>-</sup>, por lo que a pH alcalino se puede lograr una electrocatálisis de carbohidratos usando este metal <sup>(7)</sup>, en contraste, las referencias enfocadas a su actividad en pH fisiológico son pocas; la mayoría reportan la oxidación de moléculas como etanol o el cofactor NADH, pero no un carbohidrato <sup>(8)</sup>.

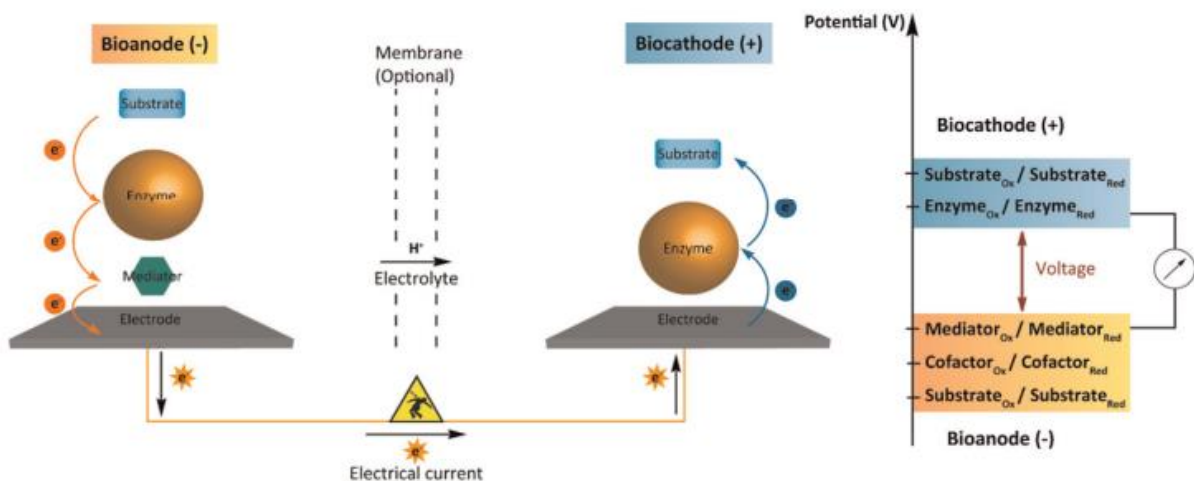
En palabras de Toghil, mucha de la investigación relacionada con el desarrollo de electrodos no biológicos para la oxidación de carbohidratos se ha vuelto repetitiva, y de manera general no parece suponer una gran ventaja sobre los estudios realizados con electrodos que involucran sistemas biológicos o bioquímicos <sup>(9)</sup>.

Esta declaración conduce al tercer tipo principal de bioceldas de combustible: las bioceldas enzimáticas; las cuales como su nombre lo indica, se caracterizan por el uso de enzimas para catalizar la oxidación y/o reducción del sustrato. Dependiendo



del tipo de reacción se designará como enzima anódica oxida al combustible o catódica si su acción va encaminada a la reducción del  $O_2$ . El principio básico de estos sistemas es simple: la superficie de un material conductor que funge como electrodo, se recubre con la enzima correspondiente, procurando que ésta quede adsorbida o apropiadamente inmovilizada en el material.

En el caso de un electrodo anódico, la enzima cataliza la oxidación del sustrato al que es afín, y los electrones obtenidos son transferidos de la enzima al soporte conductor, ya sea de forma directa o con ayuda de un mediador electroquímico. Por otro lado, en el electrodo catódico, los electrones viajan desde el soporte hasta la enzima, y son transferidos mediante la reducción enzimática al  $O_2$ . Si ambos electrodos se conectan mediante un circuito externo, se obtiene una biocelda enzimática completa, como se muestra en la Figura 2 <sup>(10)</sup>. Esto convierte a las enzimas en una opción viable para la generación de ánodos y cátodos que podrían implementarse en una biocelda de combustible, por lo que la mayor parte de este trabajo se centra en la inmovilización enzimática sobre superficies conductoras para este fin.



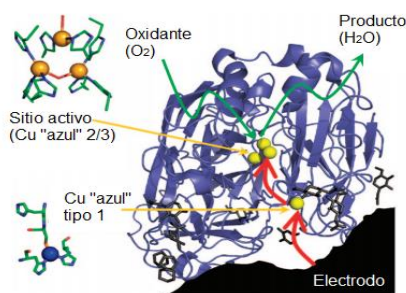
**Figura 2.-** Representación gráfica de una biocelda enzimática en la que el ánodo requiere de un mediador electroquímico y en el cátodo se lleva a cabo la transferencia directa de electrones <sup>(10)</sup>.

## 2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

### 2.1 Enzimas utilizadas en la fabricación de bioceldas de combustible

Una enzima es un catalizador biológico de naturaleza proteica que por sí misma o con ayuda de un cofactor, se vale de los grupos funcionales presentes en su estructura para acelerar la conversión de una especie en otra <sup>(11, 12)</sup>. Estas moléculas son producidas por la mayoría de los organismos vivos para llevar a cabo reacciones necesarias en un gran número de procesos biológicos. En algunos casos, las enzimas pueden aislarse y aprovecharse en procesos técnicos o industriales, debido a su buen desempeño catalítico <sup>(13)</sup>, tal es el caso de las utilizadas en la fabricación de cátodos y ánodos enzimáticos <sup>(14)</sup>.

Entre las principales enzimas usadas en la modificación de electrodos catódicos se encuentran las Lacasas, pertenecientes a las oxidasas del cobre azul; también se han usado las ciclo-oxigenasas, enzimas involucradas en la respuesta inflamatoria e incluso la bilirrubina oxidasa, perteneciente también a las oxidasas del cobre azul. Todas ellas poseen la capacidad de reducir el oxígeno a agua en presencia de los electrones necesarios para tal reacción, los cuales en su estado natural son suministrados por otras especies, mientras que en una biocelda son obtenidos de la oxidación efectuada en el ánodo como se observa en la Figura 3 <sup>(15)</sup>. En este tipo de cátodos, la transferencia electrónica se da de manera directa entre el electrodo y la enzima, siendo la inmovilización del complejo proteico el reto principal.



**Figura 3.-** Esquema de la reducción de O<sub>2</sub> que ocurre en el cátodo de una biocelda enzimática, catalizada por una Lacasa. Las flechas rojas señalan el curso que siguen los electrones durante la reacción, yendo desde el electrodo, a través de los iones Cu<sup>+</sup> hasta el O<sub>2</sub> para formar H<sub>2</sub>O <sup>(16)</sup>.

Por otro lado, la diversidad de enzimas que pueden ser utilizadas en un electrodo anódico es mucho más amplia, y de hecho, de la enzima utilizada depende sobremanera la denominación de la biocelda, ya que el combustible a utilizar definirá el tipo de enzima que debe ser anclada sobre el electrodo. Con base en esto, se han descrito ánodos enzimáticos capaces de oxidar etanol <sup>(17)</sup>, metanol, lactato, piruvato, glicerol entre otros <sup>(10)</sup>, siendo cada cual oxidado por enzimas específicas y afines a cada respectiva molécula. En la Tabla 1 se resumen algunas de estas enzimas y sus respectivos sustratos.

**Tabla 1.-** Enzimas comúnmente utilizadas en la construcción de ánodos para bioceldas enzimáticas <sup>(16)</sup>.

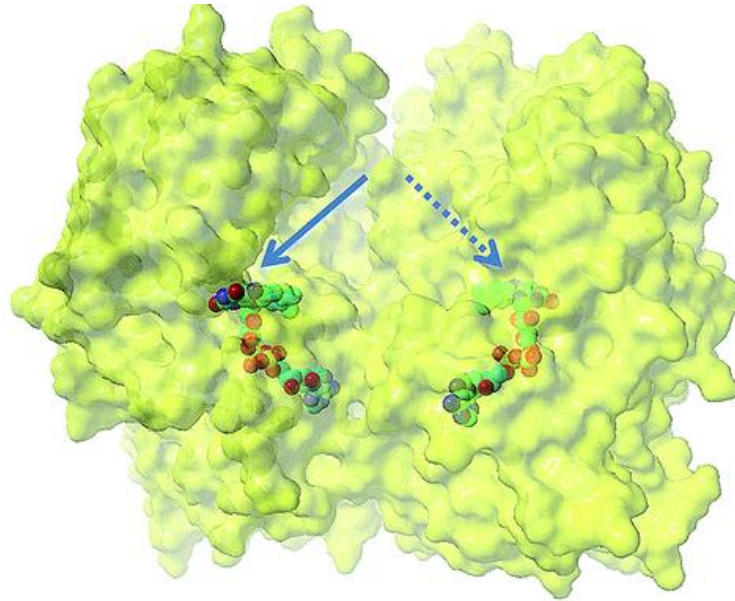
Enzima	Co-factor	Sustrato	Aceptor de e <sup>-</sup> <i>in vitro</i>	Km/mM
<i>Glucosa oxidasa</i>	FADH	Glucosa	O <sub>2</sub> o mediadores	42
<i>Glucosa deshidrogenasa</i>	NADH	Glucosa	NAD <sup>+</sup>	10
<i>Glucosa deshidrogenasa</i>	PQQ	Glucosa	Indoles o azul de metileno	25
<i>Alcohol deshidrogenasa</i>	PQQ	Etanol	Ferricianuro	1.6
<i>Metanol deshidrogenasa</i>	PQQ	Metanol	Metosulfato de fenazina	0.6
<i>Fructosa deshidrogenasa</i>	FADH	Fructosa	Ferricianuro	10

Sin embargo, uno de los compuestos de mayor interés como combustible para las bioceldas enzimáticas sigue siendo la glucosa, tanto por su abundancia, como por su disponibilidad en fluidos biológicos de interés como lo es el torrente sanguíneo.

Además, la determinación de las concentraciones de este carbohidrato es de sumo interés tanto en el diagnóstico clínico de enfermedades como la Diabetes mellitus, como en la industria alimentaria y agrícola <sup>(18)</sup>, lo cual incrementa el interés en la construcción de electrodos capaces de oxidar glucosa, que pudieran implementarse ya sea en la obtención de energía a manera de biocelda enzimática, o bien en la determinación de carbohidratos a modo de biosensor <sup>(19)</sup>.

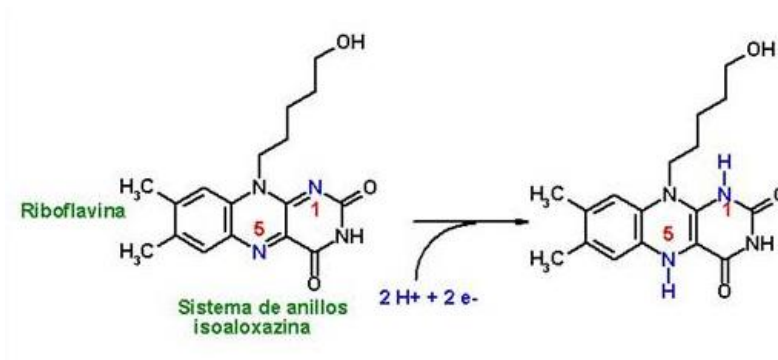
Para el desarrollo de un electrodo enzimático capaz de oxidar a la glucosa, la enzima mayormente empleada por su gran estabilidad, las robustas condiciones que requiere para reaccionar, y su gran especificidad, es la Glucosa oxidasa (GOx), una proteína globular homodimérica de 160 kDa (Figura 4), cuyos monómeros cada

cual de 80 kDa, están fuertemente unidos a una molécula de flavin-adenin-dinucleótido (FAD) cada uno. Se sabe que posee 583 aminoácidos, el cofactor FAD (Figura 5), seis residuos de *N*-acetilglucosamina, y tres residuos de manosa.



**Figura 4.-** Estructura tridimensional de la GOx. Las flechas azules señalan la localización del cofactor FAD, responsable de la oxidación de la glucosa, y del primer intercambio electrónico <sup>(20)</sup>.

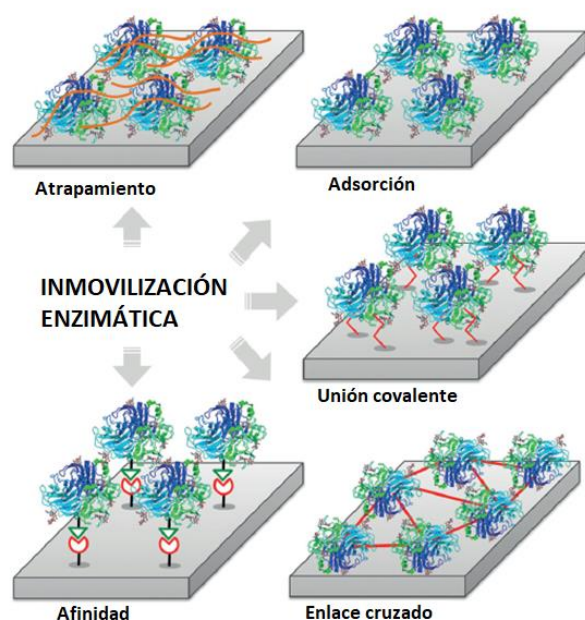
Con respecto a sus parámetros de reacción, la mayoría de los protocolos establecidos para su uso recomiendan condiciones de activación estándar: temperatura de 20-45° C y pH de 5.5 a 7.5 en la solución.



**Figura 5.-** Reacción de reducción del co-factor FAD, luego de interactuar con la glucosa.

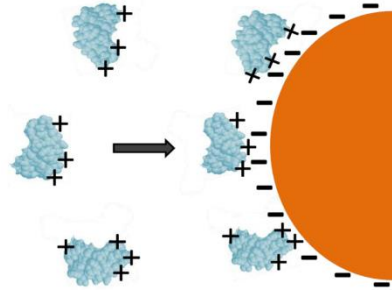
El uso de esta enzima para el desarrollo de bioceldas enzimáticas es extenso, y muchos de los trabajos reportados muestran resultados muy favorables en cuanto

a la corriente y densidad de potencia obtenidas, y el potencial a circuito abierto que ofrecen <sup>(10)</sup>, sin embargo la inmovilización prevalece como principal inconveniente en el uso no solo de GOx, sino de las diversas enzimas estudiadas para tal fin, ya que en muchos de los casos, los materiales conductores usados como electrodo de soporte, no poseen los grupos funcionales apropiados para lograr una fijación adecuada del complejo proteico, lo que ha provocado el desarrollo de diferentes técnicas como atrapamiento, microencapsulación, inclusión en membranas o adsorción (Figura 6) <sup>(21)</sup>.



**Figura 6.-** Principales tipos de inmovilización enzimática sobre superficies conductoras <sup>(Modificada de 21)</sup>.

De acuerdo con varios estudios, la adsorción física (Figura 7), en la que se ven involucradas fuerzas de Van der Waals, interacciones iónicas y puentes de hidrógeno, es uno de los métodos más convenientes para la inmovilización de enzimas, ya que la retención es muy buena, pero no tan fuerte como para comprometer la estructura tridimensional de la enzima, u ocluir sus sitios activos, como ocurre en la unión covalente, la microencapsulación o el reticulado <sup>(22)</sup>.



**Figura 7.-** Esquema de la adsorción física de una enzima a un material cargado negativamente <sup>(23)</sup>.

Estudios previos de sugieren que la adsorción de la enzima GOx sobre nanopartículas semiconductoras como los Quantum dots (QD) de telurio de cadmio recubiertos con glutatión (GSH-CdTeQD), es bastante buena, y la afinidad pudiera deberse a la interacción entre los grupos amino de la lisina que sobresale en la superficie proteica, con los grupos carboxilo presentes en el glutatión (GSH) que recubre los GSH-CdTeQD, una interacción que ya se ha descrito como apropiada para la adhesión de esta enzima a otras superficies <sup>(24)</sup>, además se ha reportado que la adhesión de GOx a este tipo de QD permite que la estructura proteica se conserve de tal forma que su actividad no se vea comprometida en comparación a otros soportes <sup>(25)</sup>.

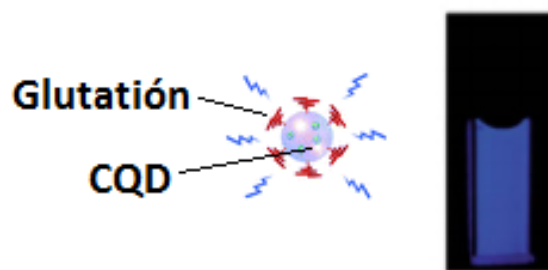
## 2.2 Quantum dots

Los QD son partículas semiconductoras nano-cristalinas, cuyas dimensiones por lo general se encuentran entre los 2 y los 10 nanómetros de diámetro <sup>(26)</sup>. El tamaño y la naturaleza semiconductoras de estas estructuras les confiere propiedades fisicoquímicas muy apreciadas en el campo de la óptica, la nanotecnología y la biotecnología entre otras <sup>(27)</sup>. Si bien la mayoría de los estudios que involucran a estas nanopartículas se enfocan más en su actividad fotoeléctrica, los reportes que hay respecto a su uso como matriz de soporte para GOx <sup>(25)</sup>, los convierten en moléculas atractivas para favorecer el anclaje de la enzima en una superficie conductora.

Resultados preliminares obtenidos respecto al tipo de Quantum dots utilizados para tal fin, indican un buen funcionamiento de los GSH-CdTeQD como matriz de

soporte para GOx, sin embargo, uno de los principales inconvenientes de este tipo de QD radica en su baja conductividad. En 2013 se reportó la síntesis de QD de carbono (CQD) formados por pequeñas láminas de grafeno funcionalizadas con GSH en la superficie (Figura 8) <sup>(28)</sup>, brindando con esto la posibilidad de aprovechar los sitios activos que ofrecen el GSH, y la conductividad del grafeno que los conforma.

Hasta el momento no existe evidencia que respalde la propuesta de que los GSH-CQD tengan alguna ventaja en capacidades de conducción respecto a los GSH-CdTeQD, por lo que abre la posibilidad de que se realice la comparación entre ambos tipos de nanopartícula a fin de determinar su viabilidad para ser utilizados como matriz de soporte para una enzima.



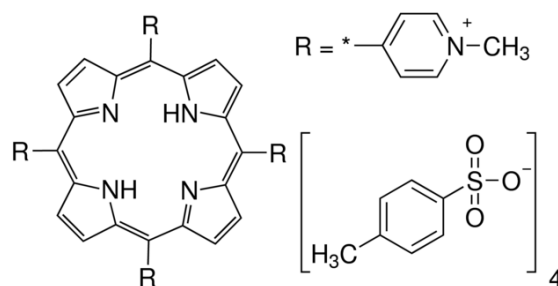
**Figura 8.-** A la izquierda, el esquema general de un GSH-CQD. A la derecha una fotografía de los GSH-CQD sintetizados por Liu, 2013 <sup>(28)</sup>.

### **2.3 5,10,15,20-Tetrakis(1-metil-4-piridinio) porfirina**

La unión de los QD por si mismos a la superficie de un material conductor es bastante baja. La mayoría de los métodos de adhesión incluyen el uso de matrices estabilizadoras o la generación de enlaces cruzados <sup>(29, 30)</sup> que al igual que en el caso de las enzimas, podrían disminuir la conductividad en la superficie del electrodo sobre el que se depositan.

Por dicha razón, en trabajos previos se demostró la inmovilización de multicapas del sistema GSH-CdTeQD empleando una porfirina no comercial que contenía grupos fosfonio como sustituyentes <sup>(31)</sup>. Desafortunadamente la porfirina utilizada

en ese trabajo fue sintetizada una sola vez, y recurrir nuevamente a su fabricación empírica representaría una gran inversión de tiempo y recursos, condición poco viable para la aplicación que este trabajo propone por lo que en actual trabajo se propuso la inmovilización con una porfirina comercial, la cual contiene cuatro grupos funcionales catiónicos: la 5,10,15,20-Tetrakis(1-metil-4-piridinio) porfirina, que se nombra en adelante sólo como Porfirina, y se muestra en la Figura 9.

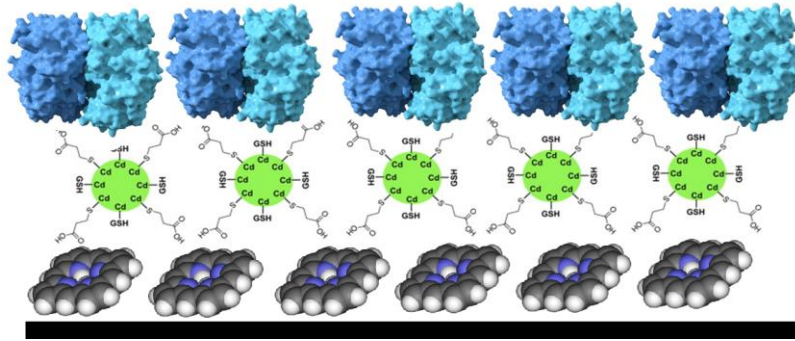


**Figura 9.-** Estructura química de la 5,10,15,20-Tetrakis(1-metil-4-piridinio) porfirina tetra (p-toluenosulfonato).

Esta Porfirina, es un compuesto tetrapirrólico con una gran cantidad de aplicaciones en la investigación científica, desde su uso como anticancerígeno y antimicrobiano pasando por el aprovechamiento de su fotosensibilidad en imagenología, hasta la detección de metales como el mercurio y su aplicación en técnicas electroquímicas (32-35). Su interacción con algunos tipos de QD también ha sido reportada, ya que como se mencionó anteriormente, existe una gran afinidad entre estos componentes que ha sido ampliamente investigada en función de las propiedades ópticas de ambos materiales, principalmente para la detección de diversos analitos por “encendido y apagado” de los QD (36-38). Por otro lado, ha demostrado buena adsorción a las superficies de carbono como el grafito (37).

Con la premisa de la afinidad de la Porfirina tanto por superficies de carbón como a los QD, en este estudio se modificarán electrodos con arreglos autoensamblados de GSH-CdTeQD o los GSH-CQD que serán utilizados como soportes para inmovilizar la enzima GOx (Figura 10).





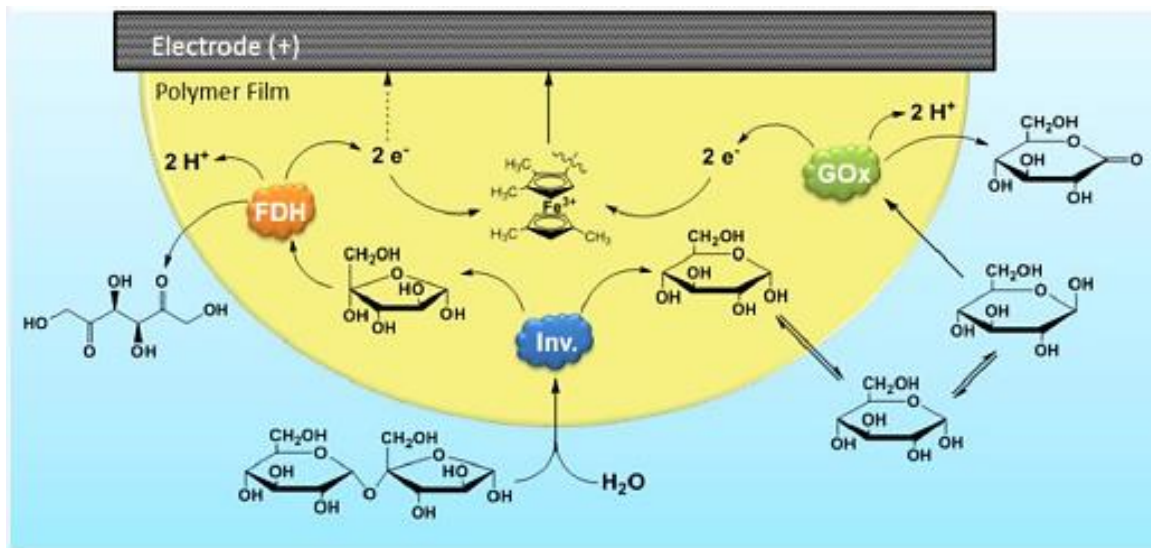
**Figura 10.-** Esquema del posible sistema de Porfirina/GSH-QD/GOx depositado sobre grafito. Los círculos pueden representar a los GSH-CQD o a los GSH-CdTeQD.

## 2.4 Inmovilización de enzimas diferentes a GOx

Si bien GOx es la enzima más reportada en el aprovechamiento de los carbohidratos para la obtención de energía, no es la única empleada para tal fin. Otra de las enzimas estudiadas en este campo es la Glucosa deshidrogenasa (GDH) que igualmente cataliza la oxidación de la glucosa utilizando el cofactor soluble nicotin adenin dinucleótido (NADH) o algún otro mediador como pirrol quinolina quinona (PQQ) <sup>(39)</sup>. Se ha estudiado también la  $\beta$ -Galactosidasa (Gal), la cual cataliza la degradación de lactosa en sus dos disacáridos  $\alpha$ -D-glucosa y  $\beta$ -1, 4-galactosa y cuya actividad se ha propuesto para desarrollar celdas de combustible que utilicen no solo glucosa, sino lactosa a la par, ya que estos se encuentran presentes en productos alimenticios, y una buena cantidad de productos biológicos <sup>(40)</sup>.

Sin embargo la mayoría de las propuestas enfocadas al uso de muchas enzimas para obtener energía de sustratos complejos en una misma celda, se basan en el desarrollo de electrodos multienzimáticos, proponiendo el depósito de por lo menos cuatro enzimas diferentes sobre un mismo electrodo, para lograr una especie de “cascada”. Por ejemplo, se reportó el desarrollo de un electrodo para la obtención de energía de la sacarosa montando un sistema en el que ésta era hidrolizada por una enzima denominada Invertasa (INV), obteniendo así sus dos monómeros:  $\alpha$ -D-glucosa y fructosa. Esta última era oxidada por la fructosa deshidrogenasa (FDH) de manera directa, mientras que la  $\alpha$ -D-Glucosa era transformada por una enzima

llamada Mutarotasa (MUT), en el isómero  $\beta$ -d-Glucosa, para facilitar su oxidación a través de GOx. Usando este diseño, la glucosa, fructosa y sacarosa presentes en cualquier muestra biológica o alimenticia podrían teóricamente ser aprovechadas en una celda de combustible <sup>(41)</sup>; un esquema de esta “cascada” se muestra en la Figura 11.



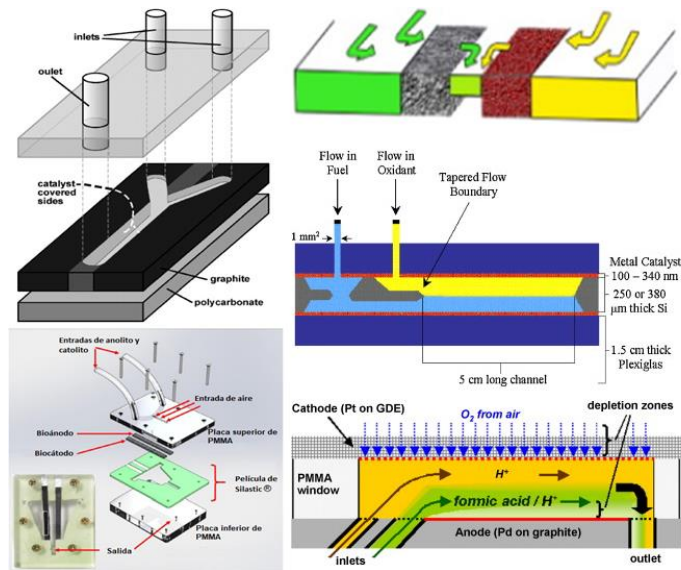
**Figura 11.-** Cascada de detección de la sacarosa en un electrodo multienzimático <sup>(41)</sup>.

Desafortunadamente las enzimas son estructuras proteicas relativamente grandes, y su composición en general las hace poco conductoras, por lo que saturar un electrodo con diferentes tipos de enzima podría disminuir ampliamente la capacidad de conducción del sistema, ocasionando un decremento en la corriente que pudiera obtenerse, a diferencia de la buena conductividad que puede alcanzarse con un electrodo que tiene solo un tipo de enzima anclada.

La saturación de una superficie con un exceso de material proteico podría evitarse si en lugar de un electrodo multienzimático, se utilizara el diseño de una celda microfluídica.

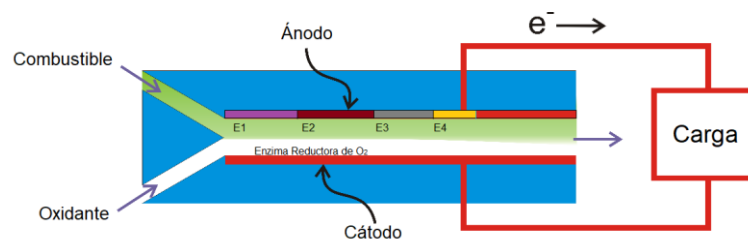
Una celda microfluídica es un dispositivo que aprovecha el flujo laminar para poner en contacto un ánodo y un cátodo, mediante un canal que permanece en flujo constante, a través del cual fluye el electrolito con el combustible para ambos

electrodos <sup>(42)</sup>. Algunos tipos de celda de combustible microfluídica se muestran en la Figura 12.



**Figura 12.-** Diferentes diseños para celdas de combustible microfluídicas reportados en la literatura <sup>(43)</sup>.

Utilizando una configuración apropiada, podrían colocarse electrodos enzimáticos en distintas ubicaciones a fin de propiciar la cascada de catálisis que permita el aprovechamiento de diferentes sustratos. Tomando en cuenta los estudios previos que sugieren una afinidad estructural entre los GSH-CdTeQD y la enzima GOx, estos nanocristales podrían utilizarse como soporte de inmovilización para otras enzimas como las antes mencionadas, y colocarlos en un diseño de celda microfluídica que permita la catálisis en cascada durante el flujo laminar del combustible y sus productos (Figura 13).



**Figura 13.-** Posible acomodo de un arreglo microfluídico involucrando diversas enzimas en diferentes regiones de un mismo electrodo para favorecer el mecanismo de cascada enzimática sin sobresaturar la superficie con material proteico.

Sin embargo enzimas como la INV, MUT o FDH mencionadas como ejemplo anteriormente, tienen un costo elevado y una baja disponibilidad en el mercado, por lo que es más conveniente probar la capacidad del sistema Porfirina/QD como inmovilizador, para otras enzimas con mayor disponibilidad y de menor costo.

De esta manera, y considerando la capacidad de los QD (de Carbono o CdTe) recubiertos con GSH para inmovilizar a la enzima GOx, en este trabajo se llevó a cabo la síntesis de GSH-CdTeQD y GSH-CQD, para su comparación como agentes inmovilizadores de GOx. Luego con el soporte de mejor desempeño se evaluó la capacidad para anclar las enzimas GDH, Gal y Lc, para finalmente valorar los electrodos enzimáticos en la oxidación de glucosa y lactosa como combustibles en una biocelda

## **2.5 Técnicas electroquímicas**

De manera general, la electroquímica abarca todo proceso químico que involucre transferencia de electrones. Tomando esto en cuenta, existen una serie de métodos que permiten monitorear dichos intercambios electrónicos a fin de conocer ciertos detalles en una reacción redox, o bien para obtener información sobre las características de un determinado material. Estos métodos denominados técnicas electroquímicas son de gran utilidad para la caracterización de electrodos enzimáticos.

Entre las técnicas electroquímicas utilizadas para evaluar estos electrodos, se encuentra la voltamperometría cíclica (VC) mediante la cual se aplica una serie de perturbaciones al potencial del electrodo de trabajo, al tiempo que se mide la corriente generada en el mismo a los diferentes potenciales aplicados, con el fin de obtener un registro gráfico de las reacciones electroquímicas que ocurren a diferentes voltajes. Dicho “barrido de potencial” se aplica en ambos sentidos lo cual genera una curva de potencial (E) vs corriente (i) en “Sentido anódico” (de izquierda a derecha) y otra en “Sentido catódico” (de derecha a izquierda de acuerdo con la IUPAC). Debido a la energía de activación característica de muchas reacciones, esta técnica permite evidenciar la presencia de cierto material o bien el incremento en la concentración de un determinado analito por aumento en la corriente asociada

a su reacción. En este trabajo, la VC se utilizó con fines de caracterización, para identificar los picos de corriente atribuidos a cada material, y con fines de cuantificación al evaluando el incremento en la corriente de oxidación del mediador Ferroceno-metanol y asociándolo con la cantidad de glucosa presente en el medio.

Otra de las técnicas utilizadas fue la Cronoamperometría, que consiste en fijar un determinado potencial (generalmente un voltaje cercano al máximo potencial de reacción de la especie a evaluar) sobre el electrodo de trabajo, manteniéndolo durante un intervalo de tiempo determinado, y midiendo el cambio en la corriente durante dicho periodo, con o sin perturbaciones al sistema según el material evaluado. La Cronoamperometría se utilizó por tanto, para determinar el incremento de la corriente detectada sobre el electrodo de trabajo al adicionar alícuotas de glucosa a la celda.

También se realizó la medición del potencial a circuito abierto (OCP por sus siglas en inglés) que consiste simplemente en detectar el cambio de potencial en la superficie del electrodo de trabajo durante un periodo determinado de tiempo, hasta que éste entre en equilibrio eléctrico con el resto de los componentes de la celda y su voltaje superficial permanezca constante. La medición del OCP permitió determinar el potencial de Celda completa y su valor se tomó como referencia para realizar las descargas que se presentan como curvas de polarización.

Las curvas de desempeño de la celda completa, se llevaron a cabo mediante Voltamperometría Lineal, una técnica que al igual que en la VC permite aplicar una serie de potenciales a la superficie del electrodo, sin embargo, en este caso el barrido de potencial se aplica únicamente en un sentido.

## **2.6 Detalles del estudio**

Debido a su robustez y disponibilidad, así como a la gran cantidad de información reportada sobre su funcionamiento, la mayoría de los estudios de inmovilización se hicieron usando GOx como enzima modelo, si bien la inmovilización de otras enzimas se realizó luego de caracterizar el sistema Porfirina/QD. Por tal motivo, este trabajo se llevó a cabo en cuatro diferentes etapas. Como inicio se compararon

los dos diferentes tipos de QD (GSH-CQD y GSH-CdTeQD), tomando en cuenta tanto su respuesta voltamperométrica como su capacidad para adsorber a GOx conservando su actividad en la mayor medida posible. Posteriormente, los QD con mejor desempeño fueron sometidos a diferentes pruebas de caracterización fisicoquímica tanto de manera individual como en conjunto con Porfirina y GOx para conocer los detalles de la interacción entre los materiales utilizados, y reafirmar las suposiciones planteadas respecto a su funcionamiento. Una vez caracterizado el sistema, éste se evaluó sobre diferentes sustratos de carbón y en una celda de combustible microfluídica. Finalmente se demostró la capacidad del sistema para anclar las enzimas GDH, Lc y Gal.

### **3. HIPÓTESIS**

La modificación de superficies carbonosas con Porfirinas y Quantum dots de CdTe o carbono, permite inmovilizar y conservar la actividad catalítica de las enzimas Glucosa oxidasa, Glucosa deshidrogenasa,  $\beta$ -Galactosidasa y Lacasa, para emplearse en una biocelda de combustible microfluídica.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo General**

Optimizar las condiciones de inmovilización enzimática sobre GSH-CQD y GSH-CdTeQD en soportes carbonosos, y caracterizar la actividad electrocatalítica de los electrodos modificados que serán empleados como ánodo en una biocelda microfluídica que utilice glucosa, y lactosa como combustibles.

#### **4.2 Objetivos específicos**

- Sintetizar y caracterizar Quantum dots de CdTe y de carbono funcionalizados con glutatión (GSH-CdTeQD y GSH-CQD).
- Evaluar la estabilidad y capacidad de transducción electroquímica del sistema: grafito modificado con Porfirinas y Quantum dots (Grafito/Porfirinas/GSH-CdTeQD y Grafito/Porfirinas/CQD).
- Comparar la capacidad de los GSH-CQD y los GSH-CdTeQD para inmovilizar la enzima Glucosa oxidasa conservando su actividad catalítica, para elegir el tipo de QD con mejor desempeño.
- Demostrar la inmovilización y actividad de las enzimas Glucosa deshidrogenasa,  $\beta$ -Galactosidasa y Lacasa soportadas en los electrodos modificados con el tipo de QD más apropiado (Grafito/Porfirinas/QD/enzima).
- Caracterizar por técnicas fisicoquímicas el arreglo Grafito/Porfirina/QD/GOx.
- Valorar el desempeño de los electrodos modificados y previamente optimizados, como bioánodo en una celda de combustible microfluídica, usando glucosa, y lactosa como combustibles.





## 5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 5.1 Primera etapa: Comparación entre GSH-CdTeQD y GSH-CQD depositados sobre Porfirina para la inmovilización de GOx

#### 5.1.1 Síntesis y caracterización óptica de GSH-CdTeQD y GSH-CQD

##### a) Síntesis

La síntesis de los GSH-CQD, se efectuó de acuerdo a la literatura previamente descrita con el método de Liu <sup>(28)</sup>. En un matraz se colocaron 0.5 g de ácido cítrico, y 0.15 g de glutatión, después de mezclarlos perfectamente, se llevaron a pirolisis en parrilla de calentamiento hasta alcanzar los 240 °C, vigilando primero la licuefacción del material, y posteriormente el viraje de amarillo claro a naranja-marrón después de 10 minutos de calentamiento. El líquido resultante fue disuelto en agua desionizada, la solución de los GSH-CQD fue almacenada a 4 °C.

Para la síntesis de GSH-CdTeQD se disolvieron 12.4mg de  $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$  en 50 ml de agua desionizada dentro de un matraz de tres bocas y se añadieron 25 mg de GSH, 10 mg de  $\text{NaH}_2(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , y 3 mg de  $\text{Na}_2\text{TeO}_3$  ajustando el pH a 10.5 hasta observar una coloración ligeramente marrón. Se llevó la mezcla a reflujo durante 120 minutos. La solución resultante de GSH-CdTeQD, fue almacenada a 4 °C.

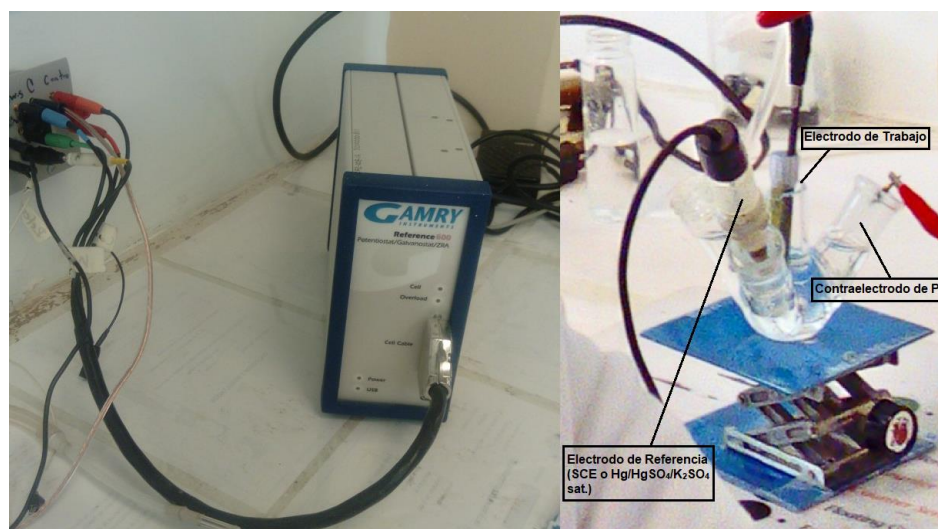
##### b) Caracterización óptica y espectrofotométrica de los QD

Ambas soluciones de Quantum dots fueron sometidas a luz  $\text{UV}_{360}$  para comprobar la emisión de fluorescencia en un color naranja brillante en el caso de los GSH-CdTeQD y azul brillante para los GSH-CQD. Posteriormente, una muestra de cada solución fue sometida a análisis espectrofotométrico UV-Vis de 250-500 nm, a fin de comprobar la presencia de los picos de absorbancia característicos de cada tipo de QD.

### 5.1.2 Preparación y caracterización de los soportes de carbón antes y después de su modificación

#### a) Preparación de los electrodos de grafito

Se construyeron electrodos de grafito utilizando cilindros de grafito de 75mm de longitud por 3mm de diámetro (Sigma-Aldrich, Cat # 496545-60G) colocados dentro de puntas de polipropileno rellenas con resina epóxica. El pulido mecánico se hizo sobre lija y papel bond. Las impurezas fueron eliminadas sonicando las puntas en isopropanol y agua desionizada durante 15 y 10 min respectivamente, y finalmente se activó electroquímicamente la superficie del electrodo por voltamperometría cíclica (VC) en solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5M a potenciales entre -0.9 y 1.4V empleando como referencia un electrodo de  $\text{Hg}/\text{HgSO}_4/\text{K}_2\text{SO}_4$  Sat (0.685 V vs NHE) a una velocidad de barrido de  $100 \text{ mVs}^{-1}$ , aplicando de 50 a 100 ciclos (Gamry 600, Potentiostat/Galvanostat/ZRA). En la Figura 14 se muestran fotografías tanto del equipo como de la celda ensamblada para todas las VC descritas en este trabajo.



**Figura 14.-** Potenciostato (izquierda) y celda (derecha) utilizados para las mediciones electroquímicas.

*b) Caracterización voltamperométrica de los soportes de carbón*

Los electrodos de grafito oxidado fueron evaluados por VC en una solución de PBS 0.1 M pH 7.4, manteniendo los potenciales entre -1.2 y 0.7 V utilizando como referencia un Electrodo de Calomel Saturado o SCE por sus siglas en inglés (0.244 V vs NHE) a una velocidad de barrido de 50 mVs<sup>-1</sup> para obtener los voltamperogramas característicos del grafito como señal de referencia. Al igual que para la limpieza electroquímica, la VC se llevó a cabo en una celda convencional de tres electrodos, usando el mismo potencióstato.

*c) Caracterización electroquímica de 5,10,15,20-Tetrakis(1-metil-4-piridinio) Porfirina*

En la superficie de un electrodo de grafito, se depositaron 3μL de una solución de Porfirina al 0.1mM disuelta en metanol al 8% en buffer Tris, y se dejó el electrodo en reposo hasta la evaporación del disolvente. Una vez seco, el electrodo se lavó con agua desionizada para retirar residuos de Porfirina no adsorbidos. El electrodo modificado fue evaluado por VC en PBS 0.1 M pH 7.4, a 50 mVs<sup>-1</sup>, para determinar la respuesta en corriente de la Porfirina.

*d) Determinación de la respuesta voltamperométrica de los QD*

Sobre electrodos de grafito limpios y por separado, se depositaron 3μL de las soluciones de QD diluídas en agua desionizada, y su huella electroquímica fue determinada por VC en PBS 0.1 M pH 7.4 a 50 mV s<sup>-1</sup> y comparada con los voltamperogramas de grafito limpio para evaluar los cambios.

*e) Evaluación electroquímica de la adsorción de los QD a las Porfirinas*

Sobre diferentes electrodos de grafito modificado con Porfirina, se depositaron por separado 3μL de las soluciones de QD permitiendo la evaporación del solvente durante el tiempo necesario. Una vez secos, y luego de eliminar los QD no

adsorbidos por lavado, los electrodos modificados con Porfirina/QD fueron evaluados individualmente por VC bajo las mismas condiciones de los experimentos anteriores y la señal se comparó con la de los electrodos anteriormente descritos.

*f) Depósito del sistema Grafito/Porfirina/GSH-QD/GOx*

Sobre la superficie pulida de los electrodos se fueron depositando de manera consecutiva y como anteriormente se describió cada uno de los compuestos con que se modificó el electrodo: Porfirinas, QD y GOx; dejando entre cada depósito un tiempo de 15 minutos para permitir la evaporación completa del solvente y lavando los electrodos después de cada adición. La concentración de cada uno de los materiales se expone a continuación:

- Porfirina: 0.1 mM en metanol al 8% diluído con buffer Tris.
- GSH-QD: 14.17 mgmL<sup>-1</sup> en PBS 0.1 M pH 7.4
- Enzima: 10mg mL<sup>-1</sup> en PBS 0.1 M pH 7.4

*g) Evaluación electroquímica de los depósitos de GOx*

Los electrodos modificados con Porfirina/QD (GSH-CdTeQD o GSH-CQD)/GOx fueron evaluados por VC en las mismas condiciones de los experimentos anteriores, dentro de la ventana de potencial de -0.8 a -0.1 V vs SCE para corroborar la presencia del par redox FAD/FADH<sub>2</sub> característico de la enzima inmovilizada. Posteriormente dichos electrodos fueron evaluados bajo las mismas condiciones, modificando la velocidad de barrido de 10 mV s<sup>-1</sup> hasta 800 mV s<sup>-1</sup> para verificar que se tratase de un fenómeno superficial.

### **5.1.3 Comparación de los electrodos enzimáticos por su respuesta a la glucosa**

*a) Determinación de la actividad catalítica de GOx*

Empleando VC, electrodos modificados con el sistema Porfirina/GSH-CdTe/GOx y Porfirina/GSH-CQD/GOx fueron evaluados en ausencia y presencia de glucosa, utilizando ferroceno-metanol como mediador electroquímico para evaluar su actividad catalítica, tomando como referencia el aumento en la corriente de oxidación del par redox atribuido al Ferroceno, como indicador de la catálisis de dicho carbohidrato.

*b) Respuesta cronoamperométrica a las adiciones de glucosa*

Mediante cronoamperometría en PBS 0.1 M pH 7.4 en presencia de Ferroceno 0.5 mM a potencial 0.245 V vs SCE, se determinó la sensibilidad a glucosa de los electrodos modificados con Porfirina/QD/GOx, adicionando alícuotas de una solución de glucosa para incrementar la concentración en el medio en 2 mM por adición. El cambio en la corriente se midió durante 200 segundos entre cada adición.

*c) Curvas de polarización celda de un solo compartimento*

Se midió el OCP de electrodos de grafito modificados con el sistema Porfirina/QD/GOx para determinar su potencial en celda de un solo compartimento. Posteriormente se construyeron curvas de descarga mediante voltamperometría lineal desde el OCP hasta 0 mV a una velocidad de barrido de  $5 \text{ mV s}^{-1}$  en PBS 0.1 M pH 7.4 en presencia de Ferroceno 0.5 mM y glucosa 20 mM.

## **5.2 Segunda etapa: Caracterización fisicoquímica.**

### **5.2.1 Adsorción de los materiales de soporte**

En una celda convencional de tres electrodos, usando PBS pH 7.4 como electrolito soporte y el par redox  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O} / \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  (en adelante denominado Ferro-Ferri) a una concentración de 10 mM, se determinó la resistencia a la transferencia de carga ( $R_{tc}$ ) de electrodos de grafito y carbón vítreo (GC por sus siglas en inglés) antes y después de su modificación con Porfirina y Porfirina/GSH-

CdTeQD, mediante espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) a un potencial de 0.27 V vs SCE.

### **5.2.2 Determinación de tamaño teórico y carga de partícula**

Alícuotas de GSH-CdTeQD y Porfirina/GSH-CdTeQD en solución PBS 0.1 M pH 7.4 fueron analizadas por DLS en un equipo *Zetasizer Nano ZS* de *Malvern* (Figura 15) para la determinación del tamaño de partícula teórico. En el mismo equipo, se determinó el la carga superficial de las nanopartículas y los complejos creados por la interacción Porfirina/GSH-CdTeQD mediante la medición del potencial zeta en cada muestra. Todas las mediciones se hicieron por triplicado para reportar el promedio.

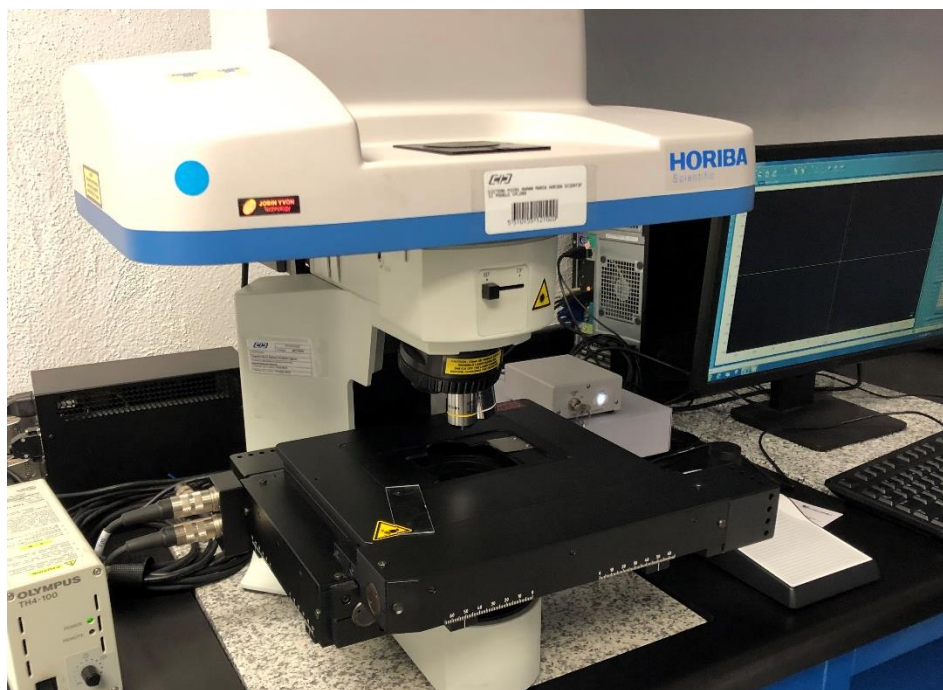


**Figura 15.-** Imagen del equipo utilizado para las mediciones de DLS y Potencial zeta.

### **5.2.3 Análisis espectroscópico del complejo Porfirina/GSH-CdTeQD**

La respuesta espectroscópica de la Porfirina y los GSH-CdTeQD se determinó por espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) en un

espectrómetro *FT-IR Spectrum Two*, y espectroscopía de Raman con un *Raman Microscope Horiba Scientific* modelo *Xplora* (Figura 16), analizando electrodos sin modificar como blanco y modificados con Porfirina, o Porfirina/GSH-CdTeQD. La modificación a los electrodos se realizó por depósito de los materiales como se describió anteriormente.



**Figura 16.-** Microscopio Raman utilizado para el análisis de los electrodos modificados con Porfirina/GSH-CdTeQD.

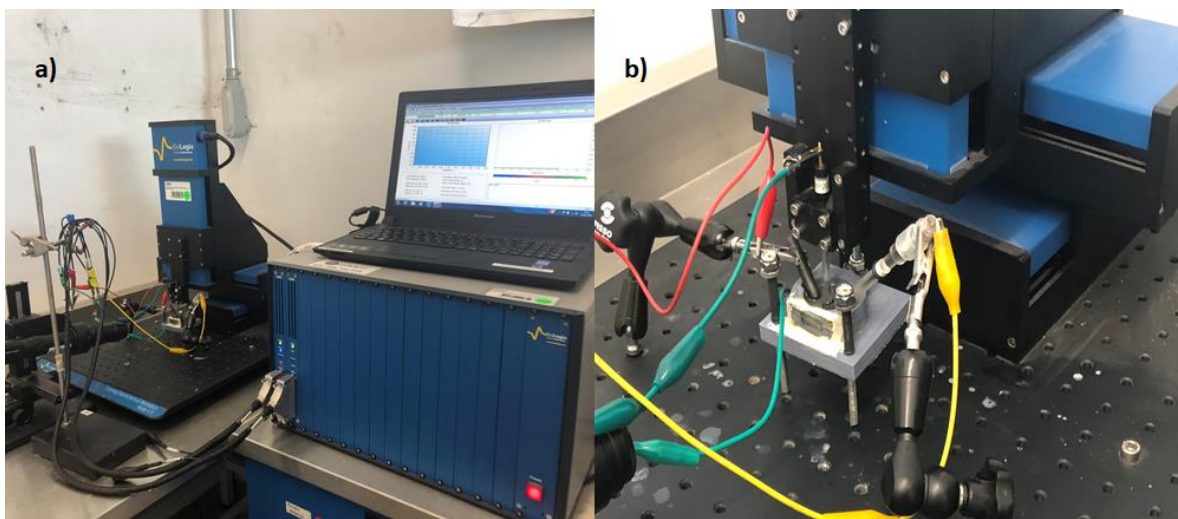
#### **5.2.4 Microscopías**

##### *a) Microscopía electrónica de barrido (SEM)*

Por microscopía de barrido se evaluó la superficie de los electrodos de grafito, y modificados con GSH-CdTeQD y Porfirina/GSH-CdTeQD. Para ello se empleó un equipo Scanning Electron Microscope, marca JEOL GmbH, modelo JSM-6610, T = 24,0 °C; +/- 0.17°C, Hr = 12 %; +/-1 %, P = 1012,0 hPa +/- 0.1 hPa, con una densidad de aire= 1.029 kg/m<sup>3</sup>.

##### *b) Microscopía electroquímica de barrido (SEQM)*

La superficie de electrodos de grafito modificados con el sistema Porfirina/GSH-CdTeQD con y sin depósito de GOx, fueron evaluadas y comparadas en un potenciostato *Biologic Science Instruments* por la técnica de SEQM en PBS 0.1 M pH 7.4 Ferroceno 0.5 mM en ausencia y presencia de 5 mM de glucosa, escaneando la superficie con un micro-electrodo de platino con un diámetro de 25  $\mu\text{m}$  aplicando a éste un potencial de 0.7 V vs SCE para detectar la producción de peróxido, y de 0.25 V vs SCE para detectar la oxidación del mediador Ferroceno; ambos parámetros se asociaron con la catálisis de glucosa y por ende con la distribución y actividad de GOx en la superficie. El contra-electrodo utilizado fue una barra de grafito, y no se aplicó ningún potencial al electrodo con la muestra debido a que la reacción de oxidación de glucosa por GOx ocurre de manera natural; fotografías de la celda y el equipo usados para el análisis se muestran en la Figura 17.



**Figura 17.-** Potenciostato y brazo de soporte móvil (a), y arreglo de la celda (b) utilizados para el análisis de SEQM.

### 5.3 Tercera etapa: Ensayos en celda microfluídica

a) *Sistema Porfirina/GSH-QD/Enzima como ánodo para una celda de combustible*

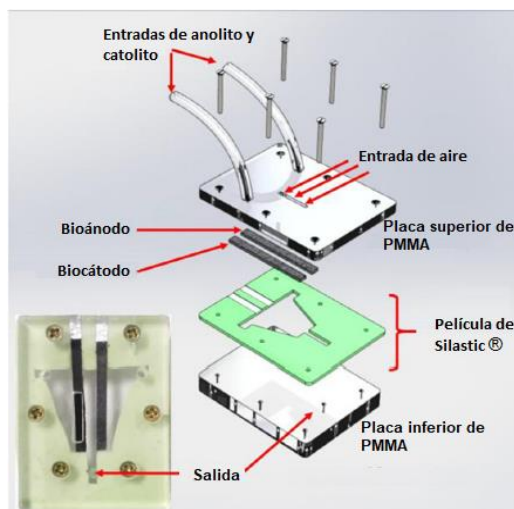
Se determinó el potencial a circuito abierto de los electrodos modificados con Porfirina/QD/GOx (GSH-CdTeQD o GSH-CQD) en presencia de Ferroceno 0.5 mM



y glucosa 20 mM. Posteriormente se realizaron las curvas de polarización correspondientes a cada uno de ellos, utilizando como cátodo un electrodo de platino, los resultados fueron comparados entre sí, a fin de determinar el arreglo que ofrece la mayor densidad de carga. La técnica de curvas de polarización, consiste en la demanda de una cierta corriente al electrodo de trabajo, y la evaluación del potencial asociado a la misma. El producto de la corriente demandada y el potencial obtenido da como resultado la densidad de potencia de la celda de combustible, una medida asociada a la eficiencia de ésta para la obtención de energía.

*b) Arreglo del sistema microfluídico.*

Para el arreglo de celda microfluídica, se utilizó el sistema reportado por Escalona-Villalpando <sup>(44)</sup> en el que dos placas de acrílico se sobrepone en un arreglo “tipo sándwich” separando el espacio intermedio por una placa de Silastic® cortada en trapezoide para favorecer el microflujo de ambos electrolitos, la Figura 18 esquematiza el arreglo de la celda microfluídica. Se utilizaron ánodos de papel Toray de 0.2 cm de ancho por 3 cm de largo modificados con Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx con terminaciones de papel aluminio sobrepuestas como contactos eléctricos. Los cátodos empleados, PyrAnMWCNT/Lc fueron preparados tal cual se describe en la literatura <sup>(44)</sup> mezclando en una tinta los nanotubos de carbono modificados con antraceno y la enzima Lacasa, para después depositarla sobre electrodos de papel Toray con las dimensiones antes descritas.



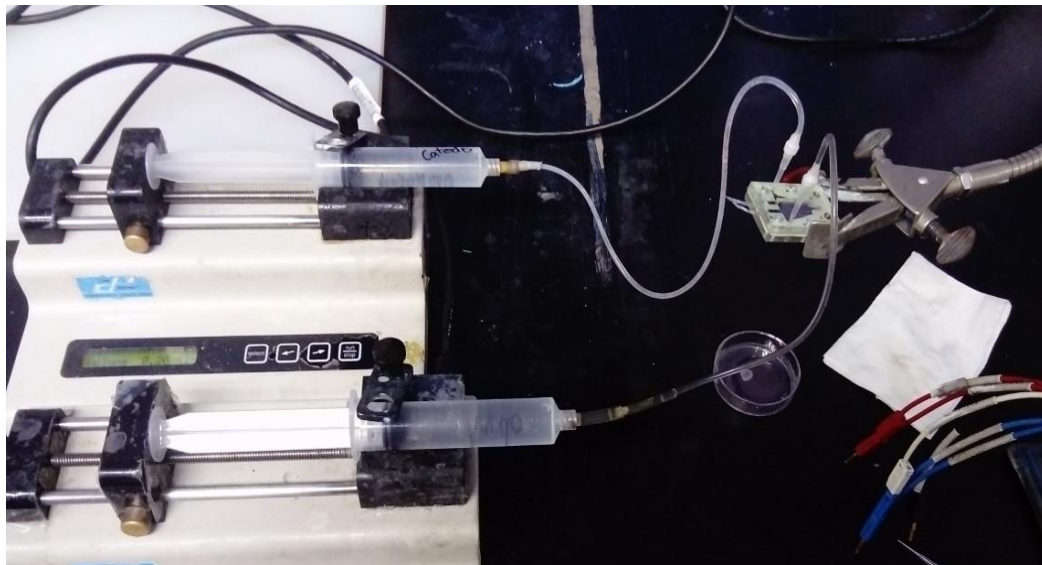
**Figura 18.-** Acomodo de las piezas en una celda microfluídica como la utilizada en este trabajo

*c) Determinación de la concentración óptima.*

En la celda de microflujo los bioánodos fueron evaluados en PBS 0.1 M pH 7.4 en presencia de Ferroceno-metanol 0.5 mM, a diferentes concentraciones de glucosa, comenzando en 0 mM y pasando posteriormente a 10, 20 y 50 mM. Las mediciones electroquímicas se realizaron por triplicado para cada concentración, determinando el potencial de celda mediante la medición del potencial a circuito abierto (OCP) hasta potencial constante, y posteriormente la medición por voltamperometría lineal de la descarga de celda. El biocátodo fue PyrAnMWCNT/Lc en PBS 0.1 M pH 5.6 como catolito.

*d) Ensayo de flujos*

El mismo procedimiento descrito en el inciso anterior se utilizó dejando fija la concentración de glucosa a 20 mM, y cambiando únicamente la velocidad de flujo de los electrolitos, las diferentes velocidades fueron: 1, 3, 6, 9, y 12 mLh<sup>-1</sup>. La Figura 19 muestra el ensamble de la celda acoplada a las bombas de jeringa a flujo constante usadas durante uno de los experimentos.



**Figura 19.-** Celda de microflujo ensamblada y acoplada a las jeringas de alimentación.

## **5.4 Cuarta etapa: Inmovilización de enzimas diferentes a GOx sobre el sistema Porfirina/GSH-CdTeQD.**

### **5.4.1 Evaluación de la adsorción enzimática.**

#### *a) Disminución en la corriente*

Electrodos de grafito modificados con el sistema Porfirina/GSH-CdTeQD fueron evaluados por VC en PBS 0.1 M pH 7.4 en presencia del par Ferro-Ferri 10 mM de 0.1 a -0.5 V vs Hg/HgSO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (sat). Posteriormente las enzimas Lc, GDH y Gal se depositaron por separado en los diferentes electrodos, y se midió su respuesta voltamperométrica bajo las condiciones antes descritas, a fin de evidenciar el cambio en la corriente pico del par Ferro-Ferri antes y después de la modificación con cada enzima. Un electrodo modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx se analizó a la par, como control positivo de la adsorción enzimática.

#### *b) Espectroscopía de impedancia electroquímica*

En las mismas condiciones de electrolito soporte y molécula sonda, los electrodos descritos anteriormente fueron evaluados por EIS a un potencial de -0.14 V vs Hg/HgSO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (sat) antes y después de la modificación con las enzimas correspondientes, asociando una disminución en la R<sub>tc</sub> con la presencia de enzima adsorbida en la superficie. Los diagramas de Nyquist, se analizaron mediante la simulación de un circuito equivalente descrito en la sección de Resultados y Discusión.

### **5.4.2 Evaluación electroquímica de la actividad enzimática**

#### *a) Incremento en la corriente por oxidación o reducción de sustrato*

*Lacasa:* Un electrodo modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD/Lc se evaluó por VC en PBS 0.1 M pH 7.4 en una celda convencional de tres electrodos usando una

ventana de potencial entre 0.8 y -0.2 V vs SCE, comenzando en sentido catódico a una velocidad de  $2\text{mV s}^{-1}$  en atmósfera de  $\text{N}_2$  y  $\text{O}_2$  para detectar la reacción de reducción de  $\text{O}_2$  por el incremento en la corriente catódica. Como control negativo se usó la respuesta de un electrodo modificado únicamente con Porfirina/GSH-CdTeQD, sin Lc.

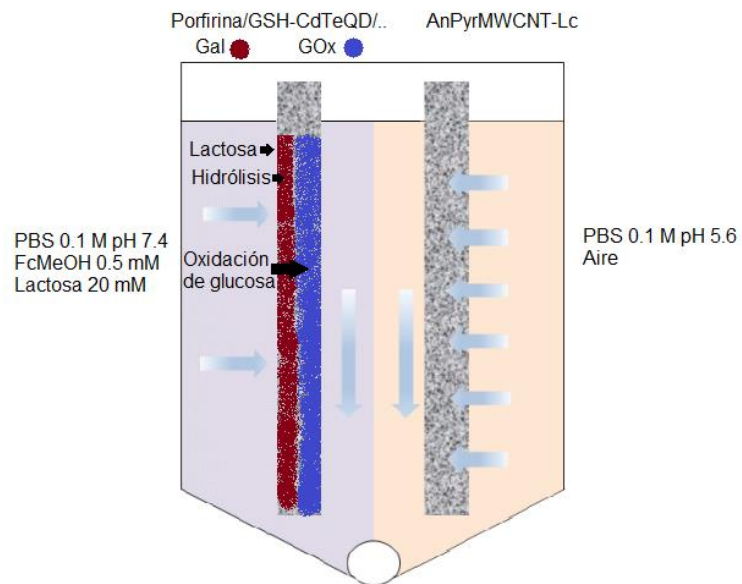
*GDH:* Se modificó la superficie de un electrodo de grafito con el sistema Porfirina/GSH-CdTeQD/GDH y se evaluó por VC en PBS 0.1 M pH 7.4, en presencia del  $10\text{ mg mL}^{-1}$  del cofactor  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , antes y después de la adición de 20 mM de glucosa, usando una ventana de potencial de -0.2 a 0.9 V vs SCE con una velocidad de  $20\text{ mV s}^{-1}$ . El incremento en la corriente a un potencial cercano a 0.55 V vs SCE se tomó como prueba de la oxidación del cofactor NADH y por ende, se asoció a la catálisis de glucosa por GDH.

*Gal:* Sobre un electrodo de grafito modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD, se depositó una mezcla de las enzimas Gal (para hidrolizar lactosa) y GOx (para oxidar la glucosa obtenida de tal hidrólisis). El electrodo modificado se evaluó por VC en PBS 0.1 M pH 7.4 en presencia del mediador Ferroceno antes y después de la adición de 8 mM de lactosa, asociando el incremento en la corriente pico del Ferroceno con la hidrólisis de lactosa y subsecuente obtención de glucosa. Se añadieron 8 mM de glucosa al sistema luego de las mediciones como control positivo para la actividad de GOx.

#### *b) Evaluación de la actividad de Gal en celda microfluídica*

Un ánodo de papel Toray se modificó con Porfirina/GSH-CdTeQD y posteriormente se depositaron en la superficie las enzimas Gal y GOx en dos regiones diferentes como se muestra en la Figura 20 a fin de aprovechar el microflujo a través del electrodo para favorecer una reacción en cascada. El ánodo se evaluó por voltamperometría lineal contra un cátodo de AnPyrMWCNT-Lc en una celda microfluídica como la descrita en la sección 5.3 b), usando como catolito una solución de PBS 0.1 M pH 5.6 en atmósfera de aire, y como anolito PBS 0.1 M pH 7.4 Ferroceno 0.5 mM en ausencia y presencia de 20 mM de lactosa. La velocidad de flujo de los electrolitos fue  $6\text{ mLh}^{-1}$  y la descarga se realizó desde el OCP del

sistema como potencial máximo, hasta 0 mV. Se empleó un electrodo modificado con GOx (sin Gal pero aún sobre Porfirina/GSH-CdTeQD) evaluado bajo las mismas condiciones, como control negativo para la hidrólisis de lactosa.



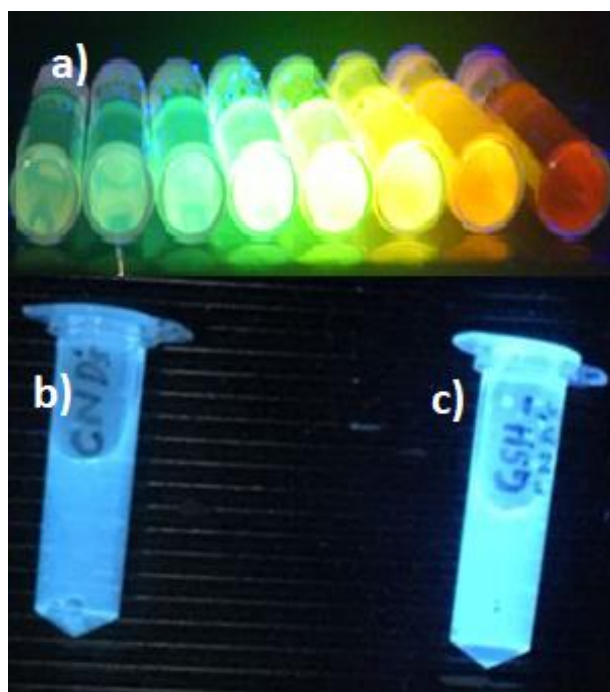
**Figura 20.-** Esquema del arreglo microfluídico empleado para la evaluación de la actividad de Gal. La Figura expone la región del electrodo de Toray en la que se depositó cada enzima, Gal (marrón) y GOx (azul).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Primera Etapa: Comparación entre GSH-CdTeQD y GSH-CQD depositados sobre Porfirina para la inmovilización de GOx

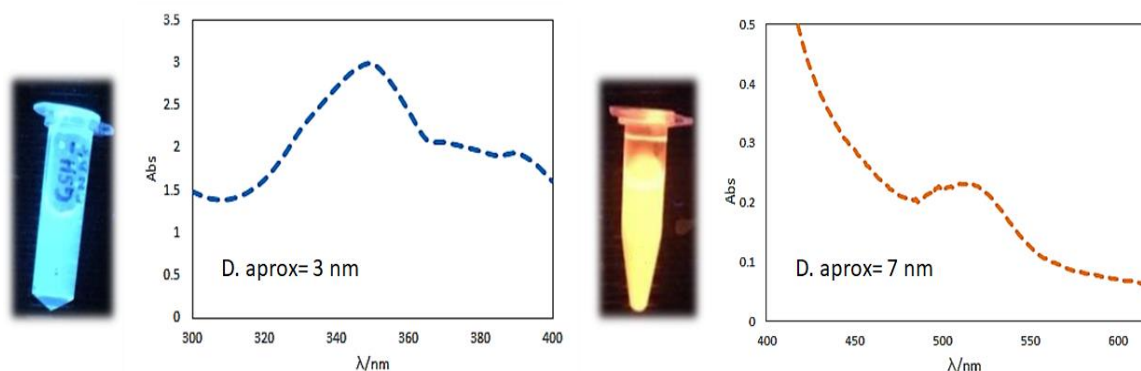
#### 6.1.1 Síntesis y caracterización de los QD

Se obtuvieron QD de alta fluorescencia, como se aprecia en la Figura 21. El comportamiento fotoeléctrico de los GSH-CdTeQD ya se encuentra descrito en la literatura, y su crecimiento en función del tiempo de síntesis pudo demostrarse al monitorear alícuotas obtenidas a diferentes tiempos (Figura 21 a). Los GSH-CQD, por su parte, muestran una fotoluminiscencia mayor que los CQD sin glutatión, un comportamiento también reportado previamente <sup>(22)</sup>. Se calculó un incremento de aproximadamente 20.4% en la fotoluminiscencia de los GSH-CQD con respecto a los CQD (Figura 21 b y c), mediante el análisis de imagen utilizando el programa ImageJ.



**Figura 21.-** QD observados bajo luz UV360. En la parte de arriba se muestran alícuotas de los GSH-CdTeQD obtenidas a diferentes tiempos de síntesis, las alícuotas ordenadas de izquierda a derecha en orden creciente según el tiempo al que fueron extraídas del matraz (a). En la parte inferior se presenta una comparación entre los CQD (b) y los GSH-CQD (c).

El análisis espectrofotométrico de ambos tipos de QD muestra el espectro de absorbancia obtenido para cada uno (Figura 22). De acuerdo con la literatura consultada, la ecuación de Yu permite relacionar la absorbancia con el rango de tamaño de partícula en este tipo de QD. Así, el pico de absorbancia de los GSH-CQD en una longitud de onda de 350 nm indica un tamaño de partícula alrededor de los 3 nm<sup>(28)</sup>. En tanto, la longitud de onda en 514 nm del pico máximo para los GSH-CdTeQD señalaría un tamaño de aproximadamente 7 nm<sup>(45)</sup>.

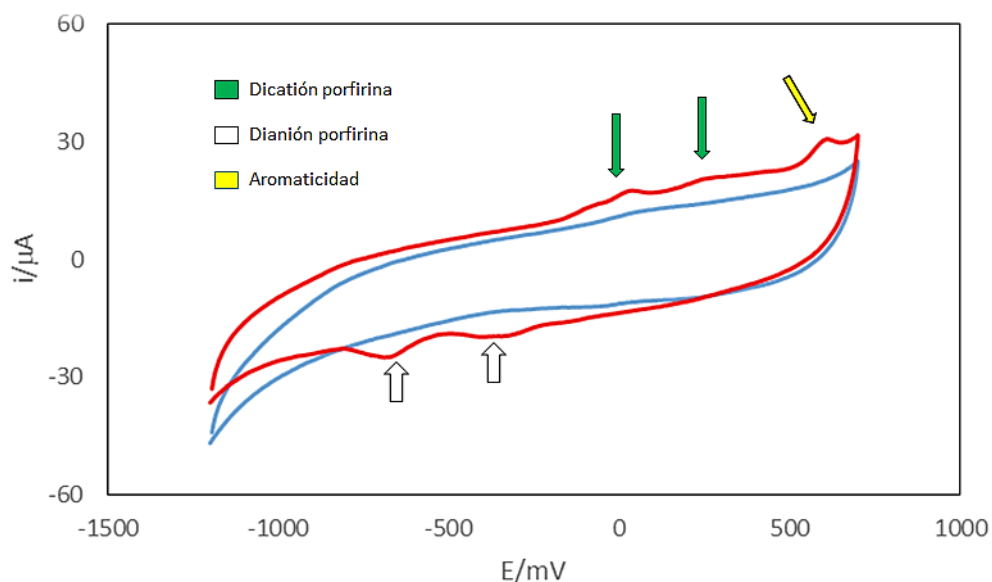


**Figura 22.-** Espectros de absorbancia de los GSH-CQD (izquierda) y los GSH-CdTeQD (derecha) obtenidos.

### **6.1.2 Evaluación voltamperométrica de la Porfirina**

El análisis voltamperométrico de la 5,10,15,20-Tetrakis(1-metil-4-piridinio) porfirina tetra (p-toluenosulfonato) depositada sobre grafito, mostró un perfil similar al reportado en la literatura. Como se aprecia en la Figura 23, esta molécula exhibe un par de procesos anódicos y catódicos en potenciales de 25 y 255 mV vs SCE en sentido anódico, y -410 y -690 mV en sentido catódico, los cuales se asocian a la formación de un dicatión y un dianión en los nitrógenos orientados al centro del macrociclo. Además es posible distinguir una señal que aparece a 620 mV en sentido anódico, la cual también se ha reportado como característica de la oxidación de dos electrones, responsables del carácter aromático del anillo

porfirínico <sup>(46)</sup>. Esto permite sugerir que la Porfirina efectivamente, se encuentra unida al grafito.

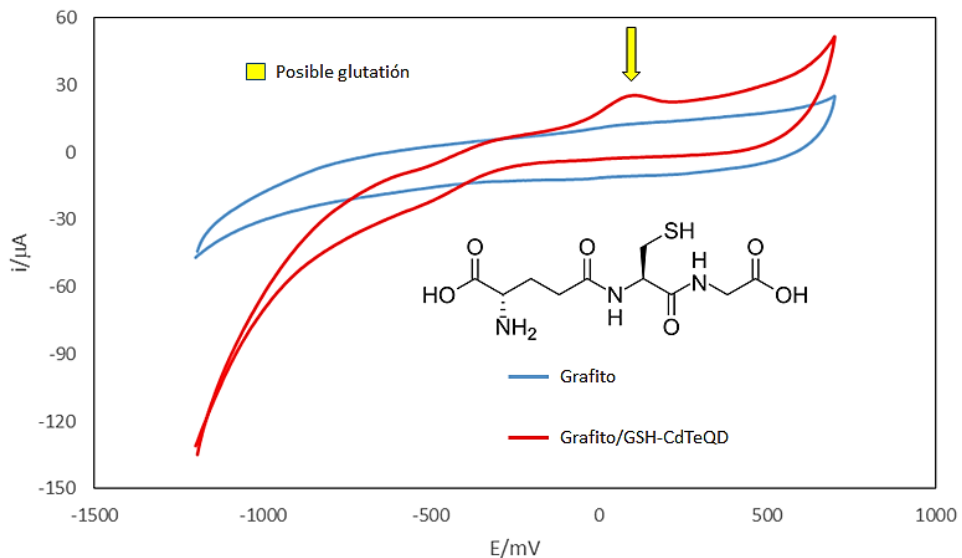


**Figura 23.-** VC en PBS 0.1M pH 7.4 a 50 mVs<sup>-1</sup> de un electrodo de grafito limpio (azul) y uno modificado con Porfirina (rojo). Las flechas señalan los procesos asociados a la detección de determinados grupos funcionales en el macrociclo.

### 6.1.3 Evaluación voltamperométrica de los QD

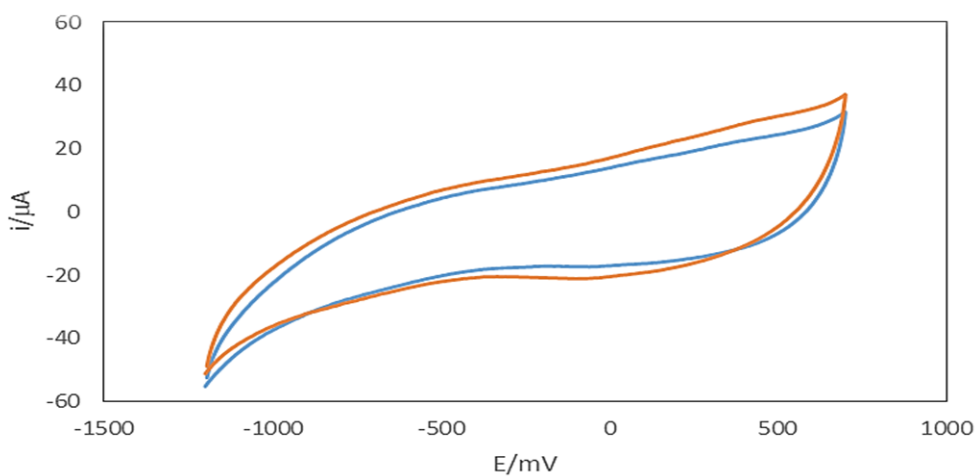
Con respecto a la respuesta electroquímica de los GSH-CdTeQD que se presenta en la Figura 24, destaca un pico de oxidación a 100 mV vs SCE del cual se desconoce su naturaleza, si bien algunos autores lo han relacionado con la oxidación del glutatión, la variabilidad entre estudios y materiales dificulta la asignación de la especie que se esté detectando. El hecho de que no haya otra molécula electroactiva en el sistema, aparte de CdTe cuyas señales de oxidación sobre grafito aparecen a potenciales más negativos, refuerza la propuesta de que se trata del glutatión.





**Figura 24.-** Respuesta voltamperométrica de un electrodo de grafito modificado con GSH-CdTeQD (rojo), comparada con un electrodo limpio (azul).

Los electrodos de grafito modificados con GSH-CQD presentan una respuesta voltamperométrica muy similar al del grafito. En la Figura 25 sólo se aprecia un ligero aumento en la capacitancia que se puede relacionar con el incremento en el área superficial del electrodo, pero ningún proceso redox alrededor de los 100 mV. De esta manera la única evidencia de la incorporación de GSH en los CQD es el incremento en la luminiscencia de las nanopartículas.

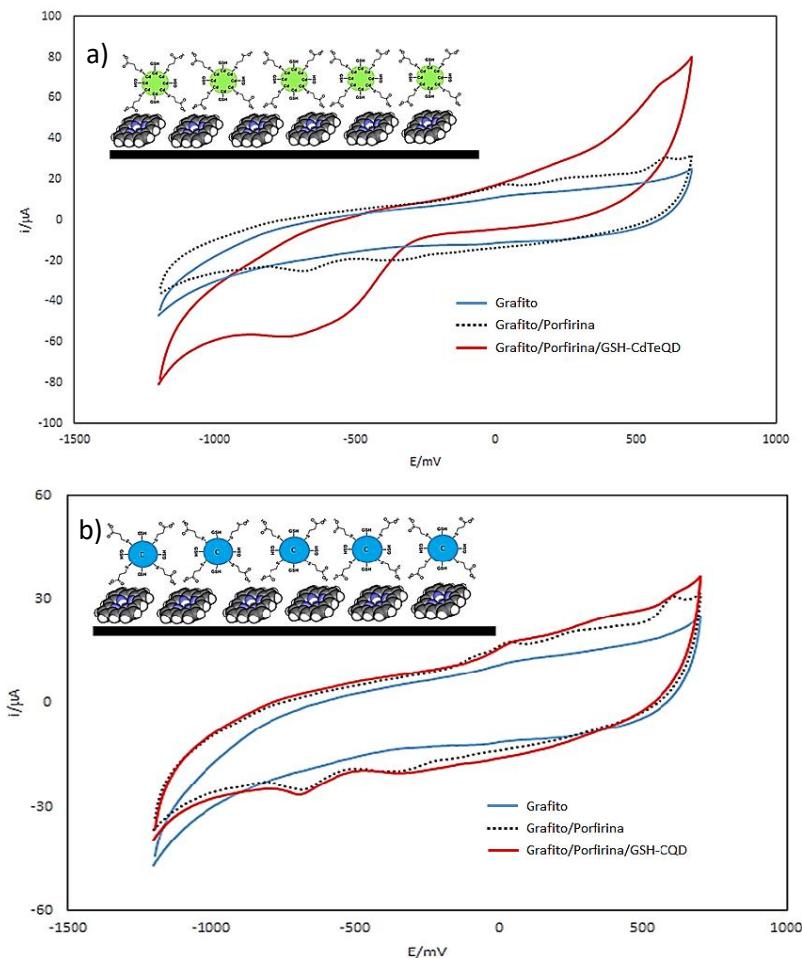


**Figura 25.-** Respuesta voltamperométrica de un electrodo modificado con GSH-CQD (naranja) y uno sin modificaciones (azul).

En la respuesta voltamperométrica de los electrodos en los que se depositó la porfirina y en seguida los QD, se observa, aunque disminuida, la señal del anillo porfirínico. En particular los electrodos modificados con GSH-CdTeQD depositados sobre Porfirina muestran un incremento considerable en las corrientes de reducción asociadas al dianión de la Porfirina, como se observa en la Figura 26 a.

Además pareciera que el sistema favorece la reacción de evolución de oxígeno, ya que se observó un incremento en la corriente al medirla en sentido anódico. Pese a ello, aún fue posible distinguir la señal porfirínica asociada a la aromaticidad del compuesto, si bien la señal que se atribuye al dianión se vuelve difícil de apreciar, y la corriente asociada al dianión parece sobrelaparse con otro proceso hasta el momento sin ser identificado. Por su parte, los GSH-CQD depositados sobre Porfirina, mostraron un comportamiento radicalmente distinto como se observa en la Figura 26 b. En este caso, la señal dianiónica permanece casi intacta, ya que solo se observó un ligero decremento en los picos de reducción correspondientes. Por otro lado, los picos atribuidos al dianión porfirínico forman más bien una especie de meseta, mientras que la señal asociada con la aromaticidad del macrociclo, se desvanece casi por completo.

Se requieren más estudios para explicar estos cambios, sin embargo creemos que esto podría indicar con cuales grupos funcionales interacciona cada tipo de QD. Aun cuando se desconoce el mecanismo exacto de unión de los QD a la Porfirina, estos resultados apuntan a que existe una interacción fuerte entre ambos compuestos.

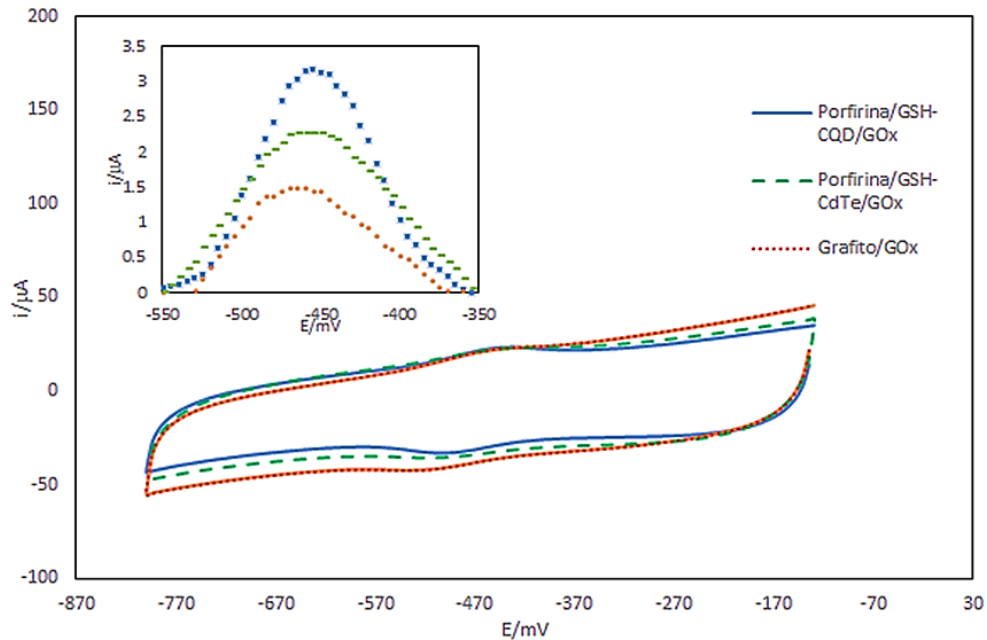


**Figura 26.-** Huella voltamperométrica de los electrodos de grafito (azul) modificados con Porfirina (puntos) y Porfirina/QD (Rojo)

#### **6.1.4 Evaluación voltamperométrica de la adsorción de GOx**

Una vez modificados los electrodos con la Porfirina y ambos tipos de QD, la adsorción de la enzima fue evaluada mediante el monitoreo por VC del grupo FAD/FADH<sub>2</sub>, ya que la señal de este cofactor tiene un par redox detectable entre -400 y -500 mV vs SCE. Electrodo depositado sólo con GOx se utilizaron para comparar las señales de los electrodos modificados con Porfirina/QD/GOx. Los voltamperogramas que se obtienen con ambos tipos de QD se presentan en la Figura 27. A primera vista los VC son muy similares, sin embargo, el restar la línea base en cada uno, permite observar diferencias en la amplitud de la corriente del pico de oxidación de FAD (inserto en la Figura 27). La mayor corriente se obtuvo

con los electrodos modificados con Porfirina/GSH-CQD/GOx, seguido de los modificados con Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx, y los que dieron menor corriente fueron los modificados sólo con GOx.



**Figura 27.-** Respuesta voltamperométrica de los electrodos modificados con Porfirina/QD/GOx. El gráfico interior muestra el pico de oxidación de FAD luego de restar la línea base.

Según diversos autores, los valores de corriente pico de oxidación de FAD pueden dar una idea de la cantidad de enzima inmovilizada utilizando la Ecuación de Brown Anson (Ec. 1), la cual indica que a mayor corriente de oxidación mayor es la cantidad de GOx inmovilizada. Los resultados de dicho análisis se muestran en la Tabla 1.

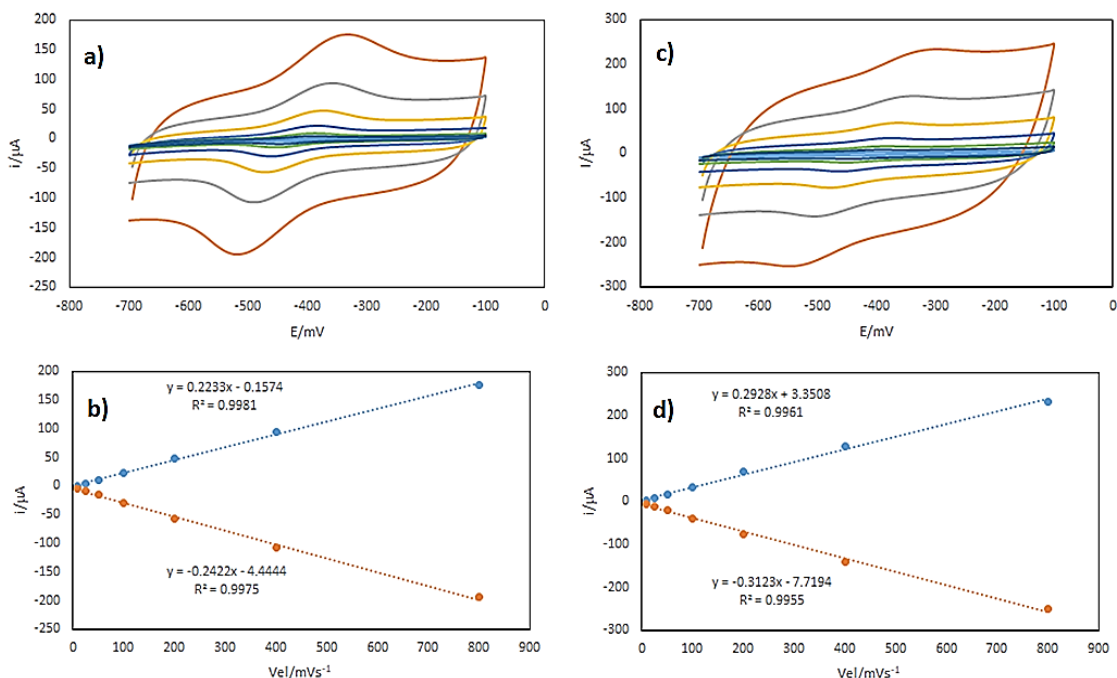
$$iP = \frac{n^2 F^2 v A \Gamma^*}{4RT} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde  $iP$  es la corriente pico de oxidación de FAD<sup>+</sup>,  $A$  es el área geométrica del electrodo,  $v$  es la velocidad de barrido,  $\Gamma$  es la concentración de GOx adsorbida en el electrodo,  $F$  es la constante de Faraday,  $T$  es la temperatura del sistema y  $R$  es la constante de los gases ideales.

**Tabla 2.-** Cantidad teórica de GOx depositada sobre electrodos modificados con Porfirina/QD/GOx

Modificación	$\Delta E_p/mV$	$i_{Max}/\mu A$	Cantidad de GOx/M $cm^{-2}$
Grafito	90	1.4838	$1.00E^{-10}$
Porf-CdTe	60	2.2717	$1.65E^{-10}$
Porf-CQD	75	3.1806	$2.31E^{-10}$

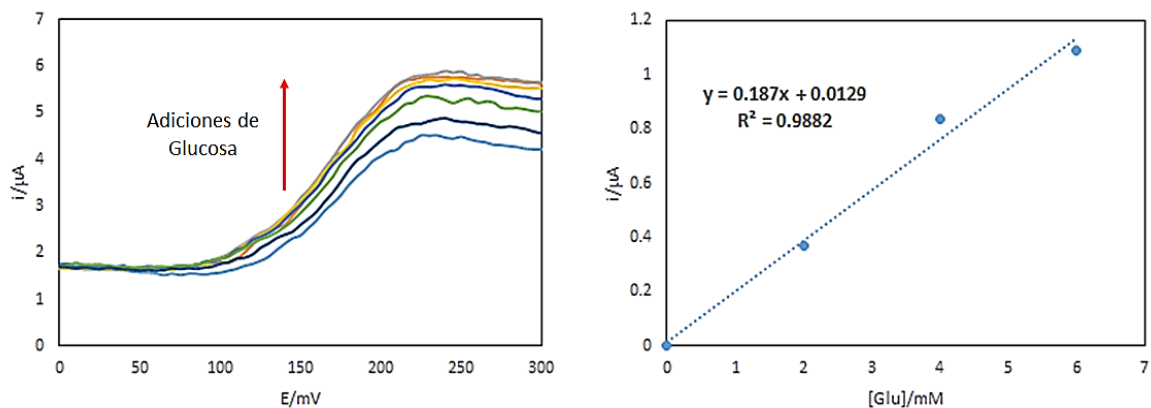
Para confirmar que la enzima se encontraba adsorbida sobre el sistema de Porfirina/QD, los electrodos fueron evaluados a diferentes velocidades de barrido, y se determinó el incremento en la corriente del par redox. La comparación de la amplitud de los picos correspondientes al par redox FAD/FADH<sub>2</sub> en los voltamperogramas de la Figura 28a y c, indicaría que el sistema Porfirina/GSH-CQD permite inmovilizar mayor cantidad de GOx. Por otro lado, los gráficos de correlación lineal entre la corriente pico de oxidación y reducción respecto de la velocidad de barrido se presenta en la Figura 28b y d. De acuerdo a lo reportado en la literatura, los resultados señalan que se trata de procesos que ocurren en la superficie, lo cual significaría que la enzima se encuentra fuertemente adsorbida sobre el electrodo.



**Figura 28.-** Evaluación de los electrodos modificados con Porfirina/QD/GOx a diferentes velocidades de barrido. (a) y (b) corresponden al electrodo en el que se usaron GSH-CQD, mientras que las respuestas obtenidas en (c) y (d) corresponden al electrodo modificado con GSH-CdTeQD.

### 6.1.5 Sensibilidad a glucosa de los electrodos enzimáticos: caracterización como sensor

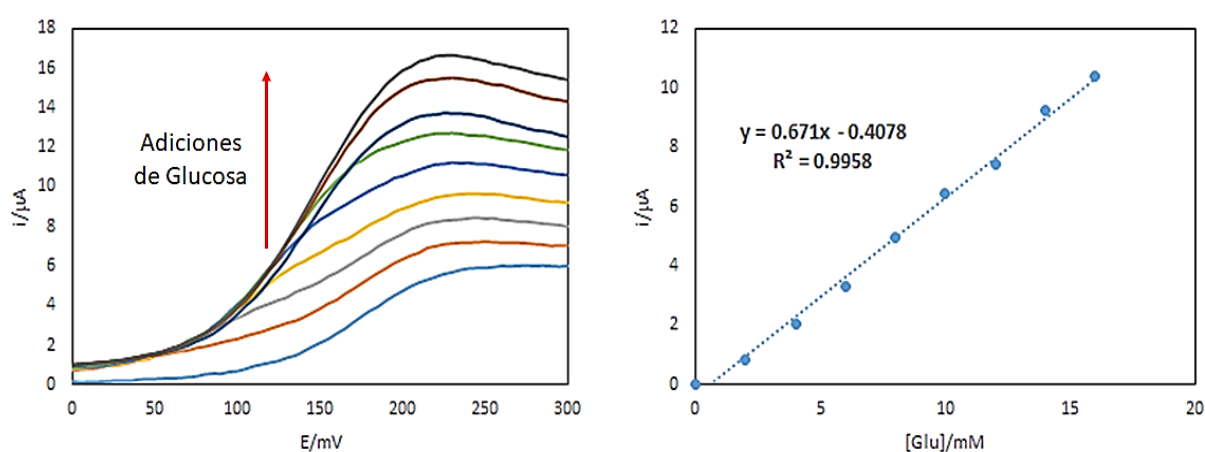
Aún con la enzima adsorbida en el electrodo, es necesario demostrar que conserva su actividad catalítica. Para esto se optó por evaluar los electrodos enzimáticos en presencia del mediador Ferroceno-metanol, el cual tiene un par redox característico cuya corriente incrementa en función de la concentración de glucosa cuando se lleva a cabo la oxidación de ésta. El electrodo modificado con GSH-CQD produjo un incremento muy pequeño en la corriente (Figura 29) de aproximadamente 1.2  $\mu\text{A}$  luego de la adición sucesiva de alícuotas de 2 mM de glucosa hasta alcanzar una concentración de 8 mM después de la cual se observó un aparente punto de saturación ya que no se obtuvieron más incrementos en la corriente incluso al llegar a 12 mM. Estos resultados pudieran indicar que sólo parte de la enzima adsorbida se encuentra activa o expuesto su sitio catalítico. Adicionalmente pudiera suceder que los productos de la reacción se acumulen en la superficie del electrodo dificultando la transferencia de electrones. La sensibilidad de estos electrodos fue de 0.187  $\mu\text{A}/\text{mM}$  de glucosa, y el rango lineal se mantuvo de 0 a 6 mM con un  $R^2=0.988$ .



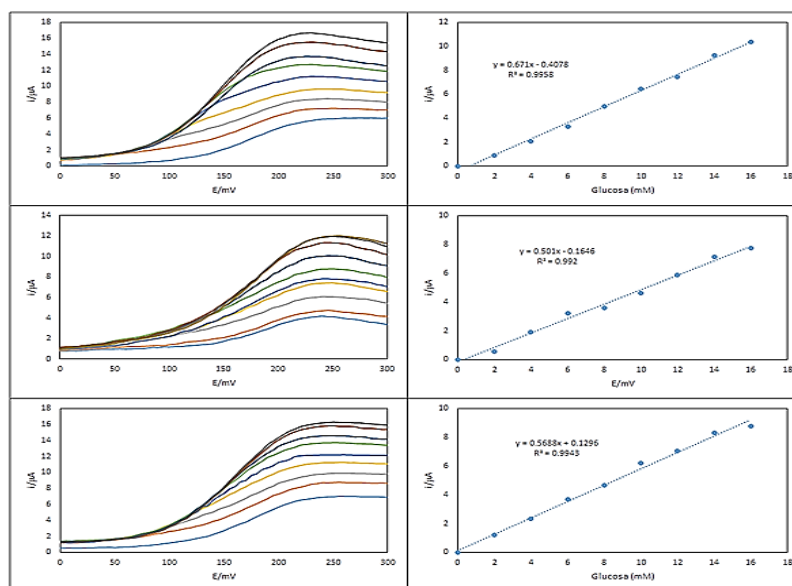
**Figura 29.-** Respuesta de los electrodos modificados con Porfirina/GSH-CQD/GOx a las adiciones de glucosa, evaluada en función del incremento de corriente en el pico de oxidación del Ferroceno.

Por otro lado, el electrodo modificado con Porfirina/GSH-CdTe/GOx, produjo un incremento en la corriente mucho más grande, de alrededor de 5  $\mu\text{A}$  al alcanzar los 8 mM de glucosa, y llegando al punto de saturación solo hasta después de los 16

mM con una corriente de 10.3  $\mu\text{A}$  aproximadamente, lo cual sugiere que la enzima adsorbida a este tipo de QD conserva mejor la actividad catalítica o se favorece la interacción entre la enzima, la glucosa y el mediador. Además de ello, la señal medida en este electrodo fue más estable, y la corriente creció en función de las adiciones de glucosa de una manera más proporcional (Figura 30). La respuesta de estos electrodos es reproducible, con una sensibilidad de  $0.58 \pm 0.009 \text{ mA/mM}$  de glucosa, en el rango lineal de 2 a 16 mM (Figura 31). Tiene potencial para ser usado como bioánodo en una celda de combustible y como transductor en un biosensor de glucosa.

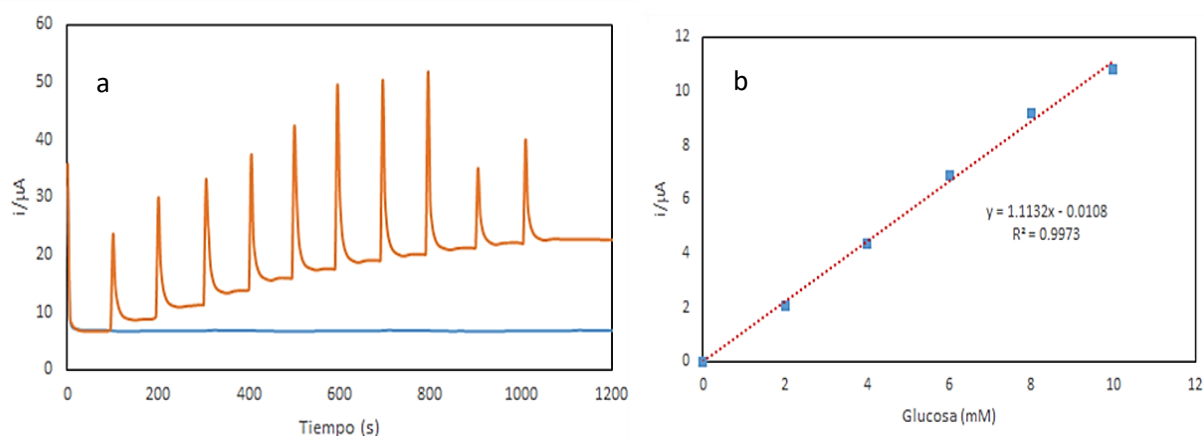


**Figura 30.-** Incremento en la corriente de oxidación del Ferroceno en función de las adiciones de glucosa, detectada sobre un electrodo modificado con Porfirina/GSH-CdTe/GOx.



**Figura 31.-** Ensayo de reproducibilidad del experimento descrito anteriormente

El incremento en la corriente de oxidación de Ferroceno al adicionar glucosa, se evaluó también por cronoamperometría, aplicando el potencial de 245 mV vs SCE durante 1200 seg. Los resultados se muestran en la Figura 32, en la que se observa claramente como la señal se mantiene estable en ausencia de glucosa, e incrementa gradualmente conforme se añaden alícuotas de este carbohidrato. Además, las primeras cinco adiciones produjeron un incremento lineal en la corriente observada, para el rango de concentraciones de 2 a 10 mM con una sensibilidad del electrodo de 1.11 mA/mM de glucosa. Estos resultados confirman la viabilidad de los electrodos modificados con GSH-CdTe para ser usados en un biosensor de glucosa.



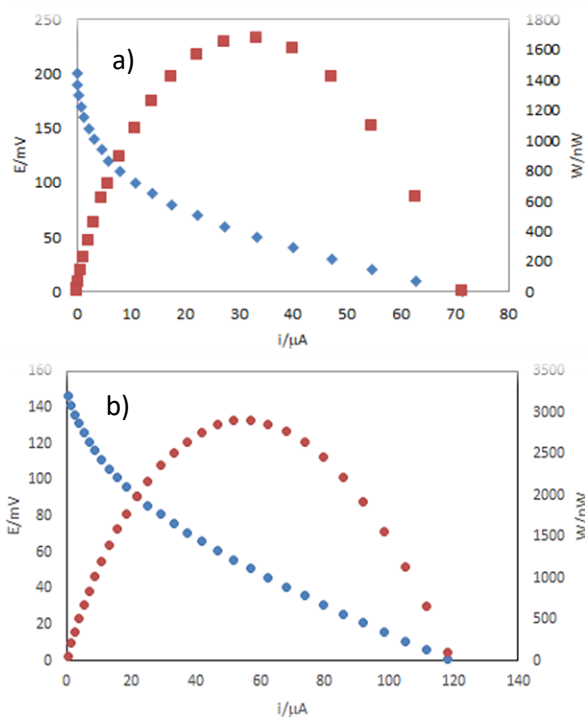
**Figura 32.-** (a) Respuesta cronoamperométrica de un electrodo modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx en ausencia (línea azul) y durante adiciones sucesivas (línea naranja) de 2 mM de glucosa. (b) Incremento lineal en la corriente durante las primeras cinco adiciones de glucosa.

### **6.1.6 Curvas de polarización en media celda de los electrodos modificados con Porfirina/QD/GOx.**

El principal enfoque de este trabajo, es determinar la viabilidad de los electrodos enzimáticos que usan QD (GSH-CQD o GSH-CdTeQD) para usarse como ánodos en una biocelda de combustible, por lo cual, electrodos modificados con estos dos sistemas fueron evaluados en media celda contra un cátodo de platino para determinar el potencial y la corriente obtenidos de dichos arreglos. Como se exhibe



en la Figura 33, ambos tipos de electrodos enzimáticos generan una diferencia de potencial, y producen una corriente eléctrica, sin embargo el ánodo que utiliza como soporte enzimático a los GSH-CdTeQD tiene un mejor desempeño en media celda que los ánodos que utilizan GSH-CQD, ya que en el primero se obtuvo una densidad de potencia  $W= 2.9 \mu\text{Wcm}^{-2}$ , un potencial a circuito abierto  $\text{OCP}= 145 \text{ mV}$ , y una corriente máxima  $I_{\text{max}}= 57.05 \mu\text{Acm}^{-2}$ , mientras que en los electrodos modificados con GSH-CQD se obtuvo una  $W= 1.6 \mu\text{Wcm}^{-2}$ , un  $\text{OCP}= 200 \text{ mV}$ , y una  $I_{\text{max}}= 33.45 \mu\text{Acm}^{-2}$  valores menores a los observados en los electrodos anteriores. La cantidad de enzima en ambos electrodos es prácticamente el mismo, ambos están en el orden de magnitud de  $10^{10}$ , por lo tanto las diferencias en su desempeño pudieran estar más bien relacionadas con la facilidad para permitir la transferencia de cargas, la conformación de la enzima que favorece la exposición del sitio catalítico, y el acceso de la glucosa y el mediador; o el mejor acoplamiento con la porfirina.



**Figura 33.-** Comparación de las curvas de polarización obtenidas al usar un ánodo de (a) Porfirina/CQD/GOx y uno de (b) Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx en presencia de glucosa y Ferroceno contra un cátodo de platino.

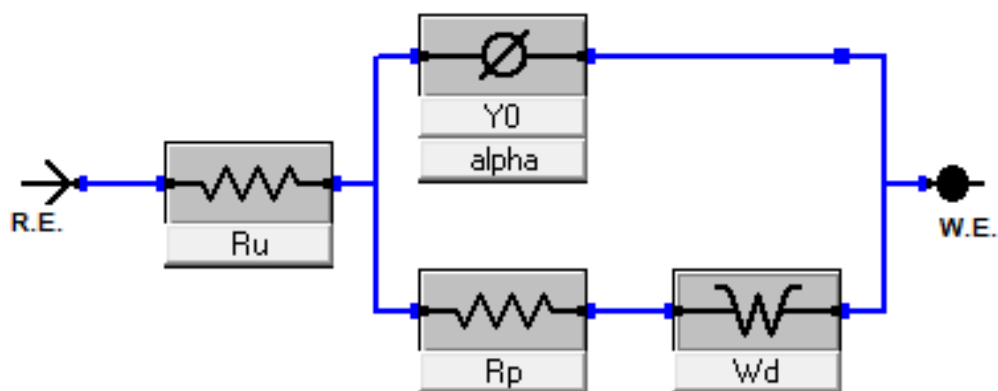
## **6.2 Segunda etapa: Caracterización fisicoquímica**

Con base en estos resultados, a fin de priorizar en los materiales más prometedores, se optó por utilizar los GSH-CdTeQD como soporte inmovilizador para GOx. En adelante, los resultados mostrados corresponden a arreglos que utilizan este tipo de Quantum dots, descartando definitivamente el uso de CQD.

### ***6.2.1 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica de Porfirina y GSH-CdTeQD***

Cuando una superficie conductora como el grafito modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD entra en contacto con una solución iónica, se genera una doble capa eléctrica, la cual bajo condiciones específicas presenta propiedades de capacitancia y conductividad. Mediante el empleo de circuitos equivalentes, estas propiedades pueden interpretarse respectivamente como un capacitor y un resistor a fin de simular el comportamiento eléctrico de un sistema electroquímico <sup>(48)</sup>.

A fin de conocer dichas propiedades en el sistema auto-ensamblado, un electrodo de grafito fue sometido a EIS antes y después de su modificación con Porfirina, o con Porfirina/GSH-CdTeQD, utilizando como molécula sonda el par redox Ferro-Ferri, y aplicando una perturbación al potencial de oxidación del dicho par. Para determinar el cambio en la resistencia a la transferencia de carga ( $R_{tc}$ ) al depositar cada material, los espectros obtenidos se ajustaron a un circuito equivalente tipo Randles usando un elemento de fase constante en el sitio del capacitor y un elemento de Warburg para simular la difusión (Figura 34).

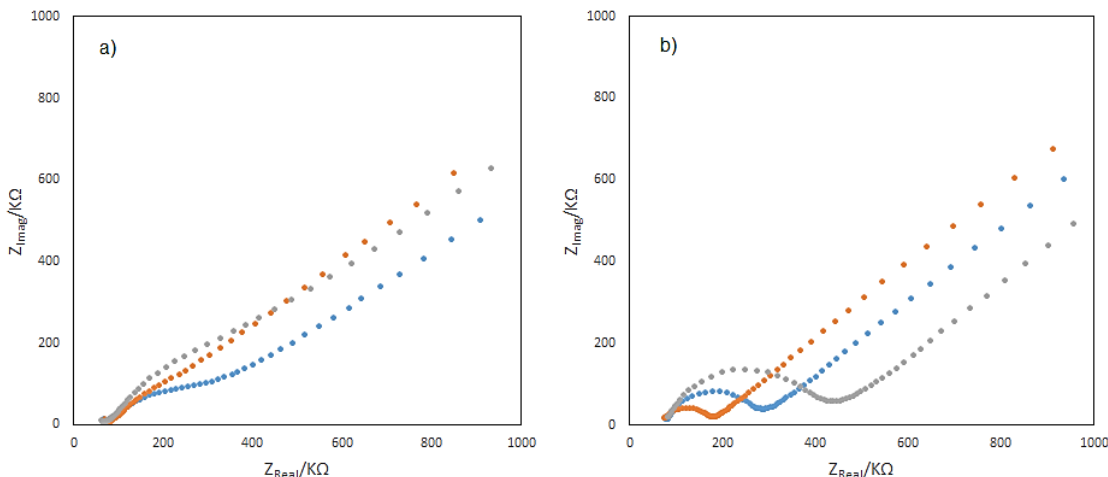


**Figura 34.-** Circuito equivalente utilizado para el análisis de EIS.  $R_u$  y  $R_p$  corresponden a las resistencias del circuito,  $Y_0$  representa el elemento de fase constante que sustituye al capacitor, y  $W_d$  es el elemento de Warburg.  $R.E.$  y  $W.E.$  representan a los electrodos de referencia y trabajo respectivamente.

Considerando el diagrama de Nyquist, los resultados obtenidos son poco claros; se esperaba un semicírculo relacionado con la resistencia del material <sup>(49)</sup> sin embargo en los diagramas se observan “semicírculos” muy poco definidos (Figura 35 a). Los valores de impedancia obtenidos gracias a la simulación con el circuito equivalente se muestran en la Tabla 3. De acuerdo con estos resultados, la adsorción de Porfirina sobre grafito disminuye la  $R_{tc}$ , mientras que el depósito del sistema autoensamblado Porfirina/GSH-CdTeQD la incrementa. No obstante, para corroborar este comportamiento, y tomando en cuenta que la superficie del grafito utilizado como electrodo es porosa e irregular a escala microscópica aún después de pulir, el depósito de Porfirina y Porfirina/GSH-CdTeQD se repitió empleando ahora carbón vítreo (GC por sus siglas en inglés) como electrodo de trabajo, ya que se sabe que las propiedades de conducción son diferentes entre ambos soportes <sup>(50)</sup>.

Como se observa en la Figura 35 b es evidente la formación del semicírculo característico que se asocia con la  $R_{tc}$ . Tal comportamiento, así como los valores de impedancia obtenidos al evaluar los espectros con ayuda del circuito equivalente (Tabla 3), permitieron confirmar la capacidad de la Porfirina para disminuir la  $R_{tc}$

con respecto al blanco, mientras que al igual que en los resultados obtenidos para grafito, el depósito del sistema Porfirina/GSH-CdTeQD incrementa la resistencia, sirviendo este dato a su vez, como indicador de la adsorción de los GSH-CdTeQD sobre la Porfirina en ambos sustratos carbonosos.



**Figura 35.-** Espectros de impedancia obtenidos del análisis de electrodos de grafito (a) y GC (b) sin material (azul) y luego de ser modificados con Porfirina (naranja) y Porfirina/GSH-CdTeQD (gris).

**Tabla 3.-** Valores obtenidos al analizar los espectros de impedancia con el circuito equivalente de Randles con CPE.

Superficie	$R_{tc}/\Omega$
Grafito	383.2
Grafito/Porfirina	211.7
Grafito/Porfirina/GSH-CdTeQD	601.4
GC	208.6
GC/Porfirina	115.2
GC/Porfirina/GSH-CdTeQD	359.6

El comportamiento resistivo de estos materiales ya ha sido descrito en la literatura; el incremento en la  $R_{tc}$  al inmovilizar GSH-CdTeQD sobre una Porfirina catiónica fue reportado en 2014 mediante la inmovilización de múltiples “bicapas” de ambos materiales sobre electrodos de ITO <sup>(31)</sup>. Por su parte, la disminución en la  $R_{tc}$  asociada al uso de Porfirina puede explicarse tomando en cuenta la carga positiva de esta molécula. Se ha descrito que la inmovilización de polipirroles sobre

superficies de grafito favorece el acercamiento de los iones de Ferro-Ferri (cargados negativamente) debido a la carga positiva de los grupos amino en su estructura. La Porphirina empleada en este trabajo contiene cuatro grupos amino secundarios al centro del anillo tetrapirrónico, y a su vez posee otros cuatro grupos amino terciarios en los sustituyentes 1-metil-4-piridinio que le confieren una carga catiónica bastante fuerte, por lo que la disminución en la  $R_{tc}$  se atribuye a esta característica.

### **6.2.2 Análisis del sistema Porphirina/GSH-CdTeQD/GOx por DLS y Potencial zeta**

Si bien, el arreglo enzimático depositado sobre carbón, fue caracterizado por métodos electroquímicos, además de confirmarse su capacidad para oxidar la glucosa e inclusive ser usado como bioánodo en una celda de combustible, es importante conocer las características fisicoquímicas del arreglo obtenido y de ser posible, mejorar su funcionamiento. Hasta este punto, se cree con base en la literatura consultada, que existe entre los materiales una interacción tal que genera el autoensamble de los materiales en un sistema capa sobre capa, sin embargo, tal afirmación solo puede fortalecerse mediante el uso de otras técnicas de caracterización como la determinación del tamaño de partícula por DLS y la medición del Potencial zeta en la superficie de las partículas. Dichos resultados se presentan y discuten a continuación.

De acuerdo con los resultados de DLS que se resumen en la Tabla 4, las partículas de GSHCdTeQD tienen tamaños entre 7.3 y 177.3 nm. El tamaño menor coincide con lo que se dedujo a partir del análisis espectrofotométrico; sin embargo, la presencia de partículas de más de 100 nm sería incompatible con la definición de quantum dots (tamaños menores a 10 nm), siendo más probable la formación de agregados de partículas.

Cabe resaltar que de acuerdo con Segets, la técnica por DLS no es muy recomendable para el análisis de tamaño en los Quantum dots, ya que la presencia

de ligandos en su superficie (GSH en el caso de este trabajo) no es despreciable; además, siendo tan pequeña la dispersión de las partículas por debajo de los 10 nm, la resolución de la mayoría de los equipos disponibles para esta técnica es muy baja <sup>(51)</sup>.

Sin embargo, la presencia de Porfirina en contacto con los Quantum dots provocó la aparente formación de partículas con una distribución uniforme alrededor de los 328 nm, un comportamiento que si bien parece poco consistente, ya ha sido reportado para la interacción de estos dos materiales, y la detección de partículas con tamaños superiores a los 100 nm al mezclar ambos componentes, se adjudica a la formación de conglomerados de tamaño más o menos uniforme <sup>(52)</sup>, por lo que se puede argumentar que la Porfirina y los GSH-CdTeQD sintetizados presentan un comportamiento similar en suspensión.

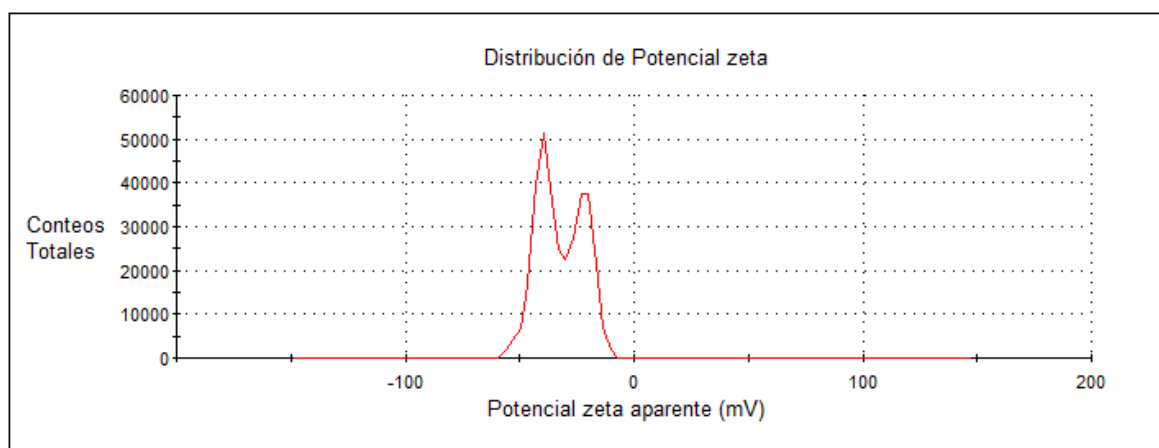
**Tabla 4.-** Potencial zeta y tamaño teórico obtenido por DLS de la Porfirina, los GSH-CdTeQD y una mezcla de ambos materiales.

Muestra	Tamaño teórico/nm	Potencial zeta/mV
Porfirina	-	-4.3
GSH-CdTeQD	7.3 y 177.3	-29.3
Porfirina/GSH-CdTeQD	328.3	-33.86

Otra de las interrogantes en torno a los GSH-CdTeQD corresponde a la presencia del GSH en la superficie de la partícula. El voltamperograma de la Figura 14 si bien sugiere la presencia del GSH, no permite determinar si se encuentra adherido al QD de manera superficial. Por ello se optó por evaluar el potencial zeta de las partículas, ya que esta técnica se ha empleado en varios trabajos para determinar la presencia de GSH en nanopartículas. <sup>(53, 54)</sup>.

En particular, para los QD recubiertos con algún ligando como GSH o MPA la medición del Potencial zeta permite identificar la presencia superficial de dichas moléculas, las cuales debido a los grupos funcionales presentes en su estructura (generalmente carboxilos) confieren a la partícula una carga negativa que dependiendo del tipo de QD puede ir desde -12 hasta -65 mV, a diferencia de los QD sin recubrimiento en cuyo caso la superficie presenta carga positiva <sup>(55, 56)</sup>.

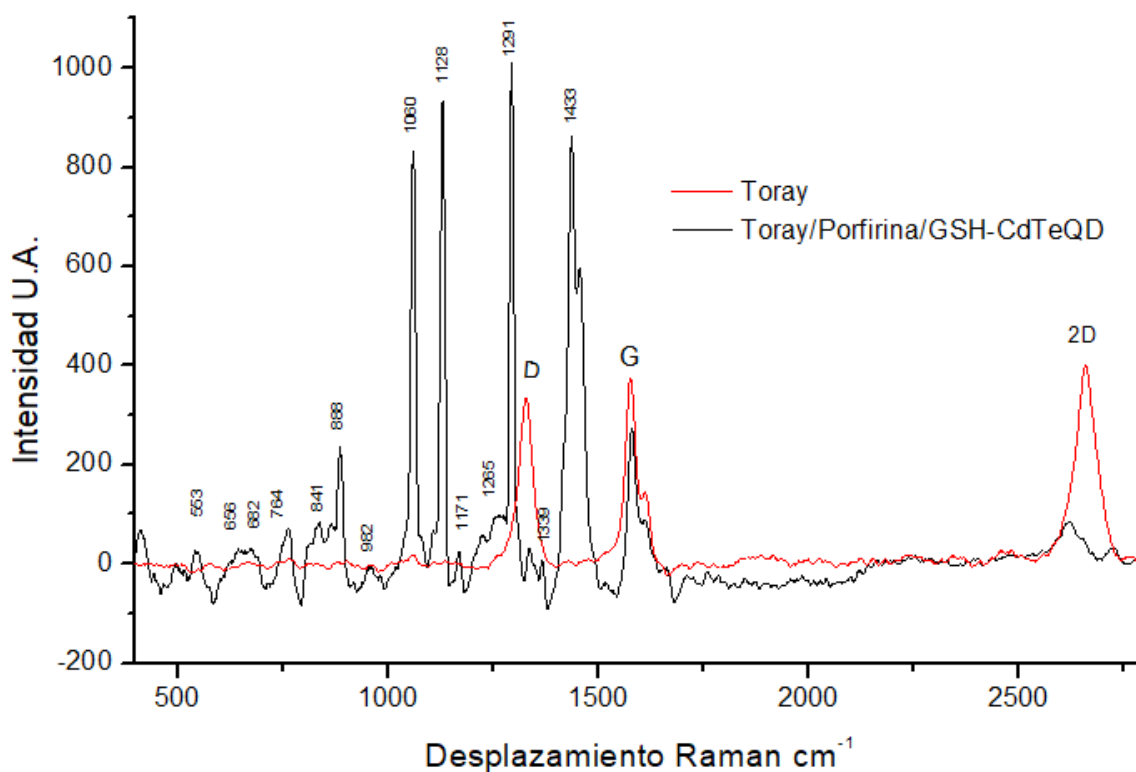
La Figura 36 muestra los resultados obtenidos al evaluar el Potencial zeta de los GSH-CdTeQD, en la imagen se aprecia como la carga superficial tiende hacia potenciales negativos, y en promedio oscila alrededor de -29.3 mV, confirmando la presencia de moléculas de GSH adheridas a la superficie de la partícula ya que de acuerdo con diversas investigaciones, durante el proceso de síntesis de QD el GSH actúa por un lado como reductor para metales como el telurio o el selenio <sup>(57)</sup>, y por otro como ligando para los átomos de cadmio mediante el grupo -SH, como se ha demostrado por métodos tradicionales y biomiméticos <sup>(58-60)</sup>.



**Figura 36.-** Gráfico del potencial zeta medido a los GSH-CdTeQD en PBS 0.1 M pH 7.4.

### **6.2.3 Análisis espectroscópico del sistema Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx**

Buscando comprender la interacción entre los componentes, electrodos de grafito modificados con Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx, así como electrodos modificados con los mismos materiales por separado fueron evaluados por espectroscopia de Raman y espectroscopia de infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR). En la Figura 37 se observan los espectros de Raman obtenidos para el análisis de un electrodo de papel de fibra de carbono limpio, y uno modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD.



**Figura 37.-** Espectros de Raman obtenidos para un electrodo de papel Toray sin modificaciones (línea roja), y un electrodo modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD (línea negra). Se etiquetan las bandas D, G y 2D en sus respectivas posiciones, así como el valor de desplazamiento Raman para las bandas principales correspondientes a los grupos activos del material depositado.

En el primer caso se aprecian las bandas características de los materiales carbonosos. La banda a  $1580\text{ cm}^{-1}$  es conocida como banda G, y corresponde a las vibraciones en el plano gráfico de los enlaces C-C. Por su parte las bandas a  $1330$  y  $2660\text{ cm}^{-1}$  se denominan banda D y 2D respectivamente, y representan las vibraciones fuera del plano en las superficies de carbono <sup>(61-63)</sup>. Por su parte, el espectro obtenido del electrodo que fue modificado con el sistema Porfirina/GSH-CdTeQD muestra una señal radicalmente distinta, que si bien conserva la banda G con muy pocas modificaciones, permite también apreciar una notable disminución en la intensidad de las bandas D y 2D. De manera general, este comportamiento sugiere que la Porfirina se deposita en el plano de la estructura carbonosa <sup>(64, 65)</sup>. También se aprecian las señales características de la Porfirina usada en este trabajo, pues a  $656$ ,  $807$ ,  $982$  y  $1261\text{ cm}^{-1}$  aparecen las señales correspondientes



al grupo amino de las piridinas que se encuentran como sustituyentes en el anillo tetrapirrónico, así como las correspondientes a los grupos funcionales de glutatión que recubre a los GSH-CdTeQD <sup>(66-69)</sup>. En algunas situaciones, la literatura citada sugiere que los grupos funcionales tanto de la Porfirina como del glutatión podrían “combinar” sus respectivas señales, ocasionando el incremento en la intensidad de una banda en particular como es el caso de la banda a 1060 cm<sup>-1</sup> que se atribuye al enlace C-N tanto del anillo tetrapirrónico como del glutamato que forma parte de la estructura del glutatión. Los grupos funcionales atribuidos a las diferentes bandas del espectro se muestran en la Tabla 5, donde se expone a su vez a qué moléculas corresponde cada señal, y se corrobora que algunas señales pertenecen a ambos materiales.

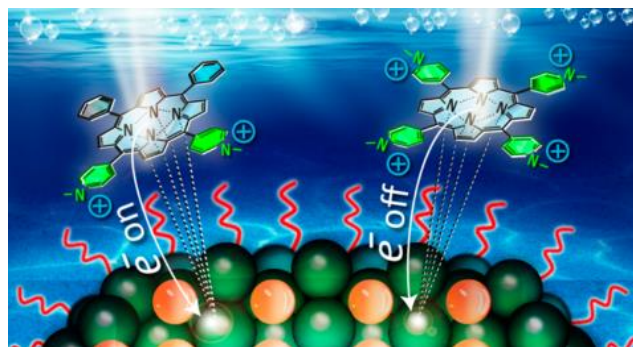
**Tabla 5.-** Asignación de grupos funcionales a las bandas del espectro de Raman para un electrodo de papel Toray modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD. (Estiramiento *str*; deformación *def*; aleteo *wag*; Simétrico *sym*).

Desplazamiento/cm <sup>-1</sup>	GF en Porfirina	GF en GSH-CdTeQD
553	-	N-C-C <i>def</i>
656	Piridil	-
682	C-N <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> <i>str</i>	-
764	-	COO <sup>-</sup> <i>def</i>
807	N-metilpiridinio	-
841	-	C-C-N <i>str</i>
888	-	C-C <i>str</i>
982	Piridil	-
1060	C-N <i>str</i>	<i>Glu</i> C-C-N <i>str</i>
1107	C-H <i>def</i>	-
1128	-	N-C S <sup>+</sup> <i>str</i> y C-C <i>str</i>
1171	-	C-H <i>wag</i>
1261	C-Piridil <i>str</i>	Amida III
1291	-	<i>Gly</i> C-H y C-N
1339	Cα-C <i>str</i>	-
1433	-	COO <sup>-</sup> <i>Sym Str</i>

Si bien es importante destacar la presencia de los grupos funcionales de cada material en el espectro como prueba de su presencia en la superficie del carbono,

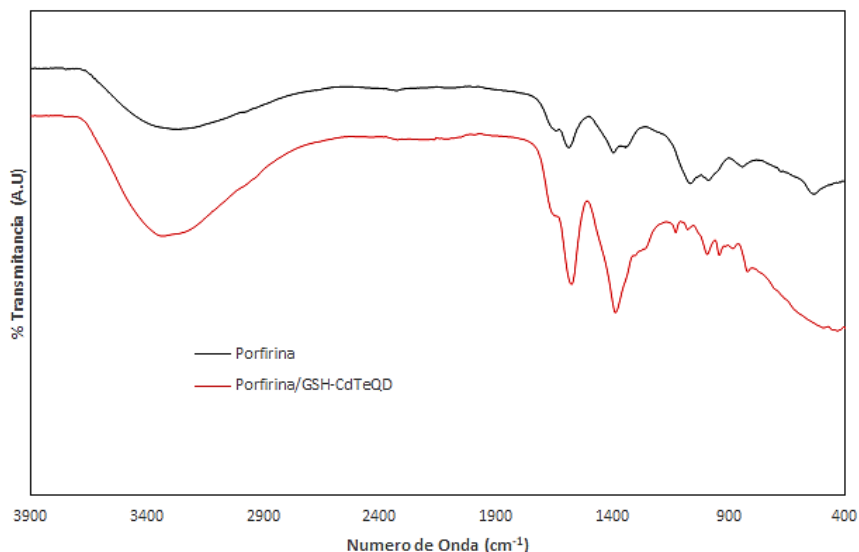
también es interesante la correlación que surge de la intensidad de estas bandas, en función del tipo de vibración que reflejan, ya que tomando en cuenta dicha intensidad, se puede proponer la orientación de los materiales en el sistema autoensamblado. En primer lugar, como se mencionó anteriormente, la notoria disminución en las bandas D y 2D al modificar la superficie con los materiales, implica que el acomodo de la Porphirina muy probablemente es en el plano, y a su vez las vibraciones fuera del plano del anillo tetrapirrólico a  $1107\text{ cm}^{-1}$  se ven impedidas posiblemente por el acomodo de la capa de GSH-CdTeQD sobre éste, en un arreglo tipo “tándem”. Es interesante resaltar que las señales asociadas a los estiramientos en plano de la Porphirina, en general aparecen como vibraciones de alta intensidad y bien definidas, mientras que las deformaciones fuera del plano reportadas en la mayoría de los trabajos no aparecen aquí, o bien generan señales débiles, apuntando nuevamente a una interacción plana entre el macrociclo y la superficie de carbono por un lado o los GSH-CdTeQD en el otro.

Si bien son más frecuentes las señales asociadas al grupo Piridinio de la Porphirina, que las que se pueden atribuir al anillo tetrapirrólico, sugiriendo que la interacción entre los materiales pudiera ocurrir a través de los grupos amino del macrociclo como han propuesto algunos autores (Figura 38) <sup>(70)</sup>, es importante dilucidar el mecanismo mediante el que se une la Porphirina a los GSH-CdTeQD mediante otras técnicas, por lo que el complejo formado se estudió también mediante FT-IR.



**Figura 38.-** Interacción propuesta por Aly y colaboradores (2015) de la 5,10,15,20-Tetrakis(1-metil-4-piridinio) Porphirina con TGA-CdTeQD a través de los grupos amino del anillo tetrapirrólico<sup>(70)</sup>.

Aunque a simple vista los espectros presentan ciertas similitudes (Figura 39), el análisis de las bandas obtenidas para Porfirina, Porfirina/GSH-CdTeQD y Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx, muestra sus diferencias características en función de los grupos funcionales más importantes detectados por este método, y a su vez las señales observadas permiten sugerir de manera más concreta las interacciones por las cuales se unen entre sí.



**Figura 39.-** Espectros FT-IR obtenidos del análisis de un electrodo modificado con Porfirina (línea negra) y Porfirina/GSH-CdTeQD (línea roja).

En primera instancia, el espectro obtenido para la Porfirina depositada en la superficie carbonosa exhibe bandas a  $542\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a las vibraciones fuera del plano del anillo tetrapirrólico; también aparece una perturbación a  $660\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a las deformaciones en el plano de la Porfirina, y las bandas características que se atribuyen a los grupos amino presentes en la estructura del macrociclo y los sustituyentes piridinio a 830, 1060, 1402 y  $1647\text{ cm}^{-1}$  (64, 71). La asignación de grupos funcionales a las diferentes bandas se presenta en la Tabla 6 tomando en cuenta la bibliografía correspondiente (72-74).

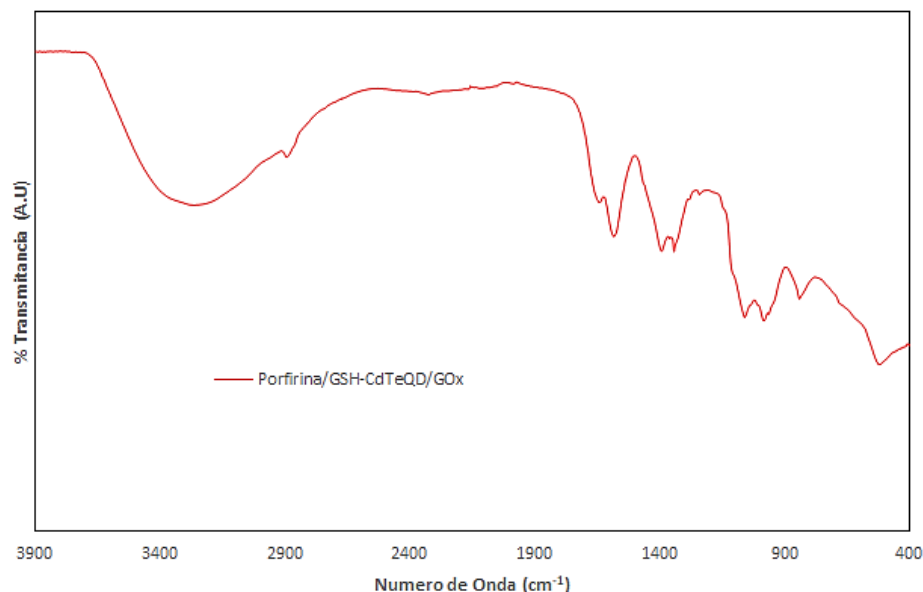
En segundo lugar, se obtuvo el espectro IR para una superficie de carbono modificada con Porfirina/GSH-CdTeQD y los cambios son bastante evidentes. Mientras que en el espectro de Porfirina la curva alrededor de  $3270\text{ cm}^{-1}$  es más

ancha y ligeramente menos intensa, cuando hay GSH-CdTeQD esta señal se vuelve más pronunciada y definida, siendo esta forma más característica de la presencia de carbonilos atribuibles al GSH que recubre a los QD. Además, se observa la aparición de nuevas señales a 933 y 1123  $\text{cm}^{-1}$ ; bandas similares se han reportado como características de la interacción entre el CdS y el grupo piridil de la Porfirina utilizada en este trabajo <sup>(75)</sup> lo cual, asumiendo la formación de CdS en la superficie de los GSH-CdTeQD, permite corroborar la unión entre la Porfirina y los QD no solamente mediante los grupos amino del anillo tetrapirrólico, sino también a través de los grupos piridinio que forman parte de su estructura.

**Tabla 6.-** Asignación de grupos funcionales a las bandas de los espectros obtenidos para Porfirina y Porfirina/GSH-CdTeQD.

<b>Porfirina</b>		<b>Porfirina/GSH-CdTeQD</b>	
<b>No. De Onda <math>\text{cm}^{-1}</math></b>	<b>Grupo Funcional y modo de vibración</b>	<b>No. De Onda <math>\text{cm}^{-1}</math></b>	<b>Grupo Funcional</b>
535	C-NH <i>def</i>	933	N <sup>+</sup> <sub>Porf</sub> -CdS
843	C-H <i>out Pyr</i>	1072	C-N <i>str</i>
991	Porf <i>bend plano</i>	1123	N <sup>+</sup> <sub>Porf</sub> -CdS
1069	C-H <i>bend complejo</i>	1249	$\delta$ OH <i>str</i>
1337	C-H <i>bend Pyr</i>	1388	$\nu$ COO <sup>-</sup> <i>asym</i>
1402	C-H <i>bend Porf</i>	1564	C=C <i>str Porf y GSH</i>
1587	C=C <i>Porf</i>	1660	$\nu$ COO <sup>-</sup> <i>sym</i>
1661	C-NH <i>str Porf</i>	3199	NH <sub>2</sub> <i>str</i>
2956	C-H <i>arom Porf</i>	3340	NH <i>str</i>
3303	N-H <i>str Porf</i>	-	-

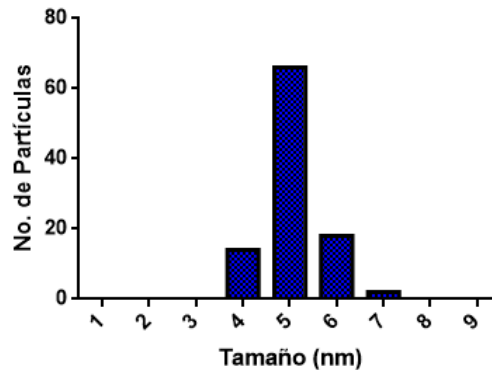
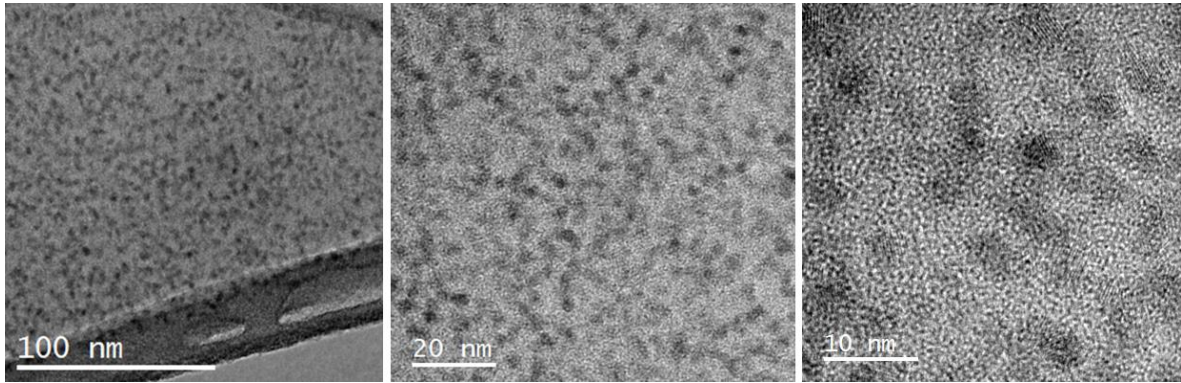
Finalmente el espectro obtenido para el sistema Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx, que se muestra en la Figura 40, presenta un conjunto de bandas que sugieren una mezcla entre las señales de los primeros dos componentes como se observó anteriormente, y a su vez la aparición de señales características que concuerdan con lo reportado para GOx, en particular las bandas a 1647 y 1543 correspondientes a las amidas I y II respectivamente, corroborando así la presencia de la enzima en el sistema autoensamblado <sup>(76)</sup>.



**Figura 40.-** Espectro FT-IR del sistema autoensamblado Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx.

#### **6.2.4 Microscopía electrónica de Transmisión y Barrido**

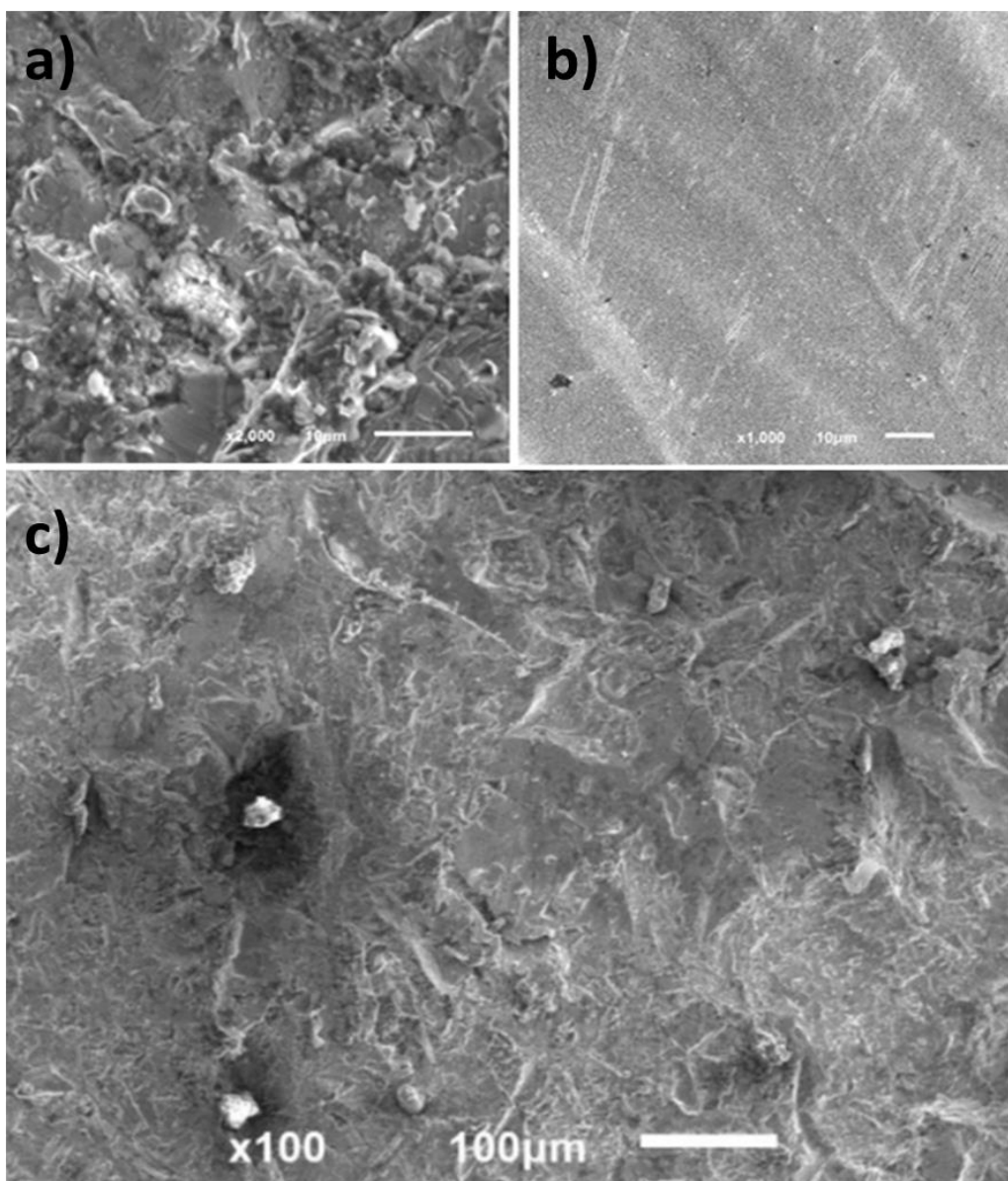
Continuando con el análisis de los componentes del sistema Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx, se sometió a microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) una muestra de GSH-CdTeQD, a fin de confirmar de una manera más certera su tamaño, forma y distribución. La parte superior de la Figura 41 muestra tres micrografías con diferente escala. En ella se aprecian QD con un tamaño promedio de 5 nm, como se confirmó mediante el conteo manual. Se observan partículas más o menos esféricas con una estructura bien definida y una dispersión regular de tamaños y formas. Este resultado confirma de manera definitiva que se trata de Quantum dots con un tamaño inferior a los 10 nm, y descarta el resultado obtenido en el análisis por DLS que apuntaba a la presencia de partículas de más de 100 nm.



**Figura 41.-** HR-TEM de los GSH-CdTeQD a diferentes escalas (arriba) y gráfico de la distribución porcentual en los tamaños de partícula (abajo)

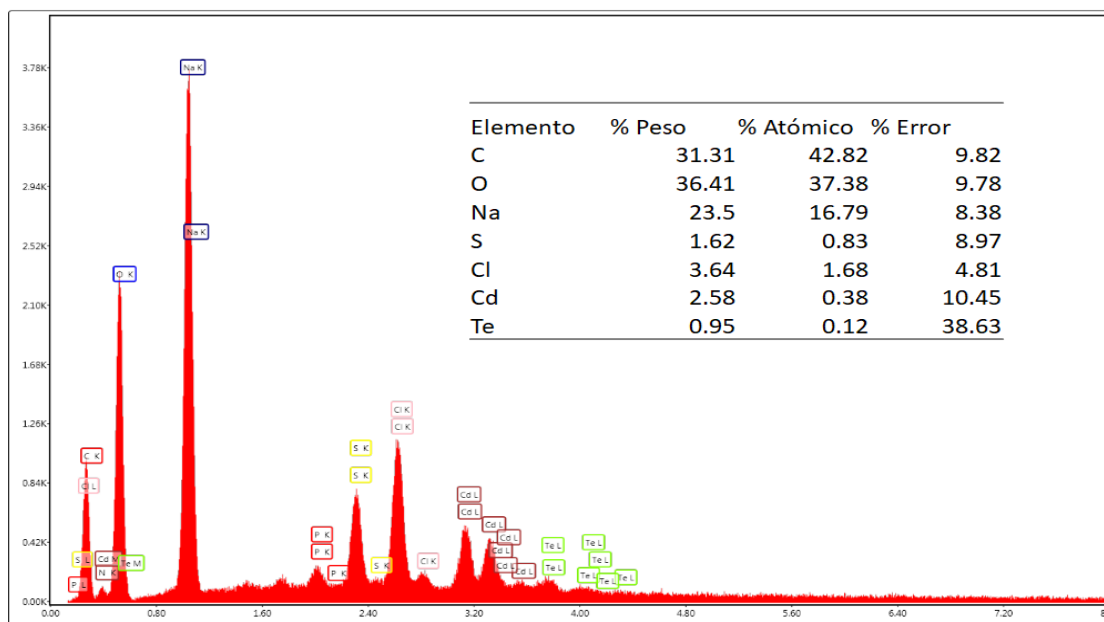
Posteriormente, electrodos de grafito modificados con los materiales del arreglo enzimático fueron evaluados por microscopía electrónica de barrido (SEM). Las imágenes en la Figura 42 muestran una comparación entre un electrodo en cuya superficie fueron depositados únicamente los GSH-CdTeQD (Figura 42 a) y otro que fue modificado previamente con Porfirina, para luego depositar los GSH-CdTeQD (Figura 42 b). Las imágenes sugieren que en el primer caso, las nanopartículas se depositan de manera desordenada formando aglomerados y relieves, mientras que en el electrodo que fue previamente modificado con Porfirina, los Quantum dots parecen formar una película uniforme, plana y con un aparente orden. Tal comportamiento de los GSH-CdTeQD reportado previamente en la literatura <sup>(31)</sup>, permite proponer la formación de un arreglo autoensamblado capa-sobre-capas que se distingue de manera visual. Además en la Figura 42 c, en la que se muestra la superficie de un electrodo de grafito modificado ya con el arreglo Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx completo, se aprecia como la capa de enzima

depositada se distribuye de manera más o menos homogénea, lo cual respalda la hipótesis de que este sistema no solo favorece la adsorción de GOx, sino que permite una distribución aceptable a lo largo de la superficie sobre la cual se deposita, conservando su actividad enzimática como se demostró en resultados anteriores.



**Figura 42.-** SEM de superficies de grafito modificadas con a) GSH-CdTeQD, b) Porfirina/GSH-CdTeQD y c) Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx.

En otro análisis, esta vez por SEM acoplado a espectroscopía de rayos X de energía dispersa (EDS) se observó la composición de los materiales presentes en un depósito del sistema Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx, de acuerdo con la Figura 43, hay presencia de cadmio y telurio, los metales correspondientes a la composición de los Quantum dots. A su vez, la literatura consultada reporta una proporción aproximada de 2.5:1 Cd:Te al evaluar los GSH-CdTeQD por esta técnica, y dicha proporción coincide con los resultados obtenidos en este trabajo <sup>(69)</sup>. También se detectó la presencia de azufre, característico del GSH utilizado como ligando, y de ciertos aminoácidos como la cisteína y la metionina presentes en la estructura proteica de GOx <sup>(77)</sup>. El porcentaje de cloro, sodio y fósforo que se indica en el espectro, posiblemente correspondan a residuos del PBS en el que se disolvieron los materiales, mientras que el carbono y el oxígeno que se encuentran en la mayor proporción en la muestra, pueden asociarse con la enorme cantidad de compuestos orgánicos que conforman tanto a la enzima, como a la Porfirina y el GSH, por no mencionar que el arreglo se depositó sobre una cinta de carbón adecuada para SEM. Con estos resultados se puede corroborar la presencia de los materiales en el arreglo autoensamblado.



**Figura 43.-** Espectro EDS del sistema Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx depositado sobre carbono. El inserto muestra las cantidades de cada elemento según fueron detectadas en el análisis.



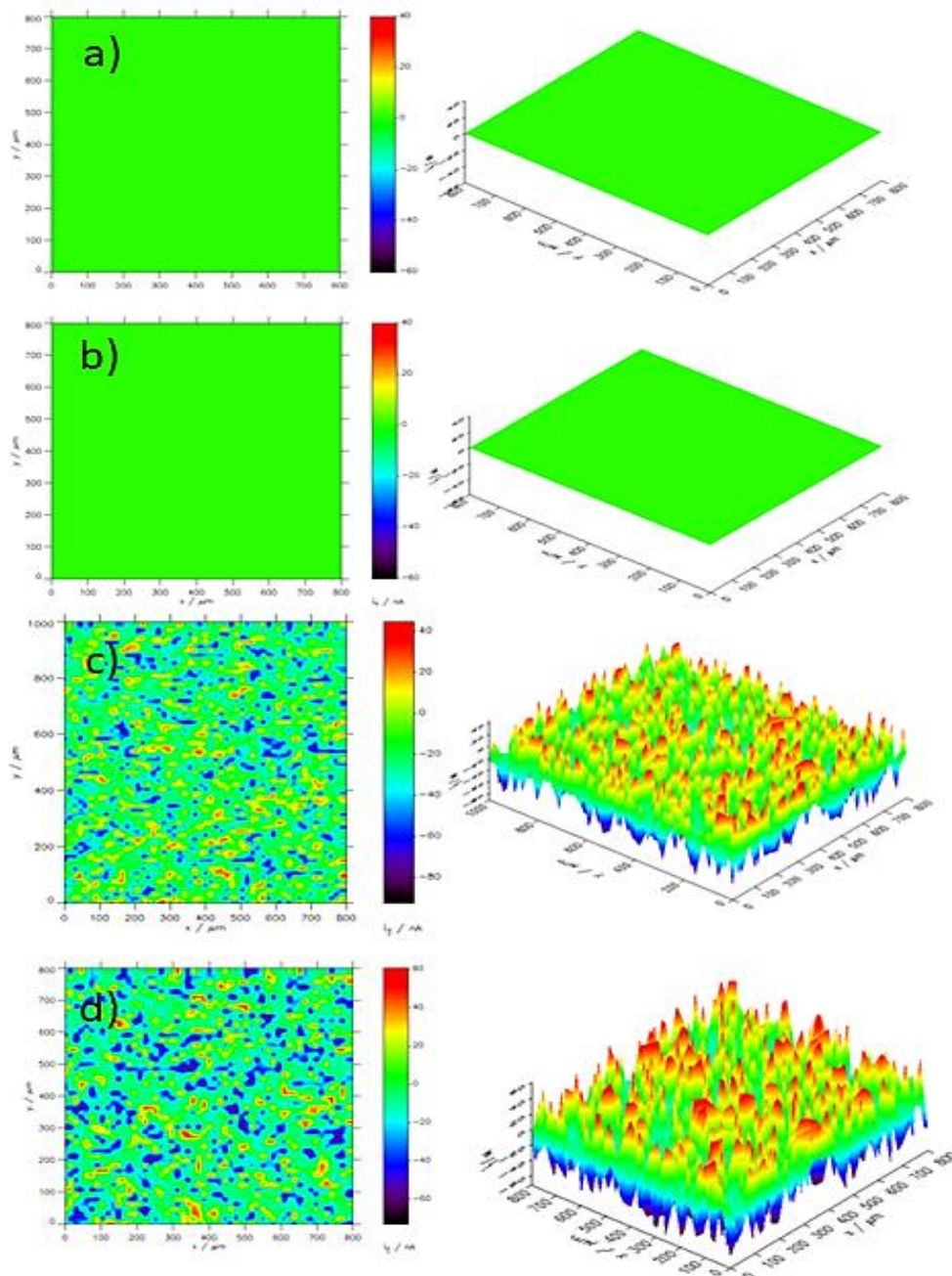
### **6.2.5 Microscopía electroquímica de barrido**

Hasta este punto, los resultados apuntan no solo a la presencia de los materiales en el arreglo sino a una interacción fuerte entre ellos que parece formar un arreglo autoensamblado cuya distribución homogénea permite la adsorción de GOx de manera relativamente homogénea en la superficie sobre la que se deposita, sin embargo a fin de esclarecer el comportamiento del arreglo enzimático corroborando no solo la actividad enzimática, sino también la distribución de los sitios activos a lo largo de la superficie, el electrodo de grafito modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx se evaluó mediante microscopía electroquímica de barrido, una técnica que permite mediante el barrido superficial de la muestra usando un microelectrodo, la detección de determinadas moléculas asociadas a la reacción.

En este trabajo se tomaron en cuenta dos moléculas diferentes: el  $H_2O_2$  producido directamente de la oxidación de la glucosa y el mediador Ferroceno-metanol, que interfiere en la reacción evitando la formación de  $H_2O_2$  reduciéndose él mismo, lo cual se refleja como un incremento en el pico de oxidación durante su análisis electroquímico. Este procedimiento tiene como propósito detectar las áreas con mayor cantidad de la molécula monitoreada, y asocia dichas zonas como evidencia de la cantidad de sitios activos disponibles.

La Figura 44 muestra una comparación entre una superficie de grafito modificada con Porfirina/GSH-CdTeQD sin la enzima (Figura 44 a) y una superficie de grafito modificada con los mismos componentes, pero añadiendo la enzima en la superficie (Figura 44 b – d). En un principio, la superficie que contiene la enzima mostró una señal igual que aquella que no la contiene, sin embargo cuando la misma superficie se puso en contacto con glucosa en solución, la respuesta cambió drásticamente, apareciendo picos en relieve que evidencian la producción de  $H_2O_2$  como consecuencia de la oxidación de glucosa efectuada por GOx. Acorde con lo observado en las imágenes de SEM, la enzima parece distribuirse de manera homogénea, si bien hay sitios con poca o nula actividad. Un resultado similar se observó cuando en lugar de  $H_2O_2$  se determinó la respuesta del mediador Ferroceno-metanol, en cuyo caso las señales obtenidas son más grandes debido

posiblemente a la naturaleza electroactiva de esta molécula. Estos resultados terminan de confirmar la viabilidad del sistema Porfirina/GSH-CdTeQD para adsorber a GOx conservando en gran medida su actividad.



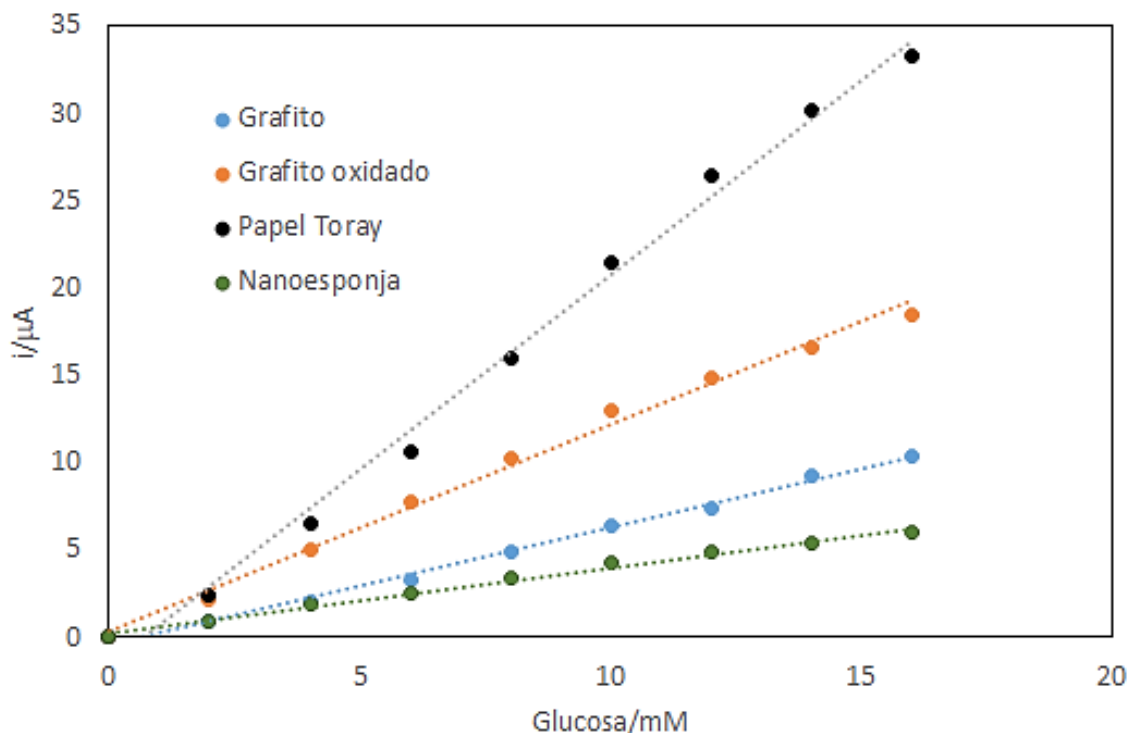
**Figura 44.-** a) Superficie de grafito modificada con Porfirina/GSH-CdTeQD; b-d) superficie modificada con Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx, c) al agregar glucosa, o d) ferroceno. El electrolito soporte fue PBS 0.1M pH 7.4. La escala de color indica las áreas con mayor actividad catalítica (rojo) y aquellas con muy poca o prácticamente nula actividad (azul).

### **6.3 Tercera etapa: Ensayos en celda microfluídica**

#### **6.3.1 Depósito de Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx sobre diferentes sustratos de carbono.**

Muchas de las formas alotrópicas del carbono tienen propiedades de conducción por ello en un sistema electroquímico el tipo de carbón utilizado como soporte conductor puede influir sobre el potencial y la corriente obtenidos. Por otro lado, la forma y disposición macroscópica de los materiales carbonosos puede dificultar o facilitar su implementación en diversos arreglos de acuerdo con propiedades como tamaño y maleabilidad, entre otras.

Con el fin de determinar el comportamiento del sistema Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx en diferentes tipos de carbón, se comparó la sensibilidad a glucosa de electrodos de grafito, grafito electro-oxidado, nanoesponja de carbono y papel Toray, modificados con el arreglo enzimático usando el procedimiento previamente descrito para la determinación de glucosa. Los electrodos fueron evaluados en PBS como electrolito soporte, y la concentración de glucosa se incrementó por adición de alícuotas, desde 2 hasta 16 mM. La Figura 45 muestra el incremento en corriente observado durante las adiciones de glucosa en los diferentes electrodos evaluados. Como se observa, todos los electrodos muestran sensibilidad a glucosa, aunque el nivel de corriente que se obtiene es diferente con cada material. Por un lado se aprecia que el electrodo de nanoesponja modificado con el arreglo enzimático fue quien generó una menor respuesta en corriente, apenas 5.9  $\mu\text{A}$  con la máxima concentración de glucosa añadida. Enseguida, el grafito alcanza una corriente de 10.3  $\mu\text{A}$  con 16 mM de glucosa añadida, en tanto que el grafito electro-oxidado generó una corriente máxima de 18.4  $\mu\text{A}$ . El papel Toray tuvo el mejor desempeño al alcanzar 33.2  $\mu\text{A}$  de corriente. En la Tabla 7 se resume la sensibilidad de los diferentes electrodos, la cual se obtuvo del valor de la pendiente del ajuste lineal de las curvas corriente vs concentración de glucosa.



**Figura 24.-** Incremento lineal en la corriente de diferentes tipos de carbono modificados con el sistema Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx. Cada punto corresponde a la corriente obtenida luego de aumentar en 2 mM la concentración de glucosa. VC en PBS 0.1 M pH 7.4 velocidad 5 mVs<sup>-1</sup> vs SCE.

**Tabla 7.-** Sensibilidad a glucosa de los electrodos de los distintos tipos de carbono modificados con el arreglo enzimático.

Tipo de carbón	Sensibilidad a glucosa/ $\mu\text{A mM}^{-1}$	Coefficiente de determinación/ $R^2$
<b>Grafito</b>	0.67	0.993
<b>Grafito Oxidado</b>	1.18	0.993
<b>Nanoesponja</b>	0.37	0.995
<b>Papel Toray</b>	2.24	0.991

Es conveniente considerar que el comportamiento se relaciona con la naturaleza geométrica de los electrodos ya que, en el caso de los electrodos de grafito (sin oxidar y oxidado) se emplearon superficies planas, en el electrodo de papel Toray se considera un electrodo tridimensional, cuyas fibras teóricamente permiten el flujo del electrolito soporte en todo el cuerpo del electrodo, no solo en su superficie. Esto a su vez podría permitir que el depósito del sistema no ocurra únicamente en la

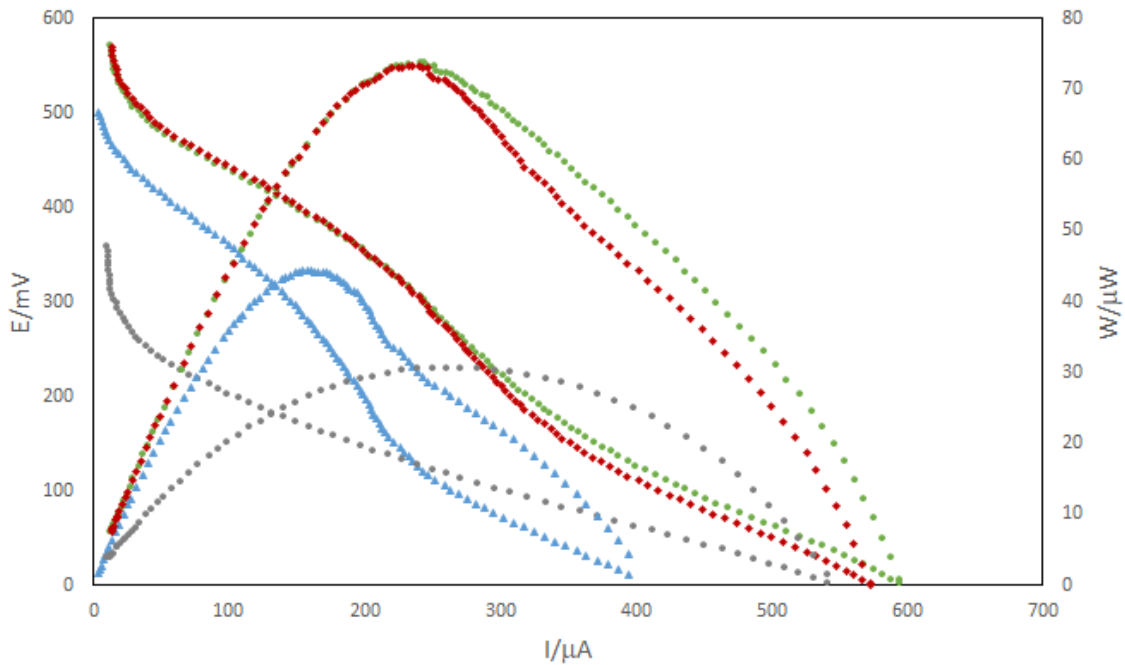
superficie geométrica del Toray, sino a través de todas sus fibras, proveyendo así el incremento de sitios catalíticos, lo cual explicaría la obtención de casi el doble de corriente en este tipo de electrodos.

### **6.3.2 Curvas de polarización de biocelda completa en el arreglo microfluídico.**

Un sistema de microflujo permite la evaluación de una celda de combustible sin la necesidad de una membrana de intercambio iónico, ya que el flujo laminar permite el contacto entre anolito y catolito sin que estos se mezclen tan fácilmente. Considerando los resultados obtenidos hasta este punto, que indican que el papel Toray modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx es una buena opción para llevar a cabo la oxidación de glucosa, y con base en otros trabajos descritos en la literatura se implementó un sistema microfluídico reportado entre otros por Escalona-Villalpando <sup>(44)</sup>, en el cual ánodo y cátodo utilizan papel Toray como soporte conductor, que debido a su tamaño y forma permiten la creación de electrodos tridimensionales apropiados para su adaptación a una celda microfluídica.

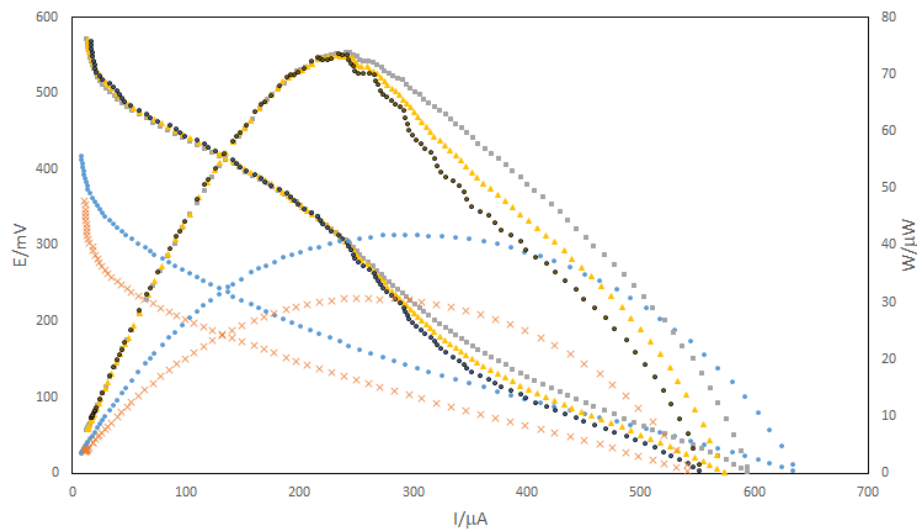
A fin de determinar las condiciones adecuadas para el mejor desempeño en la celda de microflujo, se probaron concentraciones de 10, 20 y 50 mM de glucosa en el anolito. En la Figura 45 se muestran los resultados, y se observa que aun en ausencia de glucosa (línea gris) el sistema alcanzó un valor de potencia de 30  $\mu$ W que se explica por la presencia del mediador ferroceno en la solución, esta molécula es altamente electroactiva, capaz de alcanzar un potencial y generar corriente. La presencia de glucosa en la solución provocó cambios en la forma y amplitud de las curvas de polarización, observándose una dependencia favorable con la concentración de glucosa entre 10 y 20 mM, con esta última concentración se alcanzó una potencia máxima de 73.6  $\mu$ W (línea verde en el gráfico). Sin embargo, y en congruencia con los resultados obtenidos en media celda, con la adición de altas concentraciones de glucosa que en este caso fue de 50 mM la potencia no crece más e incluso la corriente máxima de descarga disminuyó (línea marrón). De

esta manera los resultados indican que la concentración óptima de glucosa se encuentra alrededor de los 20 mM.



**Figura 45.-** Curvas de polarización en celda completa de ánodos de papel Toray modificados con Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx, evaluados en PBS 0.1 M pH 7.4, en presencia de Ferroceno metanol 0.5 mM y glucosa 0 mM (gris) 10 mM (azul) 20 mM (verde) y 50 mM (marrón). Se utilizaron cátodos de PyrAnMWCNT/Lc preparados tal cual lo reporta Escalona-Villalpando, en PBS 0.1 M pH 5.6 como catolito

Posteriormente, se procedió a seleccionar la velocidad de flujo adecuada para el mejor desempeño de la celda de microflujo. Se probaron velocidades de 1,3, 6, 9 y 12 mLh<sup>-1</sup>. Del análisis de las curvas de polarización en la Figura 46 es notorio el incremento en potencial y corriente que se obtiene a partir del flujo de 6 mLh<sup>-1</sup> (línea gris), aunque con un flujo de 9 y 12 mLh<sup>-1</sup> la potencia es ligeramente menor (líneas amarilla y negra, respectivamente) que con 6 mLh<sup>-1</sup>. De esta manera se decidió emplear la velocidad de flujo de 6 mLh<sup>-1</sup> ya que ésta implica un menor gasto de energía, consideración importante cuando al implementarse en un dispositivo real.



**Figura 46.-** Curvas de polarización en celda completa de ánodos de papel Toray modificados con Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx, evaluados en PBS 0.1 M pH 7.4, en presencia de Ferroceno metanol y glucosa 20 mM. La velocidad de flujo de anolito y catolito fue 1 mLh<sup>-1</sup> (naranja), 3 mLh<sup>-1</sup> (azul), 6 mLh<sup>-1</sup> (gris), 9 mLh<sup>-1</sup> (amarillo) y 12 mLh<sup>-1</sup> (negro).

Los valores de potencial a circuito abierto OCP corriente a la potencia máxima ( $I_{max}$ ) y Potencia de la celda ( $W$ ) normalizados al área del electrodo se muestran en la Tabla 8, en los que se aprecia el cambio en los diversos parámetros según las condiciones aplicadas, observándose que las condiciones de flujo y concentración de glucosa más apropiadas para la obtención de energía por este método, son 6 mLh<sup>-1</sup> y 20 mM respectivamente, ya que si bien a mayores flujos y concentraciones estos valores se mantienen o en algunos casos parecen mejorar, los cambios son casi nulos.

**Tabla 8.-** Comparación de los valores de OCP,  $I_{max}$  y  $W$  obtenidos al evaluar diferentes flujos (arriba) y concentraciones de glucosa (abajo) en una celda de combustible microfluídica usando un ánodo de papel Toray modificado con el sistema Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx y un cátodo de PyrAnMWCNT/Lc.

Flujo/mL h <sup>-1</sup>	OCP	W/mW cm <sup>-2</sup>	$I_{max}$ /mA cm <sup>-1</sup>
1	357	1.27	3.57
3	417	1.68	4.04
6	571	1.96	3.44
9	570	1.89	3.31
12	567	1.9	3.35

Concentración/mM	OCP	W/mW cm <sup>-2</sup>	I <sub>max</sub> /mA cm <sup>-1</sup>
0	348	1.34	3.86
10	501	1.15	2.29
20	571	1.97	3.45
50	570	1.91	3.35

Tomando en cuenta estos resultados, se hizo comparación con diferentes trabajos reportados en la literatura, que utilizan GOx para la oxidación de glucosa en celdas de combustible. Como se aprecia en la Tabla 8, los valores de mayor rendimiento obtenidos en este trabajo se encuentran bien posicionados, con una  $W_{max}$  de 1.96 mW cm<sup>-1</sup>, un valor aceptable para electrodos enzimáticos. Es cierto que existen celdas de combustible para glucosa u otros carbohidratos que permiten obtener mayores valores de corriente y potencial, sin embargo como se mencionó en la sección de Antecedentes, la mayoría son incapaces de llevar a cabo la oxidación a pH cercanos al fisiológico, una ventaja que si poseen las bioceldas de combustible enzimáticas; esta característica permite dirigir su aplicación hacia la obtención de energía en entornos fisiológicos o incluso sistemas biológicos.

**Tabla 9.-** Comparación del desempeño de diferentes celdas de combustible enzimáticas reportadas en la literatura (S. C. = Un solo compartimento; N. E. = No especificado).

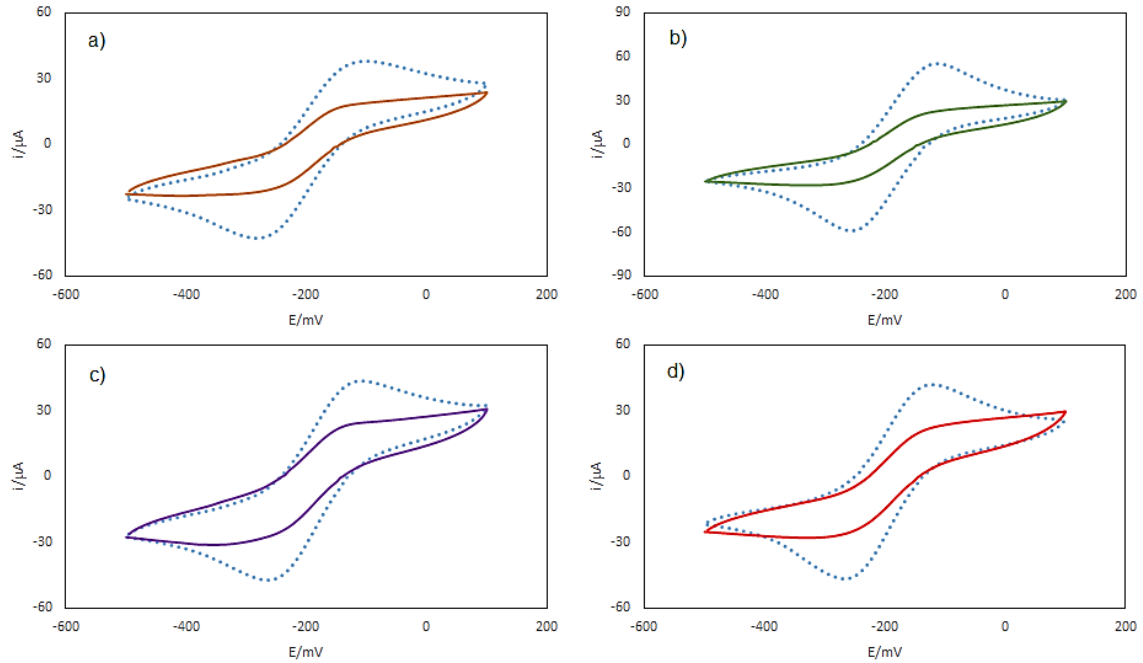
Ánodo	Cátodo	OCP/Vcm <sup>-1</sup> <sub>1</sub>	I <sub>max</sub> /mAcm <sup>-1</sup> <sub>1</sub>	W <sub>max</sub> /mWcm <sup>-1</sup>	Tipo de celda	Ref.
Vinil-Au	Vinil-Au	0.333	0.045	0.013	Microflujo	(78)
Carbon Vulcan-Maghemita-GOx	Carbon Vulcan-Pt NPs	0.3	N. E.	0.03	Microflujo	(79)
Au	Au	0.3	0.69	0.11	Microflujo	(80)
ITO-MWCNTs-CrosslinkedGOx	PET ITO-MWCNTs-Lc	0.56	0.45	0.153	Microflujo	(81)
MWCNTs-GOx-GA	Carbon Vulcan-Pt NPs	0.72	2.45	0.61	Microflujo	(82)
MWCNTs-GOx	MWCNTs-Lc	0.95	N. E.	1.25	S. C.	(83)
MWCNTs-Naftoquinona-GOx	MWCNTs-Lc-Nafion	0.76	4.47	1.54	S. C.	(84)
Porfirina-GSHCdTeQD-GOx	AnPyrMWCNT-Lc	0.571	3.44	1.96	Microflujo	<b>Este trabajo</b>



## **6.4 Cuarta etapa: Inmovilización de otras enzimas sobre Porfirina/GSH-CdTeQD**

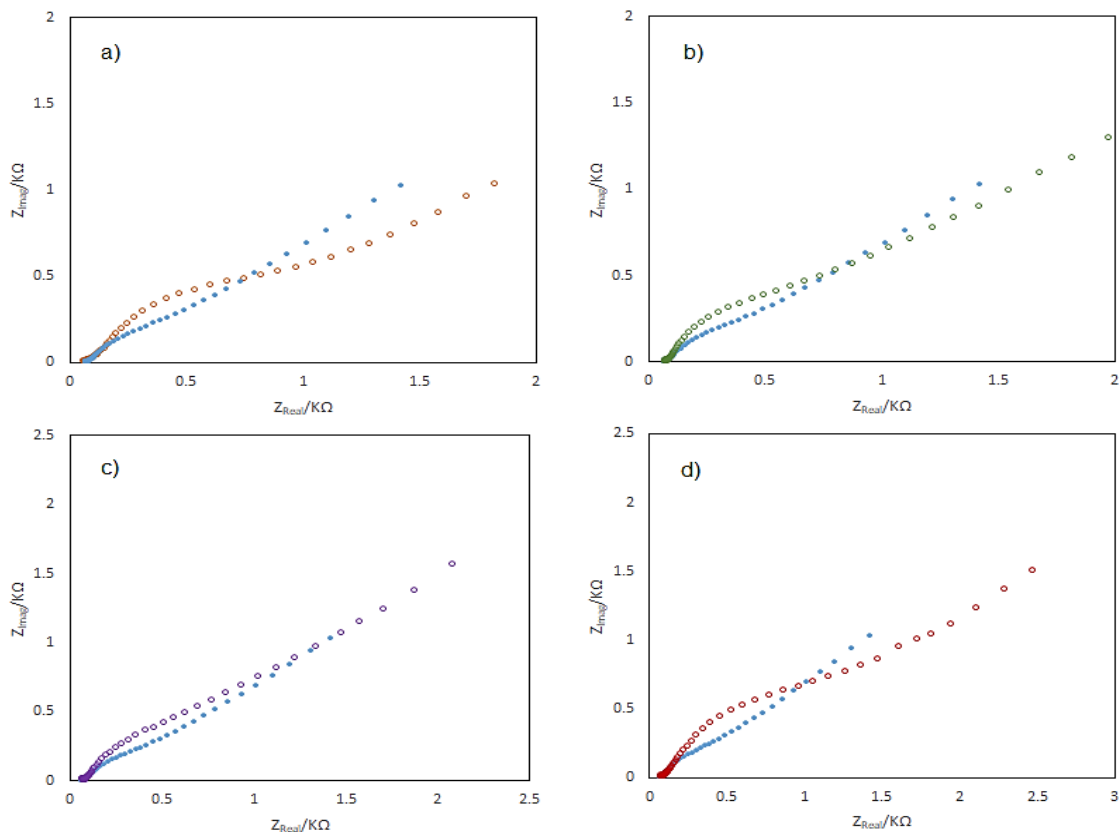
### ***6.4.1 Demostración de la adsorción enzimática en la superficie de los electrodos***

Teniendo en cuenta que el arreglo de Porfirina/GSH-CdTeQD es apropiado para inmovilizar a GOx, se exploró si el sistema era adecuado para inmovilizar otras enzimas conservando su actividad. Usando la metodología descrita previamente, se modificó la superficie de tres electrodos de grafito con Porfirina/GSH-CdTeQD, depositando Individualmente a las enzimas Lacasa (Lc), Glucosa deshidrogenasa (GDH) y  $\beta$ -Galactosidasa (Gal). Debido a que estas enzimas no poseen un par redox que permita su detección directa por VC, se utilizó el par ferro-ferri como indicador de la inmovilización enzimática. De acuerdo con la literatura, la disminución en la corriente de los picos redox del par ferro-ferri se puede atribuir a la adsorción de material proteico o nucleico en la superficie del electrodo evaluado <sup>(85-87)</sup>. Como control, un electrodo de grafito modificado con el sistema Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx fue evaluado y comparado con los electrodos modificados con las otras tres enzimas. En los gráficos de la Figura 47 se muestra que el depósito de cualquiera de las cuatro enzimas (GOx, Lc, GDH, y Gal) provocó una disminución considerable de la señal redox del par ferro-ferri, que pudiera interpretarse como evidencia de la adsorción.



**Figura 47.-** VC en PBS 0.1 M pH 7.4 en presencia de Ferro-Ferri para electrodos de grafito con Porfirina/GSH-CdTeQD (línea punteada) modificados con las enzimas (línea sólida): a) GOx, b) Lc, c) GDH y d) Gal.

Además, la inmovilización de estas enzimas a la superficie del electrodo se evaluó por EIS, asociando el incremento en la  $R_{tc}$  con la presencia de los complejos proteicos inmovilizados en la superficie. El diagrama de Nyquist obtenido para cada electrodo se muestra en la Figura 48, en la que se observa a simple vista como la  $R_{tc}$  se incrementa con respecto al blanco en todos los electrodos en cuya superficie se depositaron enzimas.

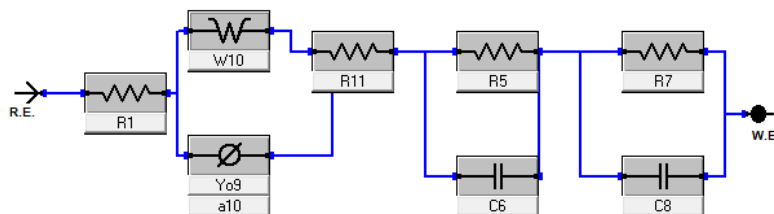


**Figura 48.-** Evaluación por EIS a electrodos de grafito modificados con Porfirina/GSH-CdTeQD (azul) y las enzimas a) GOx, b) Lc, c) GDH y d) Gal.

A su vez, tal como se hizo en la sección 6.2.1, el valor de la impedancia fue determinado mediante el empleo de un circuito equivalente. Sin embargo, al tratarse de un sistema distinto y con una mayor complejidad estructural debido a la presencia de las enzimas en la superficie, los espectros no pudieron ajustarse al circuito empleado en el análisis del sistema Porfirina/GSH-CdTeQD.

En algunos procesos electroquímicos, se puede involucrar más de una etapa durante la transferencia de carga dependiendo de las características de la superficie evaluada. Esto se traduce en una mayor cantidad de componentes necesarios en el circuito equivalente, a fin de asegurar que el espectro ajuste lo mejor posible al obtenido por simulación <sup>(88)</sup>. Tomando esto en cuenta, se optó por modificar el circuito equivalente previamente utilizado, y con base en la literatura se añadieron dos “bucles” en serie, conformados cada uno por una resistencia y un

capacitor en paralelo <sup>(48, 89)</sup>, el diagrama del circuito empleado se expone en la Figura 49.



**Figura 49.-** Circuito equivalente empleado para el análisis por EIS de los electrodos modificados con Porfirina/GSH-CdTeQD/Enzima.

A este circuito, los espectros ajustaron correctamente, y los valores de impedancia obtenidos luego del análisis se muestran en la Tabla 10. Como se observa, la  $R_{tc}$  incrementa de manera notable para todos los casos, si bien el valor exacto es diferente dependiendo del tipo de enzima depositada. Podría existir una correlación entre el tamaño y peso de cada enzima con el aumento en la  $R_{tc}$ , los cuales se exponen también en la Tabla 10 junto a la referencia correspondiente para tales valores.

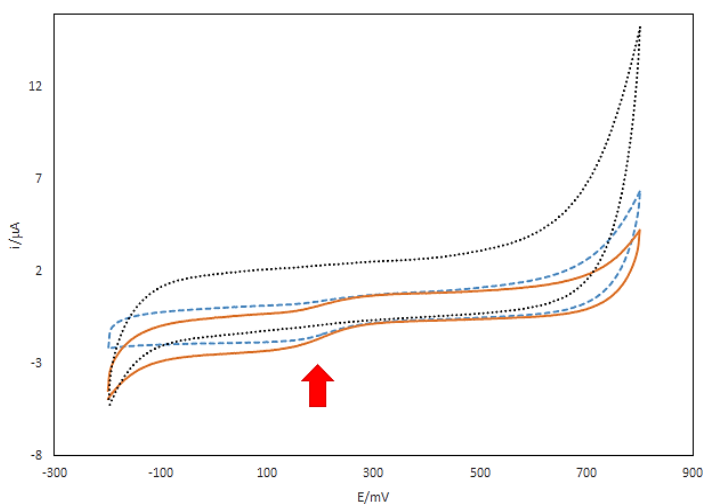
**Tabla 10.-** Valores de impedancia de los electrodos enzimáticos comparados con el tamaño y peso de las enzimas con las que fueron modificados.

Superficie	$R_{et}/\Omega$	Dimensiones/nm	Peso/KDa	Ref.
Porfirina/GSH-CdTeQD	601.4	-	-	-
Porfirina/GSH-CdTeQD/Lc	1252.2	6.5 × 5.5 × 4.5	70	(91)
Porfirina/GSH-CdTeQD/GDH	1354.6	-	115	(92)
Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx	1544.7	6.0×5.2×7.7	160	(90)
Porfirina/GSH-CdTeQD/Gal	1694.3	18.0 x 14.0 x 8.7	465	(93)

#### 6.4.2 Evaluación de la actividad de las enzimas inmovilizadas

Al igual que para GOx, no basta con determinar la presencia de la enzima inmovilizada sobre el sistema, es necesario comprobar si ésta se encuentra activa, y el método varía dependiendo de la reacción que catalice, así como del sustrato y

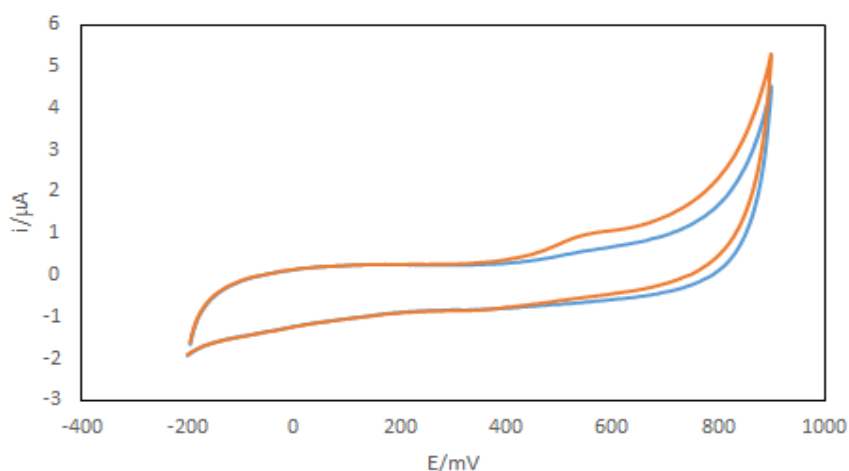
el producto de dicha reacción. En el caso de Lc, se ha reportado que cataliza la reducción de  $O_2$  generando un incremento en la corriente catódica a partir de 0.5 V vs SCE. Al comparar los voltamperogramas en la Figura 50, se observa un incremento en la corriente a partir de 0.3 V vs SCE en el electrodo modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD/Lc. Si bien dicha señal apareció a un potencial distinto al reportado en la mayoría de los trabajos, cabe mencionar que dicha corriente no se detectó al evaluar un electrodo modificado únicamente con Porfirina/GSH-CdTeQD, lo cual apoya la idea de que se trata de la reacción de reducción de  $O_2$  catalizada por la enzima Lc y sugiere la presencia de ésta en la superficie del electrodo. Desafortunadamente, la corriente obtenida de dicha reducción, es muy baja en comparación con otros trabajos que han reportado la inmovilización de esta enzima sobre materiales distintos. Estos resultados indican que el sistema Porfirina/GSH-CdTeQD no es adecuado para inmovilizar Lc.



**Figura 50.-** VC en PBS 0.1 M pH 5.6 de un electrodo de grafito modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD (negro) y uno modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD/Lc en atmosfera de  $N_2$  (azul) y aire (naranja). La flecha señala la corriente catódica asociada a la reducción de  $O_2$ .

GDH por su parte, tampoco posee un cofactor electroactivo, y su adsorción no puede ser evaluada directamente por VC de manera confiable. Esta enzima es NAD/NADH dependiente, es decir requiere de un cofactor para llevar a cabo la oxidación de glucosa; dicho cofactor no está anclado a la estructura proteica de la enzima como en el caso de GOx, sino que debe estar soluble en el medio para

intervenir en la catálisis <sup>(94)</sup>. Con esta premisa, la presencia de GDH activa inmovilizada sobre Porfirina/GSH-CdTeQD, se evaluó por su capacidad de reducir al cofactor NAD a NADH, especie que puede ser detectada electroquímicamente y asociarse a la oxidación de Glucosa. Como se observa en la Figura 51, se detectó un incremento en la corriente anódica a 550 mV al adicionar 20 mM de glucosa a la celda. Este comportamiento ya se ha reportado en la literatura asociado a la oxidación del cofactor NADH en presencia de GDH y glucosa, lo que pudiera evidenciar la adsorción de GDH al electrodo modificado. Sin embargo, también se ha descrito ampliamente que dicho cofactor demanda condiciones muy particulares para reducirse nuevamente ya que requiere de potenciales muy altos o materiales distintos a los utilizados en este trabajo, además tiende a adsorberse fácilmente sobre las superficies y por lo que su detección es difícil y poco reproducible en un mismo electrodo <sup>(94)</sup>. Debido a esto, parece poco viable usar GDH como sustituto de GOx, o en asociación. El estudio de su adsorción y la comprobación de su actividad, depositada sobre Porfirina/GSH-CdTeQD, abre la posibilidad de probar la inmovilización de otras enzimas en este sistema.

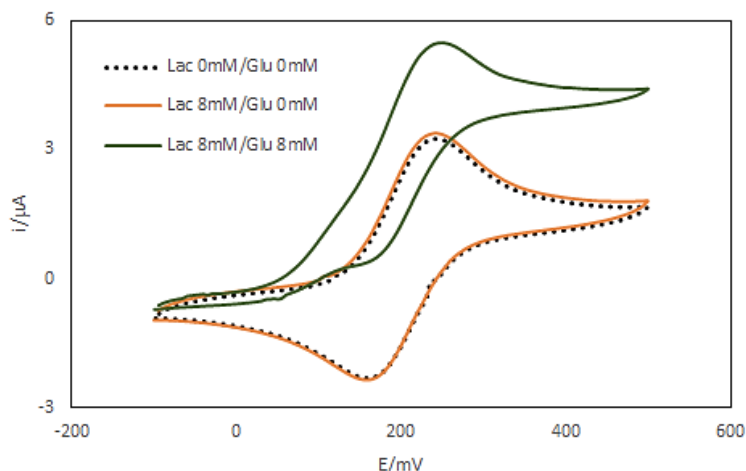


**Figura 51.-** VC en PBS 0.1 M pH 7.4 de un electrodo modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD/GDH en ausencia (azul) y presencia (naranja) de 20 mM de glucosa.

Finalmente se evaluó la actividad de Gal inmovilizada sobre el sistema Porfirina/GSH-CdTeQD. La determinación electroquímica de dicha actividad ha sido estudiada por diferentes autores, y en la mayoría de los casos se evalúa de

manera indirecta gracias a que la glucosa es uno de los productos de la catálisis que esta enzima lleva a cabo <sup>(95)</sup>. Debido a esto, reportan la necesidad de un método secundario de cuantificación, ya que esta enzima por sí misma no genera una señal electroquímica detectable, y la reacción que cataliza tampoco puede medirse con ayuda de un mediador. Una de las rutas más utilizadas para evaluar la actividad de Gal, consiste en el empleo de GOx como método secundario de cuantificación. La lactosa -sustrato de Gal- está formada por una molécula de galactosa y una de glucosa, unidas por un enlace glucosídico. Gal rompe justamente el enlace entre ambos monosacáridos y por cada molécula de lactosa en la solución, se obtiene una molécula de glucosa que puede ser catalizada por GOx <sup>(96, 97)</sup>.

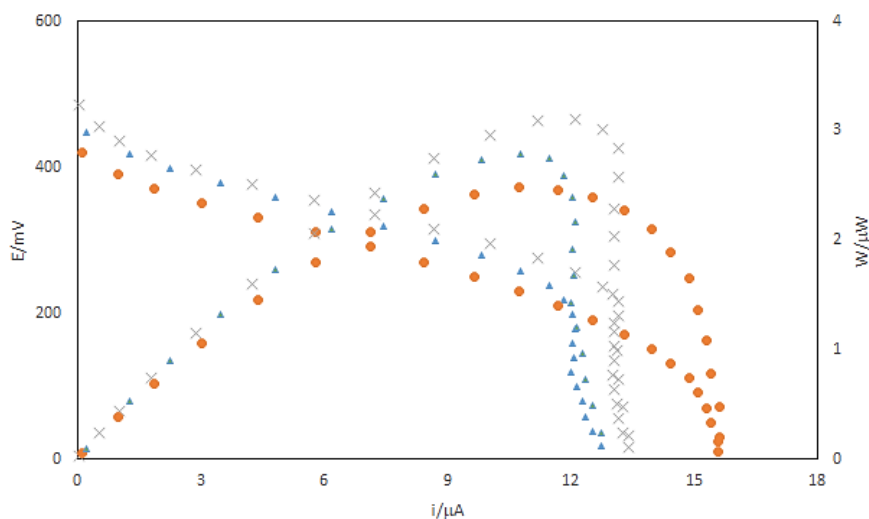
En este caso, se probaron dos métodos para monitorear la actividad de Gal. En primer lugar se modificó un electrodo de grafito depositando en la superficie el sistema Porfirina/GSH-CdTeQD con 3  $\mu$ L de una mezcla de las enzimas GOx y Gal para obtener un electrodo multienzimático <sup>(96)</sup>, que pudiese catalizar la degradación de lactosa, y al tiempo brindar una respuesta amperométrica con la glucosa obtenida de dicha catálisis, al evaluarse en una celda convencional de tres electrodos en presencia de Ferroceno como se realizó en el caso de GOx. Sin embargo los resultados voltamperométricos muestran un incremento despreciable en la corriente de oxidación del Ferroceno al evaluar el electrodo en presencia de 8mM de lactosa (Figura 52 línea naranja), mientras que cuando al mismo sistema se adicionó glucosa hasta alcanzar una concentración de 8 mM, el aumento en la corriente fue muy evidente y bastante rápido (Figura 52 línea verde) lo cual sugiere diversas explicaciones; incluso aunque Gal se encuentre inmovilizada no se encuentra activa o bien, quizá la catálisis de la lactosa ocurre de manera tan lenta que no se produce glucosa suficiente para llevar a cabo una medición. Por otro lado se sabe que el monosacárido obtenido de la degradación de lactosa es  $\alpha$ -D-glucosa <sup>(96)</sup>, mientras que GOx es activa específicamente para  $\beta$ -D-glucosa, y aunque se ha reportado el cambio de la estructura  $\alpha$ - a la  $\beta$ - de manera natural cuando el reactivo se encuentra en solución <sup>(98)</sup>, este cambio podría no ocurrir a la velocidad suficiente para ser detectable por este medio.



**Figura 52.-** VC en PBS 0.1 M pH 7.4 FcMeOH 0.5 mM para un electrodo de grafito modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD/GOxGal antes (línea punteada negra) y después de la adición de lactosa 8 mM (línea naranja) y glucosa 8 mM (línea verde).

Pese a estos resultados, la inmovilización de Gal sobre Porfirina/GSH-CdTeQD también se realizó en un electrodo de papel Toray para evaluar su comportamiento al ser empleada en una celda de combustible microfluídica, inmovilizando GOx en la misma superficie como enzima de apoyo para efectuar la oxidación de glucosa. El electrodo fue evaluado en ausencia (Figura 53 azul) y en presencia (Figura 53 naranja) de lactosa 20 mM. A su vez, se utilizó como control un electrodo modificado únicamente con GOx (Figura 53 gris) para comparación. Se aprecia un ligero incremento en la corriente final con respecto al blanco cuando el electrodo con ambas enzimas se analizó en presencia de lactosa, por su parte, al evaluar el electrodo sin Gal en las mismas condiciones, la curva de descarga exhibe una forma similar a la obtenida en el blanco, a pesar de que había lactosa en la solución, lo que podría sugerir un cierto grado de actividad en el electrodo modificado con GOx y Gal, sin embargo el cambio en la corriente final es muy pequeño, y a su vez, la corriente y el OCP asociados a la posible intervención de Gal, en lugar de incrementar disminuyen, por lo que los resultados apuntan a que el sistema Porfirina/GSH-CdTeQD no es apropiado para inmovilizar Gal.





**Figura 53.-** Curvas de polarización obtenidas al evaluar un electrodo de papel Toray modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD/Gal-GOx ( $\Delta$  y  $\bullet$ ) y uno modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD/GOx (X) usando PBS 0.1 M pH 7.4 FcMeOH 0.5 mM sin lactosa (azul) y con 20 mM de lactosa (naranja y gris).

Como lo muestran los resultados obtenidos para cada enzima diferente de GOx, el sistema Porfirina/GSH-CdTeQD no parece muy apropiado para conservar la actividad catalítica de estas macromoléculas aunque los resultados obtenidos para GOx son bastante favorables. Tomando en cuenta los resultados de EIS, se puede argumentar que las cuatro enzimas se anclaron a la superficie en una medida similar, por lo que esta baja actividad catalítica podría atribuirse a la manera en que se orienta cada enzima al depositarse en un soporte sólido.

Como se demostró, el depósito de Porfirina/GSH-CdTeQD forma un sistema autoensamblado en el cual los GSH-CdTeQD quedan expuestos en la superficie, con una carga mayormente negativa. De acuerdo con la literatura, GOx posee una gran cantidad de residuos de lisina orientados hacia la base de la estructura proteica en una región relativamente lejana al centro activo de la enzima <sup>(99)</sup>. Si se asume la interacción entre los grupos carboxilo de los GSH-CdTeQD y los grupos amino de los residuos de lisina en GOx, podría argumentarse que el soporte Porfirina/GSH-CdTeQD favorece no solo la adsorción de GOx, sino su orientación, de manera que el acceso al centro activo quede despejado, y su actividad catalítica no se vea comprometida por la inmovilización. Sin embargo, esta condición aplica

únicamente para GOx, ya que cada enzima posee una estructura particular y no en todos los casos los residuos de lisina se encuentran en un sitio favorable para permitir el anclaje sin comprometer el sitio activo.

No obstante, los resultados obtenidos sientan una base para el estudio de la adsorción de biomoléculas sobre el sistema Porfirina/GSH-CdTeQD, teniendo en cuenta la composición superficial de éstas, y con la premisa de que el soporte formado por los QD favorece la inmovilización homogénea de dichos materiales sin la necesidad de usar un agente entrecruzador.

## 7. CONCLUSIONES

Los Quantum dots (ya sea de carbono o de CdTe) recubiertos con glutatión se adsorben fácilmente a la Porfirina depositada sobre materiales carbonosos como el grafito, en un arreglo autoensamblado plano y homogéneo. El análisis fisicoquímico mostró que la interacción entre los GSH-CdTeQD y la Porfirina está relacionada con la carga de ambos materiales, siendo los grupos amino los principales contribuyentes a la unión entre Porfirina/GSH-CdTeQD. Además, la presencia de Porfirina sobre grafito disminuye la resistencia a la transferencia de carga cuando se evalúa una molécula sonda como el Ferro-Ferri, posiblemente debido a las cargas positivas presentes en su estructura gracias a las cuales se favorece el acercamiento de los iones negativos al electrodo por lo que se considera un buen material de soporte.

Por otro lado, tanto los GSH-CQD como los GSH-CdTeQD son útiles para incrementar la cantidad de GOx depositada sobre electrodos de grafito modificado con Porfirina siendo los GSH-CQD los que de acuerdo con el análisis de Brown-Anson, permiten inmovilizar mayor cantidad de enzima. Sin embargo, independientemente de la señal de FAD/FADH<sub>2</sub> observada, los GSH-CdTeQD favorecen que se conserve la actividad catalítica de GOx en comparación con los GSH-CQD, puesto que aparentemente los electrodos modificados con este tipo de partícula son más sensibles a la presencia de glucosa y de hecho podrían ser útiles en la construcción de un biosensor de glucosa. Así mismo los electrodos modificados con GSH-CdTeQD muestran valores más grandes de corriente y potencia que aquellos modificados con GSH-CQD lo que los hace más aptos para su implementación en una biocelda de combustible.

La Microscopía Electroquímica de Barrido corroboró la adsorción y actividad de GOx en los electrodos modificados, observándose depósitos homogéneos en la superficie.

Por otro lado, se demostró la adsorción de las enzimas Lc, GDH y Gal. El estudio por EIS demostró que el material proteico se adsorbe a la superficie, sin embargo la actividad de dichas enzimas evaluada mediante técnicas electroquímicas, no fue

comparable con lo reportado en otros trabajos, por lo que su uso en una celda de combustible no sería adecuado.

Los objetivos planteados para este trabajo se cumplieron de manera íntegra. No obstante, con base en los resultados obtenidos, la hipótesis que establece que el sistema Porfirina/GSH-QD es apto para inmovilizar y mantener la actividad catalítica GOx, GDH, Gal y Lc, se acepta solo parcialmente, ya que solo pudo corroborarse un buen funcionamiento de GOx inmovilizada, a diferencia de las otras tres enzimas cuyos desempeños en su mayoría son bajos, inciertos o poco concluyentes.

## 8. REFERENCIAS

1. Christwardana M, Kim D-H, Chung Y, Kwon Y. A hybrid biocatalyst consisting of silver nanoparticle and naphthalenethiol self-assembled monolayer prepared for anchoring glucose oxidase and its use for an enzymatic biofuel cell. *Applied Surface Science*. 2017;429:180-6.
2. O'Hayre R, Cha S-W, Colella W, Prinz FB. *Fuel Cell Fundamentals*. 3 ed. Hoboken, New ersey: John Wiley & Sons; 2016 22 April. 565 p.
3. Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2010;298(2):E141-5.
4. Lewis BAAJ. *How Cells Obtain Energy from Food*. *Molecular biology of the cell*. 4th edition ed. New York: Garland Science; 2002.
5. Cosnier S, LeGoff A, MichaelHolzinger. Towards glucose biofuel cells implanted in human body for powering artificial organs: Review. *Electrochemistry Communications*. 2014;38:19-23.
6. Izadi P, Rahimnejad M, Ghoreyshi A. Power production and wastewater treatment simultaneously by dual-chamber microbial fuel cell technique. *Biotechnology and applied biochemistry*. 2015;62(4):483-8.
7. Gong M, Wang D-Y, Chen C-C, Hwang B-J, Dai H. A mini review on nickel-based electrocatalysts for alkaline hydrogen evolution reaction. *Nano Research*. 2015;1:1-19.
8. Sharifi E, Salimi A, Shams E. Electrocatalytic activity of nickel oxide nanoparticles as mediatorless system for NADH and ethanol sensing at physiological pH solution. *Biosensors & bioelectronics*. 2013;45:260-6.
9. Toghiani KE, Compton RG. Electrochemical non-enzymatic glucose sensors: A perspective and an evaluation. *International Journal of Electrochemical Science*. 2010;5:1246-301.
10. Rasmussen M, Abdellaoui S, Minteer SD. Enzymatic biofuel cells: 30 years of critical advancements. *Biosensors & bioelectronics*. 2016;76:91-102.
11. Vaissier Welborn V, Head-Gordon T. Computational design of synthetic enzymes. *Chemical reviews*. 2018.
12. Anbu P, Gopinath SCB, Chaulagain BP, LakshmiPriya T. *Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine* 2016. *BioMed research international*. 2017;2017:2195808.
13. Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*. 2016;6(2):174.
14. Meredith MT, Minteer SD. Biofuel cells: enhanced enzymatic bioelectrocatalysis. *Annual review of analytical chemistry*. 2012;5:157-79.
15. Mazurenko I, Wang X, Poulpiquet Ad, Lojou E. H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> enzymatic fuel cells: from proof-of-concept to powerful devices. *Sustainable Energy & Fuels*. 2017;1:1475-501.
16. Cracknell JA, Vincent KA, Armstrong FA. Enzymes as working or inspirational electrocatalysts for fuel cells and electrolysis. *Chemical reviews*. 2008;108(7):2439-61.
17. Galindo-de-la-Rosa J, Arjona N, Moreno-Zuria A, Ortiz-Ortega E, Guerra-Balcazar M, Ledesma-Garcia J, et al. Evaluation of single and stack membraneless enzymatic fuel cells based on ethanol in simulated body fluids. *Biosensors & bioelectronics*. 2017;92:117-24.
18. Palma F, Carvajal F, Lluch C, JAMILENA M, Garrido D. Changes in carbohydrate content in zucchini fruit (*Cucurbita pepo L.*) under low temperature stress. *Plant science : an international journal of experimental plant biology*. 2014;217-218:78-86.

19. Zhao M, Gao Y, Sun J, Gao F. Mediatorless glucose biosensor and direct electron transfer type glucose/air biofuel cell enabled with carbon nanodots. *Analytical chemistry*. 2015;87(5):2615-22.
20. Ghoshdastider U, Wu R, Trzaskowskib B, Mlynarczykb K, Misztap P, Gurusarand M. Molecular effects of encapsulation of glucose oxidase dimer by graphene. *Royal Society of Chemistry*. 2015;5:13570-8.
21. Zhou Z, Hartmann M. Progress in enzyme immobilization in ordered mesoporous materials and related applications. *Chemical Society reviews*. 2013;42(9):3894-912.
22. Jesionowski T, Zdarta J, Krajewska B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Adsorption*. 2014;20(5-6):801-21.
23. Putzbach W, Ronkainen NJ. Immobilization Techniques in the Fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: A review. *Sensors*. 2013;13(4):4811-40.
24. Gregg BA, Heller A. Cross-linked redox gels containing glucose oxidase for amperometric biosensor applications. *Analytical chemistry*. 1990;62(3):258-63.
25. Cao L, Ye J, Tong L, Tang B. A new route to the considerable enhancement of glucose oxidase (GOx) activity: the simple assembly of a complex from CdTe quantum dots and GOx, and its glucose sensing. *Chemistry*. 2008;14(31):9633-40.
26. Fontes A, Santos BS, editors. *Quantum Dots: Applications in Biology*. New York: © Springer Science+Business Media; 2014.
27. Klostranec J, Chan W. Quantum dots in biological and biomedical research: recent progress and present challenges. *Adv Mater*. 2006;18:1953-64.
28. Liu JJ, Zhang XL, Cong ZX, Chen ZT, Yang HH, Chen GN. Glutathione-functionalized graphene quantum dots as selective fluorescent probes for phosphate-containing metabolites. *Nanoscale*. 2013;5(5):1810-5.
29. Wu W, Aiello M, Zhou T, Berliner A, Banerjee P, Zhou S. In-situ immobilization of quantum dots in polysaccharide-based nanogels for integration of optical pH-sensing, tumor cell imaging, and drug delivery. *Biomaterials*. 2010;31(11):3023-31.
30. Gravagnuolo AM, Morales-Narváez E, Matos CRS, Longobardi S, Giardina P, Merkoçi A. On-the-spot immobilization of Quantum dots, graphene oxide, and proteins via hydrophobins. *Advanced Functional Materials*. 2015;25(38):6084-92.
31. García C, Fuenzalida F, Ruiz D, Aguirre MaJs. Electrochemical, spectroscopic and morphological characterization of electrostatic self-assembled hybrids of tetracationic phosphonium porphyrins and CdTe quantum dots. *J Appl Electrochem*. 2014;44(1):1345–53.
32. Caemelbecke EV, Derbin A, Hambright P, Garcia R, Doukkali A, Saoiabi A, et al. Electrochemistry of  $[(\text{TMpyP})\text{MII}]_4^+(X^-)_4$  ( $X^-$ )  $\text{Cl}^-$  or  $\text{BPh}_4^-$ ) and  $[(\text{TMpyP})\text{MIICl}]_4^+(\text{Cl}^-)_4$  in N,N-Dimethylformamide where M is one of 15 different metal ions. *Inorganic chemistry*. 2005;44(11):3789-98.
33. Snyder JW, Lambert JD, Ogilby PR. 5,10,15,20-tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)-21H,23H-porphine (TMPyP) as a sensitizer for singlet oxygen imaging in cells: characterizing the irradiation-dependent behavior of TMPyP in a single cell. *Photochemistry and photobiology*. 2006;82(1):177-84.
34. Wu D, Huang Y, Hu S, Yi X, Wang J. Sensitive Hg(2+) Sensing via Quenching the Fluorescence of the Complex between Polythymine and 5,10,15,20-tetrakis(N-methyl-4-pyridyl) Porphyrin (TMPyP). *Sensors*. 2018;18(11).
35. Garcia-Sampedro A, Tabero A, Mahamed I, Acedo P. Multimodal use of the porphyrin TMPyP: From cancer therapy to antimicrobial applications. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. 2019;23:1-17.

36. Zhang L, Peng D, Liang RP, Qiu JD. Graphene quantum dots assembled with metalloporphyrins for "turn on" sensing of hydrogen peroxide and glucose. *Chemistry*. 2015;21(26):9343-8.
37. Ahmed GH, Aly SM, Usman A, Eita MS, Melnikov VA, Mohammed OF. Quantum confinement-tunable intersystem crossing and the triplet state lifetime of cationic porphyrin-CdTe quantum dot nano-assemblies. *Chemical communications*. 2015;51(38):8010-3.
38. Vaishnavi E, Renganathan R. "Turn-on-off-on" fluorescence switching of quantum dots-cationic porphyrin nanohybrid: a sensor for DNA. *The Analyst*. 2014;139(1):225-34.
39. Lalaoui N, Means N, Walgama C, Goff AL, Holzinger M, Krishnan S, et al. Enzymatic versus electrocatalytic oxidation of NADH at carbon-nanotube electrodes modified with Glucose dehydrogenases: application in a bucky-paper-based glucose enzymatic fuel cell. *ChemElectrochem*. 2016;3(12):2058-62.
40. Handa Y, Yamagiwa K, Ikeda Y, Yanagisawa Y, Watanabe S, Yabuuchi N, et al. Fabrication of carbon-felt-based multi-enzyme immobilized anodes to oxidize sucrose for biofuel cells. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*. 2014;15(10):2145-51.
41. Hickey DP, Giroud F, Schmidtke DW, Glatzhofer DT, Minteer SD. Enzyme cascade for catalyzing sucrose oxidation in a biofuel cell. *ACS Catal*. 2013;3:2729-37.
42. Chobanab ER, Markoskib LJ, Wieckowskic A, Kenis PJA. Microfluidic fuel cell based on laminar flow. *Journal of Power Sources*. 2004;128(1):54-60.
43. Kjeang E, Djilali N, Sinton D. Microfluidic fuel cells: A review. *Journal of Power Sources*. 2009;186(2):353-69.
44. Escalona-Villalpando RA, Reid RC, Milton RD, Arriaga LG, Minteer SD, Ledesma-García J. Improving the performance of lactate/oxygen biofuel cells using a microfluidic design. *Journal of Power Sources*. 2017;342:546-52.
45. Liu YF, Yu JS. In situ synthesis of highly luminescent glutathione-capped CdTe/ZnS quantum dots with biocompatibility. *Journal of colloid and interface science*. 2010;351(1):1-9.
46. Van Caemelbecke E, Derbin A, Hambright P, Garcia R, Doukkali A, Saoiabi A, et al. Electrochemistry of [(TMpyP)M(II)]<sup>4+</sup> (X)<sub>4</sub> (X = Cl<sup>-</sup> or BPh<sub>4</sub><sup>-</sup>) and [(TMpyP)M(III)Cl]<sup>4+</sup> (Cl)<sub>4</sub> in N,N-dimethylformamide where M is one of 15 different metal ions. *Inorganic chemistry*. 2005;44(11):3789-98.
47. Areias MC, Shimizu K, Compton RG. Voltammetric detection of glutathione: an adsorptive stripping voltammetry approach. *The Analyst*. 2016;141(10):2904-10.
48. Ramanavicius A, Genys P, Ramanaviciene A. Electrochemical Impedance Spectroscopy Based Evaluation of 1,10-Phenanthroline-5,6-dione and Glucose Oxidase Modified Graphite Electrode. *Electrochimica Acta*. 2014;146(10):659-65.
49. Ribeiro DV, Souza CAC, Abrantes JCC. Use of Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) to monitoring the corrosion of reinforced concrete. *Revista IBRACON de Estruturas e Materiais*. 2015;8(4):529-46.
50. Magdić K, Horvat-Radošević V, Kvastek K. Impedance aspect of charge storage at graphite and glassy carbon electrodes in potassium hexacyanoferrate (II) redox active electrolyte. *J Electrochem Sci Eng*. 2016;6(1):37-45.
51. Segets D. Analysis of Particle Size Distributions of Quantum Dots: From Theory to Application. *KONA Powder and Particle Journal*. 2016;33:48-62.
52. Lemon CM, Karnas E, Han X, Bruns OT, Kempa TJ, Fukumura D, et al. Micelle-encapsulated Quantum dot-porphyrin assemblies as in vivo two-photon oxygen sensors. *Journal of the American Chemical Society*. 2015;137(31):9832-42.

53. He D, Yang X, He X, Wang K, Yang X, He X, et al. A sensitive turn-on fluorescent probe for intracellular imaging of glutathione using single-layer MnO<sub>2</sub> nanosheet-quenched fluorescent carbon quantum dots. *Chemical communications*. 2015;51(79):14764-7.
54. Shi Y, Zhang H, Yue Z, Zhang Z, Teng KS, Li MJ, et al. Coupling gold nanoparticles to silica nanoparticles through disulfide bonds for glutathione detection. *Nanotechnology*. 2013;24(37):375501.
55. Li D, Li G, Guo W, Li P, Wang E, Wang J. Glutathione-mediated release of functional plasmid DNA from positively charged quantum dots. *Biomaterials*. 2008;29(18):2776-82.
56. Zheng Y, Z. Yang, Li Y, Ying JY. From glutathione capping to a crosslinked, phytochelatin-like coating of Quantum dots. *Advanced materials*. 2008;20(18):3410-5.
57. Gu YP, Cui R, Zhang ZL, Xie ZX, Pang DW. Ultrasmall near-infrared Ag<sub>2</sub>Se quantum dots with tunable fluorescence for in vivo imaging. *Journal of the American Chemical Society*. 2012;134(1):79-82.
58. Deng Z, Lie FL, Shen S, Ghosh I, Mansuripur M, Muscat AJ. Water-based route to ligand-selective synthesis of ZnSe and Cd-doped ZnSe quantum dots with tunable ultraviolet A to blue photoluminescence. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 2009;25(1):434-42.
59. Li Y, Cui R, Zhang P, Chen BB, Tian ZQ, Li L, et al. Mechanism-oriented controllability of intracellular quantum dots formation: the role of glutathione metabolic pathway. *ACS nano*. 2013;7(3):2240-8.
60. Cui R, Gu Y-P, Zhang Z-L, Xie Z-X, Tiana Z-Q, Pang D-W. Controllable synthesis of PbSe nanocubes in aqueous phase using a quasi-biosystem. *J Mater Chem*. 2012;22:3713-6.
61. Ferrari AC, Basko DM. Raman spectroscopy as a versatile tool for studying the properties of graphene. *Nature nanotechnology*. 2013;8(4):235-46.
62. Rebelo SL, Guedes A, Szefczyk ME, Pereira AM, Araujo JP, Freire C. Progress in the Raman spectra analysis of covalently functionalized multiwalled carbon nanotubes: unraveling disorder in graphitic materials. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*. 2016;18(18):12784-96.
63. Bokobza L, Bruneel J-L, Couzi M. Raman Spectra of Carbon-Based Materials (from Graphite to Carbon Black) and of Some Silicone Composites. *C Journal of Carbon Research*. 2015;1(1):77-94.
64. Wang RX, Fan JJ, Fan YJ, Zhong JP, Wang L, Sun SG. Platinum nanoparticles on porphyrin functionalized graphene nanosheets as a superior catalyst for methanol electrooxidation. *Nanoscale*. 2014;6(24):14999-5007.
65. Barszcz B, Bogucki A, Laskowska B, Ion RM, Graja A. Spectral investigations of fullerene-porphyrin complexes. *Acta Physica Polonica A*. 2007;112:143-52.
66. Huang GG, Han XX, Hossain MK, Kitahama Y, Ozaki Y. A study of glutathione molecules adsorbed on silver surfaces under different chemical environments by surface-enhanced Raman scattering in combination with the heat-induced sensing method. *Applied spectroscopy*. 2010;64(10):1100-8.
67. Singh G, Dogra SD, Kaur S, Tripathi SK, Prakash S, Rai B. Structure and vibrations of glutathione studied by vibrational spectroscopy and density functional theory. *Spectrochimica acta Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*. 2015;149:505-15.
68. Qian W, Krimm S. Vibrational analysis of glutathione. *Biopolymers*. 1994;34(10):1377-94.
69. Perez-Donoso JM, Monras JP, Bravo D, Aguirre A, Quest AF, Osorio-Roman IO, et al. Biomimetic, mild chemical synthesis of CdTe-GSH quantum dots with improved biocompatibility. *PloS one*. 2012;7(1):e30741.
70. Aly SM, Ahmed GH, Shaheen BS, Sun J, Mohammed OF. Molecular-structure control of ultrafast electron injection at cationic porphyrin-cdte quantum dot interfaces. *The journal of physical chemistry letters*. 2015;6(5):791-5.



71. El-Nahass MM, Zeyada HM, Aziz MS, Makhlouf MM. Optical absorption of tetraphenylporphyrin thin films in UV-vis-NIR region. *Spectrochimica acta Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*. 2005;62(1-3):11-5.
72. Jahan M, Bao Q, Loh KP. Electrocatalytically active graphene-porphyrin MOF composite for oxygen reduction reaction. *Journal of the American Chemical Society*. 2012;134(15):6707-13.
73. Khenfouch M, Bajjou O, Baïtoul M, Mongwaketsi N, Maaza M, Venturini JW. Optical properties and dynamics excitation relaxation in reduced graphene oxide functionalized with nanostructured porphyrins. *Optical Materials*. 2015;42:479-83.
74. El-Nahass MM, Zeyada HM, Aziz MS, Makhlouf MM. Optical absorption of tetraphenylporphyrin thin films in UV-vis-NIR region. *Spectrochimica acta Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*. 2005;61(13-14):3026-31.
75. Jhonsi MA, Renganathan R. Photoinduced Electron Transfer from Meso-Tetrakis (N-methylpyridyl)porphyrin (TMPyP) to Colloidal CdS. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*. 2008;222(11):1601-10.
76. Baghayeri M, Veisi H, Ghanei-Motlagh M. Amperometric glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase on a magnetic glassy carbon electrode modified with a novel magnetic nanocomposite. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2017;249:321-30.
77. Hecht HJ, Kalisz HM, Hendle J, Schmid RD, Schomburg D. Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 Å resolution. *Journal of molecular biology*. 1993;229(1):153-72.
78. Renaud L, Selloum D, Tingry S. Xurography for 2D and multi-level glucose/O<sub>2</sub> microfluidic biofuel cell. *Microfluidics and Nanofluidics*. 2015;18(5-6):1407-16.
79. R.Galindo, A.Dector, L.G.Arriaga, S.Gutiérrez, P.Herrasti. Maghemite as a catalyst for glucose oxidation in a microfluidic fuel cell. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2012;671:38-43.
80. A.Zebda, L.Renaud, M.Cretin, F.Pichot, C.Innocent, R.Ferrigno, et al. A microfluidic glucose biofuel cell to generate micropower from enzymes at ambient temperature. *Electrochemistry Communications*. 2009;11(3):592-5.
81. Khan H, Kim CM, Kim SY, Goel S, Dwivedi PK, Sharma A, et al. Fabrication of Enzymatic Biofuel Cell with Electrodes on Both Sides of Microfluidic Channel. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing-Green Technology*. 2019:1-10.
82. Escalona-Villalpando RA, Dector A, Dector D, Moreno-Zuria A, Durón-Torres SM, Galván-Valencia M. Glucose microfluidic fuel cell using air as oxidant. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2016;41(48).
83. Zebda A, Gondran C, Le Goff A, Holzinger M, Cinquin P, Cosnier S. Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes. *Nature communications*. 2011;2:370.
84. Reuillard B, Le Goff A, Agnes C, Holzinger M, Zebda A, Gondran C. High power enzymatic biofuel cell based on naphthoquinone-mediated oxidation of glucose by glucose oxidase in a carbon nanotube 3D matrix. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*. 2013;15(14):4892-6.
85. Rosati G, Scaramuzza M, Pasqualotto E, De Toni A, Reggiani C, Paccagnella A. Modeling of SAM Impedance Onto Gold and Silver Thin-Film Mass-Produced Electrodes and Their Use for Optimization of Lactic Acid Detection. *IEEE transactions on nanobioscience*. 2016;15(7):756-64.
86. Vogt S, Su Q, Gutierrez-Sanchez C, Noll G. Critical view on electrochemical impedance spectroscopy using the ferri/ferrocyanide redox couple at gold electrodes. *Analytical chemistry*. 2016;88(8):4383-90.
87. Fourou H, Zazoua A, Braiek M, Jaffrezic-Renault N. An enzyme biosensor based on beta-galactosidase inhibition for electrochemical detection of cadmium (II) and chromium (VI). *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 2016;96(19):872-85.

88. Cesiulis H, Tsyntsaru N, Ramanavicius A, Ragoisha G. The Study of Thin Films by Electrochemical Impedance Spectroscopy. In: Tiginyanu I, Topala P, Ursaki V, editors. Nanostructures and Thin Films for Multifunctional Applications NanoScience and Technology: Springer, Cham; 2016.
89. Daglia U, Gulera Z, Sarac AS. Covalent Immobilization of Tyrosinase on Electrospun Polyacrylonitrile/Polyurethane/Poly(m-anthranilic acid) Nanofibers: An Electrochemical Impedance Study. Polymer-Plastics Technology and Engineering. 2015;54(14):1494-504.
90. Libertino S, Aiello V, Scandurra A, Renis M, Sinatra F. Immobilization of the Enzyme Glucose Oxidase on Both Bulk and Porous SiO<sub>2</sub> Surfaces. Sensors. 2008;8(9):5637-48.
91. Piontek K, Antorini M, Choinowski T. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. The Journal of biological chemistry. 2002;277(40):37663-9.
92. Hilt W, Pflleiderer G, Fortnagel P. Glucose dehydrogenase from *Bacillus subtilis* expressed in *Escherichia coli*. I: Purification, characterization and comparison with glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium*. Biochimica et biophysica acta. 1991;1076(2):298-304.
93. Bartesaghi A, Matthies D, Banerjee S, Merk A, Subramaniam S. Structure of beta-galactosidase at 3.2-Å resolution obtained by cryo-electron microscopy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2014;111(32):11709-14.
94. Ertek B, Dilgin Y. Photoamperometric flow injection analysis of glucose based on dehydrogenase modified quantum dots-carbon nanotube nanocomposite electrode. Bioelectrochemistry. 2016;112:138-44.
95. Jiana T-R, Periasamy AP, Hsu N-Y, Wu W-P, Harroun SG, Chang H-T. Quantitation of -galactosidase and *E. coli* through electrochemical oxidation of glucose on CuO/Cu<sub>2</sub>O/Ppy paper electrode. Sensors and Actuators B: Chemical. 2017;253:1063–70.
96. Portaccio M, Lepore M. Determination of Different Saccharides Concentration by Means of a Multienzymes Amperometric Biosensor. Journal of Sensors. 2017;2017:8.
97. Nguyen BH, Nguyen BT, Vu HV, Nguyen CV, Nguyen DT, Nguyen LT. Development of label-free electrochemical lactose biosensor based on graphene/poly(1,5-diaminonaphthalene) film. Current Applied Physics. 2015;16(2):135-40.
98. Lewis BE, Choytun N, Schramm VL, Bennet AJ. Transition states for glucopyranose interconversion. Journal of the American Chemical Society. 2006;128(15):5049-58.
99. Hecht HJ, Schomburg D, Kalisz H, Schmid RD. The 3D structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Implications for the use of GOD as a biosensor enzyme. Biosensors & bioelectronics. 1993;8(3-4):197-203.