

**Inmovilización de la glucosa oxidasa para su evaluación como catalizador anódico en una biocelda
microfluídica de glucosa**

R.A. Escalona-Villalpando¹, M. Galván-Valencia², L.G. Arriaga-Hurtado³, S.M. Durón-Torres², J. Ledesma-García^{4*}.

¹Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental, Centro Académico Multidisciplinario, Campus Aeropuerto
Carr. A Chichimequillas S/N, Terrenos Ejidales Bolaños, Querétaro, Qro. 76140, UAQ.

²Unidad Académica de Ciencias Químicas, Campus Siglo XXI, Km 6 Carretera Zacatecas-Guadalajara
Ejido la Escondida 98160, Zacatecas, Zac. UAZ.

³Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica, Parque Tecnológico Querétaro, Sanfandila,
Pedro Escobedo, 76703, Querétaro, Qro.

⁴Ingeniería en Nanotecnología, Centro Académico Multidisciplinario, Campus Aeropuerto
Carr. A Chichimequillas S/N, Terrenos Ejidales Bolaños, Querétaro, Qro. 76140, UAQ.

*Tel. + (442) 192 12 00 EXT 65411, mail: janet.ledesma@uaq.mx

Resumen

Los catalizadores enzimáticos para bioceldas de combustible han sido ampliamente estudiados en los últimos años por sus aplicaciones en baterías para dispositivos electrónicos, diseño e implantación de marcapasos, desarrollo de estimuladores neuronales y biosensores. No obstante, el corto tiempo de vida útil y baja producción de energía constante son algunas de las limitaciones de una biocelda de combustible, básicamente debido a la dificultad para inmovilizar la enzima y pérdida de su actividad. En el presente trabajo, se evaluó un método para inmovilizar glucosa oxidasa (GOx) sobre grafito para su uso como bioánodo en una celda de combustible de microflujo (CCMF). El procedimiento consistió en adsorción directa de la enzima a partir de una solución de GOx en BF 0.1 M pH 7 sobre grafito (área geométrica entre 0.6 a 0.8 cm²) y el co-depósito de mezclas de glutaraldehído o poli-L-lisina con GOx. La actividad catalítica de GOx se evaluó por voltamperometría cíclica con 0 a 100 mM de β -D-glucosa, usando un electrodo de calomel saturado (ECS) como referencia y platino como contraelectrodo. La densidad de corriente de los bioánodos se evaluó en una CCMF con soporte de carbón tipo PPF (pyrolyzed phothoresist film). En el rango de potencial de -0.9V a 0V respecto al ECS, en ausencia de glucosa se observaron picos de oxidación y reducción cercanos a -0.45V y -0.47V respectivamente, los cuales se atribuyen a la transferencia de electrones del cofactor FAD. En presencia de glucosa ambas señales disminuyen y en presencia de oxígeno los voltamperogramas se modificaron. La estabilidad de la GOx adsorbida se favoreció con glutaraldehído y poli-L-lisina. La densidad calculada de enzima adsorbida fue de 3.55×10^{-12} hasta 4.21×10^{-11} mol/cm². Los resultados indican que utilizando esta metodología es posible optimizar la inmovilización de la GOx para su uso como bioánodo en una CCMF híbrida.

1. Introducción

Las celdas de combustible representan una prometedora alternativa para la producción de energía a partir de reacciones químicas por medio de catalizadores metálicos en el cátodo y ánodo como el oro, paladio, platino y plata, siendo costosos, además de sufrir envenenamiento catalítico y requieren condiciones de reacción específicas para su

óptimo funcionamiento [1]. Una de las propuestas más estudiadas en los últimos años para el remplazo de dichos catalizadores ha sido la implementación de enzimas que operan a temperatura ambiente y pH neutro, lo que representa ventajas para su potencial aplicación como fuente de energía en dispositivos electrónicos, diseño e implantación de marcapasos, desarrollo de estimuladores neuronales y biosensores [2]. Sin embargo, una baja producción de energía eléctrica y un corto tiempo de vida útil son algunos inconvenientes para el buen funcionamiento de una biocelda de combustible, debido principalmente a la deficiente inmovilización e inestabilidad enzimática [3]. Para la inmovilización de GOx se han empleado métodos físicos, utilizando principalmente agentes microencapsuladores y de atrapamiento como polímeros de polipirroles o hidrogeles de poliacrilamida [4], así como agentes químicos que permiten la adsorción de la enzima al electrodo. En este último caso se han empleado compuestos entrecruzadores como el glutaraldehído y quitosano [5] o moléculas que favorecen la unión covalente por medio de interacción entre grupos funcionales de la enzima y del agente inmovilizador [6]. En esta primera parte del proyecto, se planteó la inmovilización de GOx por adsorción física y la inmovilización usando compuestos entrecruzadores como el glutaraldehído (GA) y la poli-L-lisina (PL-ly) sobre grafito. Las evaluaciones fueron realizadas en media celda y celda completa en un dispositivo microfluídico tipo película fotoresistente pirolizada (PPF, del inglés pyrolyzed photoresist film) que utiliza glucosa como combustible [7].

2. Sección Experimental

Materiales

La Glucosa Oxidasa (GOx) de *Aspergillus Niger* (E.C.1.1.3.4) con $\geq 100,000$ unidades/g, el cofactor flavín adenin dinucleótido (FAD), las placas de grafito, glutaraldehído (50 % en agua V/V), la poly-L-lisina (0.1 % W/V) y la β -D-glucosa fueron adquiridos de Sigma Aldrich. El fosfato ácido de sodio (Na_2HPO_4) y de potasio (KH_2PO_4) y el hidróxido de potasio (99 % pureza) son grado reactivo marca Merck. Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada.

Pre-tratamiento del electrodo de grafito

Para los experimentos en media celda, el electrodo de grafito se pulió utilizando alúmina ($0.05\ \mu\text{m}$) y después se sonicó durante 20 min en agua desionizada para retirarle el exceso de alúmina. Posteriormente, fue sometido a una limpieza electroquímica empleando voltamperometría cíclica, 100 ciclos a una velocidad de barrido de $100\ \text{mV s}^{-1}$ en un rango de potencial de -0.9 a 1.0 V en una solución de ácido sulfúrico 0.5 M.

Preparación del electrodo con GOx

Para la adsorción física de GOx sobre el grafito previamente tratado, se preparó una solución de la enzima a una concentración de 5 mg/mL en un amortiguador de fosfatos (BF) 0.1 M pH 7 y se depositó sobre el grafito incubándolo a 4 °C por 1 y 24 h. Después de este tiempo, se secó a temperatura ambiente y fue estudiada la respuesta

de GOx a diferentes concentraciones de glucosa: 0, 1, 5, 10, 20, 50 y 100 mM. Para la evaluación del glutaraldehído (GA) con GOx se utilizaron las concentraciones de 0.05 % y 1.12 % en BF utilizando dos métodos: a) mezcla de la solución de GOx con GA que se depositó sobre el grafito dejándolo incubar por 1 h, posteriormente se secó a temperatura ambiente y se enjuagó con BF antes de evaluar la actividad enzimática a diferentes concentraciones de glucosa. b) la solución de GOx se depositó sobre el grafito dejándolo secar a temperatura ambiente y después se cubrió con GA. Para la evaluación con la poli-L-lisina (PL-ly) se emplearon concentraciones de 0.1 y 10 % y se siguieron los mismos métodos descritos para el GA.

Sistema electroquímico

En todos los estudios electroquímicos fue empleada una celda de vidrio de 25 mL empleando un electrodo de calomel saturado (ECS) como referencia y un alambre de platino como contra-electrodo. Las mediciones se realizaron a través de un potenciostato-galvanostato (BioLogic Science Instruments modelo VMP3) y todos los potenciales expresados en este trabajo se refieren al ECS.

Celda de combustible microfluídica híbrida

Se utilizó una celda de combustible microfluídica tipo PPF para la evaluación de bioánodos a partir de GOx. Para la inmovilización de GOx se emplearon dos métodos de adsorción. En el primero se depositó GOx en solución de BF sobre el PPF y en el otro GOx con GA 0.05 %. En todas las mediciones se utilizó como fluido anódico glucosa 10 mM en BF. Como cátodo se preparó una tinta de platino al 30 % con isopropanol y Nafión, depositándolo sobre el PPF con ayuda de un aerógrafo y como fluido catódico se usó una solución 0.3 M de KOH.

3. Resultados y Discusión

Adsorción de GOx sobre grafito

La caracterización de la adsorción de GOx se realizó por voltamperometría cíclica (VC) a una velocidad de barrido de 50 mV/s en una ventana de potencial de -0.9 a 0.0 V en BF 0.1 M y atmósfera de nitrógeno. Se observó un pico de oxidación característico a -0.462 V y uno de reducción a -0.531 vs ECS (Figura 1 A) que coincide con los resultados reportados por otros autores [8]. Estos picos son atribuidos a la transición de FAD a FADH₂ y viceversa, dentro del sitio catalítico de la enzima [9]. Para corroborar que los picos corresponden a lo descrito, se realizaron experimentos empleando solo al cofactor sobre grafito bajo las mismas condiciones de reacción. Los voltamperogramas cíclicos obtenidos muestran un pico de oxidación a -0.422 V y otro de reducción a -0.521 V (Figura 1 B), desplazados catódicamente y de mayor intensidad con respecto a los observados con GOx, lo que pudiera estar relacionado a la estructura de GOx que además de FAD contiene residuos de aminoácidos, amino azúcares e hidratos de carbono, que le pudieran conferir más resistencia a la transferencia de electrones desde el sitio catalítico de la enzima al electrodo,

a diferencia de FAD en la que ocurre un transferencia directa de electrones [10].

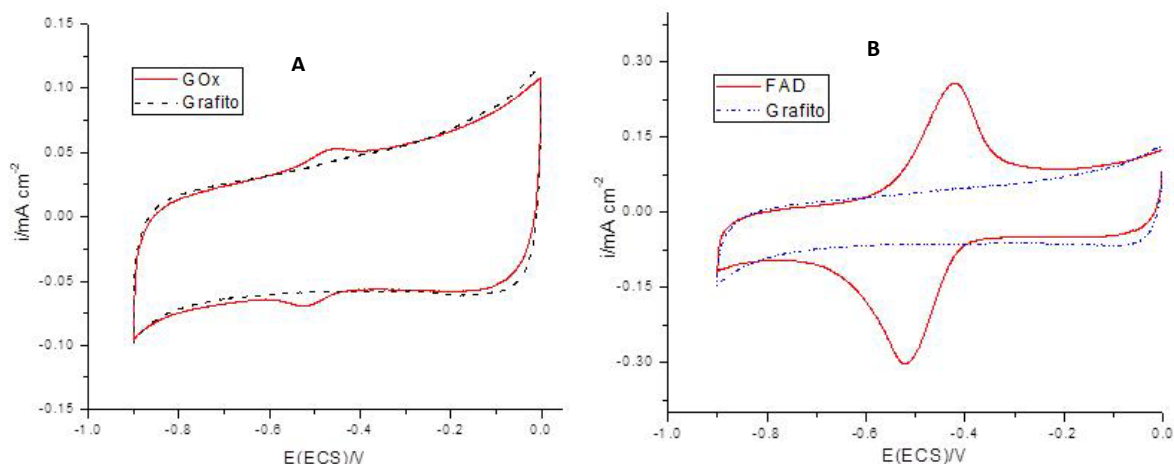


Figura 1. A) Voltamperometría cíclica comparativa del grafito vs GOx inmovilizada B) FAD adsorbido sobre grafito

Actividad catalítica de GOx en presencia de β -D-glucosa

La determinación del efecto catalítico de GOx inmovilizada se llevó a cabo en presencia de concentraciones crecientes de glucosa 0, 1, 5, 10, 20, 50 y 100 mM en BF bajo atmosfera de nitrógeno. Los resultados se muestran en la Figura 2 donde se observa una disminución en la intensidad de corriente de los picos redox a medida que aumenta la concentración de la glucosa. Este efecto se puede atribuir a la saturación del centro activo de GOx y a la transformación de oxígeno a peróxido de hidrógeno por la enzima, disminuyendo la concentración de oxígeno en la superficie del electrodo [11].

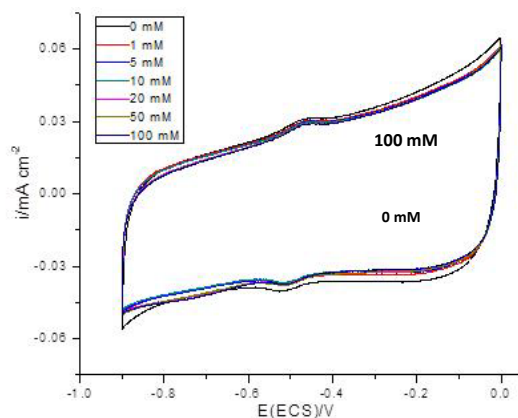


Figura 2. Actividad catalítica de GOx a diferentes concentraciones de glucosa

Adsorción de GOx con GA y su actividad catalítica a diferentes tiempos

La respuesta de la mezcla de GOx con GA se evaluó por VC observándose un par redox a -0.515 y -0.461 V (Figura 3A) que en comparación con los potenciales observados para GOx sobre grafito muestran un desplazamiento poco

significativo. De igual manera se aprecia un aumento en la pseudo-capacitancia del voltamperograma al incorporar GA. Además se evaluó la actividad catalítica en presencia de diferentes concentraciones de glucosa (0, 1, 5, 10, 20, 50 y 100 mM) presentándose una disminución de la intensidad de la corriente al aumentar la concentración del azúcar (Figura 3B).

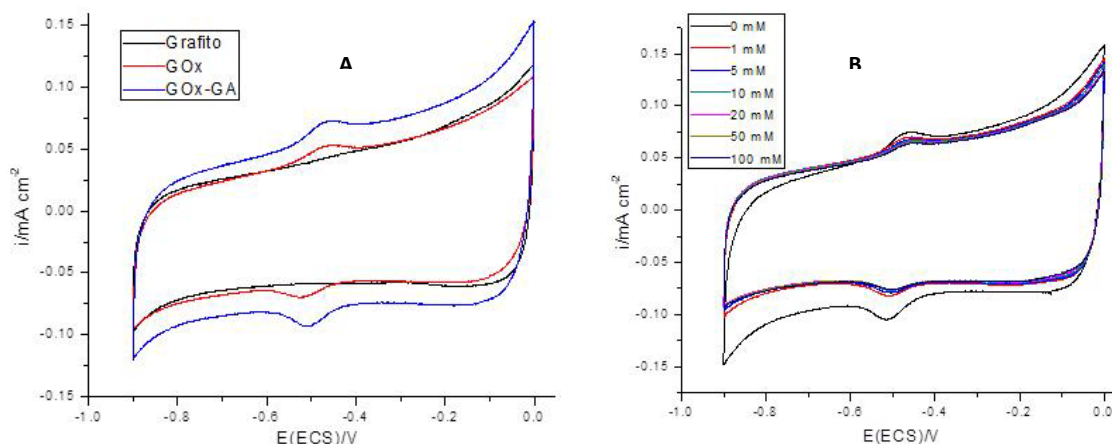


Figura 3. A) VC comparativos entre los electrodos de grafito, grafito/GOx y grafito/GOx-GA. B) Actividad de grafito/GOx-GA a diferentes concentraciones de glucosa

Finalmente, se evaluó la actividad de los electrodos de grafito/GOx con diferentes concentraciones de GA (0.05 y 1.12 %) a 1 h, 24 h, 1, 2 y 4 semanas en 10 mM de glucosa bajo atmósfera de nitrógeno, con la finalidad de ensayar su estabilidad. Se encontró que al emplear el método b) de inmovilización para las dos concentraciones de GA se prolongó la actividad enzimática hasta 4 semanas. Cuando se empleó el método a) utilizando una concentración de GA de 0.05% la actividad se conserva durante cuatro semanas, sin embargo, a mayor concentración (1.12%) su estabilidad se reduce a una semana. En ausencia de agente entrecruzante la estabilidad se ve drásticamente reducida a 72 h (Tabla 1).

Tabla1. Tiempo de operación de los electrodos de grafito modificados con GOx con y sin GA. El depósito del agente entrecruzante (GA) se realizó por lo métodos a) y b)

Método	Concentración de GA (%)	Tiempo de operación
--------	-------------------------	---------------------

GOx	0	72 h
GOx-GA (a)	0.05	4 semanas
GOx-GA (a)	1.12	1 semana
GOx-GA (b)	0.05	4 semanas
GOx-GA (b)	1.12	4 semanas

Inmovilización de GOx con PL-ly

La GOx fue inmovilizada con PL-ly a concentraciones de 0.1 y 10% por los métodos a) y b) descritos anteriormente para GA. La evaluación de la actividad de la enzima se llevó a cabo en media celda utilizando como electrodo de referencia el ECS y como contra-electrodo un alambre de platino. Utilizando ambos métodos de inmovilización y para las dos concentraciones de PL-ly, se observó un par redox alrededor de -0.539 y -0.497 V (Figura 4). Estos resultados coinciden en la posición de los picos redox con los encontrados al utilizar el GA lo que confirma la presencia y actividad de GOx sobre el grafito. Sin embargo, las pruebas de estabilidad y la actividad catalítica en presencia de glucosa se encuentran en proceso de experimentación.

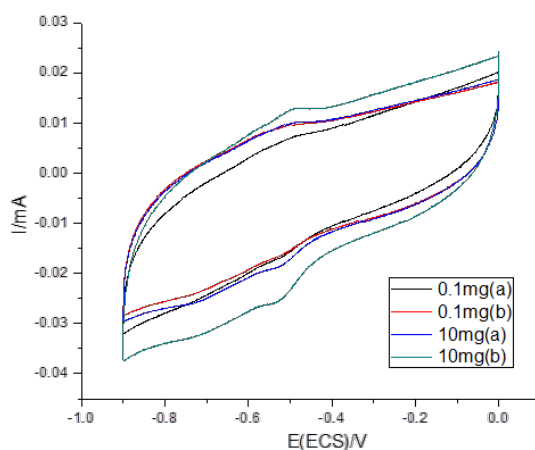


Figura 4. VC del electrodo Grafito/Gox-PL-ly al 0.1 y 10% por ambos métodos de depósito del agente entrecruzante.

Cantidad adsorbida de GOx y GOx-GA sobre grafito

El cálculo de la cantidad promedio de enzima activa adsorbida se realizó integrando el pico de reducción de varios electrodos utilizando la ecuación 1 en donde Γ es el promedio de enzima inmovilizada, Q es la carga durante la reacción de reducción, n el número de electrones transferidos, en este caso es igual a 2, A el área geométrica del electrodo y F es la constante de Faraday [12].

$$\Gamma = Q/nFA \quad (1)$$

Para el electrodo de Grafito/GOx se calculó una cantidad promedio de enzima inmovilizada de $8.28947 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$, lo que correspondería a 4.99×10^{13} moléculas cm^{-2} . Después de medir la actividad catalítica durante tres días consecutivos en los cuales el electrodo se almacenaba en BF a 4 °C, la evaluación de la cantidad de enzima inmovilizada disminuyó a $1.95915 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ (Tabla 2) debido principalmente al lavado de la enzima. Al emplear el agente entrecruzante GA se mejoró la retención de GOx sobre el grafito impidiendo su remoción de la superficie, cuantificándose una cantidad promedio de GOx adsorbida de $1.61948 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ que es similar o mayor a lo reportado por otros autores por ejemplo: $1.3 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ utilizando grafeno; $2.35 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ con carbón vítreo (CV) y nanotubos de carbono (NTC); y $5.93 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ con nafión-CV-NTC [12].

Tabla 2. Cantidad de enzima adsorbida sobre grafito

Electrodo	Cantidad mol cm^{-2}
Grafito-GOx (1ra determinación)	8.28947×10^{-11}
Grafito-GOx (3ra determinación)	1.95915×10^{-11}
Grafito-GOx-GA (0.05%)	1.61948×10^{-10}

Evaluación de GOx en una biocelda microfluídica tipo PPF

En una celda de microflujo tipo PPF se utilizó como bioánodo a GOx depositada sobre el carbón PPF con un área geométrica de 0.03 cm^2 y como cátodo platino, empleando una velocidad de flujo (VF) de 1.5 mL h^{-1} obteniendo un potencial a circuito abierto (PCA) de 0.5 V y una densidad de corriente (DC) de $6.2 \mu\text{W cm}^{-2}$. Al aumentar la velocidad del flujo a 3 mL h^{-1} se observó un incremento de la densidad de corriente a $7.9 \mu\text{W cm}^{-2}$ pero al aumentar la VF a 5 mL h^{-1} disminuyó considerablemente la DC debido posiblemente a la remoción de la enzima puesto que ningún agente entrecruzante fue utilizado (Figura 5).

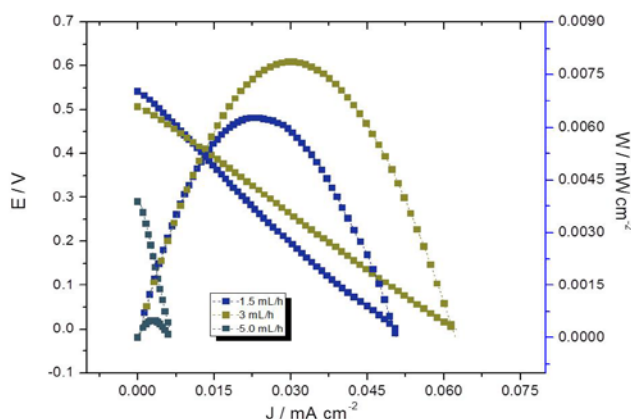


Figura 5. Curvas de descarga de GOx sobre carbón tipo PPF

Para evitar la remoción de la enzima sobre el PPF (área geométrica de 0.03 cm^2) por el aumento del flujo se empleó GA y se observó una disminución del PCA de 0.3 V (Figura 6), con una densidad de corriente máxima de $20 \mu\text{W cm}^{-2}$ a 0.29 V y una VF de 9 mL h^{-1} manteniéndose un desempeño constante de la celda de microflujo durante 15 días. Si bien la potencia y la densidad de corriente obtenidas aún son pequeñas para una aplicación práctica, la densidad de corriente se encuentran por encima de algunas reportadas por ejemplo: 1.38 a 18 mW cm^{-2} empleando la misma enzima pero un método de adsorción diferente, pero la potencia es baja en comparación a los $760 \mu\text{W cm}^{-2}$ reportado como máxima hasta el momento [13].

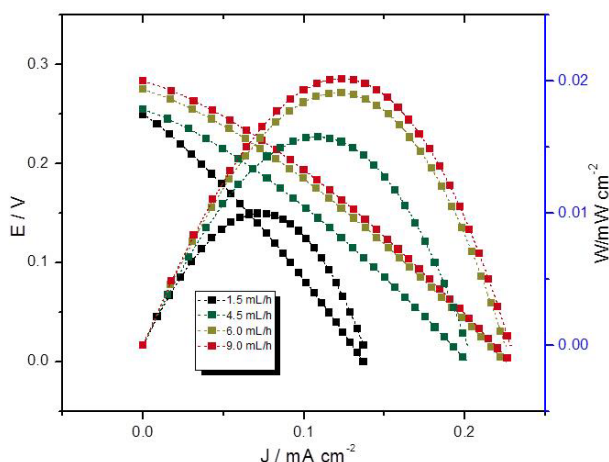


Figura 6. Curvas de descargas de GOx con GA a diferentes velocidades de flujo

4. Conclusiones

Se logró la inmovilización de la GOx sobre grafito por adsorción simple, con un tiempo de vida útil de hasta 72 h, con una cantidad de enzima adsorbida de $8.28947 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$. La señal voltamperométrica corresponde a la oxidación-reducción del cofactor FAD-FADH₂ la cual es una función inversa de la concentración de glucosa. La densidad de corriente máxima conseguida en la biocelda microfluídica cuando se empleó únicamente GOx fue de $6.2 \mu\text{W cm}^{-2}$ con un flujo de 9 mL h^{-1} . Al agregar GA como inmovilizador se mejoró el tiempo de vida útil del electrodo de Grafito/GOx hasta 4 semanas con una cantidad de GOx adsorbida de $1.61948 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ en media celda, y en la celda de microflujo se alcanzó una densidad de corriente de $20 \mu\text{W cm}^{-2}$ a 0.29 V a un flujo de 9 mL h^{-1} , con un tiempo de operación de hasta 15 días. Finalmente, los resultados preliminares con la PL-Iy como agente inmovilizador son prometedores.

5. Agradecimientos

Se agradece a la Universidad Autónoma de Querétaro por la beca otorgada y se agradece a ANR-CONACYT por el financiamiento obtenido a través del proyecto 163114.

6. Referencias

- [1] D Ivnitski, B Branch, P Atanassov. C Apblet, *Electrochem. Commun.*, 8, 1204–1212 (2006).
- [2] W. C Ming, W. K Hei, C. Dong. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 78, 927–938 (2008).
- [3] Z. Zhu, C. Momeu, M. Zakhartsev, U. Schwaneberg, *Biosensors and Bioelectronics* 2, 2046–2051 (2006).
- [4] Q. Wu, L. Wang, H. Yu, J. Wang, Z. Chen, *Chem. Rev.*, 111, 7855–7875 (2011).
- [5] Y-G. Zhou, S. Yang, Q-Y. Qian, X-H Xia, *Electrochem. Commun.*, 11, 216–219 (2009).
- [6] D. Wan, S. Yuan, G. L. Li, K. G. Neoh, E. T. Kang, *electrode Appl. Mater. Interf.*, 2, 3083-3091 (2010).
- [7] M. J. González, J. P. Esquivel, D. Sánchez, P. Godignon, F. X. Muñoz, F. J. Campo, F. Giroud, S. D. Minter, N. Sabaté. *Lab on a Chip*, 1-9 (2013).
- [8] G. Wang, N. M. Thai, S. T. Yau, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 2158–2164 (2007).
- [9] J. M. Goran, M. Mantilla, K. J. Stevenson. *Anal. Chem.* 85, 1571-1581. (2013).
- [10] W. C Ming, W. K. Hei, C. X. Dong, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 78, 927–938 (2008).
- [11] K. Won, Y-H Kim, S. An, J. H. Lee, S. Park, Y-K Choi, J. H Kim, H-I. Hwang, H. J. Kim, H Kim, S. H Lee, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 11, 1-9 (2013).
- [12] P. Wu, Q. Shao, Y. Hu, J. Jin, Y. Yin, H. Zhang, C. Cai, *Electroch. Act.*, 55, 8606–8614 (2010).
- [13] M. Holzinger, A. L. Goff, S. Cosnier. *Electrochem Act.* 82, 179-190. 2012.