



## **Biopilas: la energía sostenible en los seres vivos**

**Mireia Buaki-Sogó<sup>1\*</sup>, Leire Zubizarreta<sup>1</sup>, Mayte Gil-Agustí<sup>1</sup>, Marta García<sup>1</sup>, Alfredo Quijano<sup>1,2</sup>**

<sup>1)</sup> Instituto Tecnológico de la Energía, Avda. Juan de la Cierva, 24, 46980 Paterna, Valencia

<sup>2)</sup> ITE, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n 46022 Valencia

(\*) [mireia.buaki@ite.es](mailto:mireia.buaki@ite.es)

**Recibido:** 10/04/2018

**Revisado:** 24/04/2018

**Aceptado:** 30/04/2018

---

### **Resumen**

La biopila de glucosa nace de la necesidad de desarrollar pequeños dispositivos capaces de suministrar energía de manera independiente implantados en un ser vivo. En esta disciplina existen retos a solventar relacionados con baja durabilidad y densidad de corriente; hitos desafiantes y serios cuando se trata de aplicaciones in vivo. Con el objetivo de abordar las limitaciones de la biopila enzimática se plantean estrategias para obtener un sistema útil en cuanto a la estabilidad, capacidad y durabilidad para aplicaciones en organismos vivos mediante ingeniería enzimática y mejoras en inmovilización de enzimas en electrodos y en los materiales utilizados para ello.

**Palabras claves:** almacenamiento de energía; biopilas de glucosa; dispositivos implantables; inmovilización de enzimas; oxidación de glucosa

### **Abstract**

**Biofuel cells: the sustainable energy in living beings.** Glucose fuel cells arise from the need for developing small devices able to supply energy in an independent manner while remain implanted in living organisms. In this field there are different challenges to be addressed related with low current densities and durability; important and challenging milestones when dealing with in vivo applications. In order to overcome the drawbacks of enzymatic biofuel cells, different approaches to achieve useful systems in terms of stability, capacity and durability for living organisms application are being proposed via enzymatic engineering techniques and improvements in enzyme immobilization onto electrodes and materials employed at this purpose.

**Keywords:** Energy harvesting; Enzyme immobilization; Glucose biofuel cell; Glucose oxidation; Implantable devices.

### **Introducción**

Las biopilas de glucosa emergen junto con el esfuerzo que se ha hecho en desarrollar pequeños dispositivos de suministro de energía capaces de operar de manera independiente durante periodos prolongados de tiempo, sin necesidad de reemplazo e implantados en un ser vivo. Cronológicamente se observa que desde los años 70 las pilas de glucosa han sido un punto de interés para la generación de energía autónoma (figura 1).

La glucosa es una de las fuentes de energía más importantes en la mayoría de los organismos vivos. El mecanismo básico para la obtención de energía a partir de la glucosa es la rotura en carbohidratos y posterior oxidación a CO<sub>2</sub> y agua vía rutas metabólicas aeróbicas. La glucosa puede generar hasta 16 kW por gramo, obteniéndose 12 electrones por molécula durante esos procesos de oxidación<sup>1</sup>. Por tanto, la glucosa es una fuente de energía inagotable en los seres vivos. En la figura 2 está representado el esquema de generación energética general de una pila que funciona con glucosa. En una biopila la energía eléctrica es generada por la reacción electroquímica de un combustible (glucosa) y un oxidante (oxígeno) que

tienen lugar en dos electrodos separados espacialmente. Los electrones liberados del combustible circulan desde el ánodo a través de un circuito externo al cátodo donde se produce la reducción del oxígeno. La fuerza que conduce a los electrones es la diferencia de potencial entre los pares redox en el ánodo y el cátodo.

Adentrándonos en los mecanismos de oxidación de glucosa, en la figura 3 se muestra un intento de elucidación de las reacciones y productos intermedios formados en la oxidación de la glucosa. En la práctica, nunca se ha alcanzado la máxima transferencia de 24 electrones por molécula de glucosa. En los estudios realizados sobre la electrooxidación de la glucosa en medio neutro (0,5 mol.L<sup>-1</sup> glucosa en tampón de fosfato 1 M a pH = 7,4 y 0,5 mol.L<sup>-1</sup> NaCl) empleando electrodos de platino, se concluyó que el ácido gluónico es el único producto de reacción encontrado<sup>2,3</sup>.

Otros grupos han demostrado que el ácido gluónico puede oxidarse de manera similar a la glucosa, pero en un grado de reacción inferior<sup>4</sup>. Existen más teorías respecto a la oxidación de la glucosa, halladas mediante el análisis de los productos

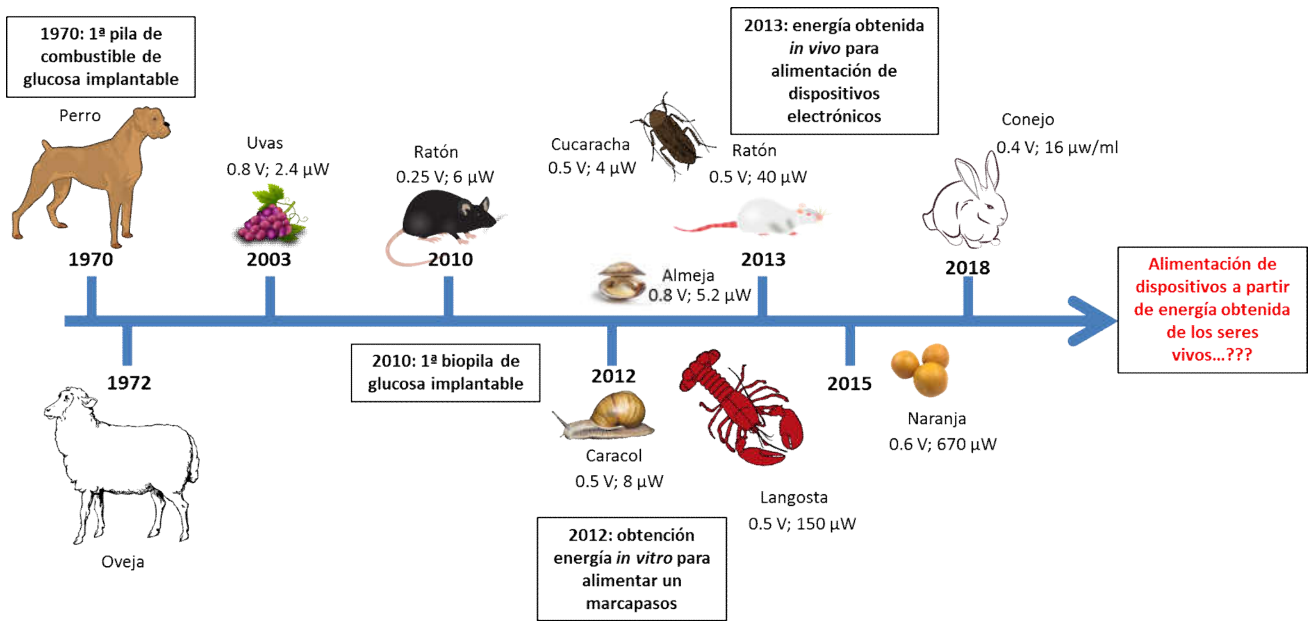


Fig. 1: Cronología de los implantes de la biopila de glucosa en seres vivos.

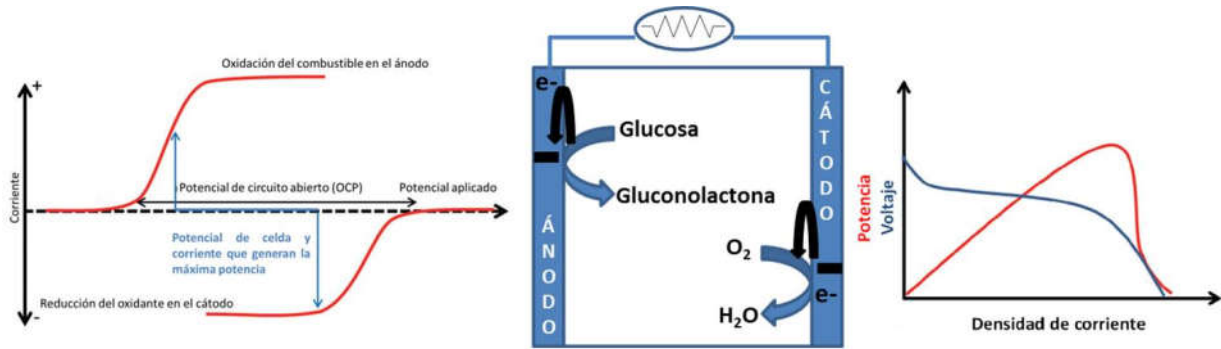


Fig. 2: Esquema general de funcionamiento de una biopila de glucosa.

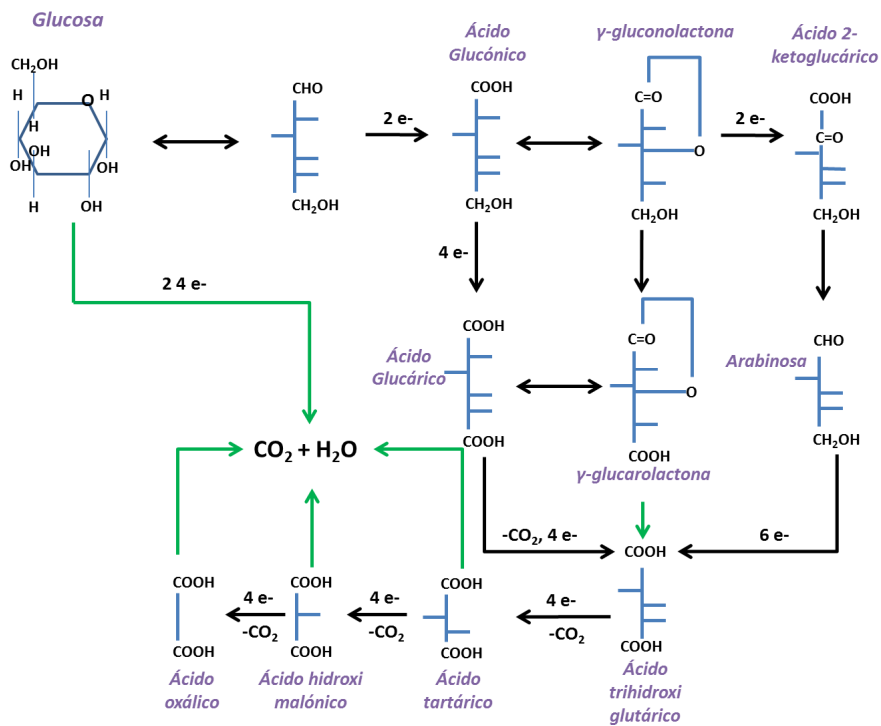


Fig. 3: Ruta de oxidación y productos de reacción intermedios generados en la oxidación de la glucosa.

de reacción encontrados. Estos hallazgos presentan diferencias con respecto a los productos de reacción que pueden ser debidas a las limitaciones de los métodos analíticos y la influencia del pH y la fuerza iónica del electrolito en el mecanismo de reacción de la oxidación electrocatalítica de glucosa<sup>2</sup>.

Mientras que en las pilas de combustible no implantables es posible ajustar la concentración de reactivos, pureza y temperatura para alcanzar condiciones de operación óptimas, el rendimiento en biopilas implantables se define por la fisiología del organismo vivo.

En el funcionamiento de las biopilas, además de glucosa y oxígeno, se tiene que considerar la presencia de sustancias endógenas cuando se trata de un sistema *in vivo*. Algunos componentes fluidos oxidables del cuerpo pueden contribuir a la reacción, mientras que otros componentes inhiben o contaminan el catalizador, produciendo una disminución del funcionamiento de la biopila como es el caso del aminoácido histidina que inhibe la oxidación de glucosa llevada a cabo utilizando un catalizador de platino<sup>5,6</sup>.

### Tipos de biopilas implantables de glucosa

En general las biopilas implantables de glucosa se pueden dividir en dos tipos principales en función del tipo de catalizador utilizado para dar lugar a las reacciones en los electrodos y son las biopilas enzimáticas y biopilas abióticas.

Las biopilas enzimáticas emplean enzimas tales como la glucosa oxidasa y lacasa en su forma aislada. En cambio, las biopilas catalizadas abióticamente utilizan catalizadores abióticos no-biológicos tales como metales o carbones activados.

A continuación se describen algunas características de estos dos tipos de biopilas:

#### Biopilas abióticas

Este tipo de biopilas (figura 4) fue la primera desarrollada en los años 70 y utilizan compuestos inorgánicos como catalizador<sup>1</sup>. Para el cátodo, se requiere un electrodo que sea selectivo al oxígeno y se suelen utilizar aleaciones de platino o diferentes tipos de carbón activado. El platino es el metal que muestra mejor actividad catalítica frente a la oxidación de la glucosa y la reducción de oxígeno pero es inapropiado porque ambos substratos se encuentran mezclados con otras sustancias en los fluidos corporales que envenenan el catalizador<sup>5</sup>. Se han propuesto alternativas en este sentido para realizar la reacción de conversión *in vivo*. Para catalizar la reacción en el ánodo, se suelen utilizar metales nobles o sus aleaciones tales como platino/tungsteno/níquel. Sin embargo, estos catalizadores fueron evaluados en condiciones anaeróbicas<sup>2</sup>.

En referencia a la reducción electrocatalítica de oxígeno, se ha utilizado paladio, oro, aleaciones y carbón activado o catalizadores moleculares basados en ftalocianinas con cobre, cobalto o hierro; estos catalizadores constituyen alternativas

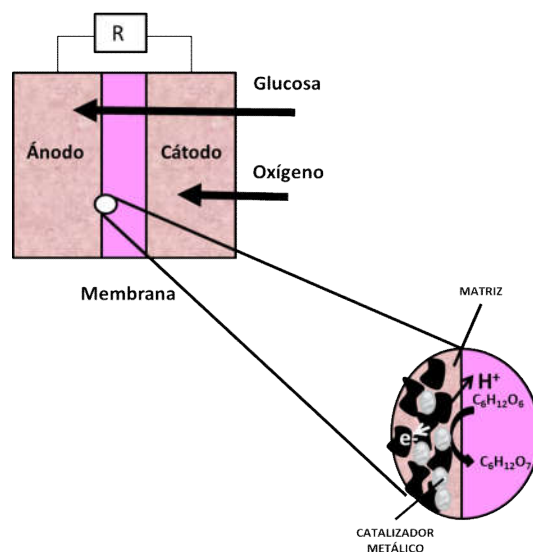


Fig. 4: Esquema de una biopila abiótica.

prometedoras debido a su baja sensibilidad frente a la glucosa<sup>2</sup>. Los factores que influyen en la selectividad y la densidad de corriente del cátodo son el área superficial, porosidad y la conductividad. Dentro de los diferentes tipos de biopilas, las biopilas abióticas son las más robustas. Se han propuesto una serie de distintos metales nobles y aleaciones, como aleaciones de platino/rutenio, rodio e iridio para la electrooxidación de la glucosa en medio neutro. Debido a la dificultad en diseñar catalizadores selectivos abióticos frente la oxidación de la glucosa y oxígeno se han publicado diferentes avances en cuanto el desarrollo de membranas selectivas que permitan la difusión de oxígeno e impidan la difusión de glucosa<sup>2</sup>.

En cuanto a funcionamiento *in vivo*, los experimentos más relevantes en celdas abióticas implantadas han sido en mamíferos, como por ejemplo perros, proporcionando potencias moderadas y estables de  $2,2 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  con un voltaje de circuito abierto de aproximadamente 0,5 V. Otras se implantaron en la vena de una oveja proporcionando  $40 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  pero decreciendo la misma rápidamente en una hora. Sin embargo, los principales problemas que han obstaculizado la implantación de este tipo de celdas son la baja especificidad del catalizador, densidades de potencia de suministro insuficientes y la inflamabilidad del dispositivo<sup>1</sup>.

Entre las ventajas de estos dispositivos se encuentran la larga duración de los catalizadores basados en metales por su elevada estabilidad. Sin embargo, a pesar de las estrategias ya propuestas y avances conseguidos, la falta de selectividad frente al oxígeno y la glucosa y la baja actividad electrocatalítica de los catalizadores basados en metales a pH neutro dificultan el suministro de una potencia adecuada de estos dispositivos en condiciones fisiológicas<sup>2</sup>.

#### Biopilas enzimáticas

En el caso de las biopilas de combustible enzimáticas un sistema biológico (biocatalizador) es el responsable de la

catálisis, siendo necesaria la transferencia electrónica entre el biocatalizador y el electrodo, que puede producirse a través de mediadores. Dos limitaciones importantes de las biopilas de combustible enzimáticas frente a las convencionales, basadas principalmente en electrocatalizadores de Pt, son la corta estabilidad operacional del sistema biológico y las bajas densidades de corriente medidas. El uso de biocatalizadores inmovilizados en el electrodo, en lugar de en disolución, mejora tanto la estabilidad del enzima como la transferencia electrónica con el electrodo, siendo posible incluso obtener corrientes catalíticas sin necesidad de mediadores, lo que es conocido como transferencia directa con el electrodo<sup>1,2</sup>.

Los últimos avances en conexión eléctrica de biocatalizadores (enzimas) han hecho que este tipo de biopilas enzimáticas se haya convertido en una alternativa a las biopilas abióticas. Este tipo de biopilas utiliza la enzima glucosa oxidasa como catalizador. La utilización de enzimas en este tipo de dispositivos presenta importantes retos en cuanto al diseño de la pila en términos de especificidad frente a la reducción de oxígeno y oxidación de la glucosa que en biopilas abióticas conlleva la necesidad de compartimentar los electrodos.

Las enzimas son proteínas, por ello, presentan estabilidad limitada a largo plazo ya que cambios en el pH y temperatura pueden producir la desnaturalización de las mismas. Sin embargo, las enzimas presentan una elevada especificidad y un elevado grado de reacción y son excelentes electrocatalizadores cuando están eficientemente conectadas a los electrodos<sup>1</sup>.

Los ánodos están diseñados normalmente para ser utilizados con las enzimas glucosa oxidasa (GOx) y glucosa deshidrogenasa (GDH) mientras que los biocátodos se basan en enzimas del tipo multi-cobre oxidasa como lacasa y bilirrubina oxidasa (BOD). La transferencia de electrones entre las enzimas redox y el material electrodo se clasifica en transferencia electrónica mediada (MET, del inglés *Mediated Electron Transfer*) o transferencia electrónica directa (DET, del inglés *Direct Electron Transfer*)<sup>7</sup>.

La transferencia electrónica mediada (TEM) involucra moléculas redox activas o polímeros, cuyo potencial redox se encuentra cerca del potencial correspondiente al centro activo de la enzima. La transferencia electrónica directa (TED) implica una conexión directa donde los electrones son directamente transferidos desde el centro catalítico de la enzima al electrodo. La transferencia electrónica mediada es más sencilla. Los mayores avances se han realizado conectando la glucosa oxidasa con enzimas multi-cobre oxidasa inmovilizadas y eléctricamente conectadas utilizando hidrogeles redox basados en osmio proporcionando elevados voltajes en la celda, 0,8 V en experimentos *in vitro*<sup>7</sup>.

La TED es más difícil de conseguir. Los últimos avances en

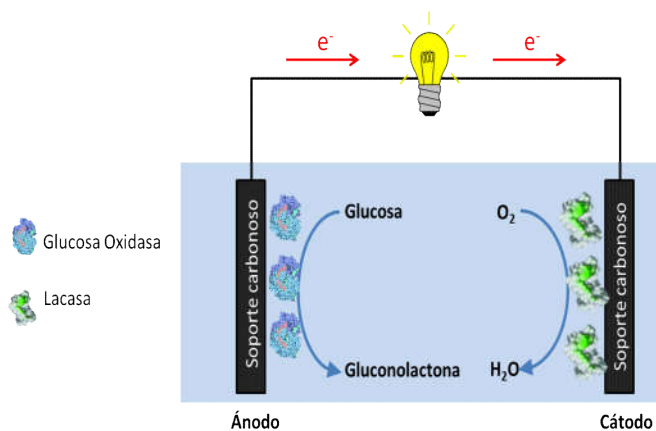


Fig. 5: Esquema de una biopila enzimática.

unión de las enzimas disminuyendo los sobrepotenciales de la oxidación de la glucosa y la reducción de oxígeno. El desarrollo de electrodos basado en nanoestructuras tridimensionales aumenta considerablemente el número de enzimas conectadas por unidad de superficie y volumen. En la mayoría de biopilas enzimáticas la transferencia electrónica directa se ha conseguido eficientemente utilizando electrodos modificados con nanotubos de carbono<sup>8</sup>. Las propiedades ideales para el contacto de las enzimas con los electrodos son, por una parte, una superficie hidrofóbica que permita una elevada adsorción de enzimas y, por otro lado, una superficie que facilite la transferencia de electrones entre el centro activo y el electrodo. La orientación de las enzimas sobre la superficie de los electrodos y su electroconectividad son también factores determinantes en la transferencia de electrones<sup>7,9</sup>.

Las enzimas inmovilizadas son enzimas físicamente confinadas o localizadas en una región del espacio reteniendo su actividad catalítica y pudiendo ser usadas continua y repetidamente. Posteriormente se amplió el concepto considerando que la inmovilización de enzimas es un proceso en el cual se restringen los grados de libertad de movimiento de enzimas mediante su unión a un soporte, dando lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica.

La inmovilización de enzimas se puede llevar a cabo sobre electrodos desnudos o previamente funcionalizados. La ventaja de trabajar con electrodos desnudos es que no es preciso ningún paso previo a la modificación con enzima, con el consecuente ahorro de tiempo y reactivos. Sin embargo hay que tener en cuenta que sobre superficies metálicas las enzimas suelen desnaturalizarse, perdiendo por tanto su capacidad enzimática. El uso de superficies funcionalizadas con monocapas no sólo previene la desnaturalización del enzima en la superficie, sino que, además, hace posible controlar la orientación de la enzima a través de los grupos funcionales expuestos y enlazar covalentemente la enzima al electrodo<sup>10,11</sup>.

No existe un método ni un soporte ideal para la inmovilización de enzimas, por lo que es preciso seleccionar los adecuados en función de las características específicas que se

necesiten. Por lo general, hay que tener en cuenta dos factores a la hora de elegir el método de inmovilización. El primero es que el proceso de inmovilización puede variar la estructura de la proteína, dando lugar a pérdidas de actividad o incluso a la inactivación completa de la enzima. El segundo factor a considerar es la orientación de los centros activos del enzima con respecto a la superficie, puesto que no todas las orientaciones facilitan la comunicación con el transductor<sup>7</sup>.

Existen diferentes métodos para inmovilizar enzimas sobre superficies electrónicas, siendo los más comunes: adsorción física, atrapamiento físico, entrecruzamiento y enlace covalente directo<sup>7</sup>.

### Componentes de la biopila enzimática

Los componentes que forman parte de una biopila enzimática (EFC, del inglés *Enzymatic Fuel Cell*) se muestran en la figura 5. Cabe destacar el tipo de combustible utilizado, materiales de los electrodos y los participantes directos en la reacción de generación de corriente eléctrica que son las enzimas.

Por otra parte, el tipo de ensamblaje que se forma entre enzima y electrodo, dará valor a la biopila en función de cómo esté inmovilizada y estabilizada la enzima en el material electrónico, lo cual facilitará las futuras reacciones de oxidación del combustible en el ánodo y el transporte de electrones<sup>12</sup>.

#### Combustible, oxidantes, enzimas y electrodos

**Combustibles:** la naturaleza de los catalizadores empleados en pilas de combustible enzimáticas permite la utilización de numerosos combustibles incluyendo una variedad de azúcares

y alcoholes alifáticos. El combustible más común para la biopila enzimática es la glucosa debido a su abundancia en la naturaleza y su papel esencial en el metabolismo humano. La glucosa es un intermedio metabólico importante y una fuente de energía para una gran variedad de organismos vivos. La glucosa es un carbohidrato aldohexosa y de dos estereoisómeros sólo el dextrógiro (la D-Glucosa) es biológicamente activo. La glucosa está implicada en la ruta metabólica de glucólisis donde es oxidada a piruvato que más tarde entra en el ciclo ácido cítrico. Posteriormente, y después de la serie de reacciones químicas con liberación de energía la glucosa se transforma en CO<sub>2</sub> y agua.

**Oxidantes:** el oxidante más extensamente empleado en biopilas de combustible enzimáticas es el oxígeno. Es el oxidante típico usado en pilas de combustible convencionales usado puro o en aire.

Por otra parte, el O<sub>2</sub> molecular es esencial para la respiración de todos los organismos aeróbicos y su omnipresencia en los humanos hace que sea el escogido para usarse como oxidante en sistemas de biopila potencialmente implantables. En el caso de las biopilas enzimáticas, por lo general, es usado disuelto en el electrolito acuoso. Debido a su baja solubilidad aparecen problemas adicionales asociados a la transferencia de materia.

**Enzimas:** existen dos tipos distintos de enzimas aplicables uno al ánodo y otro al cátodo. Las enzimas usadas en el ánodo son fundamentalmente dos: Glucosa Oxidasa (GOx, EC1.1.3.4) y enzimas del tipo Glucosa Deshidrogenasa (GDH, EC1.1.1.47).

**Tabla 1:** Enzimas y combustibles en biopilas enzimáticas.

Fuel	Enzima	Cofactor	Aceptor natural de e <sup>-</sup>
Glucosa	Glucosa Oxidasa EC 1.1.3.4	FAD	O <sub>2</sub>
	Glucosa Deshidrogenasa EC 1.1.1.47	NAD	NAD
	Glucosa Deshidrogenasa EC 1.1.5.2	PQQ	quinona
	Celobiosa Deshidrogenasa EC 1.1.99.18	FAD, heme	aceptor
Fructosa	Fructosa Deshidrogenasa EC 1.1.99.11	FAD, heme	aceptor
Celobiosa	Celobiosa Deshidrogenasa EC 1.1.99.18	FAD, heme	aceptor
Lactosa	Celobiosa Deshidrogenasa EC 1.1.99.18	FAD, heme	aceptor
Metanol	Alcohol Deshidrogenasa EC 1.1.1.1	NAD	NAD
	Aldehido Deshidrogenasa EC 1.2.1.5	NAD	NAD
	Formiato Deshidrogenasa EC 1.2.1.2	NAD	NAD
	Alcohol Deshidrogenasa EC 1.1.99.8	PQQ, heme	aceptor
Etanol	Aldehido Deshidrogenasa EC 1.2.1.5	NAD	aceptor
	Alcohol Deshidrogenasa EC 1.1.99.8	PQQ, heme	aceptor
Glicerol	Aldehido Deshidrogenasa	PQQ, heme	-
	Oxalato Oxidasa EC 1.2.3.4	FAD, Mn	O <sub>2</sub>
Piruvato	Piruvato Deshidrogenasa EC 1.2.4.1	NAD	NAD
Hidrógeno	Hidrogenasa unida a una membrana	-	-

**Tabla 2:** Oxidantes y enzimas utilizadas en pilas de combustible enzimáticas.

Oxidante	Enzima	Metal/Cofactor
Oxígeno	Lacasa EC 1.10.3.2	Cu
	Bilirrubina Oxidasa EC 1.3.3.5	Cu
	Citocroma Oxidasa EC 1.9.3.1	Cu, Fe / heme
	Citocroma C	Fe / heme
Peróxido de hidrógeno	Microperoxidasa 11	Fe / heme
	Peroxidasa de rábano EC 1.11.1.7	Fe / heme
	Microperoxidasa 8	Fe / heme
Peróxido de cumeno	Microperoxidasa 11	Fe / heme

La GOx es un dímero compuesto por dos unidades idénticas con peso molecular (PM) = 160 kDa, un diámetro medio de 8 nm y punto iso-eléctrico de 4,2<sup>13</sup>. La GDH presenta ventajas sobre la anterior desde el punto de vista que el aceptor natural del electrón no es el oxígeno aunque de momento para esta enzima todavía falta solventar el encontrar un cofactor que sea soluble. Las enzimas usadas en el cátodo para la reducción del oxígeno son principalmente dos: lacasas (EC1.10.3.2) y bilirrubina oxidasa (BOD, EC1.3.3.5).

**Electrodos:** la mayoría de los electrodos consisten en una estructura mesoporosa de carbón con tamaños de poro entre 2 y 50 nm. Es importante que la estructura sea compacta y tenga formato para formar un electrodo 3D. La idea es que las enzimas se retengan no sólo en la superficie sino en todas partes del electrodo dando lugar a una mayor superficie y por tanto un soporte más eficiente para poder finalmente obtener elevadas densidades de potencia de salida de la biopila.

La estructura del electrodo y la distribución de los tamaños de poro del carbón son de capital importancia a la hora de evaluar la durabilidad y densidad de potencia de la biopila enzimática en cuestión. En grandes rasgos se puede explicar de la siguiente manera: si los poros son demasiado grandes las enzimas no son estabilizadas correctamente, por lo que se reduce el efecto de inmovilización y, por tanto, disminuyen la vida de la biopila. Por otra parte, si el tamaño de poro es demasiado pequeño el flujo de sustrato se ve entorpecido provocando una disminución en la potencia de salida. El movimiento de las enzimas también podría verse dificultado y la carga del electrodo con la enzima no sería óptima.

#### *Ensamblaje enzima-electrodo*

Existen diferentes métodos para inmovilizar enzimas sobre superficies electródicas, siendo tres los más comunes: adsorción física, enlace covalente directo y atrapamiento físico.

**Adsorción física:** es el método más sencillo, puesto que simplemente requiere el contacto entre la superficie electródica (desnuda o funcionalizada) y la enzima. La enzima se retiene en la superficie por fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas o interacciones electrostáticas, siendo posible en este caso controlar la orientación con una funcionalización de la superficie adecuada a la distribución de cargas de la proteína.

Este tipo de unión tiene la ventaja de que no suele implicar pérdidas importantes de actividad enzimática. Sin embargo, la mayor desventaja de este método es la baja fortaleza del enlace, dando como resultado la pérdida de enzima por cambios de pH, fuerza iónica o simple difusión al medio.

**Enlace covalente directo:** esta metodología requiere de superficies electródicas funcionalizadas a las que se unirá la enzima mediante enlace covalente. Las ventajas de esta metodología son:

- Estabilidad de la monocapa de enzima ante cambios en las condiciones del medio,
- mayor reproducibilidad en el recubrimiento de enzima,
- posible orientación de la proteína en la superficie,
- posible cercanía del centro activo de la enzima con la superficie electródica, lo que puede hacer posible la transferencia electrónica directa enzima-electrodo.

Sin embargo, puesto que la enzima se une covalentemente a la superficie, su estructura se ve alterada, lo que podría conllevar la pérdida de actividad de la misma. Por lo tanto, hay que tener cuidado con la elección del procedimiento de inmovilización química con el fin de evitar la desnaturalización y consiguiente inactivación de la proteína.

**Atrapamiento físico:** en este método la enzima es retenida físicamente en el interior de una matriz sólida porosa (un

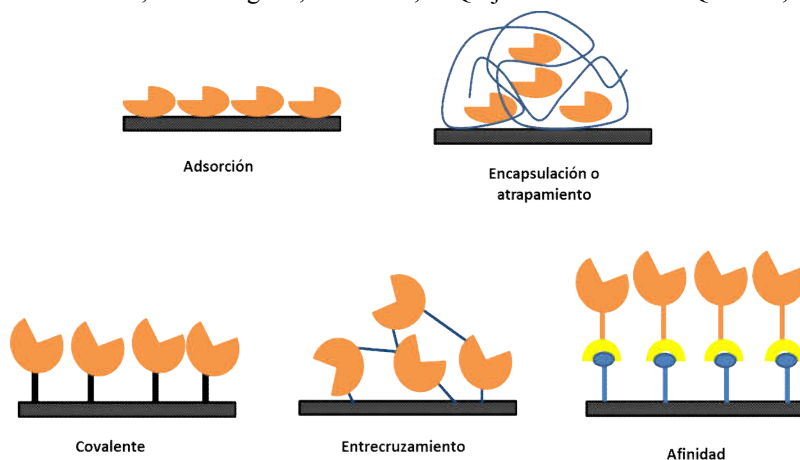


Fig. 6: Diferentes formas de inmovilizar enzimas en los electrodos.

polímero altamente entrecruzado o un gel) o encapsulada dentro de una membrana semipermeable. Este método produce una unión estable, no suele alterar la estructura de la proteína, por lo que mantiene su actividad, y es un método sencillo para la co-inmovilización de distintas proteínas. Además, el uso de polímeros redox conductores puede mejorar la transferencia directa entre la enzima y el electrodo. Sin embargo, pueden producirse grandes barreras difusionales de sustratos.

#### Limitaciones actuales de la biopila enzimática

Una de las limitaciones principales de este tipo de biopilas es cuando su aplicación se enfoca a su uso en organismos vivos. En este caso, las enzimas deben oxidar la glucosa de la sangre y reducir el oxígeno para generar energía para alimentar un dispositivo implantable como puede ser un marcapasos<sup>14</sup>.

Dos limitaciones constituyen en la actualidad los retos más importantes a solventar en biopilas enzimáticas: una vida corta y baja densidad de corriente. Estos son retos difíciles y serios cuando se trata de aplicaciones *in vivo*.

**Vida corta de la biopila:** esta situación es consecuencia directa del tiempo de vida de las enzimas que se usan en la catálisis. Los tiempos de vida útil son cortos, como mucho unas semanas, y con estos resultados no son viables para su implantación en organismos vivos.

La baja durabilidad de las enzimas es debida a varios factores; entre ellos destaca la desactivación por autólisis o proteólisis o desnaturalización siendo estos procesos complejos de frenar desde una perspectiva sintética. Por otra parte, se suele inmovilizar las enzimas para aumentar la vida de las mismas pero en muchos casos repercute de manera negativa puesto que disminuye la densidad de corriente de la biopila.

**Baja densidad de potencia de salida de la biopila:** la potencia de salida es el producto del voltaje de celda y la corriente por área superficial del electrodo. El primero está influenciado directamente por la resistencia interna de la pila, y el segundo, depende de la actividad enzimática y la velocidad (*ratio*) de transferencia de electrones de las enzimas involucradas. Además, la geometría de la enzima juega un papel primordial en la velocidad de electrones transferidos. También se debe

tener en cuenta que la transferencia directa o mediada de electrones posee mecanismos distintos. Es más difícil trans-

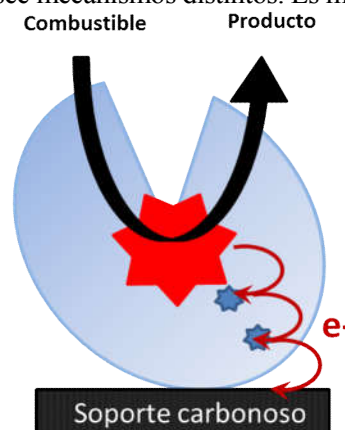


Fig. 7: Esquema de la transferencia de un electrón desde el centro de una enzima. Fuente: Elaboración propia.

portar los electrones desde el centro de una enzima que desde sitios cercanos a la superficie. Actualmente, se han alcanzado densidades de potencia<sup>12</sup> de  $2 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ .

En el caso de usar transferencia mediada con otros compuestos la potencia global de la pila se verá disminuida debido a que reduce el potencial de celda (figura 8). Además de estos

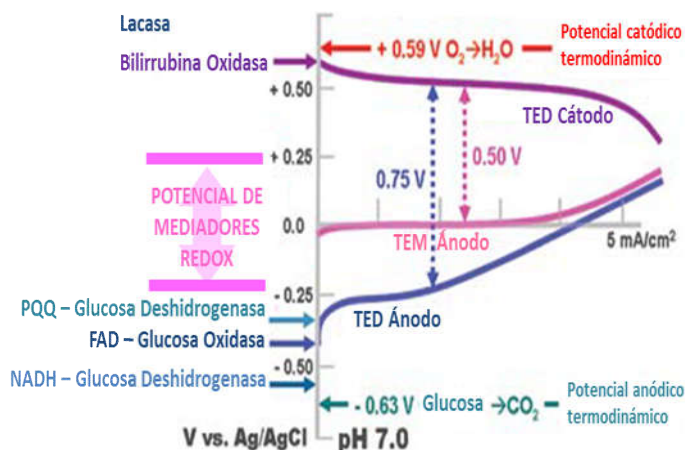


Fig. 8: Potenciales redox para diferentes enzimas y cofactores. Reproducida de Atanassov *et al.*<sup>15</sup> con permiso de *Electrochemical Society (ECS)* 2018.

inconvenientes la mayoría de mediadores son compuestos en disolución por lo que hará falta añadir una membrana para prevenir cortocircuito en la celda.

### **Estrategias de mejora**

Con el objetivo de abordar las limitaciones de la biopila enzimática se plantean diferentes estrategias para obtener un sistema capaz de ser útil en cuanto a la estabilidad, capacidad y durabilidad para aplicaciones en organismos vivos.

#### *Ingeniería enzimática*

Una alternativa para aumentar la actividad de la enzima y su estabilidad a ciertos factores como el pH, temperatura, y su tolerancia al oxígeno, es el uso de la ingeniería de proteínas. Esta rama está enfocada a modificar proteínas para mejorar sus propiedades en determinadas aplicaciones.

En ingeniería proteica se utilizan esencialmente dos métodos para realizar ajustes de las características de las enzimas: el diseño racional o de proteínas y la evolución dirigida.

En el diseño racional las enzimas son modificadas por el método racional. Este se basa en reemplazar un aminoácido específico dentro de la enzima por otro aminoácido mediante modificaciones genéticas en el gen de la enzima relevante. Para llevar a cabo este método, se requiere un amplio conocimiento de la enzima, así como la función del aminoácido específico. Teniendo estos parámetros bien conocidos, la enzima se puede mejorar fácilmente intercambiando el código genético del aminoácido dentro del ADN del organismo receptor.

Sin embargo, es difícil adquirir información precisa de la enzima, y deducir que aminoácidos se tienen que reemplazar. En este contexto, el método de evolución dirigida se ha desarrollado para solventar estos problemas.

En la evolución dirigida se insertan mutaciones en el ADN de los organismos receptores. De esta manera, el microorganismo produce enzimas mutadas. Se hace un cribado (*screening*) de estas enzimas mutadas hasta alcanzar aquella con las propiedades deseadas. Cuando se determina el mutante óptimo, se repite el ciclo con éste. A lo largo del tiempo, se irán produciendo las mutaciones y a su vez mejores enzimas.

Sin embargo, existen ciertas desventajas de este método. En primer lugar, se requiere una gran base de datos para almacenar toda la información de los mutantes debido a que cuando estas mutaciones se producen aleatoriamente, las posibilidades son numerosas. En este sentido se han desarrollado determinadas técnicas computacionales que facilitan el manejo de estas bases de datos.

En segundo lugar, es necesario testear cada mutante para testear sus propiedades más relevantes. Dependiendo del objetivo de la investigación, el cribado puede durar al menos una semana, siendo por lo tanto un proceso que es largo y

costoso. Por ello, siempre que sea posible el diseño racional es el método más eficiente.

#### *Mejora en la inmovilización de las enzimas en los electrodos*

Aunque existe gran cantidad de bibliografía sobre la tecnología de inmovilización de las enzimas, todavía existen ciertas limitaciones que deben ser superadas para que sea susceptible de aplicarse a nivel industrial. Los principales desafíos se pueden resumir en: el mantenimiento de la actividad de la enzima, la estabilidad de los factores físico-químicos, la vida útil de las enzimas, la orientación correcta del centro activo de la enzima en la superficie del electrodo o la interacción sinérgica de la enzima con el electrodo después de inmovilización. El mecanismo de adsorción es muy recurrido pero presenta problemas relacionados con la liberación progresiva del componente enzimático. Del mismo modo, la unión covalente proporciona gran estabilidad a la enzima, pero disminuye su actividad después de la inmovilización.

Es conocido que las estructuras de inmovilización influyen fuertemente en la transferencia de masa en los sistemas bioelectroquímicos enzimáticos en términos de difusión de sustrato a través de los sitios activos, la transferencia de electrones y la difusión de mediadores redox. En relación a este aspecto, ha aumentado el interés en el desarrollo de nanoestructuras (nanopartículas, nanofibras, nanohilos, nanotubos, nanoláminas, nanoporos y nanocompuestos) por su mayor superficie, longitud de difusión de carga y tasas de difusión rápida. En general, la gran superficie de las nanoestructuras conduce a una elevada carga de la enzima y por lo tanto resulta en una mejora de la densidad de potencia. Además, estas nanoestructuras también ayudan a ampliar la vida útil de las pilas de biocombustible por el aumento de la estabilidad de la enzima. Por otra parte, se están investigando sistemas poliméricos redox para facilitar la transferencia de electrones en estos sistemas bioelectroquímicos. Por último, otras de las propiedades a mejorar mediante la utilización de mediadores y soportes compatibles, es aumentar la selectividad y la biocompatibilidad de dichos dispositivos, de cara a su futura implantación<sup>7</sup>.

#### *Mejora en los métodos de inmovilización*

Los materiales utilizados para la inmovilización de enzimas son considerados críticos y deben ser capaces de extraer o llevar los electrones desde o hacia el punto activo del enzima, según el caso. La eficiencia bioelectrocatalítica de un material de inmovilización se rige en gran medida por la conductividad eléctrica y, por lo tanto, es la principal característica junto con la solidez para seleccionar correctamente un material de inmovilización. En general, los soportes sólidos tales como el oro y el platino son considerados como materiales de inmovilización, pero con los avances en los campos de la ciencia de los materiales, polímeros, nanomateriales de carbono, materiales metálicos y a base de óxidos, materiales de base sólida-gel y materiales compuestos, también se están



utilizando como materiales de inmovilización eficientes en sistemas bio-electroquímicos enzimáticos<sup>7</sup>. A continuación se nombran brevemente algunos de ellos:

**Polímeros:** existe una gran variedad de materiales poliméricos (Nafion, polianilina, polifenol, politiofeno, poli-1,3-fenilendiamina, piridina de polivinilo, alcohol de polivinilo, policarbonato, nylon) que han sido estudiados como materiales de inmovilización enzimática. El desarrollo de polímeros bio-compatibles y eléctricamente activos se está extendiendo, debido a que la transferencia de electrones está garantizada por la reacción electrocatalítica de la enzima. Del mismo modo, el uso de mediadores eficientes como el osmio se ha estudiado para la mediación eficaz de electrones tanto en ánodos como en cátodos. Por otra parte, se ha estudiado la técnica de la electrodeposición del polímero sobre un soporte funcionalizado previamente por grupos amino, seguido de acoplamiento de biomoléculas a través del grupo carboxílico de la proteína.

**Materiales de base carbonosa:** este tipo de materiales son atractivos para funcionar como soportes de electrodos por sus propiedades únicas, tales como una gran superficie, alta conductividad eléctrica, alta deslocalización electrónica y alta estabilidad química y térmica. La inmovilización de enzimas se ha estudiado para una amplia variedad de materiales de carbono, incluyendo negros de humo, pastas de carbono, grafeno, nanotubos, grafito, fibra de carbono, carbón vítreo, aerogel de carbono, carbón mesoporoso y átomos de carbono vítreo reticulado. En el caso del grafeno, éste presenta una conductividad eléctrica y calorífica elevada, resistencia mecánica y absorción óptica; sin embargo, es un material hidrófobo y forma fácilmente aglomerados de forma irreversible. Para evitar este problema en la adsorción se recomienda ampliamente el carbón mesoporoso. Cabe destacar que el área de superficie y el tamaño y distribución de los poros, son dos parámetros morfológicos que influyen sustancialmente en la actividad catalítica. En general, los carbonos activados tienen una superficie superior a  $1000 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ , pero suelen ser inadecuados para soportar biocatalizadores ya que una gran parte del área está compuesta por microporos los cuales son inaccesibles a los catalizadores e incluso a algunos electrolitos acuosos.

**Óxidos metálicos y nanopartículas magnéticas:** las propiedades químicas y físicas únicas de los óxidos metálicos y las nanopartículas magnéticas, hacen que este tipo de materiales tengan aplicación en sistemas bioelectroquímicos enzimáticos. Entre las nanopartículas estudiadas, destacan las de Au, Ag y Pt debido a su alta estabilidad térmica y propiedades electrónicas. Del mismo modo, algunas nanopartículas de óxido como  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  y  $\text{Co}_3\text{O}_4$  se han investigado también en pilas de combustible enzimáticas para favorecer la transferencia de electrones. En comparación con otros métodos convencionales la utilización de este tipo de materiales implica tres importantes beneficios: síntesis con alto contenido

en sólidos, homogeneidad en la estructura y tamaño de partícula controlado. Por otra parte, las nanopartículas magnéticas pueden separarse del medio de reacción mediante un imán, lo cual permite la reutilización de la enzima durante un período más largo; y permiten la fabricación del electrodo enzimático sin usar productos químicos agresivos ni altas temperaturas.

**Materiales mesoporosos de base sólida-gel:** las fases micelares o mesoporosas se añaden normalmente a los electrodos enzimáticos para proporcionar un intercambiador de iones inmovilizado, efecto tampón, para impedir el acceso de las especies venenosas o competitivas, o simplemente para mejorar la estabilidad. Dichos materiales son por lo general de base polimérica o silicea. En el caso de las estructuras de sílice porosa pueden encapsular enzimas por gelificación de precursores sol-gel que rodean las biomoléculas o por adsorción de la enzima después de la gelificación. Estos materiales de base sol-gel son biocompatibles y se pueden combinar con una celda individual o con varios sistemas biológicos. Por otra parte, la inmovilización de la enzima mediante materiales mesoporosos tiene lugar por simple adsorción. En este caso es sumamente importante el tamaño de poro (similar o mayor al tamaño de la enzima) y la interacción de la carga (un sistema es estable cuando la carga del material mesoporoso es opuesta a la carga neta de la enzima). Este último parámetro, la carga, se puede controlar cambiando el pH o por funcionalización de mesoporos (por ejemplo, con grupos amino o carboxilo).

**Líquidos iónicos:** recientemente, los líquidos iónicos han surgido como una alternativa a los disolventes no polares e hidrofóbicos para actuar como soporte biocatalítico. La modificación del electrodo mediante líquidos iónicos resulta interesante por su hidrofobicidad, alta viscosidad, conductividad iónica, baja volatilidad y biocompatibilidad. Los líquidos iónicos están compuestos en su totalidad por aniones y cationes, su punto de fusión es inferior a la temperatura ambiente y su conductividad puede llegar a  $100 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ . La amplia ventana de potencial que presentan es considerada una de las principales ventajas respecto a otros sistemas electroquímicos. No obstante, hasta la fecha existen relativamente pocos datos sobre la actividad enzimática de por ejemplo la óxido-reductasa en líquidos iónicos. Los electrodos modificados con líquidos iónicos se pueden dividir en cinco categorías principales: 1) electrodos modificados con gotas de líquido iónico o películas, 2) electrodos de película con líquidos iónicos como uno de los componentes, 3) electrodos de pasta de carbono con líquido iónico como un aglutinante, 4) nanotubos de carbón líquido y 5) electrodos modificados con líquidos iónicos anexados. Por supuesto, la presencia de líquidos iónicos afecta a los procesos y mecanismos internos, y otorgan numerosas posibilidades inexploradas hasta ahora para la electrocatalisis enzimática.

**Materiales compuestos:** aparte de todos los materiales mencionados, existen numerosos estudios basados en la combina-

ción de dos o más de ellos, obteniéndose resultados significativos en cuanto a propiedades físicas y químicas. Estos materiales resultantes, también conocidos como composites tienen la ventaja de combinar diferentes estructuras y propiedades tanto a escala macroscópica como microscópica. Existen tres combinaciones principales: compuestos de polímeros con carbón, nanomateriales y sol-gel; compuestos de carbón con nanomateriales y sol-gel; y compuestos de sol-gel con óxidos metálicos y nanopartículas. En general, la combinación de dos o más compuestos puede aportar nuevas propiedades a la inmovilización de la matriz, lo cual ayuda a soportar la actividad enzimática y mejora la estabilidad y las tasas de transferencia de electrones entre los electrodos.

#### *Nuevos materiales electródicos*

El importante avance en la mejora de las interfaces conductoras para transferencia de electrones biomoleculares se puede atribuir a los materiales de base carbonosa, especialmente los siguientes: el negro de carbón, los nanotubos de carbono y el grafeno<sup>9</sup>.

**Negro de carbón:** los nanomateriales de negro de carbón se suelen utilizar para fabricar electrodos funcionalizados con enzimas, ya que poseen características muy apropiadas para una interfaz biológica; es decir, una alta porosidad, área superficial y conductividad. Generalmente las moléculas de proteínas se adsorben en este tipo de materiales principalmente a través de interacciones hidrofóbico-hidrofílo: para favorecer la correcta orientación de la enzima redox, la interacción debe ocurrir lo suficientemente próxima para permitir la transferencia directa de electrones. En bibliografía hay numerosos ejemplos de este tipo de interacción, como es el caso de la inmovilización de hemoglobina en negro de carbón teniendo lugar posteriormente la oxidación directa y la reducción de la molécula hemo-hierro utilizando una voltametría cíclica<sup>16</sup>.

El negro de carbón es fácilmente modificable para obtener materiales compuestos, emulsiones de Teflon<sup>®</sup> y negro de carbón, materiales con carbón vítreo y partículas metálicas, etc. Cabe destacar que la combinación del polímero Teflon<sup>®</sup> y el negro de carbón proporciona una matriz con el apropiado equilibrio de propiedades hidrofóbicas-hidrofílo para producir una interfaz trifásica funcional "electrolito-carbón-aire" necesaria para la difusión de gas en los electrodos (GDE). La eficacia de la estructura del negro de carbón ha sido demostrada en el montaje de GDE, así como en recientes avances dentro del campo de las enzimas.

**Nanotubos de carbono:** el estudio de los nanotubos de carbono proporciona una nueva herramienta para la combinación de la interfaz de bionano, debido a las propiedades inherentes y la excelente conductividad. Todo ello proporciona una arquitectura bien adaptada a las pilas de combustible, sensores y dispositivos bioelectrónicos. Principalmente existen dos tipos de nanotubos, los de pared múltiple (MWNT, *multi-wall*

*nanotube*) y los de pared única (SWNT, *single-wall nanotube*). Además la funcionalización química de los nanotubos de carbono (por ejemplo añadiendo: aminas, carboxilo, grupos hidroxilo) puede mantener la alta conductividad y proporcionar uniones específicas para proteínas redox. Es importante mencionar que el hecho de anclar estratégicamente el nanotubo en la enzima, ofrece la oportunidad de aprovechar el resto de superficie de la proteína.

En la bibliografía es fácil encontrar ejemplos de materiales con nanotubos de carbono y nanotubos de carbono híbridos, actuando como bioelectrodos<sup>8,17</sup>. En algunas investigaciones se han utilizado nanotubos de carbono para aumentar el área superficial de los electrodos, para mejorar la conductividad de soportes porosos para la formación de biopelículas, o para aumentar la biocatálisis directa. El mecanismo de contacto más simple entre una proteína redox y un nanotubo de carbono resulta de la fisisorción mediante interacciones de van der Waals. Por otra parte, el método más común de funcionalización de este tipo de materiales electródicos es la oxidación química para producir grupos de ácido carboxílico en las zonas donde existan defectos en la superficie del nanotubo. Estos grupos carboxilo pueden ser posteriormente activados químicamente por la carbodiimida, que forma un éster inestable fácilmente reactivo con grupos amino, accesibles en la superficie de la proteína, formándose así enlaces covalentes. El enlace covalente estabiliza las interacciones y minimiza la distancia entre el proteína y la superficie del nanotubo de carbono.

**Grafeno:** el descubrimiento del grafeno y su aparición en la investigación, ha iniciado una transición hacia una tecnología basada en nanomateriales con importantes propiedades. Aunque todavía queda por determinar su evolución como material de electrodo, los estudios iniciales demuestran un gran potencial y unas características electroquímicas muy convincentes. Al igual que los nanotubos de carbono, el grafeno puede ser funcionalizado de manera covalente y no covalente, y esto no parece cambiar la conductividad intrínseca del grafeno<sup>18</sup>.

Algunos estudios han demostrado que la interacción del biopolímero quitosano con el grafeno facilita la formación de una película delgada en los electrodos<sup>19</sup>. La comparación entre estos bioelectrodos basados en grafeno con otros electrodos fabricados a partir de nanotubos de pared única (SWNT) que utilizaban glucosa oxidasa como catalizador en el ánodo y bilirrubina oxidasa como el catalizador de reducción de oxígeno en el cátodo, dio como resultado una mayor densidad de corriente.

#### **Conclusiones y recomendaciones**

En este documento se presentan de manera sencilla los diferentes tipos de biopilas de glucosa. Se hace una breve descripción tanto de la biopila abiótica como de la biopila enzimática. Se han presentado las principales características

que hacen de las biopilas enzimáticas las candidatas adecuadas para futuros trabajos, por sus ventajas en cuanto a implantación en organismos vivos. Posteriormente, se ha profundizado en los componentes y funcionamiento de la biopila enzimática. Se resalta que los dos puntos importantes a tener en cuenta son el sustrato carbonoso y la inmovilización de las enzimas para que ocurra la oxidación de la glucosa y reducción del oxígeno. Pueden, además, utilizarse dos sistemas de transferencia de electrones en la biopila: con mediador o directo.

### Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia e Innovación por la financiación recibida a través del Subprograma Torres-Quevedo del Programa Estatal de Promoción del Talento y su Empleabilidad 2013-2016 en el marco del proyecto Bio2 (PTQ-14-07145).

### Bibliografía

1. S Cosnier, A Le Goff, M Holzinger. Towards glucose biofuel cells implanted in human body for powering artificial organs: Review. **Electrochemistry Communications**, **38**, 19-23 (2014).
2. S Kerzenmacher, J Ducre, R Zengerle, F von Stetten. Energy harvesting by implantable abiotically catalyzed glucose fuel cells. **Journal of Power Sources**, **182**, 1–17 (2008).
3. MLB Rao, RF Drake. Studies of electrooxidation of dextrose in neutral media. **J. Electrochem. Soc.**, **116**, 334–337 (1969).
4. S-J Yao, A-J Appleby, A Geisel, H-R Cash, S-K Wolfson Jr. Anodic Oxidation of Carbohydrates and their Derivatives in Neutral Saline Solution. **Nature**, **224**, 921–922 (1969).
5. C Kçhler, L Bleck, M Frei, R Zengerle, S Kerzenmacher. Poisoning of Highly Porous Platinum Electrodes by Amino Acids and Tissue Fluid Constituents. **ChemElectroChem**, **2**, 1785–1793 (2015).
6. C Kçhler, L Bleck, M Frei, R Zengerle, S Kerzenmacher. Performance Loss of a Pt-Based Implantable Glucose Fuel Cell in Simulated Tissue and Cerebrospinal Fluids. **ChemElectroChem**, **1**, 1895–1900 (2014).
7. X Dominguez-Benetton S Sandipam, S Yamini, V Karolien, P Deepak. Enzymatic Electrosynthesis: An Overview on the Progress in Enzyme-Electrodes for the Production of Electricity, Fuels and Chemicals. **J. Microb. Biochem. Technol.**, **S6:007**, 1-20 (2013).
8. A Zebda, C Gondran, A Le Goff, M Holzinger, P Cinquin, S Cosnier. Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes. **Nature Communications**, **2**, 70 (2011). doi:10.1038/ncomms1365
9. SD Mintee, A Plamen, R Heather, R-Glenn. New materials for biological fuel cells. **Materials Today**, **15**, 166-173 (2012).
10. CV Domínguez. Inmovilización covalente y orientada de enzima lacasa para su uso como cátodo en pilas de combustible. Ph.D. Thesis, Universidad Autónoma de Madrid, España (2009).
11. C Gutiérrez-Sánchez. Diseño de estrategias de inmovilización orientada y estable de metaloenzimas redox sobre electrodos nanoestructurados. Ph.D. Thesis, Universidad Autónoma de Madrid, España (2012).
12. I Ivanov, T Vidaković-Koch, K Sundmacher. Recent Advances in Enzymatic Fuel Cells: Experiments and Modeling. **Energies**, **3**, 803-846 (2010).
13. R Wilson, APF Turner. Glucose oxidase: an ideal enzyme. **Biosens. Bioelectron.**, **7**, 165-185 (1992).
14. G Franken, A Hohnen, S Lemmens, F Sherry, B Visser, U Zeitler. Improving CMC electrodes for use in enzymatic fuel cells. Honorus Programme, Radboud University Nijmegen (2014).
15. P Atanassov, C Apblett, S Banta, S Brozik, S Calabrese Barton, M Cooney, B Yann Liaw, S Mukerjee, SD Minteer. Enzymatic Biofuel Cells. **ECS Interface**, **16**, 28-31 (2007).
16. GX Ma, TH Lu, YY Xia. Direct electrochemistry and bio-electrocatalysis of hemoglobin immobilized on carbon black. **Bioelectrochemistry**, **71**, 180–185 (2007).
17. B Chan Kim, I Lee, SJ Kwon, Y Wee, KY Kwon, C Jeon, HJ An, HT Jung, S Ha, JS Dordick, J Kim. Fabrication of enzyme-based coatings on intact multi-walled carbon nanotubes as highly effective electrodes in biofuel cells. **Scientific Reports**, **7**, Article Number 40202 (2017).
18. KS Mali, J Greenwood, J Adisojoso, R Phillipson, S De Feyter. Nanostructuring graphene for controlled and reproducible functionalization. **Nanoscale**, **7**, 1566–1585 (2015).
19. C Shan, H Yang, D Han, Q Zhang, A Ivaska, Li Niu. Graphene/AuNPs/chitosan nanocomposites film for glucose biosensing. **Biosens. Bioelectron.**, **25**, 1070–1074 (2010).