

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS

“Evaluación de electrodos de fieltro de carbón modificados superficialmente para la generación de energía eléctrica en celdas de combustible microbianas”

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN QUÍMICA

ELABORADO POR

SANDY LUZ CALDERON ZAVALETA

ASESOR

Dr. ADOLFO LA ROSA TORO GÓMEZ

LIMA – PERÚ

2018

**A mis padres,
A mis hermanos**

Agradecimientos

Agradezco a mi asesor Dr. Adolfo La Rosa Toro, por haber confiado en mí para la realización de este proyecto de investigación que tiene a cargo y por estar guiándome durante todo el proceso y la culminación del mismo.

A la Dra. Angélica Baena Moncada y a la Lic. Pilar García por el apoyo constante, los consejos y la paciencia que tuvieron conmigo durante la investigación.

Al Laboratorio de Química Analítica e Instrumental de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería, bajo la dirección del Dr. Hugo Alarcón, quienes apoyaron con algunos materiales, especialmente a la Sra. Rebeca Cruz y por la ayuda brindada de Alejandro Aranda durante las caracterizaciones por Espectrofotometría Ultravioleta-Visible y Dispersión de luz dinámica.

A la Dra. María Quintana y el Lic. Clemente Luyo por el apoyo durante el análisis por Microscopía Electrónica de Barrido.

A los grandes amigos que conocí durante esta etapa y su muy valioso apoyo Raysa Pillpe, Andy Cárdenas, Diego Vergaray, Anthony Cornejo y Edgar Iman.

Al grupo de Investigación de Electroquímica Aplicada quienes a través del apoyo de sus integrantes facilitaron la investigación e hicieron más ameno mi estancia en el laboratorio.

Finalmente, quisiera agradecer a FONDECYT y CIENCIACTIVA-CONCYTEC que brindaron el soporte económico del proyecto y permitieron la presentación de este trabajo en el XXII Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Electroquímica (SIBAE 2016) y Facultad de Ciencias de la UNI por su apoyo en la infraestructura.

Resumen

Una celda de combustible microbiana (CCM) es un dispositivo que utiliza microorganismos para convertir energía química en energía eléctrica. Ciertos microorganismos como las bacterias durante sus procesos metabólicos producen electrones que pueden ser captados por un electrodo (ánodo) y ser transferidos hacia el cátodo produciéndose de esta manera una potencia. En este trabajo los biocatalizadores empleados en la generación de energía se obtuvieron a partir de una cepa aislada de *Shewanella putrefaciens*. Se comparó cuatro sustratos: agua residual sintética (ARS), Luria Bertani (LB), Agua extraída de lodos de CITRAR-UNI y caldo de pescado (chilcano). En los análisis realizados se utilizó como ánodo y cátodo carbón fieltro conductor, unidos por un circuito externo de material de cobre y una resistencia externa de 1000 Ω .

Se comparó la potencia generada por cinco tipos de modificaciones de la superficie carbonosa del ánodo. La primera modificación se llevó a cabo a través del autoensamblado capa por capa de nanopartículas de oro (AuNPs) utilizando polielectrólito de carga positiva cloruro de polidialildimetilamonio (PDADMAC). En la segunda modificación, se sintetizaron directamente las nanopartículas sobre el electrodo a través del método de electrodeposición; también se modificó la superficie carbonosa con el polímero conductor polianilina (PANI) utilizando el método de polimerización de 0.1 mol L⁻¹ anilina en medio de 0.3 mol L⁻¹ de ácido oxálico y ácido sulfúrico. Además, se depositó en la superficie del fieltro nanotubos de carbón de pared múltiple (AuNPs-MWCNT) y por último se realizó un compuesto de polianilina y nanotubos de carbón (MWCNT/PANI) a través de la polimerización a pH ácido. Las superficies de los electrodos se caracterizaron por Voltametría Cíclica, Espectroscopia Raman y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Una vez formado el biofilm se monitorió la generación de electricidad durante 750 horas en el ánodo de la CCM. Los resultados muestran una mayor densidad de potencia para el electrodo modificado con nanotubos de carbón de pared múltiple que contienen nanopartículas de oro, obteniéndose 118.2 mW m⁻² y 80.7 mW m⁻² en Luria Bertani y Agua residual sintética (ARS) respectivamente.

De los resultados obtenidos se puede concluir que el aumento de la conductividad y biocompatibilidad del electrodo producida por las nanopartículas de oro es un factor importante para la obtención de mayores porcentajes de potencia eléctrica.

Abstract

A microbial fuel cell (MFC) is a device that uses microorganisms to convert chemical into electrical energy. Certain microorganisms such as bacteria during their metabolic processes produce electrons that can be picked up by an electrode (anode) and transferred to the cathode producing a power. In this work the biocatalysts used in the generation of energy were obtained from an isolated species of *Shewanella putrefaciens*. Four substrates were compared: Synthetic waste water (ARS), Luria Bertani (LB), Water extracted from sludge (CITRAR-UNI) and fish broth (chilcano). In the analyzes, conductive felt carbon as anode and cathode were used, connected by an external circuit of copper material and an external resistance of 1000Ω . The power generated by five types of modifications of the carbonaceous surface of the anode was compared. The first modification was carried out through the self-assembly layer by layer of gold nanoparticles (AuNPs) using polyelectrolyte positively charged polydiallyldimethylammonium chloride (PDADMAC). In the second modification, the nanoparticles were synthesized directly on the electrode through the electrodeposition method; the carbonaceous surface was also modified with the polyaniline conducting polymer (PANI) using the polymerization method with 0.1 mol L^{-1} aniline, 0.3 mol L^{-1} oxalic acid in sulfuric acid medium. In addition, multiple wall carbon nanotubes (AuNPs-MWCNT) were deposited on the felt surface and finally a composite of polyaniline and carbon nanotubes (MWCNT/PANI) was made through polymerization at an adjusted pH 3. The surfaces of the electrodes were characterized by Cyclic Voltammetry, Raman Spectroscopy and Scanning Electron Microscopy (SEM). Once the biofilm was formed, electricity generation was monitored for 750 hours at the anode of the MFC. The results show a higher power density for the electrode with multiple wall carbon nanotubes in two types of substrate, obtaining 118.2 mW m^{-2} and 80.7 mW m^{-2} in Luria Bertani and synthetic residual water (ARS) respectively. From the results obtained it can be concluded that the increase of the surface of the electrode is an important factor for obtaining greater percentages of electrical power.

Índice

PRÓLOGO.....	xiii
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	
1.1 Introducción	2
1.2 Planteamiento del problema y justificación	3
1.3 Hipótesis.....	4
1.4 Objetivos	5
CAPÍTULO II. FUNDAMENTACION TEÓRICA	
2.1 La celda de combustible microbiana y su arquitectura	7
2.2 Desempeño eléctrico en una celda de combustible microbiana.....	8
2.3 Resistencia interna y externa.....	10
2.4 Electrodo.....	11
2.5 Membrana de separación.....	11
2.6 Microorganismos en celda de combustible microbiana	12
2.6.1 <i>Shewanella putrefaciens</i>	13
2.6.2 Transferencia extracelular de electrones	14
2.7 Sustrato.....	16
2.8 Materiales de los electrodos	18
2.8.1 Filtro de carbón.....	19
2.9 Modificación superficial del ánodo.....	21
2.9.1 Modificación por tratamiento térmico.....	21
2.9.2 Modificación con nanomateriales	21
2.9.2.1 Nanotubos de carbón	22
2.9.3 Modificación con polímeros.....	23
2.9.3.1 Polianilina (PANI).....	23
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	
3.1 Población y muestra.....	27
3.2 Materiales.....	27
3.2.1 Materiales.....	27
3.2.2 Equipos.....	28
3.2.3 Reactivos	28
3.3 Metodología del proceso de cultivo de bacterias	29
3.3.1 Crecimiento bacteriano <i>Shewanella putrefaciens</i>	29
3.3.2 Metodología para el recuento de bacterias.....	29
3.4 Protocolo de limpieza de materiales	30
3.5 Metodología para la funcionalización de las superficies de electrodos ...	31
3.5.1 Procedimiento de autoensamblado capa por capa.....	31
3.5.2 Procedimiento de polimerización con polianilina.....	33
3.6 Métodos de caracterización para sistemas bioelectroquímicos.....	33
3.6.1 Principios Electroquímicos	33
3.6.2 Voltametría Cíclica.....	35

3.6.3 Cronoamperometría.....	36
3.7 Métodos de análisis y caracterización de superficies.....	36
3.7.1 Espectroscopia Raman	36
3.7.1.1 Proceso de dispersión Raman.....	36
3.7.1.2 Espectroscopia SERS	38
3.7.1.3 Amplificación química	39
3.7.1.4 Amplificación de campo electromagnético	39
3.7.2 Microscopía Electrónica de Barrido.....	39

CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1 Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro (AuNPs).....	41
4.1.1 Electrólisis de lámina de oro	41
4.1.2 Síntesis de nanopartículas	42
4.1.3 Caracterización de nanopartículas de oro.....	42
4.1.3.1 Método espectrofotométrico Ultravioleta-Visible.....	42
4.1.3.2 Dispersión de Luz dinámica (DLS).....	43
4.2 Modificación de la superficie de electrodo de fieltro de carbón.....	46
4.2.1 Voltametría cíclica a electrodo de oro.....	46
4.2.2 Autoensamblado capa por capa.....	47
4.2.2.1 Autoensamblado capa por capa {AuNPs /PDADMAC} ₃ /GC	47
4.2.2.2 Autoensamblado capa por capa AuNPs/PDADMAC} ₃ /fieltro	48
4.2.2.3 Autoensamblado capa por capa {AuNPs/PDADMAC} ₃ /MWCNT	51
4.2.3 Electrodeposición de AuNPs.....	53
4.2.3.1 Electrodeposición de AuNPs sobre GC.....	53
4.2.3.2 Electrodeposición de AuNPs sobre fieltro de carbón.	54
4.2.4 Modificación con polímeros.....	55
4.2.4.1 Electropolimerización de película de PANI sobre alambre de Pt.....	55
4.2.4.2 Electropolimerización de película PANI sobre fieltro de carbón.	60
4.2.5 Modificación con compositos	60
4.2.5.1 Preparación de AuNPs-MWCNT/película PANI sobre Pt y fieltro de carbón.	60
4.2.6 Caracterización superficial a electrodos modificados por Microscopía Electrónica de Barrido.....	67
4.3 Preparación de medios de cultivo y ensamblado de celda de combustible microbiana.....	69
4.3.1 Medios de cultivo bacteriano	69
4.3.2 Ensamblado de celda de combustible microbiana.....	70
4.3.2.1 Condiciones de funcionamiento	70
4.3.2.2 Medidas eléctricas	71
4.4 Caracterización de electrodos con Biofilm microbiano.....	72
4.4.1 Microscopía electrónica de barrido.....	72

4.4.2 Voltametría Cíclica.....	74
4.4.3 Espectroscopia Raman de intensidad magnificada (SERS).....	76
4.4.3.1 Preparación bacteriana de <i>S. putrefaciens</i>	76
4.4.3.2 Caracterización por Espectroscopia Raman a muestra aislada de <i>S. putrefaciens</i>	76
4.4.3.3 Caracterización por Espectroscopia Raman a bioelectrodo.....	78
4.4.4 Control de supervivencia de bacterias por conteo en placa.....	79
4.5 Evaluación de potencial generado en celdas de combustible microbianas.....	82
4.5.1 Cálculo del área superficial de electrodos modificados.....	82
4.5.2 Potencial eléctrico en celdas.....	83
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	87
CONCLUSIONES	94
RECOMENDACIONES.....	94
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
ANEXOS	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Celda de combustible microbiana.

Figura 2. Materiales de carbono tradicionales utilizados como ánodos en celdas de combustible microbianas (MFC).

Figura 3. **A:** nanotubos de carbón de una pared y **B:** nanotubo de carbón de pared múltiple, se muestra dimensiones típicas de longitud, anchura y la separación entre tubos en los nanotubos de carbón.

Figura 4. Estructuras de la polianilina de las unidades de reducción y oxidación, polímero reducido (leucoemeraldina), polímero medio oxidado (emeraldina) y polímero completamente oxidado (pernigranilina).

Figura 5. Cambio de turbidez provocada por el crecimiento de *Shewanella putrefaciens* en agar nutritivo.

Figura 6. Método de diluciones sucesivas y vertido en placas.

Figura 7. Representación esquemática de la adsorción de moléculas bipolares sobre una superficie cargada. Adsorción plana **A**, adsorción como un bucle **B** y adsorción deseada **C**.

Figura 8. Proceso de autoensamblado capa por capa al sumergir polianión paso (1) y polication paso (3) y sus respectivos enjuagados de la muestra en los pasos (2) y (4).

Figura 9. Esquema del proceso de transferencia de masa por difusión en la superficie del electrodo.

Figura 10. Esquema de la transición de Rayleigh, Stoke y antistoke.

Figura 11. Esquema básico para la dispersión Raman de superficie mejorada utilizando coloides de nanopartículas metálicas.

Figura 12. Electrólisis de oro en una celda electroquímica.

Figura 13. Síntesis de nanopartículas de oro reducidas con NaBH_4 y con cubierta de tirosina.

Figura 14. Espectro de absorción UV-Vis para las AuNPs.

Figura 15. Representación del tamaño de NP y polidispersión de datos obtenidos en el analizador de partículas (Light Scattering). Nanopartículas Rojo-rubí con cubierta de tirosina. pH 9.5.

Figura 16. Representación del tamaño de NP y polidispersión de datos obtenidos en el analizador de partículas (Light Scattering). Nanopartículas morado sin tirosina. pH 9.5.

Figura 17. Representación del tamaño de NP y polidispersión de datos obtenidos en el analizador de partículas (Light Scattering). Nanopartículas azuladas. pH 10.

Figura 18. Voltagrama cíclico de Platino policristalino en una solución acuosa de H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} , a una velocidad de barrido de 20 mV s^{-1} vs $\text{Ag/AgCl/KCl}(\text{sat})$.

Figura 19. Voltagrama cíclico de electrodo de oro en una solución acuosa de H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} , a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} vs $\text{Ag/AgCl/KCl}(\text{sat})$

Figura 20. Voltagrama cíclico de electrodo de carbón vítreo modificado con nanopartículas de oro en una solución acuosa de H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} , a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} vs $\text{Ag/AgCl/KCl}(\text{sat})$.

Figura 21. Voltagrama cíclico de electrodo fieltro de carbón autoensamblado con nanopartículas de oro 3 y 6 capas, en una solución acuosa de H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} , a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} vs $\text{Ag/AgCl/KCl}(\text{sat})$.

Figura 22. Voltagrama cíclico de electrodo fieltro de carbón activado con $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-HNO}_3$ y modificado superficialmente con nanopartículas de oro en una solución acuosa de H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} , a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} vs Ag/AgCl/KCl(sat) .

Figura 23. Voltagrama cíclico de fieltro de carbón autoensamblado con nanopartículas de oro. Solución acuosa equimolar de $\text{Fe(CN)}_6^{4-}\text{-Fe(CN)}_6^{3-}/\text{KCl}(0.1 \text{ mol L}^{-1})$ a 10 mmol L^{-1} , a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} vs Ag/AgCl/KCl(sat) .

Figura 24. Voltagrama cíclico de nanotubos de carbón autoensamblados con AuNPs y soportados sobre carbón vítreo. En solución acuosa de H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} , a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} vs Ag/AgCl/KCl(sat) .

Figura 25. Voltagrama cíclico de nanotubos de carbón y nanopartículas de oro ensamblados en nanotubos de carbón soportados sobre fieltro. Solución acuosa equimolar a 10 mmol L^{-1} de $\text{Fe(CN)}_6^{4-}\text{-Fe(CN)}_6^{3-}/\text{KCl}(0.1 \text{ mol L}^{-1})$, a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} vs $\text{Ag/AgCl/ KCl (sat)}$.

Figura 26. Voltagrama cíclico de AuNPs electrodepositadas sobre un electrodo de carbón vítreo en una solución acuosa de H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} ; a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} vs Ag/AgCl/KCl (sat) .

Figura 27. Voltagrama cíclico de fieltro de carbón activado y sin activar ambos con AuNPs electrodeposición. Solución acuosa equimolar a 10 mmol L^{-1} de $\text{Fe(II)-Fe(III)/KCl (0.1 mol L}^{-1})$, a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} vs $\text{Ag/AgCl/ KCl (sat)}$.

Figura 28. Voltagrama cíclico de polimerización electroquímica de 0.1 mol L^{-1} de anilina sobre electrodo de Pt en una solución acuosa de H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} y ácido oxálico, a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} vs Ag/AgCl/KCl (sat) .

Figura 29. Voltagrama cíclico de polimerización electroquímica de 0.1 mol L^{-1} de anilina sobre electrodo de Pt en una solución acuosa de H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} y ácido tartárico, a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} vs Ag/AgCl .

Figura 30. Espectro Raman colectados con láser y objetivo de $10\times$ para polimerización electroquímica de 0.1 mol L^{-1} de anilina y ácido oxálico sobre electrodo de Pt.

Figura 31. Preparación de composito a través de un baño ultrasónico del electrodo con polianilina en una dispersión de nanotubos de carbón en medio HCl.

Figura 32. Voltagrama cíclico de composito de nanotubos de carbón y anilina electropolimerizada sobre electrodo de Pt en una solución acuosa de H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} y ácido oxálico, a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} vs Ag/AgCl/KCl(sat) .

Figura 33: Interacción tipo $\pi\text{-}\pi$ entre los nanotubos de carbón y la polianilina.

Figura 34. Voltagrama cíclico de composito de nanotubos de carbón y anilina electropolimerizada sobre electrodo de Pt en una solución acuosa equimolar a 10 mmol L^{-1} de $\text{Fe(CN)}_6^{4-}\text{-Fe(CN)}_6^{3-}/\text{KCl}(0.1 \text{ mol L}^{-1})$, a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} vs Ag/AgCl/KCl(sat) .

Figura 35. Espectro Raman colectados con láser de 785 nm y objetivo de $10\times$ para polimerización electroquímica de 0.1 mol L^{-1} de anilina y ácido oxálico sobre electrodo de Pt.

Figura 36. Voltagrama cíclico de composito de nanotubos de carbón y anilina electropolimerizada sobre electrodo de fieltro de carbón en una solución acuosa de H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} y ácido oxálico, a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} vs Ag/AgCl/KCl(sat) .

Figura 37. Voltagrama cíclico de composito de nanotubos de carbón y anilina electropolimerizada sobre electrodo de fieltro de carbón en una solución acuosa de $\text{Fe(CN)}_6^{4-}\text{-Fe(CN)}_6^{3-}/\text{KCl}(0.1 \text{ mol L}^{-1})$ en 10 mmol L^{-1} , a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} vs Ag/AgCl/KCl(sat) .

Figura 38. Espectro Raman colectados con láser de 785 nm y objetivo de 10x para polimerización electroquímica de 0.1 mol L⁻¹ de anilina y ácido oxálico sobre electrodo de fieltro de carbón.

Figura 39. Imagen SEM de fieltro de carbón **A**, fieltro de carbón con nanotubos de carbono **B**, fieltro de carbón con compuesto de nanotubos y polianilina **C** y **D**.

Figura 40. Espectrograma EDX de fieltro modificado con nanotubos de carbono y polianilina.

Figura 41. Tubos con cepa de *Shewanella putrefaciens* en agar nutritivo (**A**). Técnica de siembra por agotamiento en placa (**B**).

Figura 42. Celdas de combustible microbianas con bacterias *Shewanella putrefaciens* en condiciones aeróbicas.

Figura 43. Imagen Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de electrodos de fieltro de carbón en la celda microbiana con agua residual sintética. Filtro limpio **A**, fieltro con nanotubos de carbono en celda en funcionamiento **B** y fibra de fieltro con un aparente crecimiento de biofilm bacteriano **C**.

Figura 44. Imagen SEM. Bacteria aislada de *Shewanella putrefaciens* crecida sobre filtros modificados con nanotubos de carbono.

Figura 45. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de electrodos de fieltro de carbón en la celda microbiana en Luria Bertani. Arriba: fieltro limpio. Abajo: fibras de filtros con un aparente crecimiento de biofilm bacteriano.

Figura 46. Voltagrama cíclico de electrodo de fieltro de carbón con aparente biofilm de *Shewanella putrefaciens* en celda en funcionamiento con agua residual sintética, velocidad de barrido de 1 mV s⁻¹ vs Ag/AgCl/KCl(sat).

Figura 47. Voltagrama cíclico de electrodo de MWCNT/fieltro de carbón con aparente biofilm de *Shewanella putrefaciens* en celda en funcionamiento (10 días) con Luria Bertani a una velocidad de barrido de 1 mV s⁻¹ vs Ag/AgCl.

Figura 48. Espectro SERS muestra aislada *Shewanella putrefaciens* colectados con láser de 638 nm y un objetivo de 50x.

Figura 49. Espectro Raman de *Shewanella putrefaciens* sobre electrodos filtros de carbón colectados con láser de 638 nm y un objetivo de 50x.

Figura 50. Desempeño de potencial en el tiempo en medio Agua residual sintética para electrodos autoensamblados con nanopartículas de oro, nanopartículas de oro electrodepositados, nanotubos sobre fieltro y fieltro sin modificar como referencia.

Figura 51. Desempeño de potencial en el tiempo en Luria Bertani para electrodos autoensamblados con nanopartículas de oro, nanopartículas de oro electrodepositados, nanotubos sobre fieltro.

Figura 52. Desempeño de potencial en el tiempo en Luria Bertani para filtros modificados con polianilina, compuesto de nanotubos-polianilina y fieltro de referencia.

Figura 53. Desempeño de potencial en el tiempo en Agua residual sintética (ARS) para filtros modificados con polianilina, compuesto de nanotubos-polianilina y fieltro de referencia.

Figura 54. Desempeño de potencial en el tiempo en caldo de pescado (chilcano) para filtros modificados con polianilina, compuesto de nanotubos-polianilina y fieltro de referencia.

Figura 55. Desempeño de potencial en el tiempo en agua extraída de lodos para filtros modificados con polianilina, compuesto de nanotubos-polianilina y fieltro de referencia.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Desarrollo de una celda de combustible microbiana usando diferentes monosacáridos.

Tabla 2. Principales variables consideradas en celdas de combustible microbiana generadoras de potenciales representativos.

Tabla 3. Calculo de la cantidad de masa presente en las modificaciones con nanopartículas de oro.

Tabla 4. Estructuras de las bandas principales (cm^{-1}) para el espectro Raman de electropolimerización de electrodo de platino con anilina.

Tabla 5. Estructuras de las bandas principales (cm^{-1}) para el espectro Raman de compuesto de nanotubos de carbón y electropolimerización con anilina de electrodo de platino.

Tabla 6. Estructuras de las bandas principales (cm^{-1}) para el espectro Raman de compuesto de nanotubos de carbón y electropolimerización con anilina de electrodo de platino.

Tabla 7. Estructuras de las bandas principales (cm^{-1}) para el espectro Raman de muestra de *Shewanella putrefaciens*.

Tabla 8. Estructuras de las bandas principales (cm^{-1}) para el espectro Raman de electrodos en celda de combustible, medio agua residual sintética.

Tabla 9. Valores de unidades formadoras de colonias antes y después de alimentar a las bacterias para cada medio de cultivo.

Tabla 10. Identificación de bacterias en agua residuales pertenecientes al Centro de Investigación en Tratamiento de Aguas Residuales (CITRAR-UNI), a una concentración de 10^8 UFC.

Tabla 11. Valores de área real de electrodos modificados y sin modificar en referencia a electrodo de carbón vítreo.

Tabla 12. Desempeño obtenido para las diferentes modificaciones al electrodo del ánodo y variaciones en el sustrato.

Tabla 13. Comparación del desempeño de diferentes estudios realizados similares a la investigación presentada.

Prólogo

El presente trabajo, es un estudio del funcionamiento del ánodo en una celda de combustible a base de microorganismos que generan energía eléctrica. Se realiza la comparación de la densidad de potencia para diferentes modificaciones de la superficie del electrodo en cuatro diferentes sustratos que contienen bacterias.

El siguiente informe está dividido en cuatro capítulos: en el primero se plantea el problema y la justificación de la investigación realizada, incluyendo la delimitación de la investigación y las limitaciones en el proceso. Así mismo, se plantea los objetivos de la tesis.

El segundo capítulo, es una revisión de la bibliografía sobre los diseños de la celda de combustible y las distintas modificaciones que se han realizado.

El tercer capítulo, se centra en la explicación de la metodología empleada así como la descripción de los métodos de caracterización con una breve justificación de su uso.

El cuarto capítulo, está dedicado a las síntesis y procedimiento experimental, además contiene los resultados de cada caracterización y su respectiva explicación y tratamiento de resultados.

En el último capítulo, se realiza una explicación global considerando los resultados preliminares. Y la parte final contiene las conclusiones a las que se llegó.

En su parte final, se ha incluido algunas recomendaciones para próximos estudios relacionados a este trabajo además, se ha colocado una lista de toda la bibliografía utilizada que incluye libros y artículos. Finalmente, en los anexos se puede encontrar algunos ejemplos de cálculos desarrollados en forma detallada.

Capítulo I

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 INTRODUCCIÓN

El problema de recursos energéticos en zonas rurales incluidas la Selva de nuestro país requiere nuestra atención ya que debido a su ubicación geográfica y la situación económica que se encuentran, las necesidades de servicio de redes eléctricas no pueden ser cubiertas. Esto trae como consecuencia que dichas poblaciones tengan problemas de inserción a la sociedad del conocimiento debido a que no tienen acceso a internet, comunicación telefónica, entre otros. En la actualidad, se está investigando sobre la fabricación de dispositivos de celdas que pueden utilizarse como sensores que miden la demanda química de oxígeno, tratamiento de agua residual, almacenamiento de hidrógeno y generación de energía eléctrica. Por tanto, es conveniente desarrollar la investigación sobre estos tipos de dispositivos versátiles que permitan solucionar problemas de contaminación y de energía eléctrica simultáneamente. De esta manera, la propuesta de esta investigación es desarrollar una celda de combustible microbiana de fácil portabilidad y bajo costo operacional como solución al problema presentado. Mediante el uso de una celda de combustible microbiana (CCM) compuesta por dos electrodos, materia orgánica y una solución con bacterias es posible generar energía eléctrica para alimentar computadoras, cargar celulares, iluminación artificial, etc, de manera continua. Esta generación de energía eléctrica se da a través de la transferencia directa de electrones de las bacterias hacia los electrodos. La capacidad de los microorganismos para generar un potencial electroquímico es de origen natural en varias especies microbianas y las bacterias conocidas por tener esta capacidad son denominadas exoelectrogénicas ya que tienden a formar biopelículas electroquímicamente activas sobre los electrodos (en particular los ánodos). Desde luego, el costo que implica poner en funcionamiento este tipo de celdas podría ser alto considerando la materia orgánica que se debe suministrar. Sin embargo, se puede aprovechar materia orgánica de aguas residuales por su contenido en desechos orgánicos domésticos e industriales, desechos inorgánicos, desechos producidos de efluentes agrícolas, compuestos formados en el tratamiento de agua, etc; y bacterias que crecen en estos desechos. Por tanto, la implementación de aguas residuales a este tipo de dispositivos puede generar en simultáneo energía eléctrica y remediación de las aguas de manera natural, esto significaría una disminución en los costos que implica el tratamiento de aguas residuales y enfocándonos en la problemática eléctrica actual un bajo consumo de combustibles fósiles que son una fuente de energía agotable que genera contaminación porque producen gases de efecto invernadero del tipo NO_x , SO_x .

Considerando estudios actuales, no todas las configuraciones de estos dispositivos de celdas generaron un alto potencial. En este sentido, se está investigando la forma de generar un alto potencial eléctrico a través de la modificación superficial de los

electrodos que facilite una mayor transferencia de electrones hacia el ánodo y que resulte ser prometedora para su utilización en zonas rurales de la Selva.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

A pesar de los avances tecnológicos la necesidad de energía eléctrica aún sigue siendo un problema en muchas regiones de nuestro país, las cifras muestran que tres millones de personas de las zonas rurales del Perú no cuentan con servicio eléctrico. De acuerdo a la última Encuesta Nacional de Hogares realizado por el Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI) con respecto al servicio de alumbrado del hogar se alcanzan porcentajes superiores al 90 % en el uso de electricidad para este fin, de este porcentaje tan solo el 63.7 % del área rural hace uso de la fuente eléctrica y por el contrario el kerosene es muy importante para el alumbrado de los hogares rurales ya que el 36.3 % de ellos lo usan mientras que es casi inexistente en el alumbrado de las ciudades de la capital como puede suponerse ¹. Por dominios territoriales el mayor porcentaje en el uso de alumbrado eléctrico lo muestra Lima Metropolitana (99 %) y la costa sur (89.5 %), en tanto que el mayor uso del kerosene se registra en la Selva (44.5 %) y en la Costa Norte (44.3 %) ¹.

Estos valores hacen notar que casi un 37 % de la población rural para satisfacer su necesidad de energía está utilizando carbón para cocinar y para iluminarse velas o mecheros los cuales emiten humos contaminantes, lo que produce mayor contaminación y genera enfermedades respiratorias a largo plazo. A pesar que comparando con cifras de años anteriores la población con energía rural ha ido aumentando, aún hay poblaciones alejadas que no cuentan con el servicio. Esta escasez de energía eléctrica afecta tanto a colegios, postas, comisarías y otras instituciones que deben contar necesariamente con este servicio lo que genera problemas de distinto índole y un atraso en la inserción de estas poblaciones a la sociedad actual.

Por tanto, como respuesta a esta problemática se requiere investigar sobre fuentes alternativas que produzcan energía pero que no generen algún impacto sobre el medio ambiente por el contrario que la reduzcan y que sean de bajo costo operacional. En este sentido, en los últimos años se han ido proponiendo soluciones, en tanto que entre las propuestas vigentes se encuentran: la generación de energía limpia autosostenible a través del proyecto Ilumina La Selva, la cual busca beneficiar a la comunidad de Saposoa, y además tiene como objetivos satisfacer las necesidades urgentes de carencia de iluminación nocturna y doméstica ². Por otro lado el proyecto “Energía, Desarrollo y vida” (EnDev) que se encuentra estudiando una propuesta de solución

sobre el tema junto a la Agencia Alemana de Cooperación/ Giz Perú, la Organización Panamericana de la Salud, el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD) y el Reino de los Países Bajos ³. Aunando a estos proyectos que se están llevando a cabo, en la siguiente investigación se desarrollará un estudio preliminar sobre el diseño de una celda de combustible microbiana como una posible propuesta viable a ser implementada en las zonas alejadas del país debido a su bajo costo operacional y su alta calidad a diferencia de la dificultad que existe y el elevado costo que implica colocar redes de distribución de energía eléctrica. De este modo el estudio contemplará específicamente la búsqueda de las condiciones favorables en el ánodo de una celda de combustible microbiana que permitirán obtener un potencial eléctrico espontáneo.

Las celdas de combustible microbianas constituyen una alternativa viable para la conversión de energía química a energía eléctrica mediante el uso de microorganismos que actúan como biocatalizadores sobre materia orgánica biodegradable. Adicionalmente, una celda de combustible puede convertir directamente un sustrato en energía produciendo 10 veces menos lodos que los tratamientos convencionales aerobios de aguas residuales que se enfrentan con altos gastos de capital, operacionales y de energía y de esta manera se está reduciendo el impacto ambiental generado por otras fuentes de energía como son los combustibles fósiles ⁴.

1.3 HIPÓTESIS

Las celdas de combustible microbianas (CCM) constituyen una alternativa energética, compatible con la preservación del medio ambiente. Sin embargo, el rendimiento energético es aún bajo, siendo la naturaleza de los electrodos un factor importante que puede contribuir a obtener mejoras significativas. El presente trabajo tiene el propósito de evaluar las modificaciones superficiales en los electrodos de fieltro de carbón incorporando nanopartículas de oro y nanotubos de carbón con el fin de optimizar la biocompatibilidad, conductividad e incrementar el área superficial de los electrodos para lograr el aumento del rendimiento energético de la CCM.

1.4 OBJETIVO GENERAL

Estudiar distintas modificaciones superficiales de electrodos de fieltro de carbón y comparar la potencia eléctrica que generan en el ánodo de una celda de combustible microbiana.

Objetivos Específicos

- Modificar superficialmente electrodos de fieltros de carbón con nanomateriales (nanopartículas de oro y nanotubos de carbón de pared múltiple).
- Modificar superficialmente electrodos de fieltro de carbón con polímero conductor polianilina y un composito de polianilina/nanotubos de carbón.
- Caracterizar los electrodos modificados por medios electr químicos y superficiales.
- Diseñar una celda de combustible microbiana.
- Caracterización del biofilm generado por *Shewanella putrefaciens* utilizando Microscopía electrónica de barrido (SEM), voltametría cíclica y Espectroscopia Raman.
- Medición del desempeño eléctrico de cada electrodo modificado.

Capítulo II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1 LA CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA Y SU ARQUITECTURA

La celda de combustible microbiana utiliza microorganismos para convertir la energía química presente en un sustrato en energía eléctrica, esto es posible cuando en la actividad metabólica de los microorganismos se producen electrones que son transferidos hacia el ánodo de la celda ⁵. El estudio de estas celdas ha tenido gran impacto en los últimos años, se ha ido probando la utilización de materia orgánica de aguas residuales como sustrato que permita hacer funcionar las celdas y simultáneamente conseguir la depuración de aguas contaminadas ^{6, 7, 8}.

Entre las aplicaciones tecnológicas más resaltantes de estas celdas se tiene el diseño del robot Eco Bot II que permite la realización de funciones de movimiento, censado, computación y comunicación. Los biosensores para medir la demanda biológica de oxígeno y el tratamiento de aguas residuales a pequeña escala para la eliminación de proteínas y otro tipo de compuestos químicos presentes en agua ⁵.

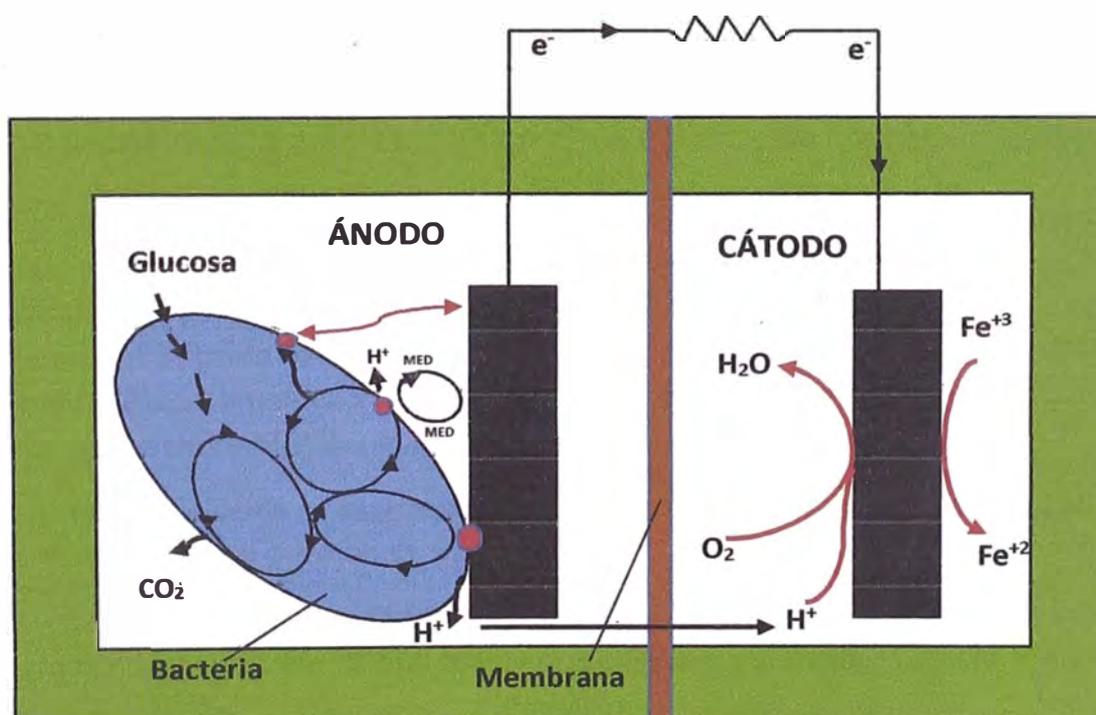


Figura 1: Celda de combustible microbiana

En relación a la arquitectura (Figura 1), la celda de combustible puede estar compuesta por una o dos cámaras. Las de una sola cámara evitan la necesidad de una membrana y así disminuye la resistencia que se puede generar en la interfase ánodo - cátodo, pero tiene como desventaja de cierta manera el espaciamiento entre electrodos; debido a que la cercanía del ánodo a los aceptores de electrones disminuye la eficiencia en la celda, como demuestra el trabajo realizado por Liu *et al.*, (2004), quienes evaluaron la generación de energía en una sola cámara en el tratamiento de aguas residuales, encontrando que solo un cierto porcentaje de materia orgánica removida en la celda

sirvió para generar energía eléctrica y el otro porcentaje de materia orgánica fue removido por otros procesos que no generaron electricidad ⁶. Prestigiacomo *et al.*, (2016), por su parte estudió diversos prototipos de celda, evaluando la eficiencia de la separación entre el ánodo y cátodo obteniéndose que a mayor aislamiento del ánodo se producía una menor intensidad de corriente ⁹. Estos estudios revelan que de cierta forma cada diseño muestra ventajas y desventajas, por tanto la utilización de cada diseño dependerá del estudio que se realice.

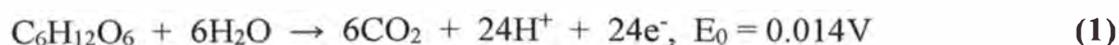
Por otro lado, la cámara anódica contiene sustratos orgánicos que al oxidarse por acción de los microorganismos generan electrones, protones y CO₂. Además las celdas se pueden fabricar en acrílico o en vidrio y para los electrodos se pueden utilizar diferentes materiales entre metales como el cobre, platino, o electrodos de carbón como el grafito, fibra de carbón, entre otros ¹⁰.

2.2 DESEMPEÑO ELÉCTRICO EN UNA CELDA DE COMBUSTIBLE

El desempeño eléctrico de una celda de combustible se estudia a partir de las mediciones de voltaje que se realizan en la resistencia externa conectada entre ánodo y cátodo. Los parámetros que se analizan para evaluar el comportamiento eléctrico son el potencial de celda, la densidad de potencia, la eficiencia coulombica que se relaciona con superficie y volumen y la resistencia interna que depende del diseño del sistema y como parámetro biológico analizado se tiene la carga orgánica del sustrato ¹¹.

El voltaje de la celda es determinado por la termodinámica de la reacción, la cinética electroquímica y el proceso de transporte.

De esta manera, considerando que en el ánodo de una celda de combustible está siendo operada con un sustrato de glucosa, la reacción que se llevará a cabo es la siguiente:



Entonces, el potencial real en la celda se escribiría como:

$$E_{\text{cell}} = \Delta E_e - |\eta_c, \text{activación}| - |\eta_a, \text{activación}| - IR - \eta_{\text{int}} \quad (2)$$

donde ΔE_e es la suma de los potenciales de equilibrio de las reacciones en el cátodo y ánodo, los términos η_a y η_c son los sobrepotenciales en ánodo y cátodo, η_{int} está relacionado al sobrepotencial de transporte de masa y el IR_{cell} es la suma de la caída de

voltaje óhmicos en el electrólito, la membrana, electrodos y en la conexión entre electrodos.

El potencial generado en el ánodo se puede calcular usando la siguiente ecuación de Nerst:

$$E_{\text{cel med}} = E_0 - \frac{RT}{nF} \ln Q \quad (3)$$

donde E_0 , R , T , Q son los potenciales de celda, la constante de los gases, la temperatura en Kelvin y la constante de actividad respectivamente.

La energía producida por el sistema electroquímico (teórico) puede ser calculada usando la ecuación de la energía libre de Gibbs:

$$\Delta G = -nFE_{\text{cell}} \quad (4)$$

Pero sin considerar el mecanismo específico de transferencia de electrones, los potenciales teóricos se definen de la misma manera que una celda química, la energía libre de Gibbs para el cambio químico y las condiciones específicas de operación a través de la ecuación de Nerst.

Los valores representativos que permite comparar el desempeño entre celdas son a través del cálculo de densidad de potencia la cual tiene unidades de W m^{-3} y puede ser expresada por unidad de volumen del electrodo anódico, la ecuación es la siguiente ⁴:

$$P_v = \frac{E_{\text{CCM}}^2}{V \times R_{\text{ext}}} \quad (5)$$

donde E_{CCM} es el voltaje medido, v volumen del ánodo y R_{ext} , resistencia externa.

También se puede calcular como potencia por unidad de área de sustrato ⁴:

$$P_A = \frac{E_{\text{CCM}}^2}{A_{\text{ánodo}} \times R_{\text{ext}}} \quad (6)$$

donde $A_{\text{ánodo}}$ es el área del ánodo. Y como último parámetro, se tiene la eficiencia de la celda que se calcula en base a la eficiencia coulombica que determina la cantidad de energía química de un sustrato convertido en electricidad, se representa por la siguiente ecuación ¹²:

$$E_c = \frac{C_{\text{exp}}}{C_{\text{teo}}} \times 100\% \quad (7)$$

Donde C_{exp} es el total de coulombs calculados al integrar la gráfica de corriente versus tiempo y C_t es la cantidad total de coulombs, calculada con la relación ¹²:

$$C_{teo} = \frac{nFCV}{\bar{M}} \quad (8)$$

De la ecuación se tiene F como la constante de Faraday, n número de electrones producidos, C concentración, V volumen del líquido en la celda y \bar{M} el peso molecular del sustrato.

2.3 RESISTENCIA INTERNA Y EXTERNA

Con relación a la resistencia interna este es un parámetro muy importante para caracterizar un generador de corriente como lo es una celda de combustible microbiana. La resistencia interna depende de la resistencia que existe entre electrolito y electrodos, también es considerado la resistencia de la membrana ya que la migración de protones influye en las pérdidas relacionadas a la resistencia y la unión entre ánodo y cátodo¹³. Además va a depender de la distancia entre electrodos, pero como los electrodos permanecen separados la misma distancia y las dimensiones de las celdas no varían, se considera más el efecto de los otros componentes. La resistencia interna se puede obtener a través de dos formas, por el análisis de las curvas de polarización que se derivan de las mediciones de voltaje en la resistencia externa (**Rismani-Yazdi et al., 2011**) o por la técnica de espectroscopia de impedancia calculando la resistencia a través de gráficas de Nyquist¹⁴.

La resistencia externa se utiliza para disipar la energía eléctrica cuando en una celda de combustible microbiana se opera independiente de una fuente, cuya función es controlar el flujo de electrones y cerrar el sistema¹⁵. Muchos trabajos demostraron que la disminución gradual en la resistencia externa mejora la eficiencia coulombica, otros trabajos adicionales demostraron que los cambios en la resistencia afectan no solo la generación de energía sino también la diversidad relativa de la comunidad microbiana. **Rismani-Yazdi et al., (2011)**, afirman que las diferencias en la resistencia externa en las celdas de combustible afectan la generación actual, el potencial del ánodo, la diversidad de bacterias, así como el metabolismo intermedio favoreciéndose la fermentación a altas resistencias utilizadas¹⁶. Una celda de combustible microbiana operado con una resistencia externa baja, es decir un potencial anódico alto, inicialmente genera una corriente baja y habrá una acumulación de biomasa, el resultado es una selección hacia aerobios y anaerobios facultativos; después tras el crecimiento del cultivo, la corriente se incrementara favoreciendo la selección de anaerobios facultativos. Cuando se utiliza una alta resistencia, el potencial anódico es bajo y se seleccionarán solo anaerobios facultativos¹³. La utilización inicial de una resistencia alta o baja depende claramente del inóculo. Ya que es necesario facilitar la

transferencia de electrones a las bacterias, es decir se debe favorecer la reducción en el electrodo, el ánodo debe tener inicialmente un potencial menor al de la bacteria.

2.4 ELECTRODOS

El diseño de la celda es un factor importante a considerar en el desempeño así como la forma del electrodo en la cámara anódica por ejemplo **Alzate-Gaviria *et al.* (2010)**, en uno de sus trabajos de investigación compararon dos celdas de combustible con diferente electrodo, colocando en una un electrodo de carbono plano y en el otro carbón granular, ambas conteniendo tinta de platino como catalizador ⁴. Sus resultados muestran una mayor producción de electrones en el electrodo de carbón granular que posee mayor área superficial, la conclusión de la investigación fue que la eficiencia radica en la utilización de electrodos con alto valor de área superficial o en su defecto, tratar la manera de que dichos electrodos puedan aumentar su área superficial, las formas que permiten el aumento del área de un electrodo son la modificación de superficie a través de una activación, la utilización de catalizadores metálicos o depósitos de materiales biocompatibles sobre el ánodo que serán detallados más adelante ⁴.

Otras investigaciones describen algunas condiciones que pueden mejorar el desempeño de la celda y entre estas variables se encuentra la salinidad del sustrato, ya que la concentración alta de sales puede inhibir la generación de energía ¹⁷. Además, utilizar un cierto tipo de membrana puede mejorar el desempeño eléctrico de cierta manera ¹⁴ y la variación del pH que puede en algunos casos empeorar la transferencia de electrones.

2.5 MEMBRANA DE SEPARACIÓN

La función de la membrana en una celda de combustible microbiana es separar las reacciones de ánodo y cátodo, evitar el transporte de oxígeno en la cámara anódica cuando se opera con una celda en condiciones anaeróbicas, y por último permitir el transporte selectivo de iones entre el ánodo y el cátodo principalmente de protones. Los requisitos más importantes para la elección de una membrana, es que estas sean de bajo costo, alta durabilidad y resistencia al ensuciamiento; teniendo en cuenta estos tres aspectos en la elección de la membrana se pueden generar sistemas económicamente viables ¹¹; sin embargo, hay diseños de celdas donde se intentaron omitir el uso de la membrana (**Liu *et al.*, 2004**), con la finalidad de disminuir la resistencia externa generados por la membrana, pero estos diseños generaron el envenenamiento del cátodo a largo plazo ⁶.

El separador puede ser de varios tipos: membrana de intercambio de cationes, membrana de intercambio de aniones, membrana bipolar, membrana de microfiltración, membrana de ultrafiltración, puente salino, fibra de vidrio, membrana porosa y otros materiales para filtrado ¹⁶. El separador más ampliamente utilizado en muchos trabajos de investigación ha sido la membrana de intercambio de protones y esta incluye una gama de productos diferentes con nombres comerciales como Nafión (Dupont), Flemion (Asahi Glass) y Aquivion (Solvay); entre ellas es muy común la Nafión de 112 que tiene alrededor de 50 micras de espesor y muestra una alta permeabilidad a los protones con una conductividad de 0.09 cm S^{-1} en agua líquida a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ y una resistencia de $0.1 \text{ } \Omega \text{ cm}^2$, por sus características resulta ser adecuada explica **Scott (2016)**, ya que otras membranas de más grosor producen mayor resistencia lo que ocasiona menor densidad de potencia y eficiencia ¹¹.

2.6 MICROORGANISMOS EN LA CELDA DE COMBUSTIBLE

Hasta ahora se ha mencionado diversos estudios donde utilizan únicamente bacterias en el ánodo de las celdas de combustible, pero eso no descarta que se puedan emplear también arqueas y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) ⁵. Con relación a la elección de las bacterias se suelen utilizar un cultivo de una especie microbiana o cultivos mixtos quienes en su mayoría son electroquímicamente activos y se caracterizan por transferir electrones directamente al ánodo. Entre todas las familias bacterianas, las dos ampliamente estudiadas son las bacterias Gram-negativas *Shewanellaceae* y *Geobacteraceae*. **Lovley et al., (2012)**, investigaron sobre los mecanismos de transferencia y la capacidad de oxidar los compuestos orgánicos, su investigación explica que puede darse de dos maneras (**Figura 1**): por transferencia directa de electrones a través de la membrana redox enzima o nanocables de las bacterias o por la transferencia de electrones mediada a través de sustancias redox de transporte que pueden ser metabolitos microbianos secundarios ¹⁸. Otras bacterias que no son de naturaleza conductiva también pueden ser utilizadas pero requieren de mediadores sintéticos de electrones. Entre los mediadores más usadas están los tintes y los metales orgánicos como rojo neutro, ferricianida de potasio, la 2-hidroxi-1,4-naftoquinona, entre otros; sin embargo los estudios revelaron inestabilidad química en estos mediadores y una cierta toxicidad para los microorganismos (**Du et al., 2007**) lo que resulta ser una limitación, pero la utilización de un mediador no siempre resultó ser una limitante, es así que para el caso de la especie *Shewanella oneidensis* la utilización del mediador hexacianoferrato de potasio según la bibliografía resultó ser eficaz en la transferencia de electrones con una mejora en la eficiencia coulombica ¹⁰.

En el caso de los cultivos mixtos las especies comunes encontradas en lodos anaeróbicos son la *Shewanella*, *Geobacter*, *Proteobacter* y *Pseudomonas* ⁵. **Richter et**

al., (2008), demostraron que no solo la generación de energía se lleva a cabo por el metabolismo bacteriano sino también por subproductos que se pueden generar en la fermentación, subproductos que son utilizados por otros microorganismos para la generación de corriente estableciéndose una interacción sintrófica (alimentación cruzada) de esta manera bacterias que inicialmente no jugaron un papel clave en la transferencia de electrones, ahora también intervienen ya que se alimentan de productos fermentativos generados ¹⁹.

Diversos estudios han demostrado que los cultivos mixtos generan densidades de corriente más grandes que aquellas de cultivos puros (**Rabaey *et al.*, 2003**), pero la principal ventaja de trabajar con cultivos puros es la de poder crear un modelo en común de cómo se llevaría a cabo la transferencia de electrones por tanto su importancia radica en que permite entender procesos complejos y de esta manera el estudio se podría extender a los cultivos mixtos, lo que permitiría identificar que bacterias producen la corriente eléctrica y quienes son inhibidoras de este proceso de transferencia ²⁰. Por tales circunstancias la celda de combustible en esta investigación utilizará una cepa específica de *Shewanella putrefaciens*.

2.6.1 *Shewanella putrefaciens*

El género *Shewanella* fue establecido en 1985 por MacDoneell y Colewell y nombrado en honor del Dr. J. Shewan por su trabajo en la microbiología de los peces. Taxonómicamente, la *Shewanella* son miembros del orden Alteromonadales, familia *Shewanellaceae* y de clase *Gammaproteobacteria*. Morfológicamente son bacilos Gram negativos, rectos o curvos y móviles por un solo flagelo. Se encuentra en el pescado congelado y alimentos proteicos. Algunas cepas se han encontrado en muestras clínicas, entre las principales especies se encuentra la *Shewanella putrefaciens*, su importancia en la industria alimenticia se debe a su papel en el deterioro de los alimentos congelados ricos en proteínas, almacenados y envasados a pH alto como el pescado, pollo y carne ²¹.

Para la familia *Shewanellaceae*, todos los que se consideran anaeróbios facultativos han sido estudiados por su comportamiento de transferencia de electrones extracelulares entre ellos: *S. oneidensis* MR-4, *Shewanella putrefaciens* W3-18-1, *S. putrefaciens* IR-1, *S. putrefaciens* SR-21, *Shewanella loihica* PV-4, entre otras ²².

Estas bacterias utilizan sustratos sólidos de compuestos oxidados de hierro y manganeso como aceptores terminales de electrones, pueden localizar aproximadamente hasta el 80 % de los citocromos, moléculas encargadas de la transferencia de electrones, en su membrana externa.

La producción de electricidad por *S. putrefaciens* en ausencia de aceptores de electrones exógenos (mediador) ha sido estudiada por **Park et al., (2002)** quienes utilizando una celda de una sola cámara alcanzaron una corriente máxima de 2.5 mA y una densidad de corriente de 10.2 mW/m² teniendo en el ánodo un electrodo de grafito y una concentración celular de 3.9 g de proteínas de células/mL. Además mejoraron la producción de corriente en 10 veces más con la incorporación de un mediador de electrones en el ánodo de grafito ²³.

Se ha examinado la transferencia de electrones de diferentes cepas de *Shewanellas putrefaciens* sin mediadores electroquímicos demostrando que hay actividad electroquímica solo en células crecidas en condiciones anaeróbicas ²⁴. Además se han secuenciado diferentes cepas de *Shewanella* y los resultados muestran que la cepa *S. putrefaciens* W3-18-1 supera significativamente en densidad de corriente y eficiencia coulombica a la *S. oneidensis* MR-1²².

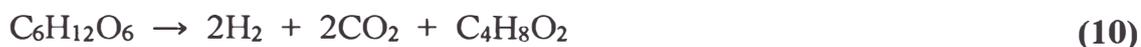
2.6.2 Transferencia extracelular de electrones

Para entender mejor las diferencias de energía generadas entre distintas especies, se debe considerar las vías metabólicas que regulan el flujo de protones y electrones, esto implica estudiar la influencia del potencial del ánodo en el metabolismo bacteriano ya que si la corriente en una celda microbiana aumenta, el potencial del ánodo disminuirá provocando que las bacterias cedan electrones. Por tanto, el potencial redox del ánodo determina la transferencia electrónica y el metabolismo. Entre las diferentes rutas metabólicas basándose en el potencial del ánodo, puede distinguirse: metabolismo de alto redox oxidativo, metabolismo medio o bajo redox oxidativo y la fermentación ¹³.

En ánodos con altos potenciales, las bacterias utilizan la cadena respiratoria en un metabolismo oxidativo (ciclo de Krebs) ¹³. La cadena respiratoria tiene como componentes NADH deshidrogenasas, flavoproteínas, proteínas no hémicas de Fe/S, quinonas y citocromos. Los electrones y de forma simultánea los protones pueden ser transportados a través de la NADH deshidrogenasa, ubiquinona, coenzima Q o citocromo ¹³. No obstante, el sistema de transporte de electrones en una celda de combustible microbiana utiliza casi siempre NADH deshidrogenasa, Fe/S, las proteínas y quinonas como portadores de electrones y no la oxidasa terminal (citocromo) ¹³, por ejemplo *G. sulfurreducens* utiliza la unión de membrana NADH deshidrogenasa para el transporte de electrones al hierro ²⁵. Los protones que son transportados salen de la membrana de la bacteria y permanecen en solución ya que la membrana es impermeable a los protones.

Por otro lado, si el potencial del ánodo disminuye se producirá metano indicando que la bacteria no utiliza el ánodo si no aceptores de electrones tales como sulfato, nitrato

u otros aceptores, y la fermentación sería el principal proceso. De esta manera para una celda que opera con glucosa, las reacciones de fermentación serán las siguientes:



De las reacciones **9** y **10** se obtiene que solo un tercio de la glucosa es aprovechada en la generación de corriente y los otros dos tercios generan acetato y butirato los cuales pueden oxidarse por las bacterias anaeróbicas a bajo potencial del ánodo.

Un tercio de los electrones totales generan corriente ya que son transportados por la hidrogenasa la cual se sitúa en la superficie de membrana bacteriana por tanto es accesible a los mediadores de electrones o directamente al electrodo.

Este transporte de electrones debe ser físico, ya sea por el uso de mediadores de electrones solubles que se oxidan en la superficie del electrodo o a través de compuestos mediadores unidos a la membrana que pertenecen a la cadena respiratoria. Entre los requisitos para que el componente actúe como una entrada de electrones parece ser la accesibilidad estérica ¹³.

La adición de mediadores no siempre es necesario ya que las bacterias generan sus propios mediadores y esto ocurre a partir de la producción de compuestos orgánicos (metabolitos secundarios) o a través de la generación de metabolitos oxidables (metabolitos primarios) ¹³. En las especies *Shewanella*, una serie de mediadores de electrones tales como los citocromos y menaquinonas son requeridos para el transporte de los electrones. Aunque todavía no se han determinado las características específicas de la generación de energía, se presume que es por una fuerza establecida en el bombeo de protones transportados por estos mediadores ²⁵. Estos mediadores influyen en el rendimiento de la celda microbiana, interfiriendo en la transferencia extracelular.

La transferencia de electrones es mayor en el biofilm, ya que la alta densidad celular permite la acumulación de mediadores químicos que pueden ser regenerados por oxidantes externos en un sistema cerrado, además se entiende que habrá diferencias en la actividad celular en diferentes capas del biofilm ya que no es homogénea ²⁵. En sistemas donde la biopelícula crece en un ambiente oxigenado, la generación de energía se llevaría a cabo principalmente por el transporte de estos mediadores químicos y la regeneración se llevaría a cabo por el O₂. Los mediadores recogen electrones desde la célula, los dejan a un aceptor de electrones y vuelven a la célula para más, y este proceso cíclico sería impulsado por difusión ²⁶. La transferencia de electrones estará dominada por la respiración aeróbica siempre que las células estén en crecimiento activo.

Uno de los problemas en la mejora de eficiencia de la celda de combustible microbiana está en el poco conocimiento de la distribución de citocromos y menaquinonas en la membrana externa los cuales desempeñan papeles trascendentales en la obtención de altos valores de potencial. Entre los estudios se encuentra el realizado por **Hernández y Newman (2001)** quienes intentaron identificar las especies responsables de la generación de electricidad, encontraron que la actividad electroquímica se debió principalmente a mediadores redox excretados como la piocianina, la cual es conocida por sus propiedades antibióticas ²⁵. Además **Rabaey et al., (2005)**, concluyen que cuando se generaba compuestos inhibitorios de la cadena respiratoria disminuía el potencial generado, debido a este hecho atribuyeron la transferencia de electrones a los compuestos presentes en la cadena respiratoria ¹³. A pesar de esto aún queda un camino por recorrer en la identificación de especies mediadoras.

2.7 SUSTRATO

El sustrato como factor importante en la generación de energía eléctrica ha sido ampliamente estudiado y se ha considerado por varios años a la glucosa y acetato como las principales fuentes de energía debido a la facilidad de degradación y porque facilitan su evaluación en el cálculo de la eficiencia de potencia generada, resistencia interna, etc. Por otro lado sustratos que son inactivos en procesos donde se produce la fermentación o la metanogénesis disminuyen la eficiencia de la celda. Entre dichos sustratos se encuentran la sacarosa, el almidón, lactato, tintes sintéticos, lactosa, maltosa, entre otros.

Varios compuestos orgánicos pueden ser utilizados en celdas de combustible entre los principales se encuentran los carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos presentes en las aguas residuales, siendo el más abundante los carbohidratos. El uso de sustratos puros ha sido bastante estudiado en los últimos años, mientras que medios de cultivo que contienen fuente de carbono y otros micronutrientes se conocen como agua residual sintética. **Catal (2008)** comparó la generación de energía en doce monosacáridos utilizando un electrodo de tela de carbón y una resistencia externa de 120 Ω . Se obtuvo como resultado una mayor densidad de energía para el ácido D-glucorónico con un máximo de voltaje obtenido entre 0.26 y 0.44 V y el carbohidrato con menor densidad fue la d-manosa (**Tabla 1**) ²⁷.

Tabla 1: Desarrollo de una celda de combustible microbiana usando diferentes monosacáridos. *Adaptado de Catal (2008) ²⁷.*

	Tipo de sustrato	Inóculo	Densidad de poder (mWm ⁻²)	Potencial Max (V)
Hexosas	D-Glucosa	Cultivo bacteriano mixto	2160 ± 10	0.39
	D-Galactosa	Cultivo bacteriano mixto	2090 ± 10	0.35
	D-Fructuosa	Cultivo bacteriano mixto	1810 ± 10	0.31
	L-Fucosa	Cultivo bacteriano mixto	1760 ± 10	0.35
	L-Rhammosa	Cultivo bacteriano mixto	1320 ± 110	0.27
	D-manosa	Cultivo bacteriano mixto	1240 ± 10	0.29
	sacarosa	lodo anaeróbico	1.79	NA
Pentosa	D-Xylosa	Cultivo bacteriano mixto	2330 ± 60	0.38
	D-(-) arabinosa	Cultivo bacteriano mixto	2030 ± 20	0.26
	D-(-) ribosa	Cultivo bacteriano mixto	1520 ± 40	0.27
Derivados del azúcar	D-ácido glucónico	Cultivo bacteriano mixto	2050 ± 30	0.28
	D-ácido glucorónico	Cultivo bacteriano mixto	2770 ± 30	0.44

Otros investigadores han utilizado como sustratos medios de cultivo básicos y enriquecidos para la *Shewanella* como es el caso de **Carmona-Martínez et al., (2013)** quienes emplearon caldo Luria Bertani Broth y cultivo medio mínimo conteniendo lactato de sodio, buffer PIPES, NaOH, sales como NH₄Cl, KCl, NaCl, NaH₂PO₄.H₂O, solución mineral, vitaminas y aminoácidos ²². Además **Choi et al., (2014)** utilizaron cepas de *Shewanellas* las cuales fueron cultivadas aeróbicamente en medio Luria Bertani y buffer de fosfato a pH 7.2 manteniéndose en una solución de lactato, fumarato y extracto de levadura ²⁸. Otros autores también usan medios de cultivos con menos componentes con el uso principal de glucosa ^{24, 29}.

En los últimos años se está experimentando con sustrato de biomasa presente en aguas residuales los cuales son más complejos pero son de mayor interés debido a que su estudio abarca la biorremediación, ejemplos de estos tipos de sustratos tenemos a las aguas residuales provenientes de procesamiento de frutas y vegetales, residuos agrícolas, aguas residuales de industrias farmacéuticas, materiales resistentes a la biodegradación. Los factores que afectan a la elección del sustrato son los costos y la concentración en lo que algunos estudios coinciden en que la concentración acelera la generación eléctrica y en otros casos inhibe debido al incremento de otros productos de fermentación ⁷.

Tabla 2: Principales variables consideradas en celdas de combustible microbiana generadoras de potenciales representativos. *Adaptado de Revelo (2013)* ⁵.

Bacterias	Sustrato	Tipo de electrodo	Densidad de potencia (mW m ⁻²)	Eficiencia coulombica (%)	Referencia
Lodo anaeróbico	Acetato	Papel carbón	7200	50-80	Oh et al, (2004)
Mezcla de bacterias	Acetato	Fibra de carbono	6860	-	Fan et al, (2008)
Lodo anaeróbico	Glucosa	Varilla de grafito	4310	-	Rabaey et al, (2004)
Geobacter sulfurreducens	Acetato	Varilla	3900	-	Yi et al, (2009)
Lodo anaeróbico	Glucosa y acetato	Filtro de carbón	3650	88±5.7	Borole et al, (2009)
Cultivo mixto	Glucosa	Grafito plano	3600	89±4	Rabaey et al, (2003)

Otras condiciones tomadas en cuenta fueron el pH que varía debido a la acumulación de protones en la cámara anódica o la catódica que puede ocasionar una disminución en la actividad bacteriana, con referente a esto, estudios de **Alzate-Gaviria et al., (2010)** muestran que la densidad de potencia mantiene una tendencia a la estabilidad en relación al pH, concluyendo que el rango de pH entre 4 a 7.5 es el más adecuado ⁴.

En los últimos años las investigaciones muestran que la máxima densidad de potencia alcanzada ha sido de 7.2 W m⁻², algunos valores encontrados se resumen en la **Tabla 2** donde se consideran las distintas variables ya mencionadas y que han sido consideradas en la configuración de las celdas con el fin de buscar la máxima eficiencia. ⁵. Lo más resaltante de estos resultados es que estos máximos valores se han alcanzado utilizando un consorcio mixto de bacterias en la mayoría de casos y electrodos carbonosos.

2.8 MATERIALES DE LOS ELECTRODOS

El material del electrodo juega un papel importante en el desempeño de una celda de combustible microbiana, diversos trabajos muestran varios tipos de materiales y se ha ido evaluando su efecto en las celdas de combustible, las propiedades que deben cumplir estos materiales son:

- Tener una buena conductividad eléctrica y baja resistencia.
- Biocompatibles.
- Estabilidad química y ser anticorrosivos.
- Resistencia mecánica adecuada.
- De gran área superficial.

El material más utilizado para los ánodos es el carbón. Se muestra los distintos tipos de carbones utilizados como electrodos en celdas de combustible (**Figura 2**), así se tiene el papel de carbón, la malla de carbón, fieltro de carbón, tela de carbón, varilla de grafito, gránulos, cepillos de fibras de carbón y carbón vítreo reticulado. Estos tipos de carbones varían en su área superficial, conductividad y costos. El fieltro de carbón se puede adquirir comercialmente y por su bajo costo se utilizó como electrodo.



Figura 2. Materiales de carbono tradicionales utilizados como ánodos en celdas de combustible microbianas (MFC). *Imagen adaptada de Scott (2015).*

2.8.1 Fieltro de carbón

Los fieltros de carbón son fabricados con fibras de carbono, las cuales poseen baja conductividad térmica y presión de vapor. Contiene entre 96-99 % de carbono además de 0.25-1 % de cenizas. Es utilizado como medio de aislamiento en hornos de

inducción y su uso principal como electrodos en celdas de combustible ya que ofrece un soporte adecuado para el crecimiento bacteriano, alta resistencia mecánica y una superficie de placa plana que permite la reducción de la distancia entre los dos electrodos, mejorando así el rendimiento de la celda de combustible microbiana³⁰, por lo que se ha vuelto de gran interés el estudio acerca de su estructura y sus propiedades físicas.

El fieltro de carbón en celdas de combustible microbianas se ha usado con cierta frecuencia como ánodo, por ejemplo en el trabajo de **Hidalgo *et al.*, (2016)** el fieltro de carbón fue modificado a través de ácido nítrico y se depositó en la superficie polianilina, además compararon su densidad de potencia generada con un electrodo de varilla de grafito modificado de la misma manera, obteniéndose una mayor densidad de potencia en el sistema con fieltro de carbón³⁰. Por otro lado, **Zhou *et al.*, 2011** concluyeron que el efecto del incremento en la energía generada en una celda de combustible microbiana se debe a la mayor área superficial del fieltro de grafito en comparación con el de varilla de grafito³¹. Adicionalmente un nuevo tipo de material con fieltro de carbón y papel de carbón usando el método de sinterizado fue desarrollado consiguiendo una alta potencia de 2426 mW m^{-2} , debido a que el sinterizado habría reducido la resistencia presente en el electrodo³¹.

Por consiguiente, las propiedades descritas y los resultados obtenidos en anteriores investigaciones brindan buenas expectativas de uso como ánodo al fieltro de carbón, además por ser un electrodo tridimensional puede soportar mayor adherencia de bacterias y aumentar la densidad de potencia volumétrica.

Scott (2015), señala que una de las principales limitaciones en el uso de un electrodo de carbono como ánodo serían los poros que pueden atascarse y de esta forma perder eficacia el proceso de transferencia de electrones, otros puntos a considerarse son la resistencia, el costo y el grado de afinidad de las bacterias a ciertos materiales carbonosos, como lo demuestra la investigación de **Hidalgo *et al.*, (2016)** quienes encuentran que la principal limitante de la formación de la biopelículas y la generación de energía es la poca área superficial que pueden tener algunos electrodos de carbono. Sin embargo la estrategia que se ha ido desarrollando para evitar estos inconvenientes es modificar las superficies del electrodo con nanomateriales para aumentar el número de sitios catalíticos activos, por otro lado hacer a estos materiales biocompatibles con la mejora de la adhesión bacteriana^{11, 30}.

2.9 MODIFICACIÓN SUPERFICIAL DEL ÁNODO

2.9.1 Modificación por tratamiento térmico

Varios métodos de modificación de superficie han sido reportados tales como la modificación superficial a través de tratamientos térmicos con ácidos o por la oxidación electroquímica de las superficies.

El tratamiento térmico conduce a la modificación de la rugosidad superficial y la porosidad. Varios compuestos como ácido nítrico, etilendiamina, nitrato de amonio, persulfato de amonio, polianilina, entre otros se han utilizado para la modificación química superficial de electrodos carbonosos ³².

Uno de los tratamientos utilizando gas de NH_3 , aumenta la carga de la superficie de los electrodos debido a la formación de grupos funcionales que contienen nitrógeno, mejorando el rendimiento de las celdas microbianas y esto se asocia al aumento de las cargas superficiales que facilitarían la adhesión de las bacterias y una mayor eficiencia en la transferencia de electrones desde las bacterias hacia la superficie de los carbones. Por ejemplo resultados de **Zhu et al., (2011)**, usando una celda de combustible microbiana de una sola cámara, muestran que la modificación de fibra de fieltro de carbón tratadas con ácido nítrico alcanzaron una densidad de 26 % mayor que la sin modificar ³³.

La oxidación electroquímica modifica las superficies. **Tang et al., (2011)**, investigaron el desempeño del ánodo de fieltro de grafito modificado electroquímicamente, el cual generó grupos carboxilos funcionales sobre la superficie, incrementando la corriente de 0.81mA a 1.13mA. Atribuyeron el incremento a los hidrógenos de los grupos carboxilos los cuales forman un fuerte enlace con los citocromos de las bacterias ³⁴.

Guo et al., (2013) investigaron los efectos de la carga superficial y la hidrofobicidad de la superficie sobre la formación de biofilms, modificando carbón vítreo con $-\text{OH}$, $-\text{CH}_3$, $-\text{SO}_3^-$ y $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, sus resultados muestran que la carga y la hidrofobicidad afectan el rendimiento del sistema, además que superficies cargadas positivamente e hidrófilas eran más selectivos a las bacterias electroactivas y propicias a la formación de biofilm ³⁵.

2.9.2 Modificación con nanomateriales

Los recientes avances en nanotecnología han permitido que la limitación que tienen los carbones sea superada a través de la modificación con nanomateriales, polímeros conductores y compuestos, permitiendo la obtención de superficies anódicas de alto desempeño con una mejor compatibilidad, adhesión a la bacteria y mejor transferencia

electrónica. Entre estos el nanotubo de carbón (CNT) y grafeno son carbonos nanoestructurados más utilizados y el CNT es aplicado en celdas de combustibles.

2.9.2.1 Nanotubos de carbón de pared múltiple (MWCNT)

Los nanotubos de carbón de pared múltiple tienen un conjunto de propiedades, su estructura permite un área de alta superficie, capacidad de actuar como semiconductor o metal, facilidad de unión con grupos funcionales químicos y con nanopartículas metálicas y las múltiples paredes concéntricas que mantienen su integridad mecánica y conductividad eléctrica. Los MWCNT han demostrado ser buenos portadores de carga y poseer una excelente conductividad 1.85 MS cm^{-1} y la densidad de corriente se aproxima a 10^9 A cm^{-2} ³⁶.

Carbonos nanoestructurados son atractivos en la modificación del ánodo ya que ofrece la ventaja de baja resistividad ($\sim 10^{-5} \Omega \text{ cm}$), estabilidad química y distribución de mesoporos controlados. Además la transferencia de electrones de los nanotubos de carbono mejora con el aumento de la densidad y los defectos de borde plano y disminuye con la mayor área de las paredes laterales en contacto con el electrolito, por tanto las estructuras con más defectos mejoran la cinética de transferencia de electrones ³⁶.

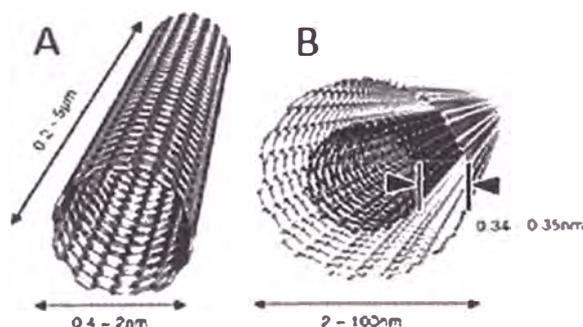


Figura 3. A: nanotubos de carbón de una pared y B: nanotubo de carbón de pared múltiple, se muestra dimensiones típicas de longitud, anchura y la separación entre tubos en los nanotubos de carbón. *Imagen adaptada de Nichanan (2012).*

Se ilustra en la **Figura 3** las dimensiones de un nanotubo de carbono de una pared y de pared múltiple, se puede apreciar la separación entre capas, los valores de las dimensiones es aproximada que los nanotubos pueden variar en diámetro, longitud.

Pueden contener impurezas carbonosas que frenan sus propiedades, por tanto requieren de una funcionalización para eliminar estas impurezas y mejorar el camino de síntesis de otros materiales. La funcionalización se puede conseguir a través de la

unión covalente de grupos funcionales en una reacción química, adsorción o envolver los nanotubos con diferentes grupos de polímeros y nanopartículas metálicas^{11,37}.

Las nanopartículas de metal se pueden conectar a la estructura de los nanotubos de carbón siendo cultivadas o depositadas sobre la estructura, por atracción de Van der Waals donde se produce un proceso de reducción en presencia de los nanotubos de carbón y esta interacción covalente o electrostática se puede hacer más fuerte si antes de la síntesis de nano partículas se produce grupos funcionales en la superficie de los MWCNT o si se absorbe grupos funcionales de polímeros³⁷.

2.9.3 Modificación con polímeros

Otra de las alternativas de modificación de la superficie del carbón es por revestimiento con polímeros conductores. Entre todos los polímeros conductores la polianilina (PANI) y el polipirrol (PPY) son los más estudiados debido a su alta conductividad eléctrica, buenas propiedades redox, estabilidad ambiental y facilidad de síntesis.

2.9.3.1 Polianilina (PANI)

La polianilina es un interesante material porque es un polímero que tiene una conductividad electrónica estable y muestra varios estados redox. Además **Scott (2016)** explica que PANI llama la atención en los estudios electroquímicos debido a su química y sus propiedades físicas controladas por el estado de oxidación y protonación tales como la facilidad de preparación, el bajo costo y la facilidad de formar varias nanoestructuras¹¹. El mecanismo de la conductividad de la polianilina difiere de otros polímeros electroconductores, debido al hecho de que el átomo de nitrógeno está implicado en la formación del catión radical, a diferencia de la mayoría de los polímeros electroconductores cuyo catión radical se forma en el carbono³⁸.

Se diferencia de los otros polímeros conjugados en que desde su dopaje se acompaña un mecanismo en cadena de protonación, la forma completamente reducida del PANI es la leucoesmeraldina que es casi incolora, la forma oxidada se llama pernigranilina de color azul-violeta y la medio oxidada emeraldina presenta una coloración verde-azul, cuyas estructuras son ilustradas en la **Figura 4**. Entre ellas la emeraldina forma una sal de polianilina más estable y protonado exhibiendo una conductividad de $5-1 \Omega \text{ cm}^{-1}$ ³⁷.

Las síntesis de polianilina se pueden llevar a cabo por métodos químicos y electroquímicos. Los métodos de polimerización química son mediante el uso de oxidantes. Este método incluye mezclado en solución, emulsión, dispersión, la polimerización in situ y la enzimática pero entre las desventajas se encuentra que en

el la síntesis se forma polianilina y oligómeros de bajo peso molecular. Por otro lado, en el método electroquímico se produce la oxidación de anilina en ácido y el rendimiento de la polimerización y sus propiedades dependerá mucho de la naturaleza del ácido y la del electrólito en la solución de preparación y tiene como ventaja sobre el proceso químico de producir materiales más homogéneos ³⁹.

Los estudios de modificación superficial de PANI sobre fieltros muestran mejoras en la potencia generada como en la investigación de **Li et al., (2011)** quienes analizaron las propiedades físicas y químicas de ánodos de una MFC de dos cámaras encontrando que fieltros de carbón modificados con PANI y poli (anilina-*co-o*-aminofenol) alcanzaron potencias de 27.4 mW m⁻² y 23,8 mW m⁻² respectivamente, superando casi en 35 % al fieltro de carbón sin modificar, además se observó un mayor crecimiento de bacterias en los carbones fieltros modificados ⁴⁰.

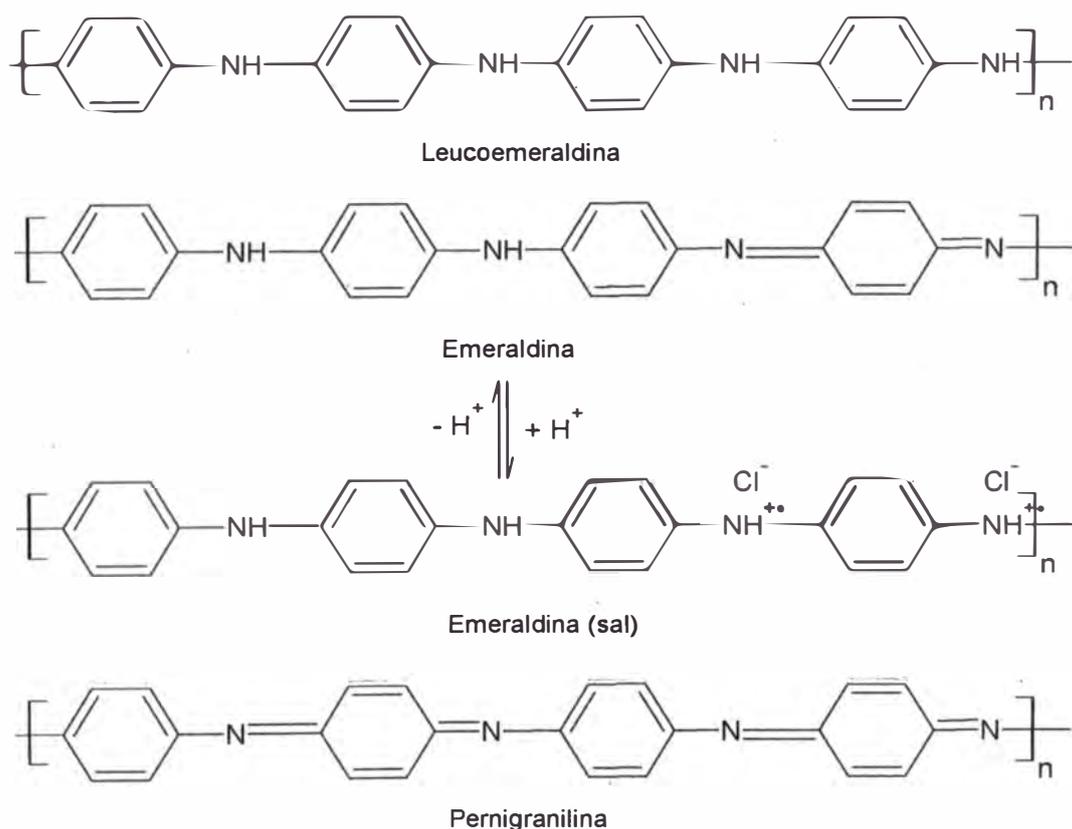


Figura 4. Estructuras de la polianilina de las unidades de reducción y oxidación, polímero reducido (leucoemeraldina), polímero medio oxidado (emeraldina) y polímero completamente oxidado (pernigranilina). *Imagen adaptada de Gvozdenovic* ³⁸.

De esta manera, los resultados muestran que el ánodo recubierto con PANI es una buena alternativa para mejorar el rendimiento de las celdas de combustible microbiana pero las limitaciones que tiene como la baja transferencia electrónica y su poca estabilidad a largo plazo podrían limitar su uso, es así que muchas investigaciones han optado por el desarrollo de materiales compuestos basados en la combinación de polímeros conductores con nanoestructuras de carbono u óxidos de metales.

2.9.4 Modificación con compositos

El desempeño de la conductividad del polímero puede ser incrementado por su combinación con nanomateriales como por ejemplo nanotubos u óxidos de metales, los cuales mejoran el número de sitios catalíticos activos y área superficial. El conocimiento del efecto que tienen los nanotubos de carbono y el grafeno sobre la energía generada en un celda de combustible y la posibilidad de combinación de polímeros conductores a estas nanoestructuras de carbono crea gran expectativa en el desempeño del ánodo ya que se estarían uniendo efectos de ambos componentes como la obtención de una gran área superficial y conductividad generada por los nanotubos de carbón con la electroquímica redox de los polímeros conductores ¹¹.

Oueiny *et al.*, (2014), explicaron que en la síntesis de composito se utilizan métodos químicos o electroquímicos donde el principal reto es obtener compuestos de CNT/PANI en forma de sal emeraldina, para la obtención de un buen conductor. Entre los métodos electroquímicos se encuentra el método de codeposición a través de la polimerización galvanostática en solución acida de anilina, el método de deposición a través de un autoensamblado capa por capa y el proceso de deposición electroforética que genera nanoestructuras conjugadas de polímero de una suspensión coloidal ⁴¹.

Estudios sobre compositos de nanotubos de carbón y polianilina se han realizado como materiales para celdas de combustible. **Qiao *et al.*, (2007)** evaluaron el comportamiento electrocatalítico de este tipo de material compuesto por impedancia electrolítica, el perfil de generación de corriente muestra que el composito con 20 % en peso de CNT posee mayor rendimiento con un valor de densidad de potencia máxima de 42 mW m^{-2} ⁴².

Capítulo III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 POBLACIÓN Y MUESTRA

La bacteria evaluada fue una cepa aislada de una muestra de pejerrey en descomposición del mar de Ancón, colectados en febrero del 2014. Después de los estudios de aislamiento, caracterización y clasificación, se obtuvo como resultado una cepa aislada de *Shewanella putrefaciens* a una concentración de 1×10^8 UFC mL⁻¹ medido por la escala de Mac Farland y por recuento en placas.

3.2 MATERIALES

3.2.1 Materiales

- Filtro de carbón comercial
- Membrana Catiónica modelo CMI-7000 de 0.45 ± 0.025 de espesor.
- Celda de vidrio de cinco bocas, burbujeador, capilar de Luggin.
- Electrodo de carbón vítreo de disco de teflón y conexión de acero inoxidable.
- Alambre de platino
- Electrodo de Referencia Ag/AgCl.
- Recipientes de plástico Hermético cuadrados 900mL, KREA
- Uniones $\frac{1}{2}$ " NPT. PVC-U PAVCO VINDUIT
- Membrana estéril $0.22\mu\text{m}$ de tamaño de poro, MS®PES Syringe Filter
- Lámina de oro
- Alambre de acero
- Placa de titanio
- Placas Petri
- Haz de siembra
- Micropipetas
- Jeringas
- Vasos precipitados
- Fiolas
- Matraz Erlenmeyer
- Kitasato
- Papel Kraft
- Ligas de goma
- Mechero

3.2.2 Equipos

- Potenciostato / Galvanostato IVIUM
- Bipotenciostato PINE Modelo AFRDES
- Autoclave FAMAIC S.A.C
- Espectrómetro RAMAN XPlora HORIBA Scientific
- Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) Philips S-505
- Potenciómetro UV
- Dispersión de Luz dinámica
- Ultracentrífuga
- Sonicador Ultrasonic Cleaner P30H
- Microprocesador de datos, HANTEK® 365A
- Fuente de Poder
- Multímetro Protek 200C
- Sistema MILLIPORE MILLI Q PLUS con una resistividad de 18.2 MΩ.cm
- pHmetro ORION
- Controlador de tiempo
- Agitador Magnético

3 2.3 Reactivos

- Luria Bertani Broth, Miller, pro análisis, MICROGEN
- Glucosa, pro análisis, CDH Microgen.
- Agar nutritivo, pro análisis, PANREAC
- Nanotubos de carbón de pared múltiple
- Borohidruro de sodio, pro análisis, MERCK
- L-Tirosina, pro análisis, MERCK
- Cloruro de Polidialildimetilamonio (PDADMAC) 20wt%, pro análisis, ALDRICH
- Anilina, pro análisis, MERCK
- Ácido Oxálico, pro análisis, J. T. BAKER
- Ácido L(+)-Tartárico, pro análisis, MERCK
- Ácido Clorhídrico, pro análisis, MERCK
- Ácido sulfúrico 96%, ultra puro, MERCK
- Hidróxido de sodio, ultra puro, MERCK
- Cloruro de sodio, pro análisis, PANREAC
- Cloruro de amonio, pro análisis, PANREAC
- Hexacianuro Ferrato (II) de potasio, pro análisis, MERCK

- Hexacianuro Ferrato (III) de potasio, pro análisis, MERCK
- Fosfato de sodio heptahidratado, pro análisis, FERMONT
- Fosfato Monosódico, J.T.BAKER
- Cloruro de Magnesio, pro análisis, J.T.BAKER
- Permanganato de potasio, Comercial Química
- Alúmina 0.3, MICRON

3.3 METODOLOGÍA DEL PROCESO DE CULTIVO DE BACTERIAS

3.4.1 Crecimiento bacteriano *Shewanella putrefaciens*

Cepa de respaldo que contenía *S. putrefaciens* se resiembra en un nuevo agar. Se preparó y pesó 8 g de agar nutritivo Difco TM Nutrient Broth, se agregó 1 mL de caldo de cultivo de respaldo y se dejó en agitación por 3 días. Pasado este tiempo se observó una turbidez producto del crecimiento bacteriano como se observa en la **Figura 5**, los matraces de la derecha contienen bacterias crecidas en medio de cultivo fresco.



Figura 5. Cambio de turbidez provocada por el crecimiento de *Shewanella putrefaciens* en agar nutritivo.

3.4.2 Metodología para el recuento de bacterias

El vertido en placa es el método para contar el número de bacterias formadoras de colonias presentes en una muestra líquida y para recuentos exactos. El recuento óptimo debe estar dentro de la gama de 30-300 colonias/placa; para asegurar una placa contable debe realizarse antes una serie de diluciones como se presenta en la **Figura 6**. Antes de comenzar el ensayo todos los materiales utilizados estuvieron bien esterilizados.

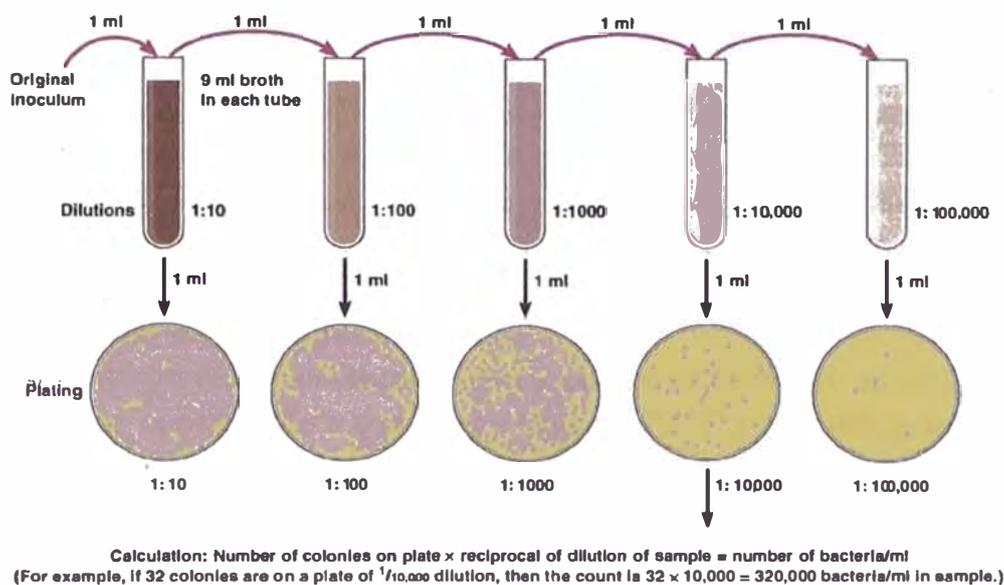


Figura 6. Método de diluciones sucesivas y vertido en placas ⁴³.

Después una cantidad fija de 1 mL de inóculo de la última dilución se colocó en el centro de la placa de Petri usando una tip y con el agar enfriado fue vertido rápidamente en la placa de Petri que contiene el inóculo y se mezcló bien. Después de la solidificación del agar, la placa fue invertida y se incubó a 37 °C entre 24-72 horas dependiendo el tipo de bacteria. El tiempo de incubación depende del tipo de bacteria.

Los microorganismos crecieron tanto en la superficie y dentro del medio. Las colonias que crecieron en el medio en general son de tamaño pequeño y pueden ser confluentes mientras que los pocos que crecieron en la superficie del agar son del mismo tamaño. Cada colonia grande y pequeña se contó cuidadosamente. Cada colonia representa una "unidad formadora de colonias" (UFC).

El número de microorganismos presentes en la muestra de ensayo se determinó mediante la fórmula siguiente:

$$\text{UFC/mL} = (\text{UFC} \times \text{factor de dilución} \times 10) / \text{alícuota} \quad (13)$$

3.4 PROTOCOLO DE LIMPIEZA DE MATERIALES

Antes de realizarse cualquier tipo de síntesis, modificación y caracterización, los materiales usados se lavaron o en otros casos se limpiaron, siguiendo un protocolo de limpieza señalado a continuación:

- Los materiales de vidrios, principalmente la celda de 5 bocas, el burbujeador y el capilar de Luggin fueron sumergidos en una solución de permanganato que contenía algunas perlas de hidróxido de potasio, transcurridos 12h los materiales se lavaron en una solución de ácido sulfúrico/peróxido de hidrógeno de 1:3 (solución piraña) hasta retirar completamente la coloración dejada por el permanganato, por último se procedió a enjuagarlos poniendo a hervir todos los materiales dos veces en agua ultrapura.
- Para la limpieza de los alambres de oro y platino se sumergió en una solución de ácido nítrico concentrado a una temperatura de 70 °C y se enjuagaron con chorro de agua ultrapura.
- La limpieza de carbón vítreo se inicia lijando la superficie con papel de SiC de grado 800 y después una de grado 1000 para la obtención de una superficie lisa, se lleva a baño ultrasónico en agua ultrapura por 5 minutos para la eliminación de residuos de carbón, después de retirar del sonicador, pulir la superficie sobre una suspensión de polvo fino de Alúmina (tamaño de partícula de 0.3 μm) formando un trazo en forma de ocho sobre una franela y se enjuagó en baño ultrasónico de agua ultrapura.

3.5 METODOLOGÍA PARA LA FUNCIONALIZACIÓN DE LAS SUPERFICIES DE ELECTRODOS

3.5.1 Procedimiento de autoensamblado capa por capa

El procedimiento de autoensamblado capa por capa se basa en la atracción electrostática entre una superficie y las moléculas que se adsorben con el fin de mantener una superficie cargada. Como se representa en la **Figura 7**, se pueden contemplar tres maneras principales de cómo tales moléculas pueden adsorberse sobre una superficie cargada. Si la molécula es demasiado corta, es decir, si las cargas sólo están separadas por una pequeña distancia, la molécula se adsorberá plana sobre la superficie (**A**), como consecuencia, los grupos iónicos que se adhieren al sustrato sólido son accesibles al disolvente y la primera monocapa está completamente desorbida cuando la segunda capa se ha de poner encima de la primera. Cuando la longitud molecular se incrementa, la molécula puede adsorberse como un bucle, lo que conduciría a una reducción de los grupos cargados en la superficie (**B**).

Se debe evitar la formación de bucles para facilitar la posibilidad de finalizar la adsorción (**C**) para esto la molécula se debe adsorber de manera paralela ⁴⁴, dejando hacia el otro extremo una cierta carga que permita la adsorción de otra nueva monocapa, aunque la técnica no precisa que exactamente se formará en todos los casos

una monocapa ya que depende de otros parámetros como la concentración de material adsorbido.

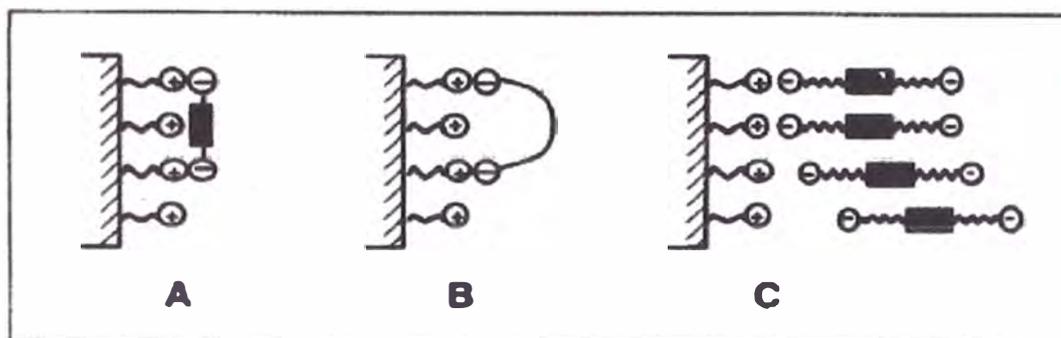


Figura 7. Representación esquemática de la adsorción de moléculas bipolares sobre una superficie cargada. Adsorción plana **A**, adsorción como un bucle **B** y adsorción deseada **C** ⁴⁴.

El autoensamblado electrostático capa por capa requiere que cada capa formada posea especies solubles en agua y multicargadas. Uno de los candidatos más populares para la construcción de películas por interacción electrostática es un polielectrolito, incluyendo polianiones y policationes con un grupo cargado por unidad de monómero. Además la deposición alternada de polianiones y policationes no requiere una coincidencia de posición exacta de los puntos cargados ⁴⁵.

De esta manera el proceso se basa en dos etapas de adsorción que se representan como deposición de una capa sobre un sustrato que inicialmente posee una carga positiva, de esta manera en la primera etapa se lleva a cabo la adsorción de un polianión y en la segunda de un polication con procesos de lavados entre cada etapa y los pasos se repetirán secuencialmente hasta la construcción de una película con un cierto grosor ⁴⁵ (**Figura 8**). La manera de representar el autoensamblado se puede hacer utilizando la notación de llaves $\{ \}_n$ donde n es el número de ciclos de deposición.

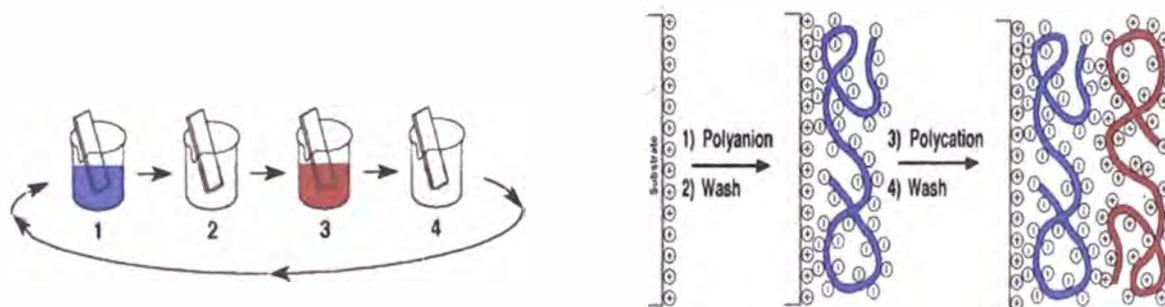


Figura 8. Proceso de autoensamblado capa por capa al sumergir polianión (1) y polication (3) y los procesos de enjuagar la muestra (2 y 4). *Imagen adaptada de Decher (2006)* ⁴⁵.

3.5.2 Procedimiento de polimerización con polianilina

La polianilina obtenida por polimerización electroquímica generalmente se deposita sobre el electrodo, la polimerización electroquímica de la anilina se lleva a cabo en electrólito acuoso fuertemente ácido, se demuestra que la polimerización electroquímica de la anilina se autocataliza.

El mecanismo de polimerización consiste en tres etapas diferentes, en primer lugar, la oxidación del monómero en el ánodo conduce a la formación de oligómeros solubles en la capa de difusión en el segundo, la deposición de oligómeros se produce a través del proceso de nucleación y crecimiento, y finalmente el tercer paso es responsable de la propagación de la cadena por polimerización en estado sólido.

La técnica electroquímica consistirá en polimerización usando voltametría cíclica y se caracteriza por un cambio periódico cíclico del potencial del electrodo generando que el polímero depositado cambia entre su estado no conductor y conductor, seguido por el intercambio del electrólito a través del polímero. El crecimiento del polímero es observado en el voltograma con un aumento en la corriente conforme se aumenta el número de ciclos y la polimerización finaliza cuando la corriente se mantiene constante. La polimerización electroquímica a través de una voltametría cíclica favorece la formación de cadenas desordenadas y estructura abierta. Para la electropolimerización de polianilina se requiere un potencial relativamente alto para lo cual se usará un límite superior de 0.9 V.

3.6 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN PARA SISTEMAS BIOELECTROQUÍMICOS

3.6.1 Principios Electroquímicos

El estudio electroquímico de las celdas de combustible, implica entender los procesos redox que ocurren en la superficie del electrodo. Para ello, en términos generales, este tipo de celda donde se produce energía eléctrica es denominado celda galvánica. Para que circule corriente a través de ella se necesita una conexión externa de los electrodos, la solución de contacto que permite el movimiento de los iones y debe ocurrir la reacción de transferencia de los electrones en los electrodos.

La conducción en la celda se da del siguiente modo: los electrodos son el soporte para los portadores de carga. En la solución se lleva a cabo el proceso de migración de cationes y aniones conocido como flujo de carga y en la superficie del electrodo se produce la reacción de oxidación y reducción. Por tanto, para que se produzca la

transferencia de electrones primero se requiere una transferencia de masa desde el bulk de la solución hacia una región fina en la superficie del electrodo. Los mecanismos por los cuales se producen son: difusión, convección y migración.

En sistemas electroquímicos la convección puede ser introducida por agitación mecánica, rotación u otro movimiento del electrodo y por el flujo de electrólito adyacente a la superficie del electrodo y variación de la temperatura. En ausencia de turbulencia, el flujo de una especie iónica en el electrólito se define para un modelo unidimensional de:

$$N_j = -D_j \frac{\partial C_j(x)}{\partial x} - \frac{z_j F}{RT} D_j C_j \frac{\partial \Phi(x)}{\partial x} + C_j v(x) \quad (11)$$

De donde se tiene:

1. El termino de migración $(\partial\Phi(x))/\partial x$ que es el transporte de especies cargadas bajo la influencia de un gradiente de potencial.
2. El termino convección que es el transporte de especies asociadas con el movimiento mayor del electrólito.
3. El termino de difusión que es el transporte de las especies debido a la existencia de un gradiente de concentración. El proceso de transferencia se da desde el más concentrado hacia la región de menos concentración.

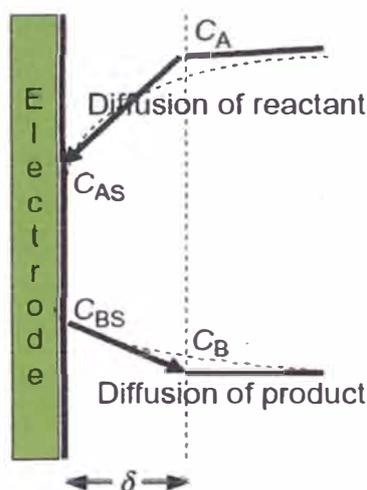


Figura 9. Esquema del proceso de transferencia de masa por difusión en la superficie del electrodo. Scott (2015).

En la celda de combustible estudiada se puede omitir los efectos de convección ya que no se aplicó agitación y las variaciones de temperatura son mínimas. Así mismo, existe una transferencia de masa por el proceso de migración, pero este valor es pequeño debido a los electrólitos presentes en solución además del medio de cultivo utilizado

en las celdas. Por tanto se puede aproximar que la transferencia se lleva a cabo exclusivamente por difusión, tal como se muestra en la **Figura 9**.

Por otro lado, en la modificación del electrodo de carbón también se consideraron estos procesos electroquímicos. Estudiar los mecanismos que modifican la superficie del electrodo y analizar los procesos que desarrolla el analito puede resultar algo tedioso. Sin embargo, la utilización de una herramienta como la Voltametría Cíclica puede resultar ser eficaz en tanto que se conozca el procedimiento y se logre una buena interpretación de los datos.

3.6.2 Voltametría Cíclica

Voltametría cíclica es una medición electroquímica en el que se aplica un potencial variable en el electrodo de trabajo el cual está en función del tiempo.

Esta exploración se realiza en un rango determinado, el proceso inicia en un cierto valor de potencial y el barrido continúa hasta que se alcanza todo el conjunto de potenciales hasta un valor final establecido, es entonces cuando el potencial de barrido del electrodo de trabajo se invierte; es decir, el potencial se dirige en la dirección opuesta hasta que se alcanza el potencial inicial. Esta inversión se puede aplicar varias veces durante un único experimento. Se calcula la corriente en el electrodo de trabajo y se representa frente al voltaje aplicado para dar el voltograma cíclico. La exploración hacia adelante puede producir un pico de corriente para cualquier especie que se puede reducir (u oxidar, dependiendo de la dirección de exploración inicial) a través del rango del potencial. La corriente aumentará a medida que el potencial alcanza el potencial de reducción de la especie, pero luego cae a medida que la concentración de la especie se agota cerca de la superficie del electrodo. Si la pareja redox es reversible, cuando el potencial aplicado se invierte, se llegará a la posibilidad de que vuelva a oxidar el producto formado en la primera reacción de reducción, y producir una corriente de polaridad inversa a partir de la exploración hacia adelante. Este pico de oxidación por lo general tiene una forma similar al pico de reducción y están ubicados al mismo potencial en lados opuestos. Como resultado, se obtiene información sobre las velocidades de reacción y potenciales electroquímicos redox de los compuestos, la carga y la concentración del analito. Esta medición fue utilizada en la modificación del electrodo así como en su propia caracterización ya que permite distinguir los potenciales de oxidación y reducción característicos de distintos materiales. Adicionalmente será aplicado en la caracterización de la bacteria crecida sobre electrodos ya que estas presentan actividad redox.

3.6.3 Cronoamperometría

Cronoamperometría (CA) es una herramienta útil para determinar los coeficientes de difusión y para la investigación de la cinética y los mecanismos. A diferencia de la voltametría cíclica, CA puede proporcionar esta información en un solo experimento. En CA el potencial del electrodo de trabajo está escalonada y la corriente resultante de los procesos de Faraday que se producen en el electrodo (causada por el paso potencial) se controla como una función del tiempo. Información limitada acerca de la identidad de la especie electrolizada puede obtenerse a partir de la relación del pico de corriente de oxidación frente a la corriente de reducción de pico. Sin embargo, como con todas las técnicas de impulsos, CA genera altas corrientes de carga, que se descomponen de forma exponencial con el tiempo como para cualquier circuito de resistencia-capacitancia. La corriente de Faraday, que es debido a los procesos de transferencia de electrones, es más a menudo el componente de la corriente de interés y se descompone como se describe por la ecuación de Cottrell.

$$i = \frac{nFAD^{1/2}C_b}{\pi t^{1/2}} \quad (12)$$

Donde D es el coeficiente de difusión, A es el área del electrodo, C_b es la mayor concentración y t es el tiempo. Ya que en la cronoamperometría se aplica un potencial específico será utilizado para el proceso de electrodeposición de nanopartículas de oro.

3.7 MÉTODOS DE ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE SUPERFICIES

3.7.1 Espectroscopia Raman

Cuando la radiación electromagnética interacciona con un medio material tienen lugar procesos de absorción, emisión y dispersión (scattering) de la misma. El estudio de la energía dispersada por el medio en función de la longitud de onda de la radiación, constituye el objeto de la Espectroscopia Raman ⁴⁶.

3.7.1.1 Proceso de dispersión Raman

Fenómenos de dispersión de luz pueden ser descritos clásicamente en términos de radiación electromagnética (EM) producida por la oscilación dipolos inducidos en la molécula por los campos EM de la radiación incidente. El momento dipolar inducido se produce como resultado de la polarizabilidad molecular α , donde la polarizabilidad es la deformabilidad de la nube de electrones sobre la molécula por un campo eléctrico externo. ⁴⁷

En un experimento típico Raman, se utiliza un láser para irradiar la muestra con radiación monocromática. Fuentes de láser están disponibles para la excitación en el UV, visible y IR cercano región espectral (785 y 1064 nm). Por lo tanto, si se utiliza la excitación visible, la luz Raman dispersa también estará en la región visible. Los procesos de Rayleigh y Raman se representan en la **Figura 10**.

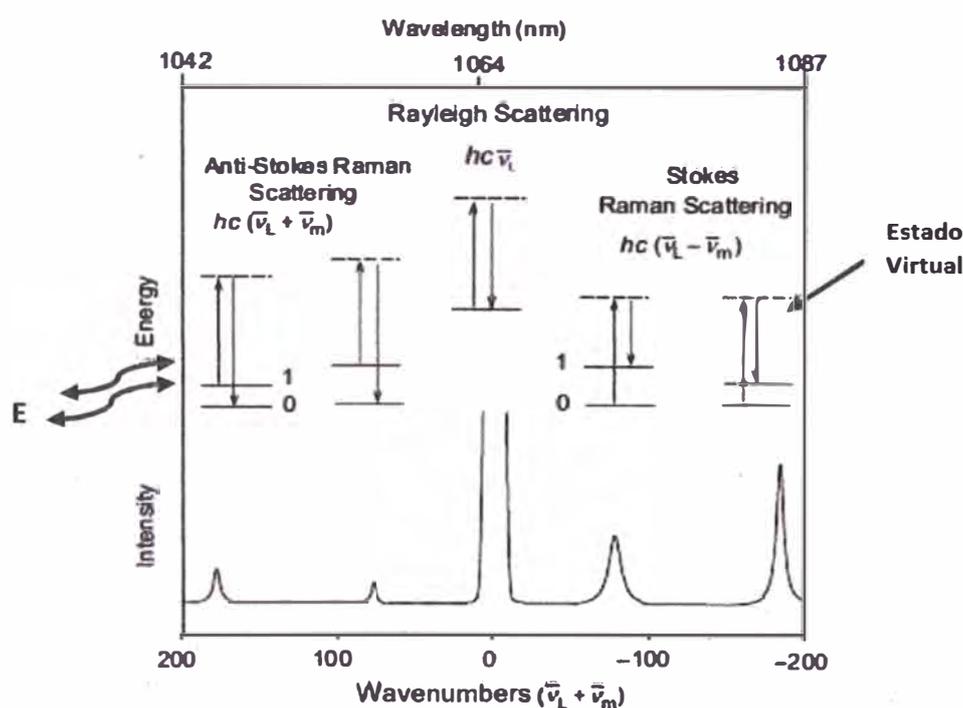


Figura 10. Esquema de la transición de Rayleigh, Stoke y antistoke. *Imagen adaptada de Lark, 2011.*

No se pierde energía para la luz dispersa elásticamente denominada Rayleigh mientras que en la dispersión Raman los fotones pierden algo de energía en relación con la energía relativa a las coordenadas de vibración específicas de la muestra. A fin de que las bandas Raman pueda ser observado, la vibración molecular debe causar un cambio en la polarizabilidad ⁴⁷.

Tanto Rayleigh y Raman son dos procesos que implican la dispersión de fotones de la luz incidente ($hc\nu_0$), desde un "estado virtual". El fotón incidente es absorbido momentáneamente y una transición desde el estado fundamental a un estado virtual crea un nuevo fotón. La dispersión de Rayleigh es el evento más probable y la intensidad dispersada es menor que la de la radiación incidente original. Este fotón dispersado resulta de una transición desde el estado virtual de vuelta al estado fundamental y es una dispersión elástica de un fotón resultante con ningún cambio en la energía (es decir, se produce a la frecuencia del láser) ⁴⁷.

La dispersión Raman es mucho menos probable que la dispersión de Rayleigh. Esto es debido al resultado de dispersión de fotones de una transición desde el estado virtual al primer estado excitado de la vibración molecular.

Esto se describe como una colisión inelástica entre fotón y molécula, ya que la molécula adquiere diferente energía de vibración ν_i y el fotón dispersado ahora tiene diferente energía y frecuencia.

Como se muestra en la **Figura 10** existen dos tipos de dispersión Raman: Stokes y anti-Stokes. Moléculas inicialmente en el estado fundamental dan lugar al estado vibratorio dispersión Raman Stokes $hc(\nu_0 - \nu_i)$ mientras las moléculas inicialmente en estado de excitación vibracional dan lugar a la dispersión Raman anti-Stokes, $hc(\nu_0 + \nu_i)$. La relación de intensidad de la Stokes relativa a las bandas anti-Stokes Raman permite el cálculo de la temperatura absoluta de la muestra, y la diferencia de energía entre el estado fundamental y estados vibracionales excitados. Las líneas de Stokes Raman son mucho más intensas que los anti-Stokes ya que a temperatura ambiente la mayoría de las moléculas se encuentran en el estado fundamental.

3.7.1.2 Espectroscopia SERS

Las moléculas están adsorbidas en la superficie de la nanoestructura metálica. La señal Raman total es proporcional a la sección eficaz Raman, σ_{libres} , la intensidad de la excitación láser $I(\nu_L)$, y el número de moléculas en el volumen de análisis, N . En SERS, es generalmente aceptado que más de un efecto contribuye a la amplificación total observada en la señal Raman. Los mecanismos de amplificación son de campo electromagnético y químico, estas dos contribuciones están expresados por el factor de amplificación del campo $A(\nu_L)$ para el láser y $A(\nu_S)$ para el campo Raman dispersado y por la sección eficaz σ_{ads} de las moléculas adsorbidas (**Figura 11**).

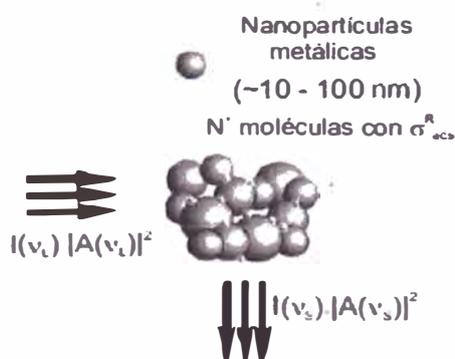


Figura 11. Esquema básico para la dispersión Raman de superficie mejorada utilizando coloides de nanopartículas metálicas. ⁴⁷

3.7.1.3 Amplificación química

La amplificación de la señal está relacionada a interacciones específicas como por ejemplo, el acoplamiento electrónico entre la molécula y el metal, resultando en un aumento de la sección eficaz σ_{ads} de las moléculas adsorbidas respecto de las que están libres. Como esta interacción requiere de un contacto cercano entre la molécula y el metal, el efecto está restringido a las moléculas que se encuentran en la primera capa sobre el metal. Los mecanismos electrónicos del SERS involucran un efecto de resonancia Raman, el cual se torna operativo debido a los corrimientos o ensanchamientos de los niveles electrónicos de las moléculas adsorbidas respecto de las que están libres o también debido a una nueva transición electrónica de transferencia de carga en el sistema metal-molécula.

3.7.1.4 Amplificación de campo electromagnético

La amplificación SERS electromagnética no requiere de contacto directo entre la molécula y el metal. La frecuencia de resonancia de plasmones dipolares en partículas y también los factores de amplificación de campo electromagnético dependen del tamaño, forma y del material de las nanopartículas metálicas y su ambiente.

3.7.2 Microscopía Electrónica de Barrido

Es un método que proporciona una descripción del relieve de superficies y utiliza electrones secundarios con energía relativamente alta dependiente del haz incidente. La emisión puede también darse por aplicación de calor a la muestra, llevándose a cabo una emisión termoiónica o una radiación electromagnética. La calidad de la imagen va a depender de la rapidez del barrido, si el barrido se hace lentamente, se obtendrá una buena señal. Tomando en cuenta que se producen también rayos x característicos, por la interacción del haz con la muestra y que estos rayos tienen una longitud de onda y energía diferente, la medición de esta energía es denominada Espectroscopia de energía dispersa.

La espectroscopia de energía dispersa (EDS) permite identificar cuáles son los elementos particulares y las proporciones relativas (% atómico). Por tanto, se puede realizar el análisis del relieve y cuantificar la composición elemental simultáneamente. Para realizar la caracterización por SEM, la muestra debe estar libre de agua y ser eléctricamente conductoras pero considerando que los electrodos caracterizados en esta investigación son carbones conductores, no fue necesario una previa preparación de muestra.

Capítulo IV

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO (AuNPs)

Para la síntesis de nanopartículas de oro se utilizó como precursor solución de oro que fue obtenido a partir de la electrólisis de una lámina de oro. Después de la purificación de la solución de oro, el análisis por Absorción Atómica dio como resultado una concentración de 1.18 g L^{-1} .

4.1.1 Electrólisis de lámina de oro

La electrólisis se llevó a cabo en una celda armada a partir de recipientes herméticos de plástico, los cuales fueron lavados con ácido nítrico diluido antes de su uso. Se armó la celda electroquímica compuesta por dos cámaras separadas por una unión de tubería como se observa en la **Figura 12**. Entre las celdas había un separador de membrana de intercambio catiónico que fue activada un día anterior sumergiendo en solución de NaCl 5 %.



Figura 12. Electrólisis de oro en una celda electroquímica.

La cámara anódica contenía solución de HCl al 20 % y el electrodo de lámina de oro. En la cámara catódica se utilizó como electrodo una lámina de titanio, en medio de Na_2SO_4 1 % ⁴⁸. El sistema se conectó a una fuente y se aplicó un potencial de 3 V por 20 minutos para producir la refinación del oro, el proceso se llevó a cabo bajo agitación. La solución de oro ácida obtenida en la cámara anódica se calentó (evitando que hierva) casi a sequedad por tres veces sucesivas con la finalidad de purificar la solución para su posterior caracterización por Absorción Atómica.

4.1.2 Síntesis de Nanopartículas

Para la síntesis se utilizaron 100 mL de dos soluciones precursora 10^{-4} mol L⁻¹ de ácido cloroáurico (HAuCl₄) ajustando a pH 9.5 y 10 con la adición de hidróxido de sodio. Fueron reducidos por 3 mL de borohidruro de sodio (NaBH₄) 0.01 mol L⁻¹, en temperatura ambiente. Este procedimiento dio como resultado una solución rojo rubí y otra azul-violeta para cada pH respectivamente. Las nanopartículas de oro formadas se estabilizaron con tirosina a través de la adición de 10 mL de una solución acuosa de 10^{-3} mol L⁻¹ sobre la solución reducida (**Figura 13**)⁴⁹. La solución obtenida se calentó por 10 minutos para la eliminación del exceso de iones de borohidruro de sodio en solución y las nanopartículas formadas se dejaron envejecer por un día.

Las nanopartículas fueron centrifugadas para su lavado a 12000 rpm por 15 minutos a 24 °C en agua ultrapura a pH 9.5 tres veces seguidas. Se caracterizaron por dispersión de luz dinámica (DLS) y por Espectroscopia de Absorción (UV-Vis).

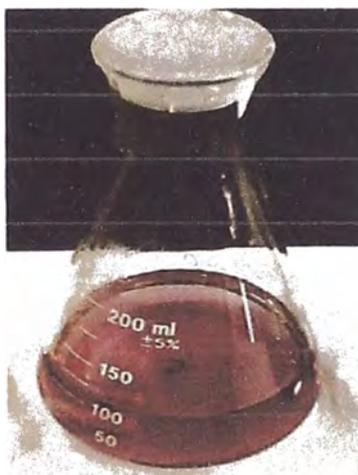


Figura 13. Síntesis de nanopartículas de oro reducidas con NaBH₄ y estabilizados con tirosina.

4.1.3 Caracterización de nanopartículas de oro

4.1.3.1 Método Espectrofotométrico de Absorción Ultravioleta-Visible

Para caracterizar las nanopartículas se utilizó el método de Absorción UV-Vis. Se midieron en una longitud de onda entre 300 a 500 nm. La absorción máxima ocurrió alrededor de 520 nm, el cual resultó característico para las nanopartículas de oro. La **Figura 14** muestra el máximo de absorción obtenido para las nanopartículas sintetizadas.

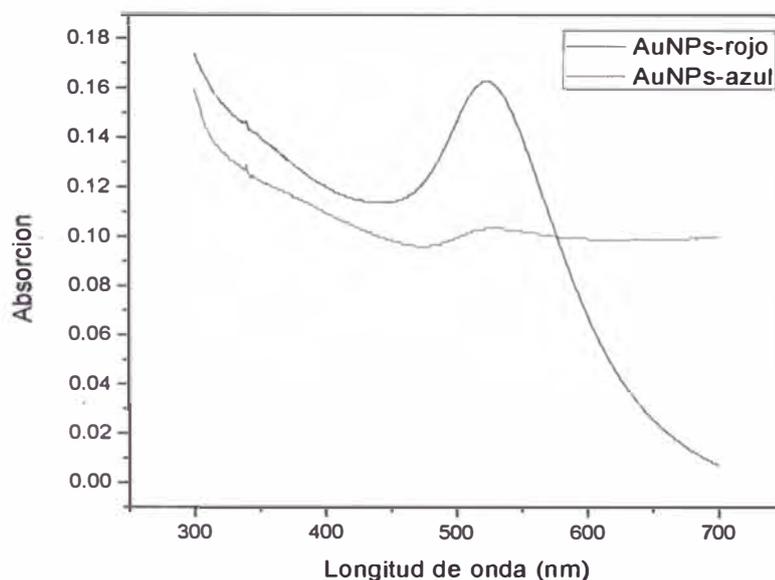


Figura 14. Espectro de absorción UV-Vis para las AuNPs.

El espectro muestra un desplazamiento de la longitud de onda para la absorción de nanopartículas azules. Considerando, que el desplazamiento está asociado al tamaño, se puede inferir que se desplazan a mayores longitudes de onda. Por otro lado, la banda del plasmón superficial para el caso de las nanopartículas de color rojo es más definido, mientras que para las nanopartículas azules tiene una banda de absorción más amplia a longitudes de onda más largas, lo cual está relacionado al promedio de las partículas de un mismo tamaño⁵⁰. Por tanto, se puede suponer que existe poca variación en la distribución del tamaño de las partículas en las nanopartículas de solución roja.

4.1.3.2 Dispersión de Luz dinámica (DLS)

Para medir por DLS las dos síntesis de nanopartículas (rojas y azules), se utilizó los parámetros de índice de refracción real $n_s = 0.21$ e imaginario $k_s = 3.272$ correspondientes al oro.

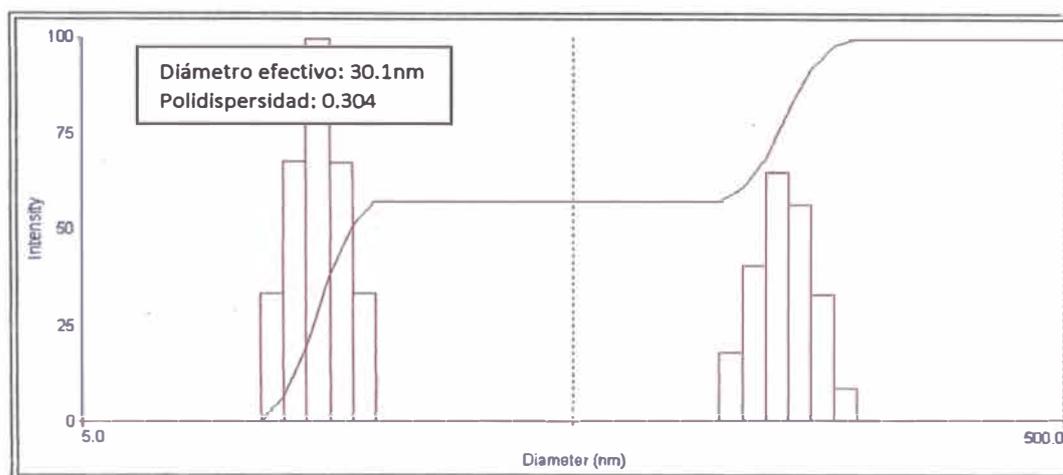


Figura 15. Representación del tamaño de NP y polidispersión de datos obtenidos en el analizador de partículas (Light Scattering). Nanopartículas Rojo-rubí con cubierta de tirosina. pH 9.5

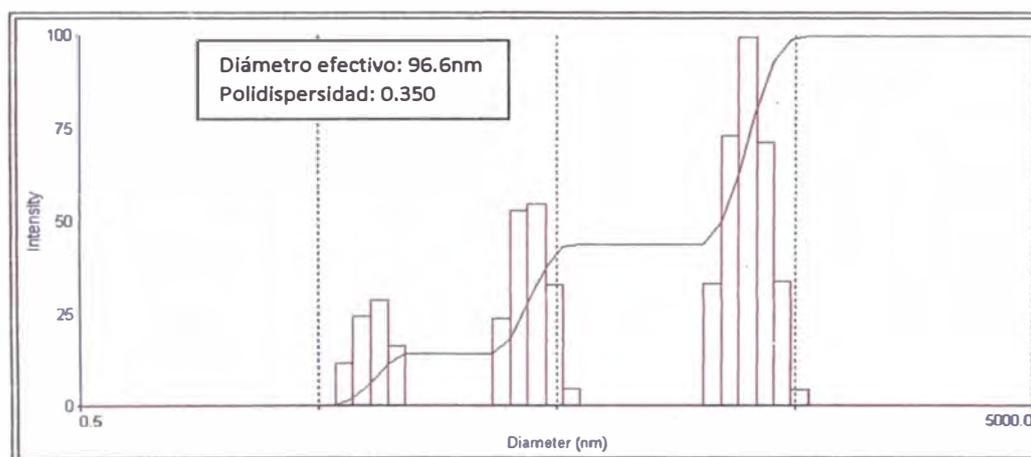


Figura 16. Representación del tamaño de NP y polidispersión de datos obtenidos en el analizador de partículas (Light Scattering). Nanopartículas morado sin tirosina. pH 9.5

Los valores obtenidos por DLS confirmaría los resultados obtenidos por Absorción UV-Vis, las NPs con cubierta de tirosina tienen un diámetro aproximado de 30.1 nm (**Figura 15**) casi un tercio menor que las nanopartículas solo reducidas con borohidruro (**Figura 16**) y mucho más pequeñas que las de coloración azul. El menor tamaño obtenido cuando se utiliza el estabilizante puede explicarse teniendo en cuenta la comprensión de la estructura de la tirosina el cual posee un grupo amino y en el otro extremo un grupo carboxilato. De esta manera, existe la posibilidad de unión entre la tirosina y la nanopartícula de oro a través de su grupo amina, estabilizándola y evitando la agregación⁴⁹. Por otro lado, la unión con el grupo amina, expone el otro extremo de

la tirosina con el medio, de esta manera la estabilidad estaría también asociado a que ahora la superficie de las nanopartículas es lo suficientemente hidrófila y puede redispersar en el medio debido al grupo carboxilato que posee interacciones puente hidrógeno con el agua.

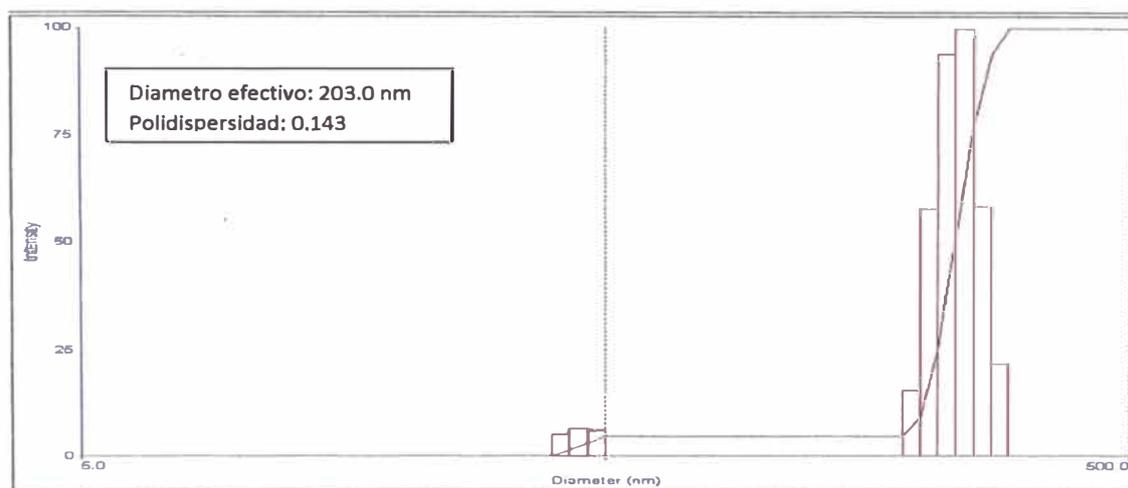


Figura 17. Representación del tamaño de NP y polidispersión de datos obtenidos en el analizador de partículas (Light Scattering). Nanopartículas azuladas. pH 10

Adicionalmente, la solución inicial rojo-rubí, con un valor de pH de 9.5 habría favorecido a la formación de la cubierta de tirosina debido a que los grupos aminos a pH básico se encuentran sin protonar y esto permitiría la unión con la superficie de oro. Asimismo, el cambio de color de rojo a azul estaría asociado a un mayor tamaño de partícula (**Figura 17**) y se observa el efecto del pH en la agregación ya que se demostró que a pH superiores a 9.5 se produce una mayor agregación de las nanopartículas de forma creciente. Cabe señalar, que se probó en un rango de pH 7-12 encontrándose que a un pH óptimo de 9.5 las nanopartículas se estabilizan.

MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE ELECTRODO DE FIELTRO DE CARBÓN

La caracterización electroquímica de los electrodos preparados se realizó por la técnica de voltametría cíclica. Antes de iniciar las mediciones se aplicó un barrido cíclico al electrodo de Pt frente a un contraelectrodo también de Pt y como electrodo de referencia Ag/AgCl/KCl(sat) en H₂SO₄ 0.5 M con la finalidad de asegurar la limpieza de la celda y mantener calibrado el electrodo de referencia (**Figura 18**). Se espera obtener un valor de potencial de reducción cercano a 0.55 V característico del Pt en estas condiciones, este tipo de voltagrama permitió tener la certeza de que el sistema celda-electrodo estaba en condiciones para iniciar con los ensayos. Además, este procedimiento se repitió todas las veces que fueron necesarias para asegurar la exactitud de las mediciones.

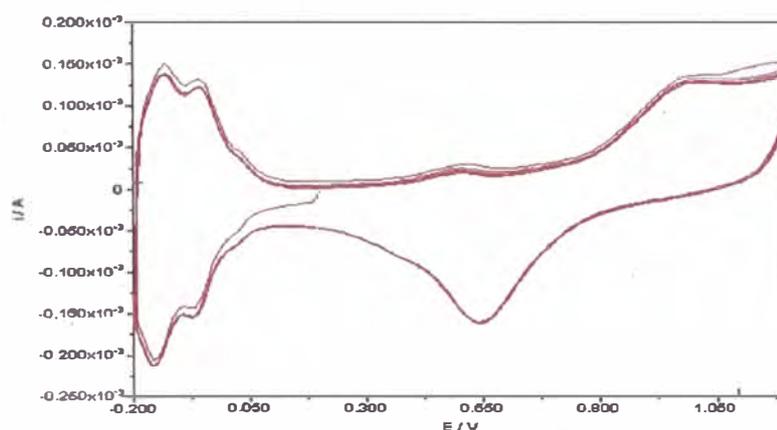


Figura 18. Voltagrama cíclico de Platino policristalino en una solución acuosa de H₂SO₄ 0.5 mol L⁻¹, a una velocidad de barrido de 20 mV s⁻¹ vs Ag/AgCl.

4.2.1 Voltametría cíclica a electrodo de oro

Se obtuvo el voltagrama cíclico del oro, utilizando como electrodo de referencia Ag/AgCl/KCl(sat) y contraelectrodo alambre de Pt, en medio de H₂SO₄ 0.5 mol L⁻¹ a una ventana de potencial entre 0 y 1.5 V y una velocidad de barrido de 10 mV s⁻¹, ambiente de N₂.

El voltagrama muestra los procesos de óxido-reducción del oro. Los dos picos en la parte superior de la **Figura 19** representan a la oxidación del oro elemental a Au(I) y Au(II) con los valores 1.1 V y 1.3 V respectivamente. En la parte inferior se observa

un pico ~ 0.95 V correspondiente a la reducción de oro. Estos picos sirvieron como referencia para reconocer los depósitos de oro en los electrodos.

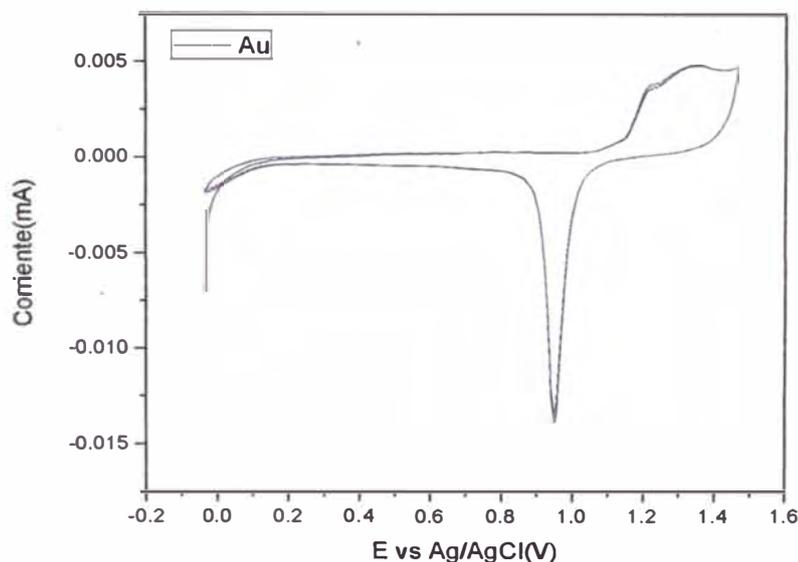


Figura 19. Voltagrama cíclico de electrodo de oro en una solución acuosa de H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} , a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} vs Ag/AgCl/KCl (sat).

4.2.2 Autoensamblado capa por capa

4.2.2.1 Autoensamblado capa por capa {AuNPs/PDADMAC}₃/GC

Pruebas iniciales del autoensamblado se realizaron en carbón vítreo. Carbón vítreo (GC) con disco de teflón se limpió utilizando el procedimiento descrito en el protocolo de limpieza, después fue sumergido en una solución de polielectrolito PDADMAC (1 mg mL^{-1}) y se llevó a baño ultrasónico por 10 minutos transcurrido este tiempo, el carbón vítreo se retiró de la solución de PDADMAC y se trasladó a un nuevo recipiente que contenía agua ultrapura. Después de sonicar por 5 minutos se sumergió en la solución de nanopartículas de oro (AuNPs) y se sonico por 10 minutos más. Por último el carbón vítreo se enjuagó llevando a baño ultrasónico por 5 minutos en una solución de agua ultrapura a pH 9.5. Este procedimiento se repitió dos veces más para la obtención de 3 capas de autoensamblado de AuNPs.

Para la caracterización se realizó un barrido cíclico entre -0.3 y 1.5 con la finalidad de identificar las nanopartículas depositadas directamente sobre el carbón vítreo en medio de H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} . En el voltograma con nanopartículas de oro soportadas sobre carbón vítreo (*curva azul*), es observado un pequeño pico de reducción entre 0.9 y 1 V el cual es característico para el oro. Sin embargo, debido a la poca concentración que se tiene de oro en la solución de NPs no es observable el pico de oxidación (**Figura 20**).

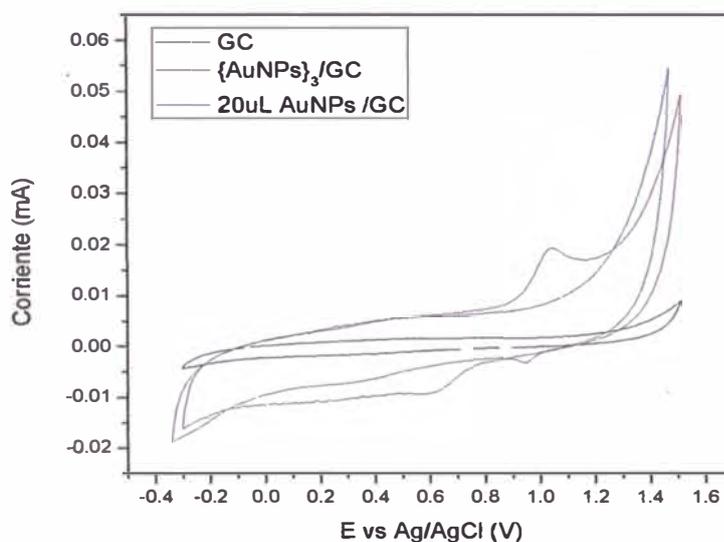


Figura 20. Voltograma cíclico de electrodo de carbón vítreo modificado con nanopartículas de oro en una solución acuosa de H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} , a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} vs Ag/AgCl.

Sin embargo, en el voltograma con nanopartículas autoensambladas sobre el carbón vítreo (*curva roja*) se puede apreciar ambos procesos, la primera oxidación a Au (I) a 1.0 V y la reducción de las nanopartículas a 0.65 V. Por otro lado, se puede distinguir un desplazamiento del pico de reducción de aproximadamente 0.4 V con respecto a las nanopartículas de oro depositadas directamente.

4.2.2.2 Autoensamblado capa por capa $\{\text{AuNPs}/\text{PDADMAC}\}_3/\text{fieltro}$ ⁴³

Filtros activados (modificación por tratamiento térmico) y sin activar se sumergieron completamente en 10 mL de solución de polielectrolito PDADMAC (1 mg mL^{-1} de cloruro de polidialildimetilamonio en 0.5 mol L^{-1} de cloruro de sodio) y se llevaron a sonicar por 30 minutos, después se pasó a retirar la solución de polielectrolito y se agregó agua ultrapura llevándose a sonicar otros 5 minutos con la finalidad de lavar y

retirar los restos de PDADMAC no adsorbidos, se retiró el agua y se agregó 10 mL de solución de nanopartículas llevándose a baño ultrasónico unos 30 minutos, transcurrido el tiempo se retiró la solución que quedo en el recipiente y se realizó el último lavado con agua ultrapura a pH 9.5. Este procedimiento permite la obtención de una monocapa, de nanopartículas sobre el fieltro de carbón, se repito el proceso 2 veces más para la obtención de 3 capas de AuNPs y se comparó el efecto del número de monocapas.

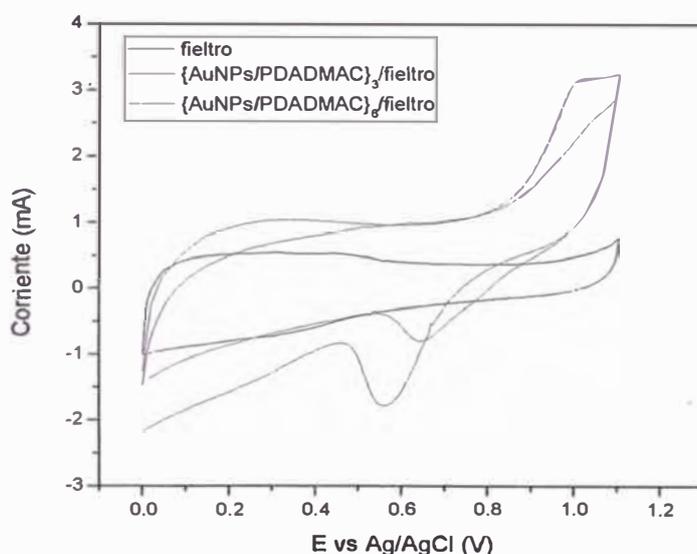


Figura 21. Voltagrama cíclico de electrodo fieltro de carbón autoensamblado con nanopartículas de oro 3 y 6 capas, en una solución acuosa de H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} , a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} vs Ag/AgCl.

Se realizó un voltagrama cíclico al fieltro del carbón reduciendo la ventana de potencial de 0 hasta 1.1 V para evitar que el fieltro de carbón se active (**Figura 21**). Los resultados obtenidos son los mismos que para el carbón vítreo ya que se puede distinguir los dos picos del proceso redox. Así también, la existencia de un mayor desplazamiento en el pico de reducción con el aumento del número de monocapas de NPs. Se puede asociar este desplazamiento al sobrepotencial generado por el autoensamblado el cual provoca un mayor impedimento a la reducción, de esta manera el proceso exige un mayor potencial.

Se trató de mejorar el proceso redox, trabajando con un electrodo activado. Con la modificación térmica en la superficie del fieltro se adsorben aniones carboxilatos lo que podría conducir a una mayor interacción electrostática con el polielectrólito positivo. No obstante, los resultados muestran que ocurre una disminución de la corriente de pico de oxidación de las NPs de oro (**Figura 22**). Considerando que para

propósito del tema es importante la cantidad de electrones que fluyen y la modificación térmica puede proporcionar componentes que obstaculicen este proceso, resultó más eficaz trabajar con un electrodo sin activar.

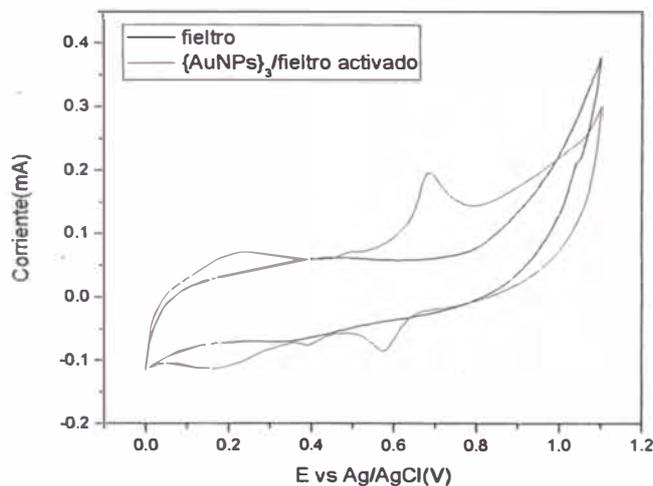
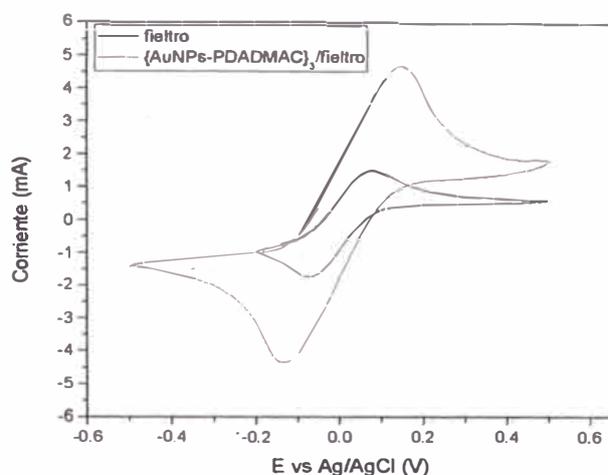


Figura 22. Voltograma cíclico de electrodo fieltro de carbón activado con $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-HNO}_3$ y modificado superficialmente con nanopartículas de oro en una solución acuosa de H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} , a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} vs Ag/AgCl/KCl(sat) .

Adicionalmente, el barrido cíclico realizado en la cupla electrolytica de $\text{Fe(CN)}_6^{4-}/\text{Fe(CN)}_6^{3-}$ permitió comparar el aumento de la corriente de pico en un electrodo autoensamblado (**Figura 23**). Este medio permite realizar una comparación entre electrodos modificados y sin modificar. Además, los cambios en la reversibilidad del proceso y la altura del pico de corriente para la oxidación del Fe (II) a Fe(III) se asocian a la modificación en la superficie.

Los resultados del voltograma muestran que existe un aumento en la corriente de pico anódico a 5 mA lo cual estaría generado por la incorporación de las nanopartículas al electrodo ya que por su alta conductividad aumentan la transferencia de electrones. Sin embargo, se observa un aumento en la magnitud de la diferencia de potencial anódico-catódico ($E_a - E_c$) con respecto al electrodo sin modificar. Esto es debido a que si bien existe una mayor cantidad de electrones el proceso se vuelve cuasi-reversible por el uso del polímero PDADMAC que se encuentra separando cada monocapa lo cual se resume en la disminución de la cinética del proceso.



	$(I_a + I_c)/2$ (mA)	$E_a - E_c$ (V)
fieltro	2.18	0.15
{AuNPs- PDADMAC} ₃ / fieltro	5.24	0.28

Figura 23. Voltagrama cíclico de fieltro de carbón autoensamblado con nanopartículas de oro en una solución acuosa equimolar de 10 mmol L^{-1} de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ - $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ en electrólito soporte de KCl (0.1 mol L^{-1}), a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} y un rango de potencial de -0.5 y 0.5 Ag/AgCl/KCl(sat).

4.2.2.3 Autoensamblado capa por capa {AuNPs/PDADMAC}₃/MWCNT

Nanotubos de carbón de pared múltiple (MWCNT) se modificaron con nanopartículas de oro a través del autoensamblado capa por capa. Se mezcló 20 mg de MWCNT con 20 mL de solución PDADMAC y se llevó a baño ultrasónico por 30 minutos, transcurrido este tiempo se llevó a centrifugar por 10 minutos a 10000 rpm y se extrajo la solución sobrenadante. La solución de nanotubos se lavó con agua ultrapura y se agregó 20 mL de solución de nanopartículas; la mezcla se llevó a baño ultrasónico otros 30 minutos, y las nanopartículas no ensambladas se retiraron por centrifugación mediante la extracción del sobrenadante, el volumen extraído se repuso con agua ultrapura a pH 9.5 para un nuevo lavado. Se repitió el procedimiento 2 veces más para la obtención de tres capas de AuNPs.

4.2.2.3.1 Preparación de tintas de MWCNT

Se preparó dos mezclas de 2 mg de nanotubos de carbón funcionalizados con nanopartículas de oro y sin funcionalizar. Se adicionó 15 μL de Nafion y 500 μL de agua ultrapura y se llevó a baño ultrasónico por 3 horas hasta obtener una solución homogénea (tinta). El proceso de ultrasonido se llevó a cabo todas las veces que fueron necesarias para mantener la dispersión de los nanotubos.

4.2.2.3.2 Voltametría cíclica de $\{AuNPs/PDADMAC\}_3/MWCNT$

Se hizo secar sobre carbón vítreo 40 μL de tinta. Se realizó el barrido cíclico entre 0 y 1.1 V en solución de H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} , en ambiente de N_2 , obteniéndose el voltagrama de la **Figura 24**. Se puede observar los picos de oxidación y reducción del oro entre 0.5-0.6 V. Además, se produce el mismo desplazamiento de potencial observado en los anteriores voltagramas. Por tanto, se puede concluir que además de los procesos electroquímicos anteriores, el uso del Nafion en la tinta no produce ningún cambio significativo, ni interferencia en el proceso redox de las nanopartículas.

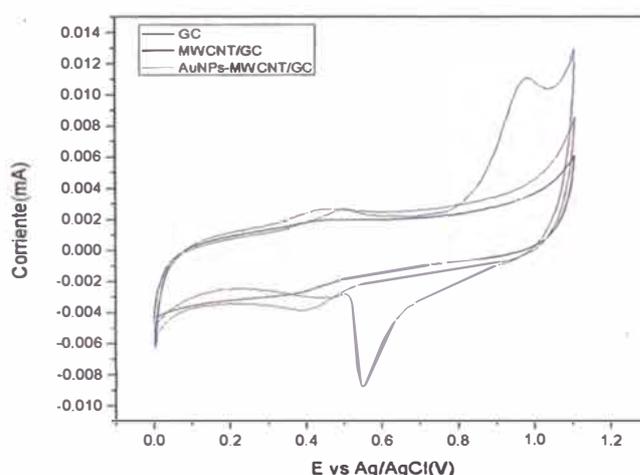
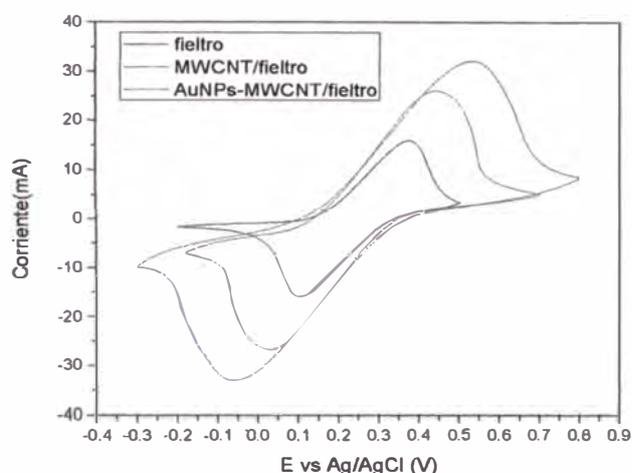


Figura 24. Voltagrama cíclico de nanotubos de carbón autoensamblados con AuNPs y soportados sobre carbón vítreo en una solución acuosa equimolar de 10 mmol L^{-1} de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ en electrolito soporte de KCl (0.1 mol L^{-1}), a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} y un rango de potencial de -0.5 y 0.5 vs Ag/AgCl/KCl(sat).

Similar al proceso anterior, se realizó el barrido cíclico del mismo electrodo en solución electrolítica de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (**Figura 25**). Los resultados muestran que existe un aumento significativo en la corriente de pico anódico así mismo existe una mayor diferencia de potencia entre los picos de oxidación y reducción para el electrodo con la tinta de nanotubos.

Tal como se observó anteriormente, si bien existe un aumento en la cantidad de flujo de electrones, el sistema puede verse desfavorecido en términos de cinética. Sin embargo, este proceso se ve compensado con el aumento en la cantidad de flujo de electrones.



	$(I_a + I_c)/2$ (mA)	$E_a - E_c$ (V)
fieltro	15.4	0.27
MWCNT/fieltro	24.7	0.42
{AuNPs- PDADMAC} ₃ / MWCNT/ fieltro	27.7	0.59

Figura 25. Voltograma cíclico de nanotubos de carbono y nanopartículas de oro ensamblados en nanotubos de carbono soportados sobre fieltro en una solución acuosa equimolar de 10 mmol L^{-1} de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ - $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ en electrolito soporte de KCl (0.1 mol L^{-1}), a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} .

4.2.3 Electrodeposición de AuNPs

4.2.3.1 Electrodeposición de AuNPs sobre GC

Sobre un carbono vítreo previamente limpiado, nanopartículas de oro se electrodepositaron a partir de una solución que contenía oro a 0.11 mmol L^{-1} en HCl 0.5 mol L^{-1} . En un sistema con tres electrodos, alambre de Pt como contraelectrodo y referencia de $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$ (sat). Se utilizó la técnica de cronoamperometría a un potencial de paso de 1.1 a 0 V en un tiempo de 600 s para la obtención de nanopartículas de 20 nm aproximadamente⁵¹. Para verificar la deposición de AuNPs, se realizó un voltograma al carbono vítreo en solución de H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} bajo ambiente de N_2 . La **Figura 26**, se muestra la formación de nanopartículas de oro ya que presenta los picos característicos de oxidación en 1.2 V y reducción en 0.9 V, como los observados en el voltograma de referencia de la **Figura 19**.

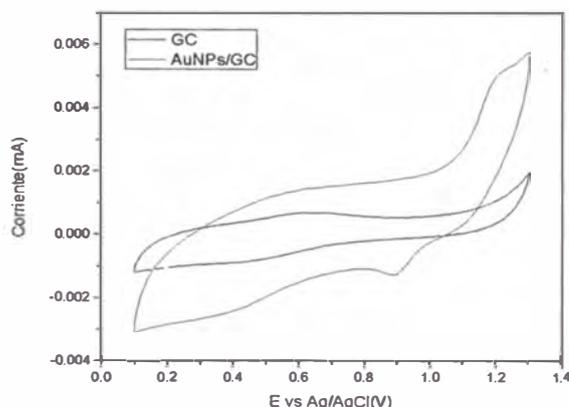
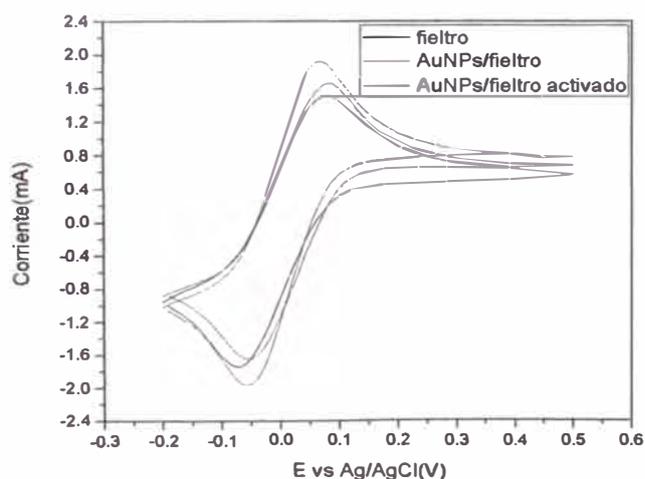


Figura 26. Voltograma cíclico de AuNPs electrodepositadas sobre un electrodo de carbón vítreo en una solución acuosa de H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} , a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} vs Ag/AgCl/KCl (sat).

4.2.3.2 Electrodeposición de AuNPs sobre fieltro de carbón

Sobre un fieltro de carbón limpio se realizó la electrodeposición de las nanopartículas, siguiendo el mismo procedimiento que para el electrodo de carbón vítreo. En la caracterización se realizó el barrido entre -0.2 y 0.5 V , usando como electrólito una solución equimolar de ferrocianuro y ferricianuro de potasio $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 - \text{KCl}$ (0.1 mol L^{-1}) a 10 mmol L^{-1} ; se comparó además los voltagramas de fieltro activado electroquímicamente y sin activar.



	$(I_a + I_c)/2$ (mA)	$E_a - E_c$ (V)
fieltro	2.11	0.15
AuNPs/fieltro	2.57	0.12
AuNPs/fieltro funcionalizado	2.24	0.13

Figura 27. Voltograma cíclico de fieltro de carbón activado y sin activar ambos con electrodeposición de AuNPs en una solución acuosa equimolar de 10 mmol L^{-1} de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ en electrólito soporte de KCl (0.1 mol L^{-1}), a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} .

Como se observa en la **Figura 27**, el fieltro con nanopartículas de oro tiene una mayor corriente con un aumento significativo en corriente de 0.46 mA con respecto al voltograma de referencia. Esto indica que se ha mejorado la transferencia de electrones en el electrodo. Estos resultados muestran que la activación electroquímica realizada al electrodo contribuye al aumento de corriente.

Para realizar la comparación de la cantidad de carga de oro en cada modificación, se calculó la densidad de partícula para la modificación por autoensamblado y el método de electrodeposición (**Tabla 3**). Los resultados muestran que a través del método de autoensamblado se puede depositar casi 10 veces más nanopartículas que por el método de electrodeposición.

Tabla 3. Cálculo de la cantidad de masa presente en las modificaciones con nanopartículas de oro.

Tipo de modificación con AuNPs	Velocidad de Barrido (mV s^{-1})	Área de pico (catódico)	Masa de AuNPs (μg)	Densidad de partícula (mg/m^2)
Autoensamblado sobre carbón vítreo – 3 capas	10	8.402×10^{-4}	0.171	24
Autoensamblado sobre fieltro – 3 capas	10	0.0072	1.469	0.012
Electrodeposición sobre carbón vítreo	10	7.536×10^{-5}	0.015	2.1

4.2.4 Modificación con polímeros

La modificación de la superficie de fieltro de carbón con polianilina (PANI) se llevó a cabo en medio de ácido sulfúrico. Con la finalidad de estabilizar la película y favorecer el crecimiento de la PANI, se realizaron ensayos de polimerización en medios orgánicos de ácido oxálico y tartárico a distintas concentraciones.

4.2.4.1 Electrodeposición de película de PANI sobre alambre de Pt

Se preparó una solución 0.1 mol L^{-1} de anilina, 0.01 mol L^{-1} de ácido oxálico y 0.5 mol L^{-1} de H_2SO_4 que sirvió como electrólito y por la técnica de voltametría cíclica se depositó polianilina sobre Pt. Antes de la electrodeposición el alambre de Pt fue limpiado siguiendo el protocolo de limpieza descrito anteriormente. Se armó el sistema de tres electrodos con Ag/AgCl como referencia y grafito como contraelectrodo, se burbujeó con N_2 por 10 minutos y se realizaron 20 barridos con un rango de potencial

entre -0.1 y 0.9 V a una velocidad de 50 mV s⁻¹ ^{52, 53}. Durante la polimerización electroquímica, ciertas partes de la superficie del alambre de Pt tornan a color verde lo que indicó la deposición del PANI en su estado emeraldina. Después el alambre fue lavado y secado. Se repitió el procedimiento variando las concentraciones de ácido oxálico en 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 y 0.5 mol L⁻¹ observándose un aumento gradual de coloración verde en la superficie del Pt conforme aumentaba la concentración de ácido oxálico. Esta polimerización se repitió con el ácido tartárico y se comparó para todas las concentraciones. El electrodo de Pt en cada modificación fue caracterizado por Espectroscopia Raman. En el proceso de electrodeposición, con el aumento de los barridos de potencial, se observó mejor definido los picos de oxidación y reducción de la polianilina (PANI). En el voltograma de la **Figura 28**, a diferente concentración de ácido oxálico añadido a la anilina, se observan dos picos de oxidación, los cuales según la bibliografía corresponderían a la transición de leucoemeraldina a sal de emeraldina para el primer pico de oxidación a potenciales cercanos a 0.2 V y el segundo pico a la forma totalmente oxidada, sal de pernigranilina a potenciales cercanos a 0.5 V ^{38, 53-54}. El cambio de color generado en el electrodo al pasar a verde indicaría el inicio de la oxidación de la polianilina y a potenciales más altos se produce la sobreoxidación con el cambio a verde oscuro. El crecimiento de los picos de reducción sugiere que se llevó a cabo la deposición de la polianilina.

Además, se puede observar que con la adición de ácido oxálico iniciando en 0.05 mol L⁻¹, el aumento de la concentración de ácido oxálico genera un aumento en la intensidad de corriente sin embargo, cuando la concentración es de 0.5 mol L⁻¹ la intensidad decrece, esto probablemente se deba a que a mayores concentraciones de ácido oxálico los iones permanecen cercanos al electrodo e impiden la difusión de la anilina hacia la superficie del electrodo obstruyendo el crecimiento de la polianilina en toda la superficie, ya que se hace más difícil la transferencia de carga.

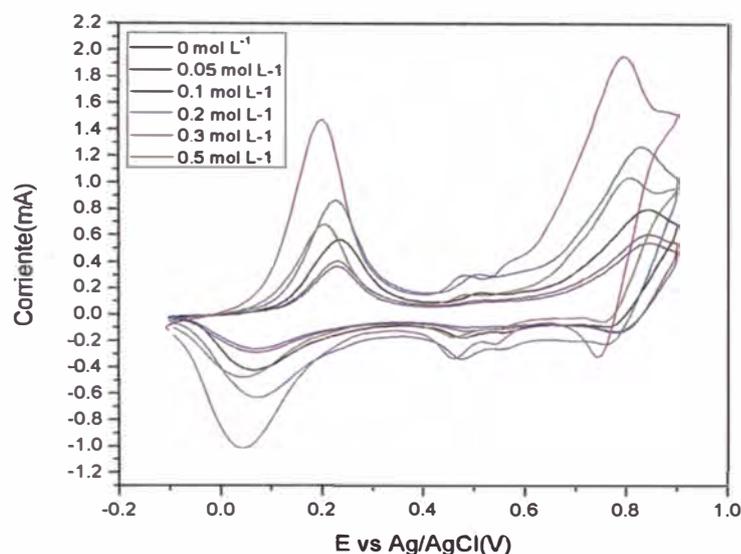


Figura 28. Voltagrama cíclico de polimerización electroquímica de 0.1 mol L^{-1} de anilina sobre electrodo de Pt en una solución acuosa de H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} y ácido oxálico, a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} vs Ag/AgCl/KCl (sat). Se muestra el barrido 20 para todas las curvas.

Adicionalmente, comparando todas las curvas del voltagrama (**Figura 28**) se observa que a partir de un valor de concentración mayor e igual a 0.1 mol L^{-1} de ácido oxálico se afecta al crecimiento del polímero y esto puede deberse a que en dicha concentración de ácido se estaría favoreciendo el crecimiento de la polianilina con un mayor porcentaje de su fase emeraldina la cual posee una mayor conductividad. Por el contrario a menores valores de concentración de ácido oxálico añadido al electrolito, no se produce ningún cambio. A diferencia del caso del ácido oxálico, se observa en la **Figura 29**, que la adición de ácido tartárico, disminuye la intensidad de corriente. Esta tendencia, se produce a concentraciones mayores de 0.02 mol L^{-1} , lo cual puede deberse a que el ácido tartárico favorece la formación de un mayor porcentaje de polianilina en su fase pernigranilina que está totalmente oxidada y la cual no es conductora ⁵⁵.

De esta manera, considerando los resultados para los dos ácidos orgánicos, se decidió trabajar con ácido oxálico por ser más adecuado como medio protónico para obtener una polianilina con alta conductividad. Además se consideró como concentración óptima 0.3 mol L^{-1} de ácido oxálico.

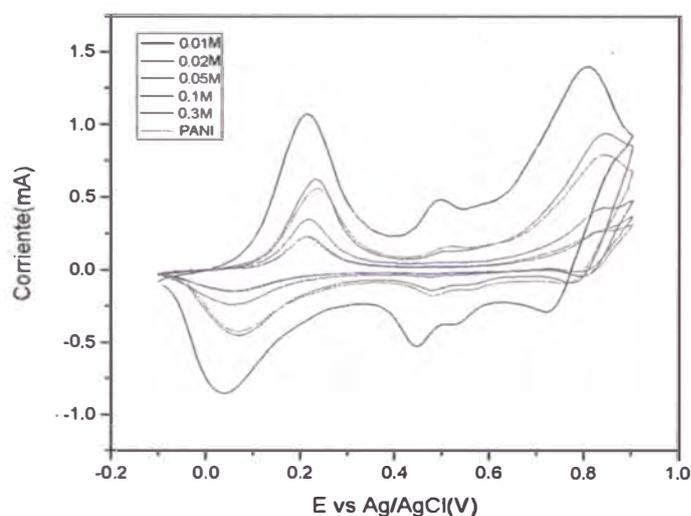


Figura 29. Voltagrama cíclico de polimerización electroquímica de 0.1 mol L^{-1} de anilina sobre electrodo de Pt en una solución acuosa de H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} y ácido tartárico, a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} vs Ag/AgCl. Se muestra el barrido 20 para todas las curvas.

Las medidas por espectroscopia Raman de la anilina electropolimerizada sobre el electrodo de Pt muestran las bandas alrededor de 419 y 1593 cm^{-1} las cuales son características para la anilina (**Tabla 4**). Dichas bandas corresponderían en su totalidad a las interacciones de anillo de quinona quienes son especies de la forma totalmente oxidada de la anilina, es decir la pernigranilina. El espectro Raman no muestra los picos característicos de los anillos semiquinoides que corresponde a la especie emeraldina únicamente la banda 1166 cm^{-1} .

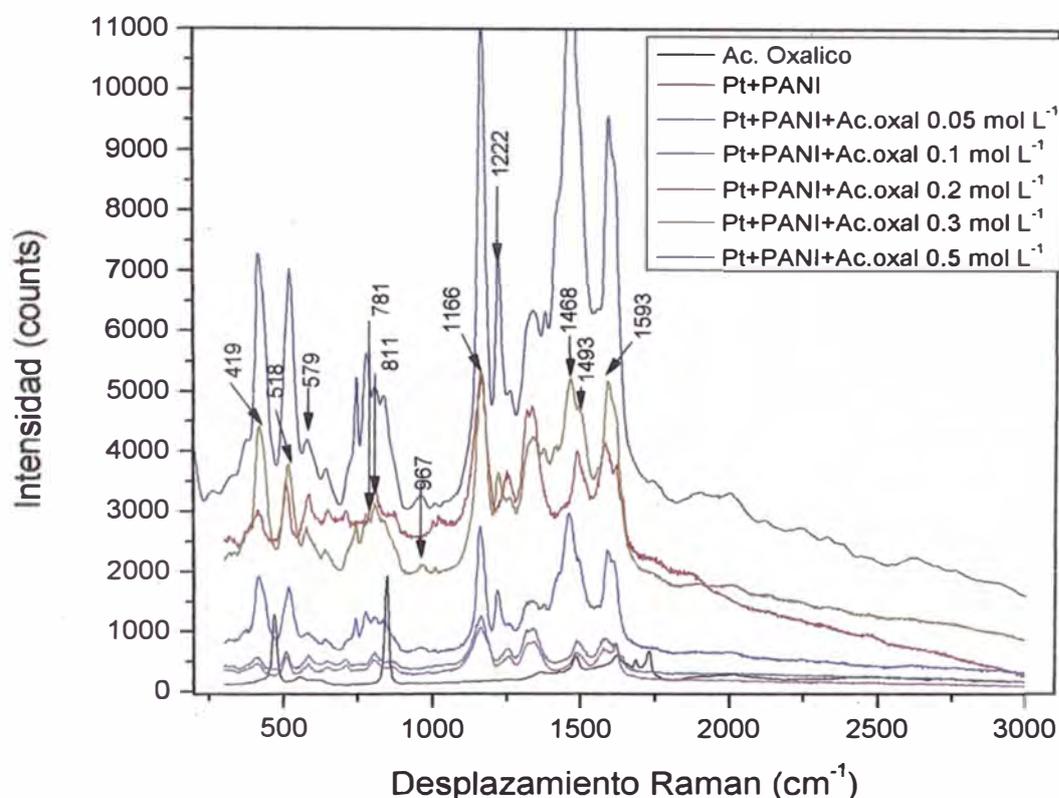


Figura 30. Espectro Raman colectados con láser 638 nm y objetivo de 10x para polimerización electroquímica de 0.1M de anilina y ácido oxálico sobre electrodo de Pt.

Tabla 4. Estructuras de las bandas principales (cm^{-1}) para el espectro Raman de la electropolimerización de anilina sobre platino ^{56,53}.

Número de onda	Asignación tentativa de picos
419	C-N-C (deformación en el plano)
518	Anillo quinoide y semiquinoide (deformación en el plano)
781	Anillo quinoide
811	Anillo benceno p-disustituido
1166	C-H (flexión en el plano de anillos quinoides y semiquinoides)
1222	C-N (estiramiento)
1468	C=N
1493	C=N y CH=CH (modo mixto, vibración)
1593	Estiramiento anillo quinoide

Estudios de investigación sobre la electropolimerización in situ y ex situ demostrarían que la medición Raman in situ permite obtener las bandas características de anillos semiquinoides y la ex situ las bandas quinoides ⁵³ debido a que la medición in situ evita la exposición del electrodo al aire y mantiene a la polianilina en su forma

protonada. Por tanto por las condiciones de caracterización que se tuvo en el laboratorio, se puede inferir que la electropolimerización permitió la síntesis de emeraldina pero la exposición al aire del electrodo de platino para su medición en Raman habría provocado la oxidación total de la anilina.

El espectro Raman (**Figura 30**) muestra resultados similares encontrados por voltametría cíclica respecto a la concentración de ácido oxálico. A partir de un valor de concentración mayor a 0.1 mol L^{-1} de ácido oxálico, se observan bandas más con mayor intensidad lo que significa que existe una mayor concentración de polianilina crecida sobre el electrodo.

4.1.4.2 Electropolimerización de película PANI sobre fieltro de carbón

Antes de la polimerización el fieltro de carbón se activó electroquímicamente por voltametría cíclica en medio de H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} entre -0.4 y 2 V con 10 barridos a 200 mV s^{-1} en una celda electroquímica con la configuración de tres electrodos, grafito como contra y Ag/AgCl/KCl (sat) como referencia. Después, se preparó una solución de 0.1 mol L^{-1} de anilina y 0.3 mol L^{-1} de ácido oxálico (concentración óptima) en 0.5 mol L^{-1} de H_2SO_4 , se mantuvo en ambiente de N_2 y se polimerizó en un rango de potencial de -0.1 hasta 0.9 V , 20 barridos a 20 mV s^{-1} .

4.2.5 Modificación por compositos

4.2.5.1 Preparación de AuNPs-MWCNT/ PANI sobre Pt y C

Alambre de Pt funcionalizado con PANI se sumergió en solución ácida de HCl ajustado a pH 3 bajo agitación continua por 10 minutos, después de enjuagar con agua ultrapura y secar el electrodo se llevó a baño ultrasónico en una solución ácida que contenía 2 mg de MWCNT/Au (**Figura 31**). Se repitió el procedimiento para carbón vítreo y fieltro de carbón.

En la **Figura 32**, se representa el voltagrama cíclico de la modificación del electrodo con el composito de anilina y MWCNT-Au. Debido a la interacción electrostática que ejerce la carga negativa de los MWCNTs a la polianilina protonada, el voltagrama presenta un ensanchamiento de aumento de corriente y una disminución del tamaño y ensanchamiento del pico de reducción.



Figura 31. Preparación de compuesto a través de un baño ultrasónico del electrodo con polianilina en una dispersión de nanotubos de carbón en medio HCl .

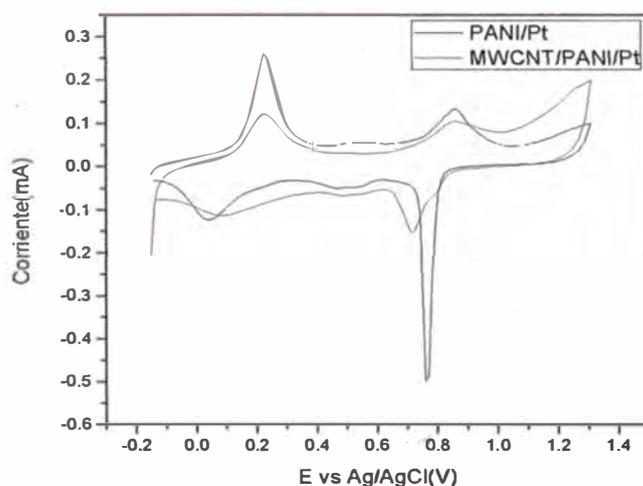


Figura 32. Voltograma cíclico de compuesto de nanotubos de carbón y anilina electropolimerizada sobre electrodo de Pt en una solución acuosa de H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} y ácido oxálico, a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} vs Ag/AgCl/KCl(sat).

Otra posibilidad de explicación para el proceso químico que se presenta con la modificación del electrodo, sugiere que la interacción de la polianilina y los nanotubos de carbón sea del tipo puente de hidrógeno las cuales se producen por los grupos amino de la anilina y los grupos carboxilatos de la tirosina que se encuentra rodeando a las nanopartículas de oro autoensamblados en los MWCNT es decir, un tipo de interacción indirecta. Por otro lado, cabe la posibilidad que la posición que tienen los nanotubos

sobre el electrodo genere interacciones del tipo π - π ⁴¹, como se observa en la **Figura 33** y se produce el desplazamiento de iones cloruros en el medio, es decir, un tipo de interacción directa.

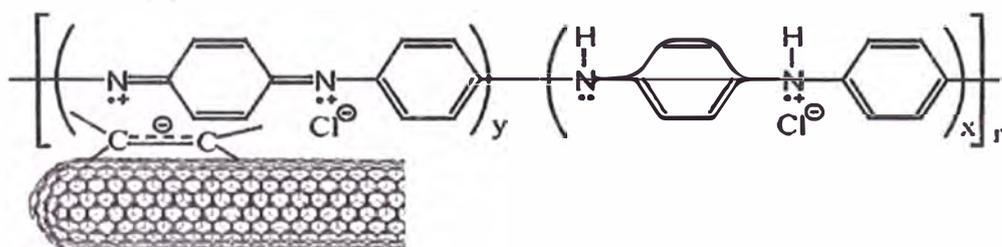
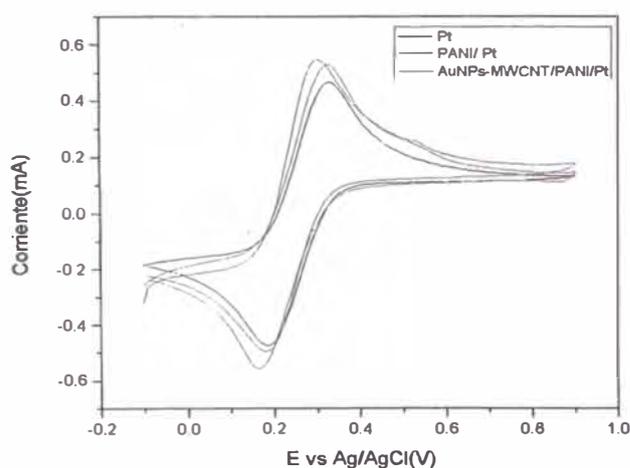


Figura 33. Interacción tipo π - π entre los nanotubos de carbono y la polianilina.⁴¹



	$(I_a + I_c)/2$ (mA)	$E_{pa} - E_{pc}$ (V)
Pt	0.56	0.15
PANI/Pt	0.63	0.17
AuNPs-MWCNT /PANI/Pt	0.65	0.12

Figura 34. Voltagrama cíclico de compuesto de nanotubos de carbono y anilina electropolimerizada sobre electrodo de Pt en una solución acuosa equimolar de 10 mmol L^{-1} de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ - $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ en electrolito soporte de KCl (0.1 mol L^{-1}), a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} .

En la **Figura 34**, se representa el proceso redox de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ para Pt con compuesto de anilina y nanotubos. Se observa un aumento significativo en el pico de corriente para la oxidación a Fe(II), esto se explicaría debido a la conductividad de la polianilina la cual mejora la velocidad de transferencia electródica de los iones. Este efecto, se ve incrementado por las propiedades de los nanotubos de carbono. El aumento del área superficial del electrodo aumenta la velocidad de transferencia debido al mayor contacto de los sitios redox del PANI y nanotubos.

En el caso del electrodo de platino el cual posee una superficie bastante lisa se observa que la modificación con la polianilina mejora la intensidad de corriente pero frena la transferencia de electrones debido al aumento de la diferencia de potencial entre los picos anódico y catódico. Asimismo, la adición de nanotubos de carbón contribuye a disminuir la diferencia de potencial, conduciendo a la mejora de la conductividad y aumento de la cinética de transferencia.

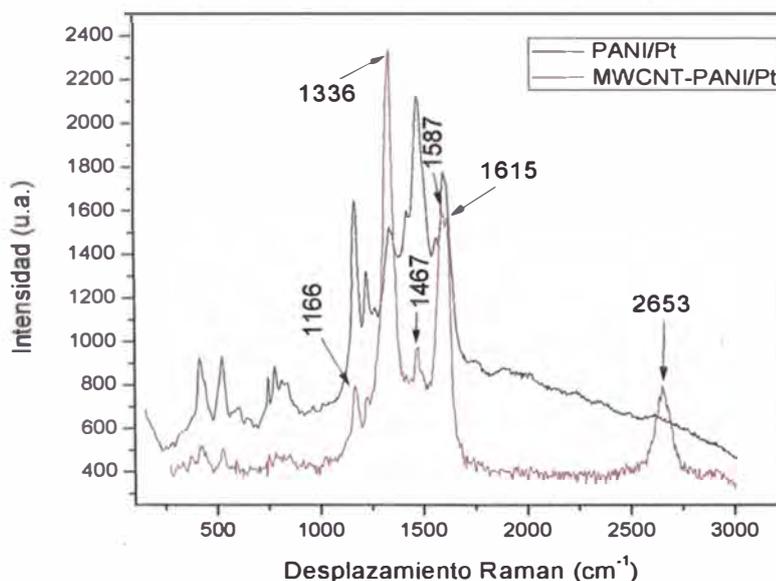


Figura 35. Espectro Raman colectados con láser de 785 nm y objetivo de 10x para polimerización electroquímica de 0.1 mol L⁻¹ de anilina y ácido oxálico sobre electrodo de Pt.

Tabla 5. Estructuras de las bandas principales (cm⁻¹) para el espectro Raman de compuesto de nanotubos de carbón y anilina sobre platino.

Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación tentativa de picos
1166	C-H (flexión en el plano de anillos quinoides y semiquinoides)
1336	Banda D
1467	C=N (quinoide)
1587	Banda G
1615	C-C
2653	Banda G'

Por otro lado, en el espectro Raman de la **Figura 35**, se puede distinguir las bandas características de la polianilina en el electrodo de platino modificado. Además, se observan las bandas características de los nanotubos de carbón en el electrodo que contiene el compuesto, lo que prueba que el método aplicado permite que los nanotubos

puedan soportarse sobre el electrodo. La **Tabla 5**, resume los valores de bandas principales y la asignación que se ha dado. De estos valores se concluye que los nanotubos se pueden depositar sobre la superficie de platino con polianilina asegurando la formación del compuesto.

En general, la polimerización es homogénea en el electrodo de platino por ser una superficie lisa, de este modo los resultados obtenidos anteriormente sirvieron para corroborar el método aplicado para la modificación. A continuación, se observa el comportamiento de la polimerización en el fieltro de carbón. En la **Figura 36**, se muestra el voltagrama cíclico para fieltro de carbón con compuesto. Existen diferencias con respecto al voltagrama de electrodo de Pt ya que se obtuvo los procesos de oxidación y reducción para el PANI a otros valores de potencial. Estos desplazamientos de potencia se pueden asociar al efecto de polarización. Además, el único pico de oxidación observado en 0.6 V es característico para la oxidación de la polianilina (emeraldina) en el compuesto con nanotubos.

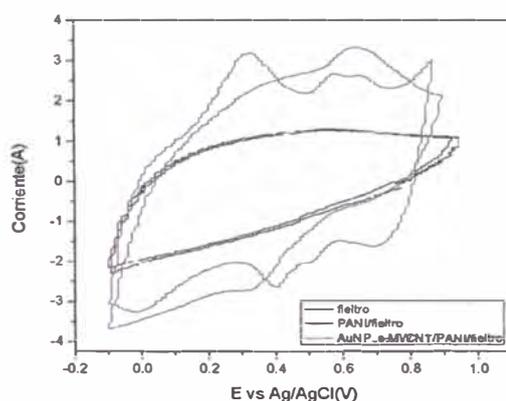
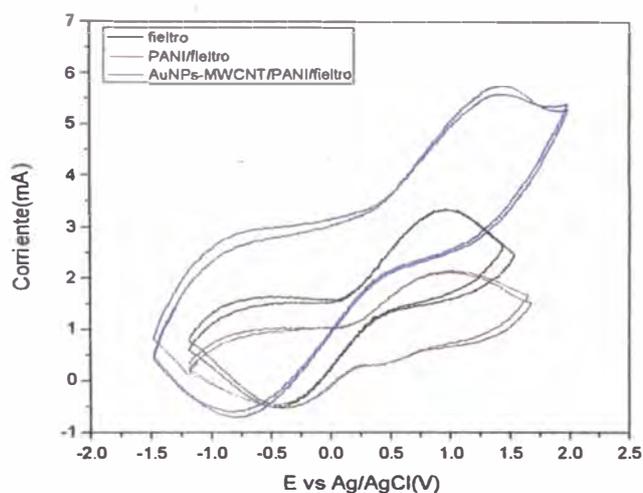


Figura 36. Voltagrama cíclico de compuesto de nanotubos de carbono y anilina electropolimerizada sobre electrodo de fieltro de carbono en una solución acuosa de H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} y ácido oxálico 0.3 mol L^{-1} , a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} vs $\text{Ag/AgCl/KCl}(\text{sat})$.

Los voltagramas en solución de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (**Figura 37**) muestran el crecimiento de corriente cuando se añade los nanotubos de carbono funcionalizados con NPs. Esto se debe a la conductividad de las AuNPs, lo cual genera una mayor transferencia de electrones. No obstante, los impedimentos producidos en la superficie de líquido cercano al electrodo, genera la separación de picos de oxidación y reducción.



	$(I_a + I_c)/2$ (mA)	$E_{pa} - E_{pc}$ (V)
fieltro	1.69	1.43
PANI/fieltro	0.97	1.42
{AuNPs} ₃ - MWCNT/PANI /fieltro	2	2.24

Figura 37. Voltagrama cíclico de compuesto de nanotubos de carbón y anilina electropolimerizada sobre electrodo de fieltro de carbón en una solución acuosa equimolar de 10 mmol L^{-1} de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ - $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ en electrólito soporte de KCl (0.1 mol L^{-1}), a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} .

Adicionalmente, en el caso del electrodo de fieltro se puede observar que la modificación con el compuesto mejora la intensidad de corriente pero empeora la cinética de transferencia debido a las propiedades intrínsecas del electrodo y las dimensiones que posee, contribuye al aumento de polarización.

La caracterización del electrodo, por Espectroscopia Raman (**Figura 38**) muestra los picos características de los componentes de la polianilina depositada, el cual es similar a la caracterización en platino. En la **Tabla 6**, se resumen los valores encontrados. Se tomó en consideración que en la caracterización Raman de la superficie de fieltro que contiene el compuesto solo es posible observar a la polianilina ya que tanto el fieltro de carbón como los nanotubos soportados poseen las bandas D y G.

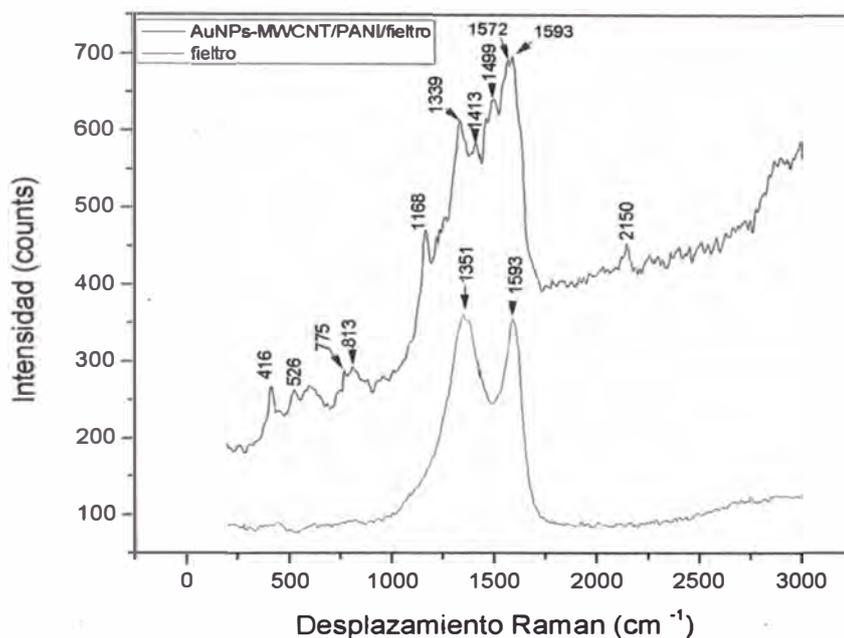


Figura 38. Espectro Raman colectados con láser de 785 nm y objetivo de 10x para polimerización electroquímica de 0.1 mol L^{-1} de anilina y ácido oxálico sobre electrodo de feltro de carbón.

Tabla 6. Estructuras de las bandas principales (cm^{-1}) para el espectro Raman de compuesto de nanotubos de carbón y electropolimerización con anilina de electrodo de platino.

Numero de onda (cm^{-1})	Asignación tentativa de picos
416	Anillo quinoide
526	C-N-C (anillo en el plano)
775	Anillo quinoide
813	Anillo benceno p-disustituido/quinoide)
1168	C-H (plano anillo quinoide)
1339	C-N-C (vibración semiquinoide)
1351	Banda D (carbón)
1413	N=N (vibración de estiramiento)
1499	C=N y CH=CH (modo mixto, vibración / semiquinoide)
1593	Banda G (carbón)

4.2.6 Caracterización superficial a electrodos modificados por Microscopía Electrónica de Barrido

La caracterización de la modificación superficial de los electrodos se llevó a cabo por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) (**Figura 39**). La morfología muestra al fieltro de carbón formado por muchas fibras. El acercamiento a una de las fibras muestra a los nanotubos de carbón en forma de ovillos soportadas a la superficie (**B**) forma característica de estos materiales ³⁶.

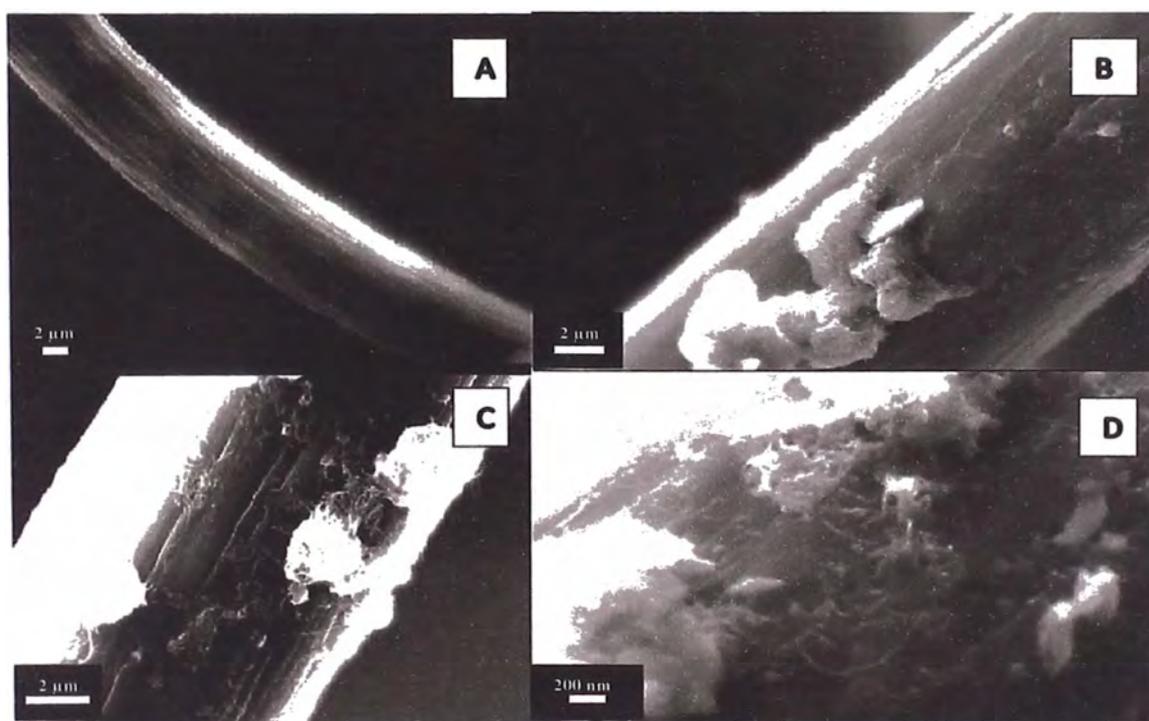


Figura 39. Imagen SEM de fieltro de carbón **A**, fieltro de carbón con nanotubos de carbón **B**, fieltro de carbón con compuesto de nanotubos y polianilina **C** y **D**.

Las otras imágenes muestran la película de polianilina sobre el fieltro de carbón. Para la figura en **C**, se puede distinguir una película polimérica sobre la fibra del electrodo. Además, el acercamiento a la imagen a 200 nm (**D**), permite distinguir la morfología de la película, la cual es comparable con la referencia (**Oueny et al., 2014**), por tanto este resultado hace suponer que se trata de la polianilina.

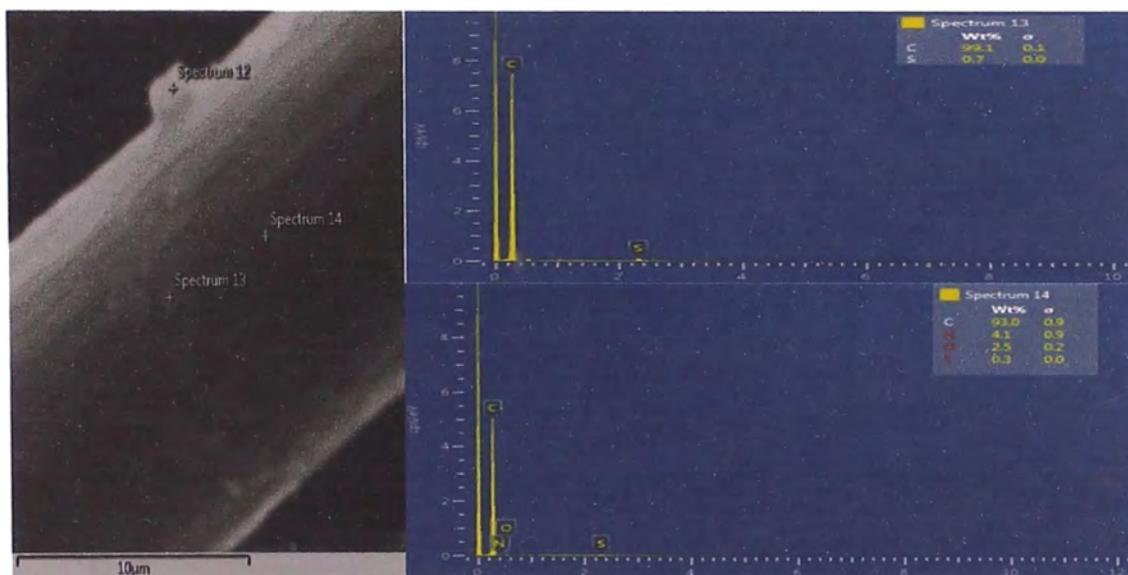


Figura 40. Espectrograma EDX de filtro de carbón modificado con compuesto de nanotubos de carbón y polianilina.

El análisis por energía dispersiva de rayos X (EDS) permite obtener el análisis elemental en el sustrato modificado. Es evidente que para las modificaciones superficiales con nanotubos no se hará el análisis debido a que lo único que se puede encontrar es la señal de carbono, en este sentido el análisis se centró en el filtro con el compuesto como muestra la **Figura 40**. Dos zonas de la superficie fueron analizadas, el espectro 13 contiene en mayor proporción carbono y el espectro 14 posee además nitrógeno y oxígeno lo que hace suponer que en esa zona se encuentra la polianilina en mayor proporción. El azufre encontrado puede ser debido al uso del ácido sulfúrico en la síntesis. No obstante, cabe resaltar que el método por dispersión de rayos X, solo permite realizar una exploración del contenido elemental y los resultados encontrados necesitan ser complementados con otros métodos.

Por otro lado, otros estudios con respecto a la modificación del electrodo con nanopartículas de oro no fueron realizados ya que debido al tamaño de las nanopartículas y la mínima concentración utilizada que no se pueda registrar usando EDS.

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y CONSTRUCCIÓN DE CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA

4.3.1 Medios de cultivo bacteriano

Bacterias *S. putrefaciens*, se mantuvo en refrigeración a 4 °C como cepas de respaldo, en tubos con medio nutritivo: 5 mL de caldo y 5 mL de agar inclinado. Se tomó de la cepa de respaldo una cantidad con el asa de siembra en condiciones de esterilidad y fue transferido a placas con agar nutritivo, sembrándose por la técnica de agotamiento, como se muestra en la **Figura 41**; y se llevó a incubar a 30 °C, por 24 horas.

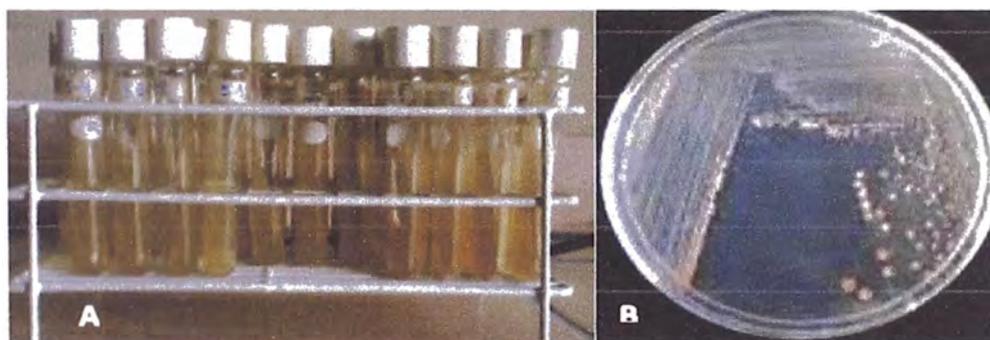


Figura 41. Tubos con cepa de *Shewanella putrefaciens* en agar nutritivo (A). Técnica de siembra por agotamiento en placa (B).

Transcurrido ese tiempo se trasladó una colonia de la placa a un matraz que contenía 100 mL de caldo LB, por 12 horas luego se transfirió 3 mL a un matraz de 1000 mL de capacidad conteniendo 750 mL caldo Luria Bertani, se cultivó en condiciones aeróbicas y en agitación (150 rpm) por 36 horas. Se repitió el procedimiento para otros tres medios distintos para evaluar el más eficiente, cada medio contenía lo siguiente:

- Caldo Luria Bertani: una mezcla de 25 g de LB en 1 L de agua ultrapura, inicialmente a un pH de 7.2 ± 0.2 . Regulado a pH 9 (optimizado) con la adición de solución de NaOH.
- Agua Residual sintética ARS: El ARS estaba compuesto por 4 g de glucosa, 310 mg de NH_4Cl , 130 mg de KCl, 4.97 g de NaH_2PO_4 y 2.75 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Este caldo contenía las sustancias químicas básicas del cual está compuesta las aguas residuales domésticas. El pH se encontró entre 6-7.
- Caldo de pescado (chilcano): Se preparó hirviendo tejidos de cabezas de pescado en agua. Luego de filtrar se combinó 75 % del filtrado con 25 % de agua destilada, obteniéndose un pH de 7.12

- Agua extraída de los lodos: lodos provenientes del reactor anaeróbico de flujo ascendente de CITRAR-UNI a 1.5 metro de profundidad, se filtró con la finalidad de obtener solo el material orgánico, el pH medido fue de 7.26 ± 0.1 .

Todos los medios fueron llevados a esterilizar en autoclave. Pasado las 36 h fue vertido 675 mL del contenido de los matraces a cada celda de combustible.

4.3.2 Ensamblado de celdas de combustible microbiana

Las celdas de combustible microbiana se construyeron utilizando dos tapers de polipropileno de forma cúbica de igual dimensiones (anchura 11.7 cm, altura 7.5 cm, longitud 11.5 cm). El volumen total de cada compartimiento fue de 900 mL, de los cuales 675 mL fue el volumen de trabajo, los 375 mL restantes permitieron la recirculación de los elementos. Los dos compartimientos se separaron por una membrana de intercambio de protones. La membrana tenía un área de superficie disponible de 2.54 cm^2 y se trató previamente sumergiendo en NaCl al 5 % por 12 h para activarla. En el ánodo se distribuyeron cuatro fieltros de carbón de igual tamaño, cada uno con un área geométrica de $1 \times 4 \text{ cm}^2$, y para el cátodo se utilizó un fieltro de carbón con un área geométrica de $4 \times 7 \text{ cm}^2$. La resistencia óhmica de los electrodos y los cables de conexión fue de 0.07Ω medido con un medidor de ohmios y la resistencia externa que se colocó fue de 1000Ω . El compartimiento anódico contenía el sustrato con bacterias en condiciones aeróbicas y el cátodo una solución de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en 0.1 mol L^{-1} de KCl.

4.3.2.1 Condiciones de funcionamiento

Las celdas de combustible se hicieron funcionar inicialmente por 10 días para realizar estudios de crecimiento microbiano, a continuación fue operado bajo condiciones de alimentación durante 4 semanas consecutivas. Durante la operación de alimentación cada celda con microorganismos se alimentaron con los cuatro medios: Luria Bertani, Agua residual sintética, caldo de pescado (Chilcano) y agua extraída de lodo anaeróbico; cada semana se extrajo 200 mL y se sustituyó con medio fresco, esta transferencia de medio se realizó en condiciones de esterilidad, trabajándose con mechero Bunsen. La solución en el cátodo se mantuvo sin cambios.

4.3.2.2 Medidas eléctricas

La salida eléctrica de la celda de combustible se controló cada 100 segundos mediante la medición de la diferencia de potencial (voltaje) entre el ánodo y el cátodo a través de la resistencia externa usando un microprocesador de datos conectado a un ordenador. Durante las mediciones eléctricas se registró valores de temperatura, con un aumento progresivo entre 24-30 °C durante la mañana. Además, se registraron variaciones de temperatura entre 29-31 °C durante la tarde la noche.

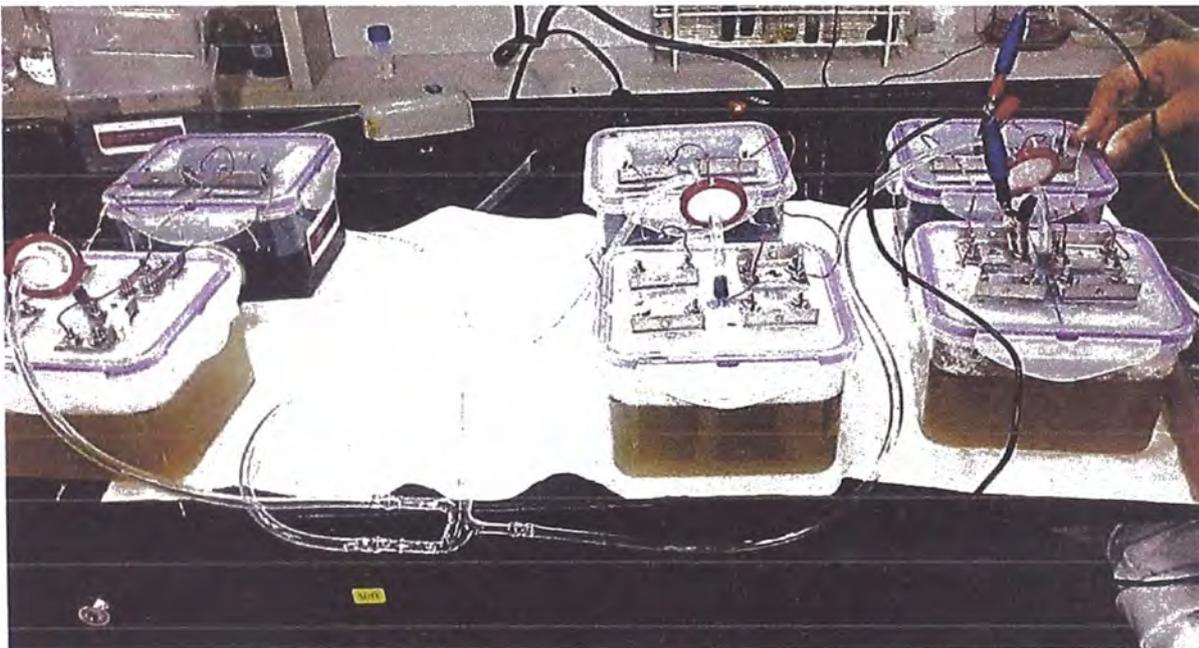


Figura 42. Celdas de combustible microbianas con bacterias *Shewanella putrefaciens* en condiciones aeróbicas.

CARACTERIZACIÓN DE ELECTRODOS CON BIOFILM MICROBIANO

4.4.1 Microscopía Electrónica de Barrido

Después de la medición de los potenciales, se extrajeron los electrodos de la celda para su caracterización por Microscopía Electrónica de Barrido. La caracterización se realizó al electrodo de fieltro de carbón con nanotubos de carbón ya que generó mayor potencial. En la **Figura 43**, se muestra los electrodos MWCNT/fieltro en el medio de cultivo agua residual sintética y Luria Bertani. En el electrodo de la celda con agua residual sintética, se identifica que hay una especie de depósito sólido sobre las fibras de los fieltros lo cual hace suponer que se trataría de las bacterias. Asimismo, haciendo un acercamiento a una de las fibras del fieltro a 10 μm , se observa como está completamente cubierto por una capa de este aparente biofilm formado por las bacterias.

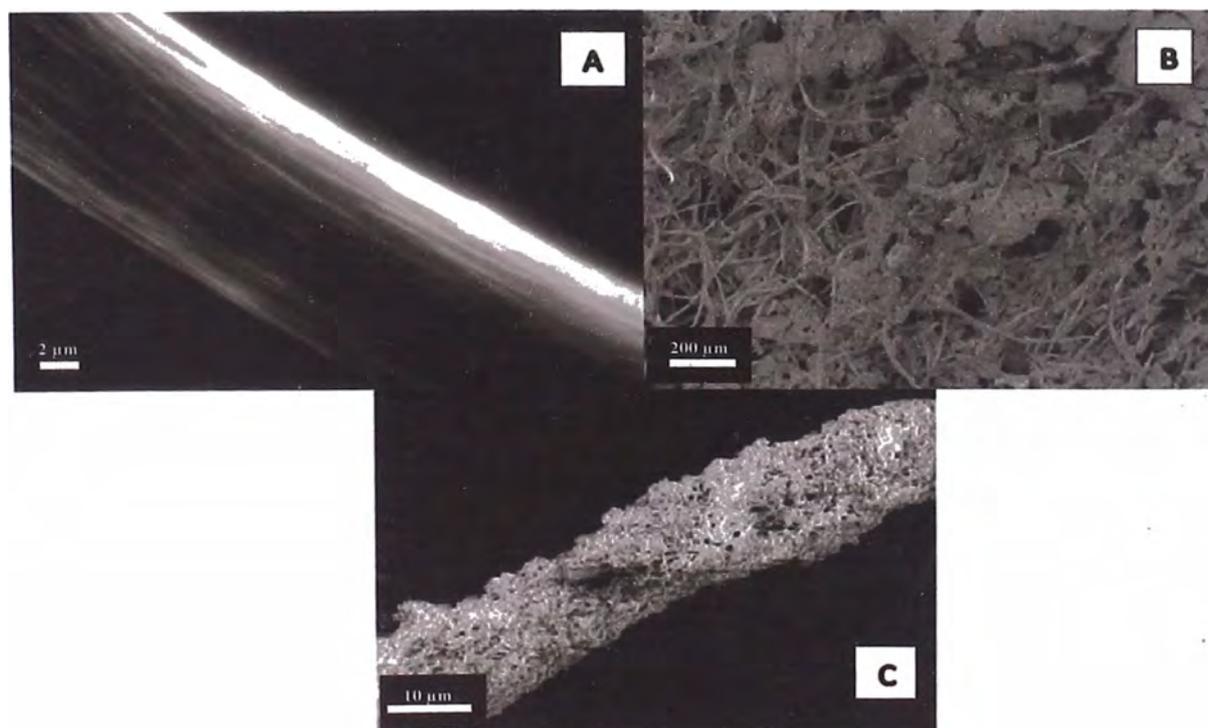


Figura 43. Imagen Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de electrodos de fieltro de carbón en la celda microbiana con agua residual sintética. Fieltro limpio **A**, fieltro con nanotubos de carbón en celda en funcionamiento **B** y fibra de fieltro con un aparente crecimiento de biofilm bacteriano **C**.

Un mayor acercamiento a la fibra, permite observar un cuerpo de mayores dimensiones en micrómetros y de forma ovalada (barra) como se puede observar en la **Figura 44**,

dichas característica hacen suponer que se trataría de una bacteria *Shewanella putrefaciens*. Asimismo, se puede descartar por las dimensiones descartándose que se trate de los nanotubos o de algún contaminante. Las dimensiones de la barra alcanzaron un diámetro de $0.46\ \mu\text{m}$ y $1.4\ \mu\text{m}$ de largo. Si se compara estos valores, con los tamaños referenciales investigados para la *Shewanella* de $0.4\text{-}0.7\ \mu\text{m}$ de diámetro de $2\text{-}3\ \mu\text{m}$ de longitud ⁵⁷, notamos que son muy cercanas en diámetro y longitud. Por tanto, se puede confirmar que se trata de una bacteria de esta especie.



Figura 44. Imagen SEM. Bacteria aislada de *Shewanella putrefaciens* crecida sobre filtros modificados con nanotubos de carbono.

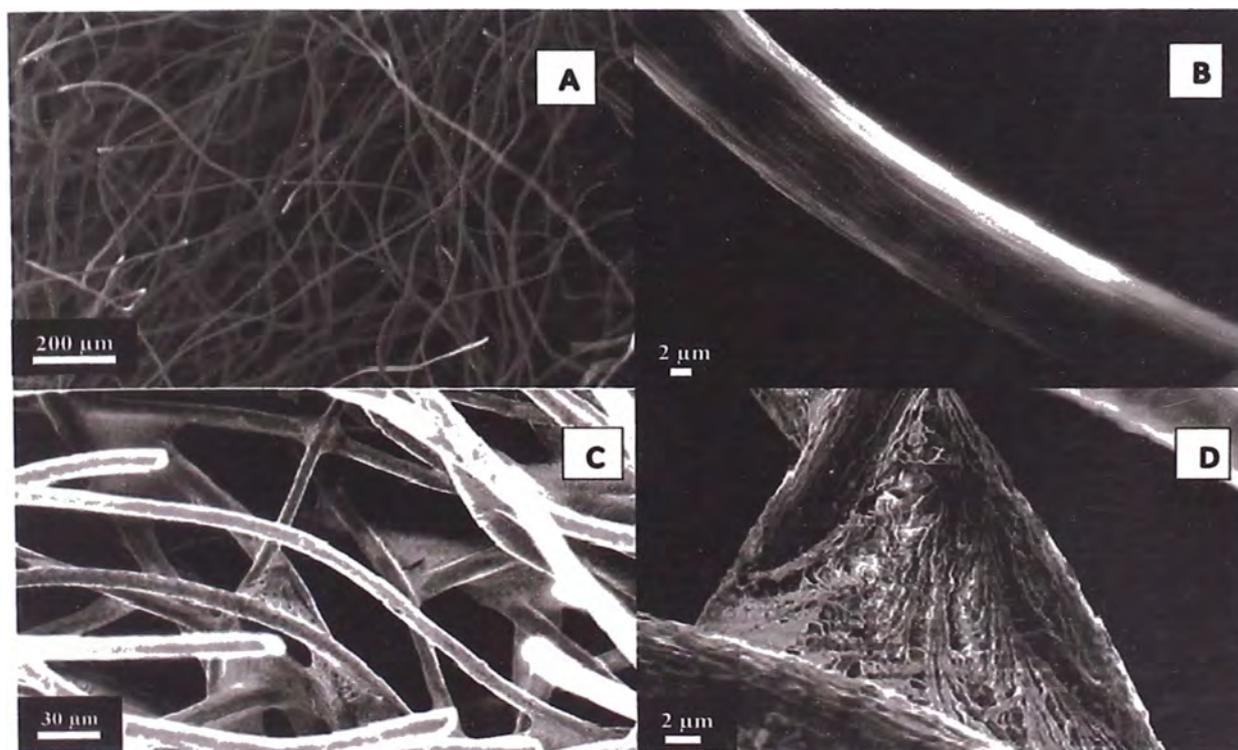


Figura 45. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de electrodos de fieltro de carbón en la celda microbiana en Luria Bertani. Arriba: fieltro limpio. Abajo: fibras de fieltros con un aparente crecimiento de bio lm bacteriano.

En la **Figura 45**, se observa los electrodos en el medio Luria Bertani, similar que en el medio de agua residual sintética la figura muestra el crecimiento aparente de bacterias y se puede observar con mayor claridad la especie de película tipo red formada entre las fibras del fieltro. Un mejor acercamiento al fieltro en **(D)** permite distinguir el biofilm que se encuentra sobre el fieltro y como esta red se extiende entre toda la superficie permitiendo la interconexión entre fibras. Cabe señalar que no se distingue completamente los nanotubos de carbón soportados en el fieltro y esto es debido a que la medición solo se realizó en una sola región de la superficie del electrodo. Sin embargo, la caracterización permitió identificar el biofilm.

4.4.2 Voltametría Cíclica

Se realizó voltametría cíclica a los electrodos dentro de la celda en funcionamiento en simultáneo con la finalidad de observar los procesos redox asociados a la transferencia de electrones hacia el electrodo.

Los voltagramas fueron obtenidos con un electrodo de referencia de Ag/AgCl que se encontraba dentro del compartimiento anódico y la velocidad de barrido utilizada fue 1 mV s^{-1} para mejorar la resolución de observación de un posible proceso redox.

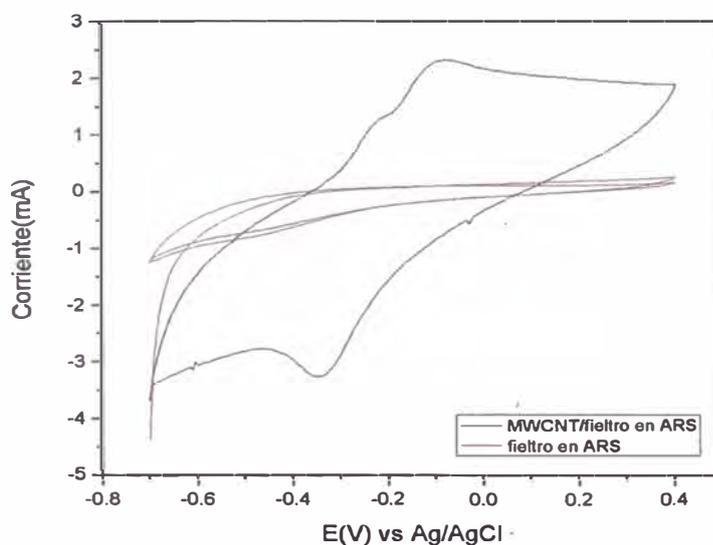


Figura 46. Voltagrama cíclico de electrodo de fieltro de carbón con aparente biofilm de *Shewanella putrefaciens* en celda en funcionamiento con agua residual sintética a una velocidad de barrido de 1 mV s^{-1} vs Ag/AgCl/KCl(sat).

El voltagrama de la **Figura 46** para el electrodo sumergido en agua residual sintética (ARS) muestra dos bandas anchas de oxidación alrededor de -0.2 y -0.1 V y una banda de reducción a -0.3 V. Por tanto, se puede considerar que la bacteria utilizada es electroquímicamente activa en condiciones aeróbicas al lograrse observar los procesos redox a la velocidad de 1 mV s^{-1} . También, el perfil del voltagrama es muy parecido a los voltagramas obtenidos en otros estudios con *Shewanella*⁵⁸. Sin embargo, algunos estudios mostraron solo actividad redox en bacterias crecidas anaeróbicamente^{24, 59}. Por tanto, este estudio reveló que también se produce actividad en bacterias crecidas aeróbicamente y que probablemente dicha actividad dependa principalmente de la especie de la bacteria, y otras condiciones de funcionamiento como el medio de crecimiento utilizado.

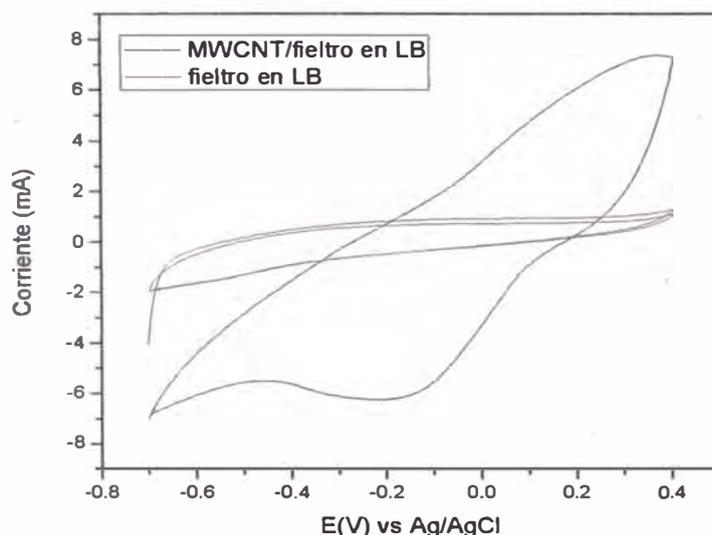


Figura 47. Voltagrama cíclico de electrodo de MWCNT/filtro de carbón con aparente biofilm de *Shewanella putrefaciens* en celda en funcionamiento (10 días) con Luria Bertani a una velocidad de barrido de 1 mV s^{-1} vs Ag/AgCl/KCl(sat).

Por otro lado, la **Figura 47** muestra el voltagrama para el filtro de carbón en la celda con Luria Bertani, en este caso no tiene bien definido los picos de oxidación y reducción por lo que no es percibida la actividad redox como el caso anterior. No obstante, se puede considerar que alrededor de -0.2 V se produce una reducción.

En esta caracterización además se tomó en consideración los efectos que podrían originar los medios de cultivo utilizados los cuales pueden dar alguna señal de oxidación y reducción. Sin embargo, se logró corroborar a través de un barrido a ese rango de potencial que no se produce ninguna señal.

Si bien se han obtenido nuevos resultados respecto a estudios anteriores y además que es notoria la diferencia que existe en el voltagrama para los fieltros sumergidos en medios sin bacterias con respecto a los electrodos sumergidos en el medio con bacterias, será necesario ensayos adicionales que confirmen estos resultados.

4.4.3 Espectroscopia Raman de intensidad magnificada (SERS)

La membrana exterior que cubre a las bacterias y los componentes encargados de la transferencia de electrones fue estudiada por Espectroscopia Raman de Intensidad Magnificada (SERS). Esta técnica permite caracterizar los componentes mayoritarios como carbohidratos, ácidos nucleicos, proteínas y lípidos en la membrana de un biofilm, así como encontrar la proteína específica de la transferencia de electrones para bacterias Gram Negativas electroactivas. Por otro lado, la técnica por SERS resultó valiosa para la maximización de la intensidad de los picos para esta tipo de muestra biológica. Antes de la caracterización del electrodo, se realizó el análisis a una muestra aislada de bacterias *Shewanella* para su comparación.

4.4.3.1 Preparación bacteriana de muestra aislada

Shewanella putrefaciens se incubó en matraces de 250 mL que contenían 25 g de caldo LB broth, Luria Bertani en 100 mL de agua ultrapura en un baño giratorio (37 °C, 100 rpm) durante 24 horas. Después de la incubación las células bacterianas crecidas se concentraron, para ello se lavaron cada 10 mL de la solución bacteriana en agua ultrapura y tampón fosfato de pH 7.2 tres veces seguidas por centrifugación cada 15 minutos a 1000 rpm y se guardaron de manera estéril ²⁴.

4.4.3.2 Caracterización por Espectroscopia Raman a muestra aislada de *Shewanella putrefaciens*

Las células bacterianas recogidas se suspendieron sobre un electrodo de oro serigrafiado; después de secar por 24 horas se llevaron para el escaneo por Espectroscopia Raman. La superficie rugosa de oro con bacterias se montó bajo la lente del objetivo del microscopio óptico, y las colonias bacterianas fueron excitadas usando la línea láser 638 nm. Espectroscopia Raman se realizó mediante un espectrómetro Xplora Horiba Scientific con un detector de carga acoplada termoeléctricamente (CCD). El grating trabajado fue de 1200 a las longitudes de onda

de 500-1200 cm^{-1} , utilizando objetivo de 50x y una potencia de láser de 50 %. Los espectros SERS desde el detector se recogieron sucesivamente con un tiempo de 3 minutos por escáner. Las posiciones de los picos espectrales fueron calibradas usando cristal oblea de Si como referencia.

El espectro obtenido para la *Shewanella p.* exhibió espectros similares al de espectros Raman para otras especies *Shewanella*, además poseen los mismos componentes en la membrana interna diferenciándose en la intensidad. Se halló el espectro entre los rangos 500-1200 cm^{-1} ya que en esa zona es la región de huella dactilar para las bacterias. Se observan picos de gran intensidad a 501, 575 y 829 cm^{-1} (Figura 48) los cuales son atribuidos a los carbohidratos y proteína, además se puede observar el pico alrededor de 745 cm^{-1} , todos estos picos identificados serian importantes ya que en el caso de la *Shewanella* la transferencia de electrones es a través de su membrana externa donde se encuentra los grupos hemo de los citocromos incrustados dentro del biofilm.

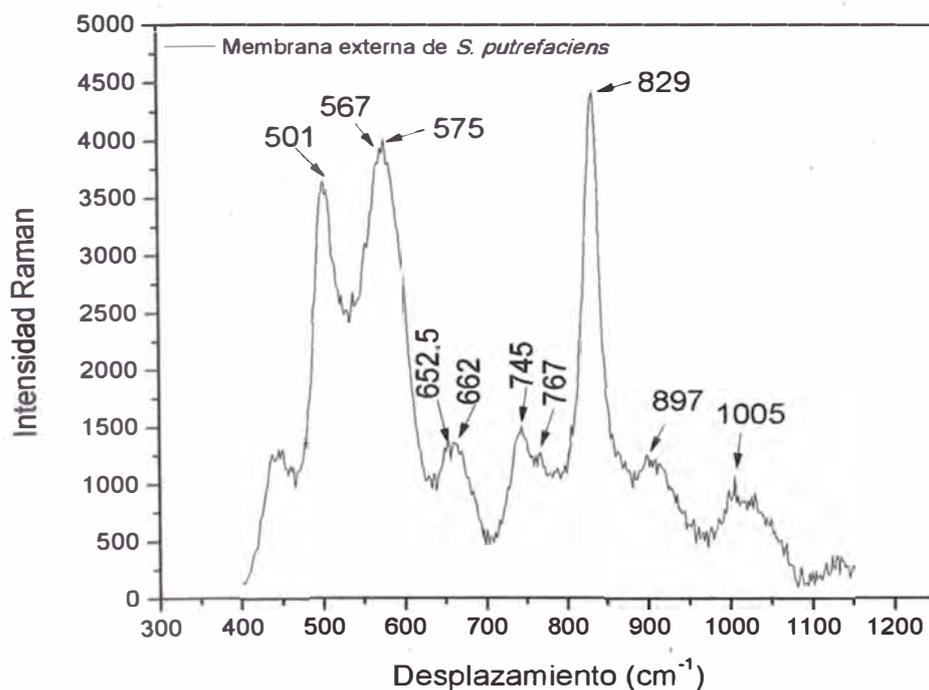


Figura 48. Espectro SERS muestra aislada *Shewanella putrefaciens* colectados con láser de 638 nm y un objetivo de 50x.

Las diferencias de los espectros SERS en estudios anteriores se puede deber a que se usan diferentes medios de cultivo, mediciones en distintas fases del crecimiento además diferente configuración del equipo principalmente la fuente de láser y el tipo

de sustrato SERS (Ag, Au o Cu) utilizado. Respecto al sustrato, se debe considerar el tamaño de las nanopartículas depositadas, la orientación espacial de los componentes moleculares del sustrato SERS, así como la ubicación de las bacterias y la cobertura del punto láser⁶⁰.

Tabla 7. Estructuras de las bandas principales (cm^{-1}) para el espectro Raman de muestra de *Shewanella putrefaciens*^{60, 61, 62}.

Número de onda (cm^{-1})	Asignación tentativa de picos
501	Carbohidrato
567	Carbohidrato
575	Carbohidrato
652.5	Proteína tirosina (estiramiento C-S y torsión C-C)
662	COO-
727	Ácido nucleico (adenina de flavina)
745	Triptófano (estiramiento simétrico de anillo benceno y pirrol)
767	No identificado
829	Proteína tirosina (doble resonancia de Fermi)
897	Triptófano (deformación en el plano)
1005	Triptófano (estiramiento simétrico de anillo bencénico y pirrol)

4.4.3.3 Caracterización por Espectroscopia Raman a bioelectrodo

Se realizó la caracterización de los electrodos de fieltro de carbón después de extraerlos de las celdas. La **Figura 49**, muestra las dos bandas de los enlaces de carbón características en Raman para el fieltro de carbón. Además, un acercamiento entre 200-1000 cm^{-1} permite hacer la comparación con el espectro característico que se tiene de la bacteria.

Como muestra los resultados en la **Tabla 8**, ha sido posible la identificación de algunas bandas características para la bacteria, lo que sirve como demostración conjuntamente con los resultados anteriormente expuestos sobre la existencia del crecimiento del biofilm de la bacteria sobre el electrodo dicha causante del potencial eléctrico.

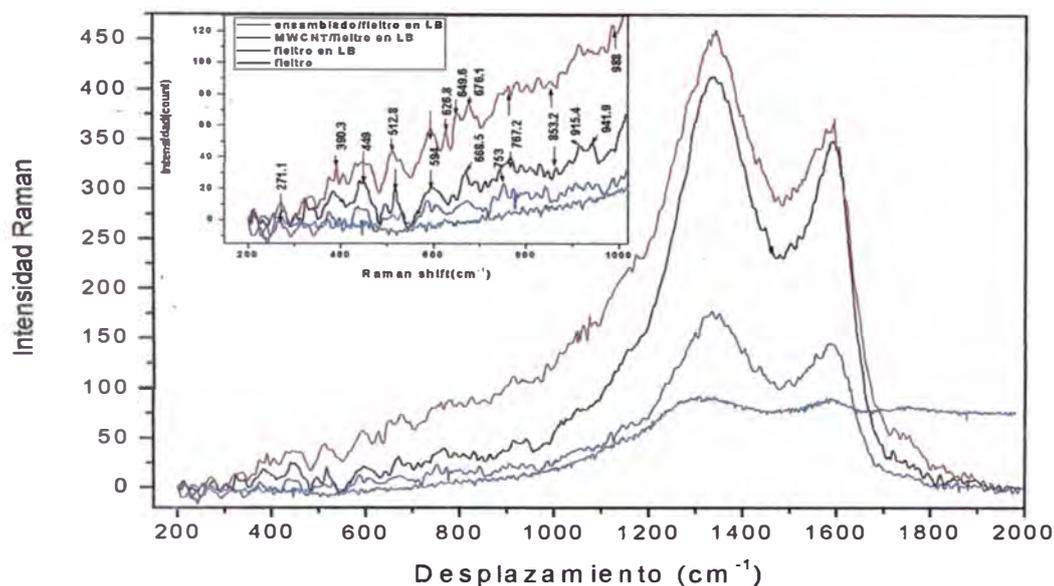


Figura 49. Espectro Raman de *Shewanella putrefaciens* sobre electrodos filtros de carbón colectados con láser de 638 nm y un objetivo de 50x. El gráfico insertado es un acercamiento al espectro Raman en el rango de 200-1000 cm^{-1} .

Tabla 8. Estructuras de las bandas principales (cm^{-1}) para el espectro Raman de electrodos en celda de combustible, medio agua residual sintética.

Número de onda (cm^{-1})	Asignación tentativa de picos
271.1	No identificado
449	Carbohidrato
626.8	COO- (intenso)
649.6	Proteína tirosina (estiramiento C-S y torsión C-C)
668.5	COO-
753	Deformación del anillo I (intenso)
767.2	Presente en espectro de <i>Shewanella</i> (no identificado)
853.2	Estiramiento C-N, probablemente de grupo tirosina (ancho)
988-1003	C-C estiramiento del anillo aromático (fenilalanina)

4.4.4 Control de supervivencia de bacterias por conteo en placa

Para evaluar la supervivencia de las bacterias dentro del compartimiento anódico, se tomó 1mL de cada solución en condiciones de esterilidad y se sembró por inmersión en placas con agar. Previamente se realizó la técnica de dilución en tubos con solución

salina, donde se procedió a tomar 1 mL de lodo que se encuentra en las celdas microbianas y se transfirieron a los tubos 1:10, 1:100, sucesivamente hasta que se obtuvo 5 diluciones. De la última dilución, se tomaron alícuotas de 1 mL y se vaciaron en las placas Petri, como se observa en la **Figura 6** y sobre él se vierte el agar. Luego que gelifica, se colocó de manera invertida y se llevó a incubar por 24 horas.

Se procedió al conteo de bacterias, se repitió la técnica de dilución 7 veces. Para las condiciones de diluciones, cuando la placa presentó poco número de colonias contables se procedió a disminuir el número de diluciones con la finalidad de tener una cantidad representativa.

La siembra en placa y el posterior recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) se realizó después de 5 días de poner a funcionar la celda, de esta manera fue posible identificar el medio de cultivo donde fue más favorable el crecimiento de *S. putrefaciens*. Se realizó los respectivos cálculos utilizando la **Ecuación 13** y se calculó las cantidades de bacterias crecidas durante el funcionamiento de la celda, como se resume en la siguiente tabla:

Tabla 9. Valores de unidades formadoras de colonias (UFC) antes y después de alimentar a las bacterias para cada medio de cultivo.

Medios de cultivo extraído de celdas	Tiempo (h)	Luria Bertani (10^4 mL^{-1})	ARS (10^4 mL^{-1})	Caldo Chilcano (10^4 mL^{-1})	Agua extraída de lodos (10^4 mL^{-1})
Antes de añadir alimento	125	4466	5458	2693	158
	195	28350	80810	14890	333
	219	82930	2764000	65210	872
Después de añadir alimento	240	43240	71590	34000	291
	264	60250	80810	40400	588
	288	82930	340200	46070	517
	312	58120	1006500	45360	333

Los valores calculados (**Tabla 9**) muestran que hay un mayor crecimiento microbiano en los medios agua residual sintética (ARS) y Luria Bertani y se muestra un menor crecimiento en el agua extraído de lodos. Asimismo, con el pasar de los días se observa una tendencia de aumento en el número de bacterias en el ARS a pH 7.

El recuento de bacterias después de alimentar a las bacterias muestra crecimiento para los cuatro medios. Sin embargo, con el pasar de los días se observa únicamente crecimiento en medio Agua residual sintética y una disminución de bacterias de aproximadamente el 12 % por día para el caso de Agua extraída en lodos lo que estaría significando la mortandad de bacterias en el tiempo. Tomando en cuenta que entre las especies identificadas en el agua extraída de lodos no se ha podido encontrar la especie

Shewanella (Tabla 10), puede considerarse este hecho como posible causa de la mortandad.

Tabla 10. Identificación de bacterias en agua residuales pertenecientes al Centro de Investigación en Tratamiento de Aguas Residuales (CITRAR-UNI), a una concentración de 10^8 UFC.

Aerobias	Anaerobias
<i>Escherichia coli</i>	<i>Clostridium</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Arthrobacter</i>	
<i>Pseudomonas</i>	
<i>Citrobacter</i>	
<i>Proteus bacillus</i>	

EVALUACIÓN DE POTENCIAL GENERADO EN CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS

4.5.1 Cálculo del área superficial de electrodos modificados

Para obtener el potencial generado, previamente fue necesario hacer el cálculo de las áreas superficiales electroquímicas. Para ello, se realizaron voltagramas de cada electrodo de fieltro de carbón en solución equimolar electrolítica de 10 mmol L^{-1} de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ - $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ /KCl (0.1 mol L^{-1}) (**Figuras 23, 25, 27 y 37**). Para cada electrodo se calculó su área considerando la relación directa que existe entre la corriente de pico anódico con el área del electrodo (ecuación de Randles-Sevcik). En los cálculos, se consideró como referencia la corriente de pico anódico para el carbón vítreo de diámetro conocido 3.0 mm . Como el área superficial del carbón vítreo es casi circular, su área se calculó como $\pi(1.5 \text{ mm})^2 = 7.07 \mu\text{m}^2$. Con la determinación de la corriente de pico anódico para cada modificación, se calculó las áreas electroquímicas de otros electrodos. La siguiente tabla resume los valores obtenidos.

Tabla 11. Valores de área real de electrodos modificados y sin modificar en referencia a electrodo de carbón vítreo.

Electrodo	Área(m^2)
Carbón vítreo	7.07×10^{-6}
Fieltro de carbón	0.12
AuNPs electrodepositadas/fieltro	0.22
{AuNPs/PDADMAC} ₃ /fieltro	0.29
AuNPs-MWCNT/fieltro	0.43
PANI/fieltro	0.14
AuNPs-MWCNT/PANI/fieltro	0.28

Los valores de la **Tabla 11** muestran que existe una mayor área superficial en los electrodos modificados con nanopartículas de oro y MWCNT mientras que en el área superficial del fieltro con polianilina (PANI/fieltro) no hubo cambios significativos. Se observa además que el tamaño del área superficial en el fieltro con nanopartículas autoensambladas y electrodepositadas son muy cercanos, esto se debe a que a pesar que el método de autoensamblado permite depositar una mayor cantidad de nanopartículas, estas se colocan una sobre otra formando tres nanocapas por tanto no existe una mayor variación que la modificación por electrodeposición que genera una sola capa de nanopartículas. En el caso de la modificación con polianilina no hay un aumento del área superficial ya que en el método de polimerización se forma una película de polianilina sobre el fieltro pero no ocurren cambios en la superficie.

En general, estos valores de área representan en qué grado se modificó la superficie, generando un aumento en los sitios activos catalíticos lo que puede originar un aumento del potencial. Sin embargo, se debe considerar que el registro de los potenciales eléctricos con los electrodos en funcionamiento permitirá determinar si el aspecto del aumento de área fue determinante en la generación de una mayor densidad de potencia.

4.5.2 Potencial eléctrico en celdas

Las mediciones eléctricas se registraron en una gráfica que representa la diferencia de potencial entre ánodo y cátodo versus el tiempo para cada electrodo modificado de fieltro de carbón. Además, simultáneamente se midió el potencial de un electrodo sin modificar como referencia. En una primera etapa se registró el potencial en solo dos medios de cultivo Luria Bertani y Agua residual sintética.

Los dos gráficos (**Figuras 50, 51**) muestran un mayor potencial obtenido en los electrodos modificados con nanotubos de carbón los cuales inician en un potencial de aproximadamente 0.02 V y las cuales se van incrementando con el paso de las horas. Además, se obtuvo una menor variación de los potenciales para el medio Luria Bertani es decir el potencial se mantuvo constante en mayores intervalos de tiempo.

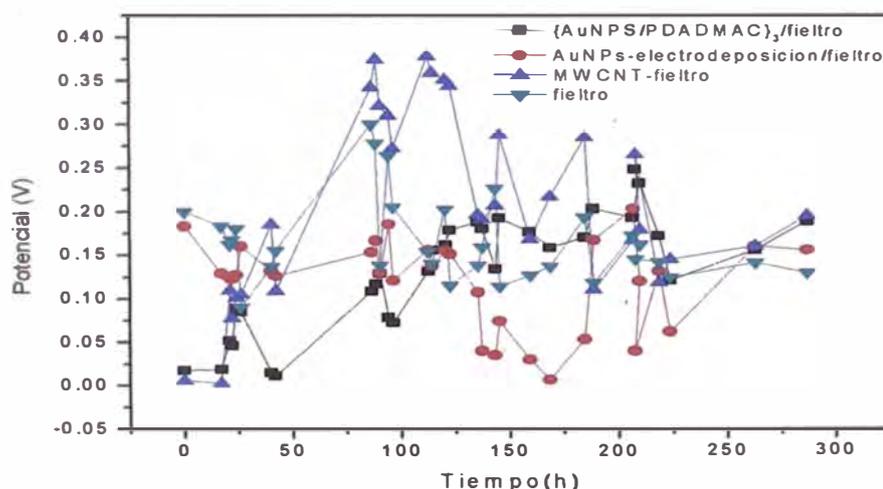


Figura 50. Desempeño de potencial versus el tiempo de la CCM en funcionamiento con electrodos con nanopartículas de oro, nanopartículas de oro electrodepositados y nanotubos de carbón sobre fieltro y fieltro sin modificar en medio Agua residual sintética.

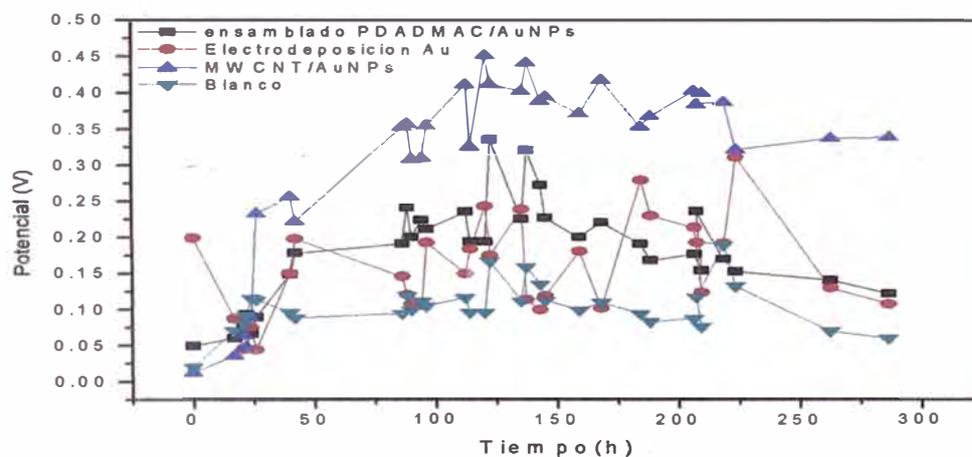


Figura 51. Desempeño de potencial versus el tiempo de la CCM en funcionamiento con electrodos con nanopartículas de oro, nanopartículas de oro electrodepositadas y nanotubos de carbón sobre fieltro y fieltro sin modificar en medio Luria Bertani.

El análisis de las tendencias de potencial, muestra que el electrodo modificado con nanotubos de carbón presenta valores altos en los dos medios de cultivo seguido de los fieltros autoensamblado con nanopartículas, este hecho puede explicarse debido a la mayor área de superficie electroquímica que poseen.

Como segunda fase de la investigación, se registró el funcionamiento de los electrodos en cuatro medios de cultivo, también fueron comparados contra un electrodo fieltro sin modificar. Los gráficos obtenidos se muestran a continuación.

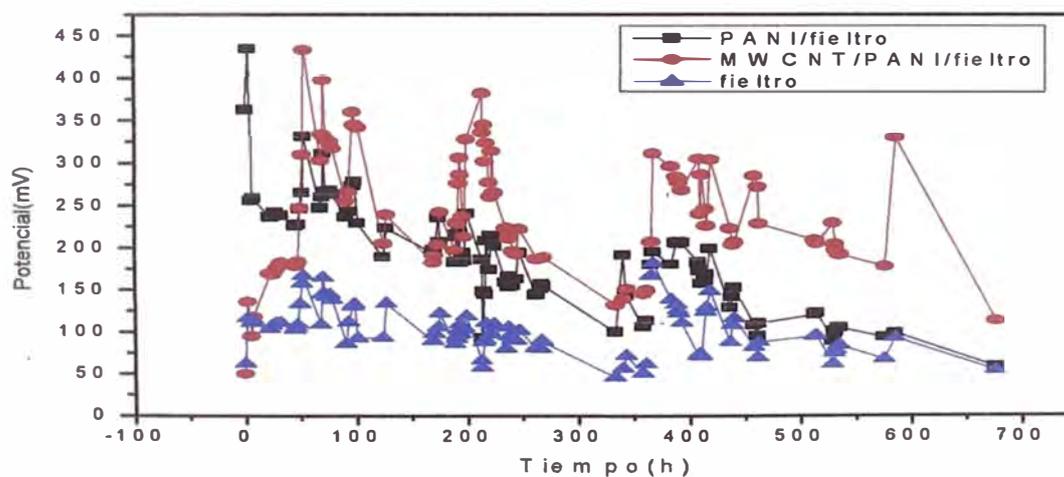


Figura 52. Desempeño de potencial versus el tiempo de la CCM en funcionamiento con electrodos con polianilina y compuesto de nanotubos/polianilina sobre fieltro y fieltro sin modificar en medio Luria Bertani.

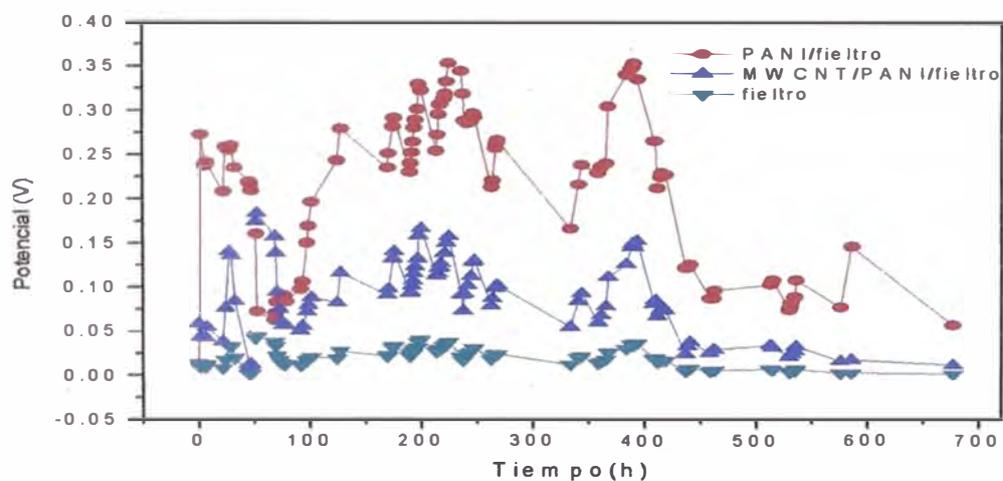


Figura 53. Desempeño de potencial versus el tiempo de la CCM en funcionamiento con electrodos con polianilina y compuesto de nanotubos/polianilina sobre filtro y filtro sin modificar en Agua residual sintética (ARS).

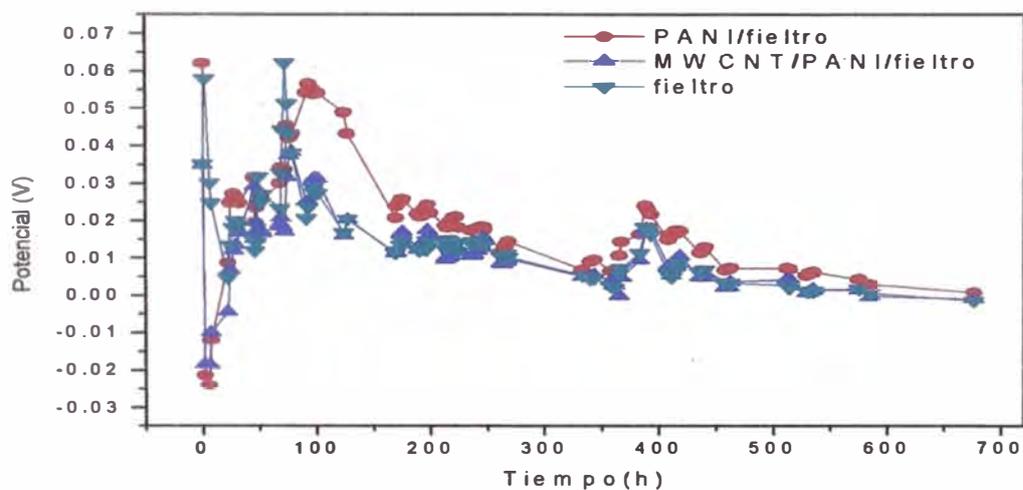


Figura 54. Desempeño de potencial versus el tiempo de la CCM en funcionamiento con electrodos con polianilina y compuesto de nanotubos/polianilina sobre filtro y filtro sin modificar en caldo de pescado (chilcano).

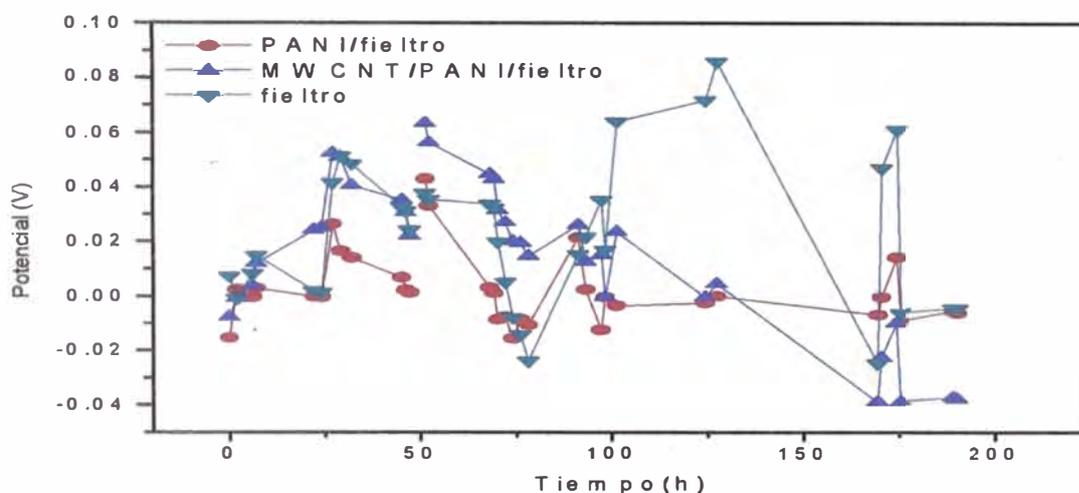


Figura 55. Desempeño de potencial versus el tiempo de la CCM en funcionamiento con electrodos con polianilina y compuesto de nanotubos/polianilina sobre fieltro y fieltro sin modificar en agua extraída de lodos.

Las **figuras 52 y 53** registraron los valores más altos de potencial en los medios de cultivo Luria Bertani y Agua residual sintética. Para la celda con LB, se obtuvo mayores valores de potencial alcanzados en el electrodo modificado con compuesto de nanotubos/polianilina, el cual alcanzó un máximo de 0.43 V. Mientras, que en la celda con agua residual sintética se presentó máximos de potencial de 0.37 V en el electrodo modificado con polianilina.

En las **figuras 54 y 55** se registraron los valores más bajos de potencial. En el medio con caldo de pescado se registró un valor de 0.06 V, además se observa que pasado las 300 horas, hay una transferencia mínima de electrones con una diferencia de potencial entre celdas ~ 0 V. En el agua residual extraída de lodos la situación se empeora observándose mínimos valores de potencial el cual decrece hasta llegar a potenciales negativos. En las primeras 100 h de operación, produciéndose una inversión de polaridad entre el ánodo y cátodo debido a la mínima producción de electrones en el compartimento anódico. Además, estos valores de potencial hacen suponer que las bacterias no pudieron adaptarse a las condiciones de los medios y fue disminuyendo su crecimiento con el paso de las horas.

Las mediciones de voltaje entre los electrodos en la celda, permitieron calcular el valor de la densidad de potencia y la eficiencia coulombica (**Tabla 12**) utilizando las ecuaciones **5 y 7** respectivamente. Además, se consideró para el cálculo de la corriente y la densidad de potencia los voltajes máximos alcanzados durante el tiempo que duro la evaluación, además de los valores de las áreas superficiales de la **Tabla 11** y el área geométrica. Cabe señalar que la eficiencia coulombica se calculó únicamente en medio

de cultivo agua residual sintética (ARS) y no para los otros sustratos debido a que solo en este medio es posible conocer la cantidad exacta de electrones involucrados para la oxidación del sustrato orgánico de glucosa (**Ecuación 7**), debido a que en los otros sustratos como el Luria Bertani y el caldo de pescado que son del tipo complejo existe dificultad para determinar el contenido de carbohidratos, proteínas, ácidos grasos, en los que se produce una serie de reacciones de oxidación y la cantidad de electrones involucrados es difícil de determinar.

Tabla 12. Desempeño obtenido para las diferentes modificaciones al electrodo del ánodo y variaciones en el sustrato.

Sustrato	Tipo de electrodo	I (mA)	P (mW m ⁻²) máx. (área superficial)	P (mW m ⁻²) máx. (área geométrica)	FC
Glucosa ^a	Filtro	0.18 ± 0.0009	0.268 ± 0.03	18.1 ± 0.2	16.51 ± 0.25
	AuNPs-MWCNT	0.38 ± 0.0019	0.336 ± 0.01	80.7 ± 0.8	77.49 ± 0.39
	PANI	0.36 ± 0.0018	0.926 ± 0.04	72.4 ± 0.7	94.5 ± 0.87
	{AuNPs/PDADMAC} ₃	0.25 ± 0.0001	0.216 ± 0.01	34.9 ± 0.3	50.15 ± 0.25
	Electrodeposición AuNPs	0.20 ± 0.0010	0.182 ± 0.01	22.3 ± 0.2	48.07 ± 0.24
Triptona y Extracto de levadura ^b	Filtro	0.19 ± 0.0010	0.299 ± 0.03	20.2 ± 0.2	
	AuNPs-MWCNT	0.46 ± 0.0023	0.492 ± 0.02	118.2 ± 1.2	
	AuNPs-MWCNT/PANI	0.41 ± 0.0002	0.600 ± 3.55	93.9 ± 0.9	---
	PANI	0.41 ± 0.0002	1.20 ± 0.05	93.9 ± 0.9	
	{AuNPs/PDADMAC} ₃	0.33 ± 0.0002	0.376 ± 0.02	60.8 ± 0.6	
Electrodeposición AuNPs	0.31 ± 0.0002	0.436 ± 0.03	53.7 ± 0.5		
Caldo de pescado ^c	Filtro	0.06 ± 0.0003	0.030 ± 0.003	2.0 ± 0.02	
	AuNPs-MWCNT/PANI	0.04 ± 0.0002	0.006 ± 0.000	0.9 ± 0.01	---
	PANI	0.06 ± 0.0003	0.026 ± 0.001	2.0 ± 0.02	
Agua Residual ^d	Filtro	0.09 ± 0.0005	0.067 ± 0.007	4.5 ± 0.05	
	AuNPs-MWCNT/PANI	0.06 ± 0.0003	0.013 ± 0.000	2.0 ± 0.02	---
	PANI	0.04 ± 0.0002	0.011 ± 0.000	0.9 ± 0.01	

^a Sustrato a pH entre 6-7 (solución tampón)

^b Sustrato a pH 9 (ajustado con NaOH)

^c Sustrato pH 7.12

^d Sustrato pH 7.26 ± 0.1

Adicionalmente, se realizó la comparación de la máxima densidad de potencia obtenida en esta investigación con la de algunos trabajos realizados en los últimos años que utilizaron el mismo medio de cultivo y tipo de microorganismo. (**Tabla 13**).

Tabla 13. Comparación del desempeño de diferentes estudios realizados similares a la investigación presentada.

Sustrato	Cultivo	Tipo de electrodo	I(mA)	P(mW m ⁻²) ^a	Referencia
Luria Bertani	<i>Shewanella putrefaciens</i>	Tela de carbón decoradas con Fe ₂ O ₃	--	52,81 76.05 100.1	Pandit et al, 2012
lactato	<i>Shewanella putrefaciens</i>	Tejido de grafito	0.04	0.00032	Kim et al, 2002
Disacárido y polisacárido	<i>Shewanella japonica</i>	--	0.08	--	Biflinger et al, 2011
Glucosa y extracto de levadura	<i>E. coli</i>	Composito con 30% PTFE	--	760	Zhang et al, 2007
Glucosa y extracto de levadura	<i>E. coli</i>	NTC dopado con PANI	--	42	Qiao et al, 2007
Luria Bertani	<i>Shewanella putrefaciens</i>	Fieltro + PANI	0.41	93.9	En este estudio
Luria Bertani	<i>Shewanella putrefaciens</i>	Fieltro de carbón con AuNPs-MWCNT	0.46	118.2	En este estudio
Glucosa	<i>Shewanella putrefaciens</i>	Fieltro de carbón con AuNPs-MWCNT	0.36	80.7	En este estudio

^aNo se utilizaron mediadores sintéticos

Capítulo V

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como se ha reportado por estudios anteriores, la modificación de las superficies de los electrodos con nanomateriales ha permitido en la mayoría de casos, mejorar la transferencia de electrones hacia los electrodos anódicos cuando ocurren procesos metabólicos en las bacterias. En este grupo de nanomateriales, las nanopartículas han logrado gran atención debido a sus propiedades eléctricas que conducen a la mejora del potencial generado en celdas de combustibles microbianas, como se reporta en la bibliografía ⁶³. Esta mejora del potencial se debe a la alta conductividad del oro de $4.88 \times 10^7 \text{ S m}^{-1}$ con un valor mayor a la de otros metales como el platino. Además, esta conductividad aumenta al pasar el oro a escala nanométrica.

En este sentido, las nanopartículas utilizadas en este estudio, se lograron sintetizar a partir de una reducción química de una solución de tetracloruro de oro con borohidruro de sodio y se estabilizaron con tirosina. Fueron caracterizadas por Espectroscopia UV-visible y Dispersión de Luz Dinámica (DLS), obteniéndose una absorción máxima a 520 nm y un diámetro efectivo de 30.1 nm con una polidispersión del 30.1 %. La utilización de las nanopartículas en las diferentes modificaciones de las superficies del fieltro de carbón y nanotubos de carbón mostró mejoras en la intensidad de corriente catódica como se reporta en los voltogramas de las **figuras 23, 25 y 27**. Además, al analizar los voltogramas para el autoensamblado y la electrodeposición de nanopartículas de oro, se logró distinguir un desplazamiento en el potencial de reducción del oro ($\sim 0.9 \text{ V}$) solo para las nanopartículas autoensamblados (**Figuras 21, 22, 24 y 26**). Es decir, la reducción de nanopartículas de oro a un menor potencial $\sim 0.6 \text{ V}$. Esta disminución de potencial evidencia la polarización del electrodo generado por el autoensamblado y la causa de este efecto se puede deber a la película de electrolito utilizado en el método de autoensamblado, que dificulta en cierto grado la transferencia de electrones. Por otro lado, después de calcular la cantidad de oro depositado en la superficie de cada electrodo (**Ver Tabla 3**), se observa una mayor cantidad de nanopartículas de oro sobre la superficie del electrodo cuando se usa el método de autoensamblado capa por capa en comparación con el método de electrodeposición. Esta cantidad es superior en casi 10 veces lo que se obtiene a través del método de electrodeposición. De este modo, el método de autoensamblado capa por capa resulta ser eficiente para la modificación de superficies por la obtención de una alta densidad de partícula. Sin embargo, el uso de la electrodeposición puede resultar ventajosa porque modifica las superficies de manera más uniforme ya que el método implica la síntesis directa sobre la superficie del electrodo ⁵⁰. Por tanto, ambos métodos mostraron ventajas y desventajas, las cuales en términos de generación de potencia resulta ser más favorable la utilización del método de modificación por autoensamblado.

Así mismo, se realizaron modificaciones de la superficie del fieltro de carbón soportante 0.8 mg de nanotubos de carbón de pared múltiple con oro (MWCNT-AuNPs) en forma de tinta. Los resultados del voltograma mostraron un aumento en la altura del pico corriente anódico mayor en comparación con la modificación de solo

nanopartículas (**Figuras 23 y 25** respectivamente). Esto se debe a que los nanotubos además de aumentar el área superficial del electrodo, añaden cierta conductividad debido a los electrones de los enlaces π en su estructura. Por tanto, los dos efectos se juntan, generando una mayor corriente. Mientras que en la modificación a través de la polimerización de polianilina, también se logró aumentar la altura de pico de corriente en el electrodo (**Figura 37**), debido a su característica conductora por la presencia de emeraldina a una concentración óptima de 0.5 mol L^{-1} de ácido oxálico, que permitió el crecimiento homogéneo de la polianilina sobre la superficie del electrodo. Sin embargo, la aplicación del compuesto de nanotubos y polianilina no generó un aumento de altura de corriente, debido a las condiciones del medio electrolítico, que ocasionaron la poca adherencia de nanotubos, provocando que se perdiera en la solución.

Además, los cálculos de la densidad de potencia permitieron realizar la comparación entre las distintas modificaciones de superficie realizadas. Se puede observar en la **Tabla 12**, que la densidad de potencia se calculó considerando el área superficial y el área geométrica. Cuando se consideró el área superficial, los resultados muestran que la densidad de potencia máxima se obtiene con el electrodo modificado con polianilina 0.467 mW m^{-2} . Sin embargo, para el área geométrica se obtiene un máximo de 118.2 mW m^{-2} en el electrodo modificado con nanotubos de carbón de pared múltiple. De estos resultados se puede concluir que el efecto de la conductividad de la polianilina prevalece cuando se compara las densidades de potencia en función del área superficial en cambio los nanotubos de carbón a pesar de aumentar la generación de sitios activos sobre la superficie del electrodo, generan un voltaje que no es suficiente para generar una alta densidad de potencia. Pero, teniendo en cuenta que el proceso de colonización y posterior crecimiento de biofilm de bacterias se genera de manera exterior sobre las fibras del electrodo como se observó por SEM (**Figuras 43-45**) y que el tamaño de las bacterias alcanza las micras, existe poca probabilidad de colonización de nanositos activos del electrodo. Es decir, realizar un análisis de potencia considerando el área superficial puede resultar poco práctico. Por tanto, considerando solo aspectos de modificación, soportar nanotubos de carbón (MWCNT-AuNPs) sobre fieltro de carbón genera un mejor desempeño para la generación de densidad de potencia que los otros métodos de modificación superficial aplicados.

Por otro lado, considerando los efectos del medio de cultivo (sustrato) para las bacterias *S. putrefaciens*, el uso de fieltro de carbón con nanotubos de carbón (AuNPs-MWCNT/fieltro) en la celda con Luria Bertani generó una densidad de potencia triplicada al valor del fieltro sin modificar, mientras que para el agua residual sintética (ARS) solo el doble de la original. Estos resultados se pueden deber a las condiciones del medio de cultivo ya que los nanotubos de carbón que se encuentran en el electrodo contienen nanopartículas de oro autoensambladas las cuales fueron estabilizadas a un

pH de 9.5 en su síntesis. Por tanto, cabe esperar que un medio básico como el Luria Bertani las nanopartículas de oro se mantengan estables y las interacciones entre las bacterias y la superficie del electrodo sean más intensas. Efecto que no se produce en el medio de Agua residual sintética que se encuentra a un pH casi neutro.

Además, en la modificación del electrodo con polianilina se observa que también es mayor la densidad para el medio Luria Bertani, dicho valor es algo inesperado ya que si se toma en cuenta que la polianilina del tipo conductora es la que se encuentra protonada. Se esperaría, que la polianilina necesitara un medio ácido para mantener su carácter conductor, esto conllevaría a predecir que el agua residual sintética es más apropiada. Como lo sostienen, estudios posteriores que obtuvieron una mejora de densidad de potencia cuando se trabajó a pH más ácido ⁶⁴. Adicionalmente, estudios muestran la necesidad de dopar la polianilina con otros materiales como óxidos, líquidos iónicos, entre otros para mantener la conductividad a otros pH diferentes del ácido ^{64, 65, 66}. Sin embargo, los resultados mostraron que el electrodo funciona mejor en un medio básico, este efecto puede explicarse considerando el proceso metabólico de la bacteria que no solo genera electrones sino además protones los cuales modifican el pH de la solución en el medio Luria Bertani la cual finalmente con el paso de los días alcanzan un pH más ácido con el que inicio. No obstante, esta variación de pH no ocurre en la celda con medio ARS ya que en su composición tiene solución tampón, la cual ayuda a mantener el pH, con mínimas variaciones. Cabe señalar, que esta variación de pH que se hace referencia, no afectaría la interacción nanopartículas de oro con el electrodo, ya que después de la colonización de las bacterias la biocapa que forman cubre los electrodos. Por tanto, no afecta a la densidad de potencia que se pueda generar.

En la modificación con el composito de nanotubos de carbón con polianilina se observa que en ambos medios (LB y ARS) la densidad de potencia es la misma a la potencia generada en un electrodo solo con polianilina a pesar, que se esperaba que el efecto de dichas modificaciones se complementarían para obtener una mayor eficiencia. Como se explicó anteriormente, este resultado se puede deber a que los nanotubos de carbón en los electrodos se desprendieron y no producen una mejora de potencia. Los nanotubos se pueden desprender ya que para mantenerlos sobre la superficie del electrodo con polianilina se requiere interacciones electrostáticas las cuales se producen a un pH ácido (aproximadamente 3). Pero, como estos medios de cultivo varían entre neutro y básico la interacción de unión se debilita.

En general, en la celda con medio de glucosa (ARS), se observa una mayor densidad de potencia en el electrodo polimerizado con polianilina, alcanzándose un valor de 72.4 mW m^{-2} y en el electrodo modificado superficialmente con nanotubos de carbón de capa múltiple, llegando a un valor de potencia de 80.7 mW m^{-2} . Mientras que, para

los electrodos sumergidos en solución de Luria Bertani se obtuvo un mayor valor de potencia con el electrodo con nanotubos de carbón de pared múltiple, obteniéndose un máximo de 118.2 mW m^{-2} . Además, presentaron valores altos de potencia los electrodos modificados con anilina polimerizada, con un valor de 93.9 mW m^{-2} . Analizando estos resultados, se infiere que las dos modificaciones funcionan y siguen la misma relación de potencia a pesar de que se hayan cambiado de medio de cultivo. Así mismo, existe un aumento de aproximadamente 20 mW m^{-2} al pasar de medio agua residual sintética que contiene glucosa al medio Luria Bertani que contiene triptona. Entonces, como una inicial explicación a estos resultados se tiene que la potencia generada está relacionada al pH del medio de cultivo que afecta el crecimiento bacteriano. Distintos ensayos en soluciones a pH básicos y ácidos para el Luria Bertani muestran como resultado que a un pH de 9 se obtiene un mayor crecimiento de bacterias *Shewanellas p.* Adicionalmente, si se considera el conteo de bacterias cuando las celdas ya están en funcionamiento (**Tabla 9**), los resultados muestran una mayor cantidad de bacterias en la solución con agua residual sintética en comparación con el de Luria Bertani. Para los otros medios de cultivo se obtuvo menor densidad de potencia así como menor valor en el conteo del número de bacterias. Por tanto, tales resultados sugieren que el pH afecta el número de bacterias. Sin embargo, obtener un mayor número de bacterias no implica obtener una mayor densidad de potencia.

Por otro lado, los otros medios de cultivo caldo de pescado y agua extraída de lodos (CITRAR-UNI) no presentaron valores altos de potencia, además tuvieron un bajo índice en el número de bacterias crecidas (**Tabla 9**). Estos resultados muestran una disminución en el crecimiento con el paso de los días, entonces se puede deducir que no se alcanzó a la formación de biofilm sobre los electrodos. Entre las posibles causas se pueden mencionar la deficiente o mínima cantidad de nutrientes presentes en este medio caldo de cabeza de pescado, que llevó al agotamiento veloz de alimento en el tiempo establecido para todas las celdas que fue de 240 horas de espera para una nueva adición de alimento. Por otro lado, los valores obtenidos con el agua extraída de lodos también se pueden asociar a la mínima cantidad de nutrientes y a la poca adaptación que tuvieron las bacterias *Shewanella p.* a este medio de agua residual real ya que como se mencionó anteriormente, la identificación de bacterias en este medio aún no se ha podido corroborar el contenido de especies de este tipo (**Tabla 10**). Así mismo, la variación del clima pudo influir en el crecimiento que tuvieron las bacterias.

Tomando en consideración que los electrodos en cada celda fueron medidos al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones ambientales es probable que el efecto de la modificación haya sido la principal causa del valor de voltaje obtenido. El análisis de los potenciales generados en cada celda, revela que la modificación superficial de los electrodos de fieltro de carbón presenta una mejor densidad de potencia en comparación que los electrodos sin modificar, para todos los medios de cultivos en el

que se pusieron en funcionamiento. Asimismo, el mejor valor de potencia eléctrica considerando un diseño de celda de dos cámaras fue de 118.2 mW m^{-2} para el electrodo de fieltro de carbón (AuNPS-MWCNT/fieltro) sumergido en medio Luria Bertani. Por lo anteriormente expuesto, se considera como causa principal de la mayor densidad de potencia: el efecto de la modificación del electrodo, el cual llevó a un aumento de la superficie del electrodo a nivel micro que facilita la transferencia de electrones y la mejora de biocompatibilidad. Se debe considerar además, que los componentes triptona, extracto de levadura y cloruro de sodio del medio Luria Bertani establecen un buen ambiente para la colonización de la bacteria, en términos de cantidad mínima de nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos ^{22, 28, 67}.

Ya que se debe entender los procesos que facilitan esta transferencia cuando se aumenta el área y la conductividad de la superficie, se debe recordar que las bacterias ganan energía a través de la cadena de transporte de electrones en el cual se producen una serie de reacciones bioquímicas para producir trifosfato de adenosina (ATP) el cual es el compuesto energético que utilizan las bacterias en el proceso de respiración celular (Ciclo de Krebs) ⁶⁸. Entonces, en las *Shewanella putrefaciens* se generaría la oxidación de la glucosa en el agua residual sintética o de componentes equivalentes de la triptona presentes en la Luria Bertani y estos electrones generados producirían la reducción en algunos casos del citocromo o la ubiquinona, como se muestra en las siguientes reacciones ^{11,13}:



Después se produciría una nueva reducción regenerándose los electrones en el citocromo, estos electrones son los que se transportan hacia el cátodo de la celda para reducir principalmente Fe^{+3} a Fe^{+2} . A pesar que, aún no se ha llegado a un consenso sobre los procesos redox específicos que ocurren en la superficie de los electrodos, los estudios muestran que es probable que se lleve a cabo por la reducción del citocromo para el caso de las *Shewanella p.* ^{24, 25}. Los potenciales en los cuales ocurren estos procesos, se ha logrado observar en las Figuras 46, 47. Además, es posible calcular la diferencia de potencial generada para el citocromo de 0.696 V [$\Delta E = (+0.771 \text{ V}) - (+0.075 \text{ V})$] y utilizando la ecuación (4), se puede calcular la energía libre de Gibbs con un valor de $2.1 \times 10^2 \text{ kJ mol}^{-1}$. 0

Este valor de potencial 0.696 V (teórico), solo depende de la transferencia a través de la membrana externa de la bacteria pero, si se considera otros procesos que también permiten la transferencia de electrones como la vía de transferencia indirecta por medio de metabolitos secundarios generados por la bacteria, este valor de potencial puede llegar a ser mucho mayor. Comparando el valor de voltaje teórico con el voltaje

máximo experimental de 0.46 V, se puede apreciar que existe una eficiencia de 66,1 %. No obstante, otros factores que afectan el potencial como las pérdidas de voltaje durante la transferencia de electrones, es decir la pérdida por la transferencia de los electrones de la bacteria, la resistencia del electrólito, resistencia del electrodo anódico y las pérdidas relacionadas al diseño de la celda que implica el uso de la membrana de separación, el cátodo y la reducción de los aceptores de electrones señalados en la **Ecuación 2**, pueden reducir las diferencias entre el valor experimental y el teórico.

Finalmente, los resultados de la **Tabla 13** recopilan estudios anteriores con una configuración parecida a esta investigación. Se puede observar que para el uso de una especie única de *Shewanella* los valores de potenciales alcanzados no son altos a diferencia de los valores de potencia alcanzados al usar un consorcio de bacterias como cultivos mixtos. Además, comparando las densidades de potencia con los otros diseños, se puede concluir que existe una mejora en la potencia obtenida en este estudio. Este hecho es importante ya que demuestra que la modificación del electrodo mejoró la potencia obtenida hasta el momento y que la modificación efectiva se da a través del uso de nanotubos de carbón de pared múltiple y nanopartículas de oro. Sin embargo, para la obtención de resultados comparables a los máximos potenciales aún queda por definir nuevos cambios en las variables que se relacionen al inóculo y al sustrato así como mejorar la eficiencia brindada en el cátodo, objeto de investigación que se desarrollará posteriormente.

CONCLUSIONES

Se logró diseñar la celda de combustible microbiana utilizando como inóculo una cepa aislada de *Shewanella putrefaciens*, con un diseño de dos compartimientos separados bajo una membrana catiónica. Los factores estudiados en la celda fueron el medio de cultivo y el efecto la modificación superficial de los electrodos. Con las medidas de potencia realizadas en un periodo de 700 horas de las celdas en funcionamiento se logró calcular la potencia eléctrica y la eficiencia coulombica del sistema. Los resultados muestran que a pesar del efecto en el potencial que generan el contenido del medio de cultivo y el pH para el crecimiento bacteriano, la modificación superficial del ánodo es un factor crucial en el desempeño eléctrico. Dichos resultados muestran que se puede obtener una densidad de potencia eléctrica máxima de 118.2 mW m^{-2} en medio Luria Bertani a partir de la modificación del electrodo de fieltro de carbón con un depósito de 0.8 mg de nanotubos de carbón de pared múltiple (tinta). Así mismo, esta modificación resultó ser eficiente tanto en Luria Bertani como en agua residual sintética (ARS) por tanto no depende del medio de cultivo. El mayor potencial obtenido es asociado al aumento de la conductividad y biocompatibilidad de los electrodos. A través de la voltametría cíclica se logró observar los procesos redox asociados a la transferencia de electrones bajo condiciones aeróbicas para la especie *S. putrefaciens*, este resultado es bastante atractivo, ya que hasta el momento solo se reportó proceso redox bajo condiciones anaeróbicas. De este modo, este hecho demuestra el carácter facultativo de las *Shewanellas*.

Este estudio permitió la comparación de las distintas modificaciones superficiales en el electrodo de fieltro de carbón, al utilizar nanomateriales y polímero conductor. Además, se logró obtener las condiciones óptimas que permitan alcanzar potenciales superiores a las descritas en anteriores investigaciones. Otro aporte alcanzado sobre este estudio fue la demostración de la importancia de un previo crecimiento de biofilm, para que los electrodos de Au-MWCNT/fieltro puedan generar altos potenciales. Por tanto, se puede predecir que estos electrodos pueden funcionar de manera eficiente en otros sistemas. Este hecho es de vital importancia ya que permitirá realizar próximas investigaciones cambiando otras variables que permitan obtener un potencial mejorado.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Informática, I. N. d. E. e. *Perú, Síntesis Estadística 2015*; Instituto Nacional de Estadística e Informática Lima, Setiembre, 2015.
2. 42% de las zonas rurales de la selva no cuenta con energía eléctrica. <http://proactivo.com.pe/42-de-las-zonas-rurales-de-la-selva-no-cuenta-con-energia-electrica-video/#>.
3. Energising Development – EnDev Perú. <https://www.giz.de/en/worldwide/13361.html>.
4. Alzate-Gaviria, L.; González, K.; PERAZA, I.; GARCÍA, O.; Domínguez, J.; VÁZQUEZ, J.; Tzec-Simá, M.; Canto-Canché, B., Evaluación del desempeño e identificación de exoelectrógenos en dos tipos de celdas de combustible microbianas con diferente configuración en el ánodo. *Interciencia* 2010, 35 (1), 19-25.
5. Revelo, D. M.; Hurtado, N. H.; Ruiz, J. O., Celdas de Combustible Microbianas (CCMs): Un Reto para la Remoción de Materia Orgánica y la Generación de Energía Eléctrica. *Información tecnológica* 2013, 24 (6), 17-28.
6. Liu, H.; Ramnarayanan, R.; Logan, B. E., Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell. *Environmental science & technology* 2004, 38 (7), 2281-2285.
7. Sharma, Y.; Li, B., Optimizing energy harvest in wastewater treatment by combining anaerobic hydrogen producing biofermentor (HPB) and microbial fuel cell (MFC). *International Journal of Hydrogen Energy* 2010, 35 (8), 3789-3797.
8. Pandey, P.; Shinde, V. N.; Deopurkar, R. L.; Kale, S. P.; Patil, S. A.; Pant, D., Recent advances in the use of different substrates in microbial fuel cells toward wastewater treatment and simultaneous energy recovery. *Applied Energy* 2016, 168, 706-723.
9. Prestigiacomo, C.; Fernandez-Marchante, C.; Fernández-Morales, F.; Cañizares, P.; Scialdone, O.; Rodrigo, M., New prototypes for the isolation of the anodic chambers in microbial fuel cells. *Fuel* 2016, 181, 704-710.
10. Du, Z.; Li, H.; Gu, T., A state of the art review on microbial fuel cells: a promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology advances* 2007, 25 (5), 464-482.
11. Scott, K., 5 - Membranes and separators for microbial fuel cells. In *Microbial Electrochemical and Fuel Cells*, Woodhead Publishing: Boston, 2016; pp 153-178.
12. Pistonesi, C.; Haure, J. L.; D'Elmar, R., Energía a partir de las aguas residuales. *Diferentes Alternativas a los Procesos de los Tratamientos de Aguas Residuales para Obtener Energía Ecológicamente Limpia. Universidad Tecnológica Nacional-Argentina* 2010.
13. Rabaey, K.; Verstraete, W., Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends in Biotechnology* 2005, 23 (6), 291-298.
14. Hou, B.; Hu, Y.; Sun, J., Performance and microbial diversity of microbial fuel cells coupled with different cathode types during simultaneous azo dye decolorization and electricity generation. *Bioresource Technology* 2012, 111, 105-110.
15. Borole, A. P.; Hamilton, C. Y.; Vishnivetskaya, T. A.; Leak, D.; Andras, C.; Morrell-Falvey, J.; Keller, M.; Davison, B., Integrating engineering design improvements with exoelectrogen enrichment process to increase power output from microbial fuel cells. *Journal of Power Sources* 2009, 191 (2), 520-527.

16. Rismani-Yazdi, H.; Christy, A. D.; Carver, S. M.; Yu, Z.; Dehority, B. A.; Tuovinen, O. H., Effect of external resistance on bacterial diversity and metabolism in cellulose-fed microbial fuel cells. *Bioresource Technology* **2011**, *102* (1), 278-283.
17. Yong, L.; Wu, H. Y.; Jia, J. J.; Li, X. F.; Zhang, Q. M.; Xiao, C.; Ming, P.; Nan, J. In *Salinity effect on the microbial fuel cell performance*, Applied Mechanics and Materials, Trans Tech Publ: 2014; pp 1365-1369.
18. Lovley, D. R., Powering microbes with electricity: direct electron transfer from electrodes to microbes. *Environmental microbiology reports* **2011**, *3* (1), 27-35.
19. Richter, H.; McCarthy, K.; Nevin, K. P.; Johnson, J. P.; Rotello, V. M.; Lovley, D. R., Electricity generation by *Geobacter sulfurreducens* attached to gold electrodes. *Langmuir* **2008**, *24* (8), 4376-4379.
20. Rabaey, K.; Lissens, G.; Siciliano, S. D.; Verstraete, W., A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency. *Biotechnology letters* **2003**, *25* (18), 1531-1535.
21. Satomi, M., Shewanella A2 - Batt, Carl A. In *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, Tortorello, M. L., Ed. Academic Press: Oxford, 2014; pp 397-407.
22. Carmona-Martínez, A. A.; Harnisch, F.; Kuhlicke, U.; Neu, T. R.; Schröder, U., Electron transfer and biofilm formation of *Shewanella putrefaciens* as function of anode potential. *Bioelectrochemistry* **2013**, *93*, 23-29.
23. Park, D.; Zeikus, J., Impact of electrode composition on electricity generation in a single-compartment fuel cell using *Shewanella putrefaciens*. *Applied microbiology and biotechnology* **2002**, *59* (1), 58-61.
24. Kim, H. J.; Park, H. S.; Hyun, M. S.; Chang, I. S.; Kim, M.; Kim, B. H., A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Enzyme and Microbial Technology* **2002**, *30* (2), 145-152.
25. Hernandez, M.; Newman, D., Extracellular electron transfer. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **2001**, *58* (11), 1562-1571.
26. Breuer, M.; Rosso, K. M.; Blumberger, J.; Butt, J. N., Multi-haem cytochromes in *Shewanella oneidensis* MR-1: structures, functions and opportunities. *Journal of The Royal Society Interface* **2015**, *12* (102), 20141117.
27. Catal, T.; Li, K.; Bermek, H.; Liu, H., Electricity production from twelve monosaccharides using microbial fuel cells. *Journal of Power Sources* **2008**, *175* (1), 196-200.
28. Choi, D.; Lee, S. B.; Kim, S.; Min, B.; Choi, I.-G.; Chang, I. S., Metabolically engineered glucose-utilizing *Shewanella* strains under anaerobic conditions. *Bioresource Technology* **2014**, *154*, 59-66.
29. Miroliaei, M. R.; Samimi, A.; Mohebbi-Kalhari, D.; Khorram, M., Kinetics investigation of diversity cultures of *E. coli* and *Shewanella* sp., and their combined effect with mediator on MFC performance. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **2015**, *25*, 42-50.
30. Hidalgo, D.; Tommasi, T.; Bocchini, S.; Chiolerio, A.; Chiodoni, A.; Mazzarino, I.; Ruggeri, B., Surface modification of commercial carbon felt used as anode for Microbial Fuel Cells. *Energy* **2016**, *99*, 193-201.
31. Zhou, M.; Chi, M.; Luo, J.; He, H.; Jin, T., An overview of electrode materials in microbial fuel cells. *Journal of Power Sources* **2011**, *196* (10), 4427-4435.

32. Santoro, C.; Babanova, S.; Artyushkova, K.; Cornejo, J. A.; Ista, L.; Bretschger, O.; Marsili, E.; Atanassov, P.; Schuler, A. J., Influence of anode surface chemistry on microbial fuel cell operation. *Bioelectrochemistry* **2015**, *106*, Part A, 141-149.
33. Zhu, N.; Chen, X.; Zhang, T.; Wu, P.; Li, P.; Wu, J., Improved performance of membrane free single-chamber air-cathode microbial fuel cells with nitric acid and ethylenediamine surface modified activated carbon fiber felt anodes. *Bioresource Technology* **2011**, *102* (1), 422-426.
34. Tang, X.; Guo, K.; Li, H.; Du, Z.; Tian, J., Electrochemical treatment of graphite to enhance electron transfer from bacteria to electrodes. *Bioresource Technology* **2011**, *102* (3), 3558-3560.
35. Guo, K.; Freguia, S.; Dennis, P. G.; Chen, X.; Donose, B. C.; Keller, J.; Gooding, J. J.; Rabaey, K., Effects of surface charge and hydrophobicity on anodic biofilm formation, community composition, and current generation in bioelectrochemical systems. *Environmental science & technology* **2013**, *47* (13), 7563-7570.
36. Stoner, B. R.; Brown, B.; Glass, J. T., Selected topics on the synthesis, properties and applications of multiwalled carbon nanotubes. *Diamond and Related Materials* **2014**, *42*, 49-57.
37. Yazdi, A. A.; D'Angelo, L.; Omer, N.; Windiasti, G.; Lu, X.; Xu, J., Carbon nanotube modification of microbial fuel cell electrodes. *Biosensors and Bioelectronics* **2016**, *85*, 536-552.
38. Gvozdrenović, M.; Jugović, B.; Stevanović, J.; Trišović, T.; Grgur, B., Electrochemical polymerization of aniline. **2011**.
39. Huang, W.-S.; Humphrey, B. D.; MacDiarmid, A. G., Polyaniline, a novel conducting polymer. Morphology and chemistry of its oxidation and reduction in aqueous electrolytes. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases* **1986**, *82* (8), 2385-2400.
40. Li, C.; Zhang, L.; Ding, L.; Ren, H.; Cui, H., Effect of conductive polymers coated anode on the performance of microbial fuel cells (MFCs) and its biodiversity analysis. *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, *26* (10), 4169-4176.
41. Oueiny, C.; Berlioz, S.; Perrin, F.-X., Carbon nanotube–polyaniline composites. *Progress in Polymer Science* **2014**, *39* (4), 707-748.
42. Qiao, Y.; Li, C. M.; Bao, S.-J.; Bao, Q.-L., Carbon nanotube/polyaniline composite as anode material for microbial fuel cells. *Journal of Power Sources* **2007**, *170* (1), 79-84.
43. Basic Practical Microbiology A Manual. Microbiology, S. f. G., Ed. 2006.
44. Decher, G.; Hong, J. D. In *Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process, 1 consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles on charged surfaces*, Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia, Wiley Online Library: 1991; pp 321-327.
45. Decher, G.; Schlenoff, J. B., *Multilayer thin films: sequential assembly of nanocomposite materials*. John Wiley & Sons: Weinheim, 2006.
46. Domingo, C., Técnicas de espectroscopía Raman aplicadas en conservación. **2011**.
47. Larkin, P., *Infrared and Raman spectroscopy; principles and spectral interpretation*. Elsevier: 2011.
48. Chatterjee, B., Electrowinning of gold from anode slimes. *Materials chemistry and physics* **1996**, *45* (1), 27-32.
49. Selvakannan, P.; Swami, A.; Srisathiyarayanan, D.; Shirude, P. S.; Pasricha, R.; Mandale, A. B.; Sastry, M., Synthesis of aqueous Au core-Ag shell nanoparticles using

- tyrosine as a pH-dependent reducing agent and assembling phase-transferred silver nanoparticles at the air-water interface. *Langmuir* **2004**, *20* (18), 7825-7836.
50. Prema, P., Chemical mediated synthesis of silver nanoparticles and its potential antibacterial application. In *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering-From Analysis and Modeling to Technology Applications*, InTech: 2011.
51. El-Deab, M. S.; Okajima, T.; Ohsaka, T., Electrochemical reduction of oxygen on gold nanoparticle-electrodeposited glassy carbon electrodes. *Journal of the electrochemical society* **2003**, *150* (7), A851-A857.
52. Yadav, S.; Devi, R.; Kumari, S.; Yadav, S.; Pundir, C., An amperometric oxalate biosensor based on sorghum oxalate oxidase bound carboxylated multiwalled carbon nanotubes–polyaniline composite film. *Journal of biotechnology* **2011**, *151* (2), 212-217.
53. Efremova, A.; Regis, A.; Arsov, L., Electrochemical formation and deposition of polyaniline on electrode surface; in situ raman spectroscopical study. *Electrochimica acta* **1994**, *39* (6), 839-845.
54. Kaner, R.; Porter, S.; MacDiarmid, A., Polyaniline, a novel conducting polymer. *J. Chem. Soc. Faradat Trans* **1986**, *82*, 2385.
55. Kulkarni, M. V.; Viswanath, A. K.; Marimuthu, R.; Seth, T., Synthesis and characterization of polyaniline doped with organic acids. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2004**, *42* (8), 2043-2049.
56. Tagowska, M.; Pałys, B.; Jackowska, K., Polyaniline nanotubules—anion effect on conformation and oxidation state of polyaniline studied by Raman spectroscopy. *Synthetic metals* **2004**, *142* (1), 223-229.
57. Venkateswaran, K.; Moser, D. P.; Dollhopf, M. E.; Lies, D. P.; Saffarini, D. A.; MacGregor, B. J.; Ringelberg, D. B.; White, D. C.; Nishijima, M.; Sano, H., Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **1999**, *49* (2), 705-724.
58. Rabaey, K.; Boon, N.; Siciliano, S. D.; Verhaege, M.; Verstraete, W., Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer. *Applied and environmental microbiology* **2004**, *70* (9), 5373-5382.
59. Viridis, B.; Millo, D.; Donose, B. C.; Batstone, D. J., Real-time measurements of the redox states of c-type cytochromes in electroactive biofilms: A confocal resonance raman microscopy study. *PloS one* **2014**, *9* (2), e89918.
60. Chao, Y.; Zhang, T., Surface-enhanced Raman scattering (SERS) revealing chemical variation during biofilm formation: from initial attachment to mature biofilm. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2012**, *404* (5), 1465-1475.
61. Storrie-Lombardi, M.; Hug, W.; McDonald, G.; Tsapin, A.; Neilson, K., Hollow cathode ion lasers for deep ultraviolet Raman spectroscopy and fluorescence imaging. *Review of scientific instruments* **2001**, *72* (12), 4452-4459.
62. Laucks, M. L.; Sengupta, A.; Junge, K.; Davis, E. J.; Swanson, B. D., Comparison of psychro-active arctic marine bacteria and common mesophilic bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Applied spectroscopy* **2005**, *59* (10), 1222-1228.
63. Fan, Y.; Xu, S.; Schaller, R.; Jiao, J.; Chaplen, F.; Liu, H., Nanoparticle decorated anodes for enhanced current generation in microbial electrochemical cells. *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, *26* (5), 1908-1912.
64. Zhang, E. R.; Zhang, Y. C. In *Enhancing current of microbial fuel cell by modifying ionic liquid-doped polyaniline film onto graphite anode*, Advanced Materials Research, Trans Tech Publ: 2012; pp 1794-1798.

65. Genies, E.; Syed, A.; Tsintavis, C., Electrochemical Study Of Polyaniline In Aqueous And Organic Medium. Redox And Kinetic Properties. *Molecular Crystals and Liquid Crystals* **1985**, *121* (1-4), 181-186.
66. Wu, C.-G.; DeGroot, D.; Marcy, H.; Schindler, J.; Kannewurf, C.; Liu, Y.-J.; Hirpo, W.; Kanatzidis, M. G., Redox intercalative polymerization of aniline in V₂O₅ xerogel. The postintercalative intralamellar polymer growth in polyaniline/metal oxide nanocomposites is facilitated by molecular oxygen. *Chemistry of materials* **1996**, *8* (8), 1992-2004.
67. Roy, J. N.; Luckarift, H. R.; Sizemore, S. R.; Farrington, K. E.; Lau, C.; Johnson, G. R.; Atanassov, P., Microbial-enzymatic-hybrid biological fuel cell with optimized growth conditions for *Shewanella oneidensis* DSP-10. *Enzyme and Microbial Technology* **2013**, *53* (2), 123-127.
68. McGilvery, R. W., Conceptos Bioquímicos. Reverte, E., Ed. España, 1977.

ANEXO

1. EJEMPLO DE CÁLCULO DE LA DENSIDAD DE POTENCIA

Se tiene un voltaje de 0.46 V para una electrodo en un celda microbiana en funcionamiento, utilizando una resistencia de 1000Ω y para un área de electrodo de $1,79 \text{ mm}^2$.

Entonces, utilizando la **Ecuación 6**, se obtiene:

$$P_A = \frac{E_{CCM}^2}{A_{\text{ánodo}} \times R_{\text{ext}}}$$

$$P_A = \frac{0.46^2 \text{ V}}{1.79 \text{ mm}^2 \times 1000\Omega} = 118.2 \text{ mW/m}^2$$

2. EJEMPLO DE CÁLCULO DE LA EFICIENCIA COULÓMBICA EN UNA CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA

Primero se calcula la cantidad total de coulombs a través de la integración de la gráfica de corriente vs tiempo. El valor obtenido fue de 130.25.

Además, la cantidad de coulombs teóricos se calcula con la **Ecuación 8**, teniendo en cuenta que de la reacción para la glucosa intervienen $24 e^-$:



el volumen de medio en la celda 0.675 mL , la constante de Faraday 96485 C/mol y el peso molecular de 180.56 g/mol :

$$C_{\text{teo}} = \frac{nF[C]V}{M}$$

$$C_{\text{teo}} = \frac{24 \times 96485 \times 0.03 \times 0.675}{180.56} = 259.7$$

Finalmente utilizando la ecuación para la eficiencia coulombica (**Ecuación 7**), se obtiene:

$$E_c = \frac{C_{\text{exp}}}{C_{\text{teo}}} \times 100\%$$

$$E_c = \frac{130.25}{259.7} \times 100\% = 50.15 \%$$



XXII CONGRESO DE LA SOCIEDAD IBEROAMERICANA DE ELECTROQUÍMICA
(SIBAE 2016)

ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DEL BIOFILM SOBRE ELECTRODOS DE CARBÓN MODIFICADO SUPERFICIALMENTE CON MWCNT-AuNPs PARA CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS

Sandy Calderón Zavaleta^a, Angélica Baena, Pilar García, Adolfo La Rosa Toro^b
Laboratorio de Electroquímica Aplicada, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima-Perú
^asandy.calderon@uni.edu.pe, ^btercer@uni.edu.pe

CIENCIACTIVA

Una iniciativa de

CONCYTEC



OBJETIVOS

- Estudiar la formación del biofilm sobre electrodos caracterizándolos mediante espectroscopia Raman de superficie mejorada (SERS) y voltamperometría cíclica
- Modificar superficialmente electrodos de filtros de carbón para mejorar la transferencia de electrones del ánodo de la celda de combustible.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos desde siempre se han utilizado para el tratamiento de aguas residuales¹. Sin embargo, su función se optimiza al oxidar la materia orgánica y simultáneamente obtener energía eléctrica para la cual es importante construir una celda de combustible microbiana (CCM) en la cual el biofilm tiene un rol importante en la generación del flujo de electrones.²

La microscopía Raman es una técnica vibracional que permite estudiar especies vivas y obtener información química de su comportamiento, sin embargo su poca sensibilidad puede ser mejorada empleando superficies de oro o plata sobre las cuales es posible aumentar la señal Raman. La voltamperometría cíclica permite identificar la presencia del oro depositado sobre el electrodo.



Figura 1: *E. coli* obtenido con objetivo x10 - Raman HORIBA Scientific



Figura 2: *S. putrefaciens* sobre superficie de oro rugoso

PROCEDIMIENTO Y MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN

Preparación Bacterial³

Escherichia coli y *Shewanella putrefaciens* se incubaron en caldo LB Broth, Luria-Bertani (Fisher Biotech) en un baño giratorio (37°C, inoperm) durante 18 y 20h respectivamente. Después de la incubación, las células bacterianas se lavaron tres veces con agua ultrapura y también fosfato de pH 7.4 por centrifugación.

Técnica de ensamblado capa a capa

Electrodos se sumergen en polielectrolito de carga positiva cloruro de polidimetilammonio (PDADMAC) por 20min para formar la primera capa, después se enjuaga sumergiendo otros 5 min en agua ultrapura, la segunda capa se forma sumergiendo el electrodo en solución de AuNPs-tirosina por 20min y se enjuaga en una solución básica a pH 9.5.

Espectroscopia Raman

La superficie de vidrio arnado plateado y de oro con bacterias se montó bajo la lente del objetivo del microscopio y las colonias bacterianas fueron excitadas usando una línea laser 638nm. Espectroscopia Raman se ha realizado mediante un espectrómetro Horiba Scientific con un detector (CCD) de carga acoplada termoelectricamente, en el rango de 500-2000 cm^{-1} , utilizando objetivo de x50 y una potencia de laser de 500mW.

Método Espectrofotométrico Ultravioleta-visible

Las nanopartículas de oro se midieron a una longitud de onda que van de 300 a 500nm. La absorción máxima ocurrió alrededor de 523nm.

Dispersión de la Luz dinámica (DLS)

Se midió por light scattering utilizando los parámetros de índice de refracción real n_r de 1.97 e imaginario k_r de 2 para nanopartículas de oro, obteniéndose un diámetro efectivo de 130.6 nm.

Voltamperometría Cíclica

Todas las soluciones se prepararon con agua ultrapura de 18.2 Mohm.cm. Mediciones se llevaron a cabo en medio básico NaOH 0.1M, electrodo de referencia Hg/HgO, auxiliar Pt a 10mV/s de 0 a 1.0V. En medio ácido H_2SO_4 0.5M, electrodo de referencia Ag/AgCl, a la misma ventana de potencial, en ambiente de N_2 .



Síntesis de nanopartículas de oro

