



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

**OPTIMIZACIÓN DE CELDAS SOLARES SENSIBILIZADAS
CON FICOBILIPROTEÍNAS OBTENIDAS DESDE *Gracilaria*
*chilensis***



Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

AMBBAR ESTEFANÍA ABALLAY GONZÁLEZ
CONCEPCIÓN-CHILE
Septiembre, 2019

Profesor Guía: José Martínez Oyanedel
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular,
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

© Derecho de Autor

Ninguna parte de esta tesis puede reproducirse o transmitirse bajo ninguna forma o por ningún medio o procedimiento, sin permiso por escrito del autor.



Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Concepción, y Departamento de Física, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

José Martínez Oyanedel
Dr.
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

Paulraj Manidurai
Dr.
Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:



Maximiliano Figueroa Yévenes
Dr.
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Víctor Castro Fernández
Dr.
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

Director de Programa

Elena Uribe Perez
Dr
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

DEDICATORIA



A mi Madre por incondicional amor y enseñanzas.

AGRADECIMIENTOS

A Becas de Magister nacional Conicyt, Proyecto FONDEF Idea ID17I-10314, Laboratorio de Biofísica Molecular de la Universidad de Concepción y Laboratorio de Termo-óptica de la Universidad de Concepción, y a todos mis compañeros.



TABLA DE CONTENIDOS

	página
PORTADA	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE GENERAL	iv
INDICE DE FIGURAS	vii
INDICE DE TABLAS	x
RESUMEN	1
	
I. INTRODUCCIÓN	6
II. HIPÓTESIS	27
III. OBJETIVOS	29
IV. METODOLOGÍA	31
Objetivo 1: Purificar Ficobiliproteínas desde Gracilaria chilensis.	
1.1 Extracción de Ficobiliproteínas (PBP)	31
1.2 Purificación de Ficobiliproteínas (PBP)	32
Objetivo 2. Caracterizar las Ficobiliproteínas purificadas.	
2.1 Caracterización espectroscópica de Ficobiliproteínas	34
2.2 Caracterización polipeptídica de Ficobiliproteínas	35
Objetivo 3. Estabilización térmica de Ficocianina	
3.1 Estabilización térmica de Ficocianina mediante entrecruzamiento	38

3.2 Evaluación de estabilidad térmica de ficocianina	39
3.2.1 Análisis estadístico	39
Objetivo 4. Sensibilizar celdas solares con Ficobiliproteínas.	
4.1 Preparación de fotoelectrodo	40
4.2 Sensibilización de fotoelectrodo	42
4.3 Funcionalización de fotoelectrodo	43
4.4 Espectroscopia de absorción infrarroja	44
Objetivo 5. Ensamblar y caracterizar las celdas solares sensibilizadas con Ficobiliproteínas.	
5.1 Preparación de contraelectrodo o cátodo	46
5.2 Caracterización de celdas solares sensibilizadas con Ficobiliproteínas	47
Objetivo 6. Optimización de las celdas solares sensibilizadas con Ficobiliproteínas.	49
V.RESULTADOS	
1. Purificación Ficobiliproteínas desde <i>Gracilaria chilensis</i>	50
2. Caracterización las Ficobiliproteínas purificadas	65
3. Obtención de Ficocianina estabilizada térmicamente	69
4. Sensibilización de fotoelectrodos con Ficobiliproteínas	76
5. Construir y caracterizar las celdas solares sensibilizadas con Ficobiliproteínas	99
6. Optimización de las celdas solares sensibilizadas con Ficobiliproteínas	103

VI. DISCUSIÓN	110
VII. CONCLUSIONES	137
VIII. GLOSARIO	139
IX. REFERENCIAS	140



INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Representación esquemática de una celda solar de silicio.	10
Figura 1.2 Celda solar sensibilizada con pigmentos (DSSC).	15
Figura 1.3 Esquema del PBS del alga roja <i>G. chilensis</i> .	24
Figura 5.1 Análisis electroforético en condiciones denaturantes (SDS-PAGE) del proceso de extracción de Ficobiliproteínas de <i>G. chilensis</i> .	52
Figura 5.2 Espectros de Absorción UV-Visible de extracto Proteico de Ficobiliproteínas de <i>G. chilensis</i> .	54
Figura 5.3. Cromatograma de purificación de Ficocianina mediante cromatografía de intercambio aniónico.	56
Figura 5.4 Espectros de absorción UV-Visible y análisis electroforético (SDS-PAGE) de fracciones colectadas en cromatografía de intercambio aniónico.	59
Figura 5.5 Cromatograma obtenido en columna de hidroxapatita para purificación de Ficoeritrina y Aloficocianina.	61
Figura 5.6 Espectro de absorción UV-Visible de muestras de entrada y salida en columna de hidroxapatita.	63
Figura 5.7 Caracterización espectroscópica de Ficobiliproteínas.	66
Figura 5.8 Caracterización polipeptídica de Ficobiliproteínas.	68
Figura 5.9 Curva de denaturación térmica de Ficocianina.	70
Figura 5.10 Espectros de absorción UV-visible de Ficocianina después del tratamiento con formaldehído.	71
Figura 5.11 Curvas de denaturación para Ficocianina estabilizada con formaldehído.	73

Figura 5.12 Gráfico de temperatura de fusión (T_m) calculadas y concentración de formaldehído usada en la estabilización.	75
Figura 5.13 Espectro de absorción en líquido del extracto proteico en 5 mM o 20 mM de tampón fosfato o Tris-HCl pH 7,0.	77
Figura 5.14 Sensibilización de vidrios recubiertos con TiO_2 , con extracto proteico de ficobiliproteínas (EP) en diferentes tampones	79
Figura 5.15 Sensibilización de vidrios recubiertos con TiO_2 , con extracto proteico.	83
Figura 5.16 Espectro de absorción infrarrojo (FTIR) de 3-Aminopropiltrimetoxilano (APTMS) en solución.	86
Figura 5.17 Espectro de absorción infrarrojo (FTIR) de película de TiO_2 de gusa P25 sin funcionalizar.	88
Figura 5.18 Espectro de absorción infrarrojo (FTIR) de película de TiO_2 funcionalizada con APTMS, usando etanol como solvente.	90
Figura 5.19 Espectro de absorción infrarrojo (FTIR) de las dos zonas de obtenidas sobre la película de TiO_2 , luego de funcionalizar con APTMS usando etanol como solvente.	91
Figura 5.20 Espectro de absorción infrarrojo (FTIR) de película de TiO_2 funcionalizado con APTMS usando DMSO como solvente.	92
Figura 5.21 Espectro de absorción infrarrojo (FTIR) de película de TiO_2 funcionalizado con APTMS usando una mezcla de Etanol y DMSO (1:1).	94
Figura 5.22 Comparación de los espectros de absorción infrarrojo (FTIR) de película de TiO_2 funcionalizado con APTMS usando como solvente etanol, dimetilsulfóxido o mezcla etanol y dimetilsulfóxido (1:1).	96
Figura 5.23 Sensibilización con una solución de Ficoeritrina, sobre fotoelectrodos funcionalizados con APTMS.	98

Figura 5.24 Curvas de intensidad de corriente versus voltaje (JV) de las celdas solares sensibilizadas con Ficobiliproteínas.	101
Figura 5.25 Curvas de intensidad de corriente versus voltaje (JV) de las celdas solares funcionalizadas con APTMS y sensibilizadas con Ficobiliproteínas.	104
Figura 5.26 Curvas de intensidad de corriente versus voltaje (JV) de las celdas solares funcionalizadas con APTMS, sensibilizadas con PC nativa y PC estabilizadas con formaldehido.	108



INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Disponibilidad de fuentes de energías renovables.	7
Tabla 5.1 Rendimiento de purificación de Ficobiliproteínas.	64
Tabla 5.2 Tabla resumen de temperaturas de melting calculadas para Ficocianina estabilizada mediante entrecruzamiento con formaldehído.	74
Tabla 5.3 Tabla comparativa de unidades arbitrarias de absorción en sólido de la película de TiO ₂ sensibilizada con extracto proteico de Ficobiliproteínas en diferentes tampones a pH 7.0.	80
Tabla 5.4 Parámetros eléctricos para celdas solares sensibilizadas con Ficobiliproteínas.	102
Tabla 5.5 Parámetros eléctricos para celdas solares funcionalizadas con APTMS y sensibilizadas con Ficobiliproteínas.	105
Tabla 5.6 Comparación de parámetros eléctricos para celdas solares funcionalizadas con APTMS y sensibilizadas con Ficocianina o Ficocianina térmicamente estabilizada.	109
Tabla 6.1 Contenido de Ficobiliproteínas en [mg/g de peso húmedo] para diferentes especies de algas.	112

RESUMEN

En la actualidad existe la necesidad urgente de reemplazar las fuentes de energías no renovables como los combustibles fósiles por fuentes alternativas de energía renovable y no contaminante. La energía solar puede ser transformada directamente en energía eléctrica gracias al efecto fotoeléctrico, mediante el uso de celdas solares o fotovoltaicas. Las celdas solares comerciales basadas en silicio se han utilizado y desarrollado enormemente, y se conocen como celdas solares de primera generación. El alto costo de los materiales de fabricación empleados, ha llevado al desarrollo de celdas solares de segunda y tercera generación.

Entre estas últimas, encontramos las celdas solares sensibilizadas con colorante (DSSC, por sus siglas en inglés) o celdas de Grätzel, las cuales se basan en la sensibilización (recubrimiento) de un semiconductor con colorantes/pigmentos que le permitan ampliar su espectro de absorción. El pigmento en el ánodo actúa como captador de la energía solar, absorbe un fotón inyectando electrones al semiconductor de TiO_2 , oxidándose. Los electrones pasan desde el fotoelectrodo al conductor

externo hacia el contraelectrodo, realizando trabajo y generando energía eléctrica. Entre el fotoelectrodo y el contraelectrodo se encuentra el electrolito, compuesto de un par redox, que reduce al pigmento y éste a su vez es reducido cuando recibe el electrón desde el contraelectrodo, cerrando el ciclo.

Las principales ventajas de este tipo de celdas solares es su bajo costo de fabricación, disponibilidad de materiales, son amigables con el ambiente y es posible su aplicación a gran escala. Es por esto que han sido ampliamente estudiadas y las mayores eficiencias alcanzadas se basan en colorantes organo-metálicos como derivados de rutenio o colorantes sintéticos. Sin embargo este tipo de colorantes son costosos y contaminantes, por lo cual los esfuerzos se dirigen hacia el uso de colorantes de origen natural.

Organismos acuáticos como algas rojas y cianobacterias, poseen un sistema proteico de captación lumínica altamente eficiente llamado Ficobilisoma. Los Ficobilisomas de algas rojas se componen de Ficobiliproteínas (PBP) como Aloficocianina (APC), Ficocianina (PC) y Ficoeritrina (PE), y proteínas de unión o *linker* que ayudan en el

ensamblaje y conducción de energía solar. La abundancia de algas rojas en la naturaleza, su potencialidad de cultivo y las características espectroscópicas singulares de estas Ficobiliproteínas, las convierten en excelentes candidatas para la sensibilización de semiconductores en dispositivos DSSC.

Es por esto que el objetivo de este trabajo es evaluar y optimizar el uso de Ficobiliproteínas y Ficobilisomas estabilizados, obtenidos desde *Gracilaria chilensis*, como sensibilizadores para DSSC.

Las Ficobiliproteínas de *G. chilensis* fueron extraídas y purificadas con grado de pureza analítico, con un rendimiento de extracción respecto al peso húmedo de alga de 176 mg de Ficoeritrina/Kg de alga, 154 mg de Ficocianina/ Kg de alga y 4 mg de Aloficocianina/Kg de alga.

La sensibilización o adsorción de las PBP sobre los fotoelectrodos fue evaluada mediante la comparación de su espectro de absorción (UV-Visible) en sólido. Tampón Tris HCl pH 7,0 favorece la absorción de las PBP sobre el semiconductor de TiO_2 , respecto a tampón fosfato pH 7,0.

Luego de la sensibilización, las celdas solares fueron ensambladas y sus parámetros fotoeléctricos fueron medidos en un simulador solar. La eficiencia de conversión obtenida para PE, PC y APC, sin optimizar, fue del orden de 0,020 %.

La optimización de las DSSC fabricadas, se enfocó en mejorar la adsorción de las PBP sobre los fotoelectrodos. Para estos se funcionalizó la superficie del semiconductor de TiO_2 con moléculas de Poli-L-Lisina, Amino propil trimetoxilano (APTMS), Glutaraldehído o una combinación de estos dos últimos. La eficiencia de conversión alcanzada con las celdas solares ensambladas con los fotoelectrodos funcionalizados con moléculas de APTMS, fue de 0,176 % para APC, 0,137 % para PC, 0,140 % para PE y 0,042 % para celdas solares sin sensibilizar. Mejorando la eficiencia obtenida anteriormente.

Otro factor importante en el desempeño de una DSSC es la termoestabilidad del sensibilizador utilizado. Reportes previos han mostrado que las PBP de organismo mesófilos son sensibles a temperaturas superiores a 50 °C, por lo cual, lograr la estabilidad térmica de las PBP es deseado. La optimización de éste factor, fue evaluado con

PC, mediante su entrecruzamiento posiblemente intracatenario, con formaldehído, logrando aumentar la temperatura de fusión (T_m) de 56 °C hasta 80 °C, determinado a 280 nm. Las celdas solares ensambladas con PC estabilizada térmicamente mostraron una eficiencia de conversión de 0,12 %, menor a la obtenida con PC sin estabilizar (0,160 %). A pesar de que la eficiencia de conversión alcanzada con las celdas solares ensambladas con PC estabilizada térmicamente, resultara un poco menor a la obtenida con PC sin estabilizar, esto puede ser mejorado en estudios futuros.

Las eficiencias de conversión obtenidas con las celdas solares sensibilizadas con PBP, se encuentran en el rango reportado previamente para otros complejos proteicos fotosintéticos. La funcionalización de superficie de TiO_2 y la estabilización térmica de PC mediante entrecruzamiento con FA, son un acercamiento al diseño y optimización de dispositivos fotovoltaico biohíbridos.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe un incremento global de la demanda energética, la cual ha sido sustentada mediante el uso de recursos no renovables como los combustibles fósiles. Sin embargo esta fuente de energía es finita y genera graves problemas de contaminación ambiental, como la lluvia ácida y el smog, el efecto invernadero y altos niveles de ozono en el aire que respiramos, por nombrar algunos (Radovic L. & Schobert H., 1997). Por lo cual existe la necesidad urgente de contar con fuentes alternativas de energía que sean preferentemente renovables, limpias y económicas, diversificando la matriz energética.

Como se muestra en la tabla 1.1, el sol es una fuente primaria de energía renovable y podría satisfacer todas las necesidades de la población. La energía solar puede ser transformada directamente en energía eléctrica gracias al efecto fotoeléctrico, mediante el uso de celdas solares o fotovoltaicas. El efecto fotoeléctrico se refiere a la emisión de electrones por un material cuando se le ilumina con radiación electromagnética, descubierto en 1839 por el físico francés Alexander Edmond Becquerel, al

observar que la luz sobre un electrodo de platino sumergido en una solución ácida de cloruro de plata generaba energía (Bründermann, Hübers and Kimmitt, 2012).

Tabla 1.1 Disponibilidad de fuentes de energías renovables (González-Mendoza, 2014).

Tipo de energía	Disponibilidad (TW)
Solar	100000
Eólica	14
Maremotriz	0.7
Geotérmica	1.9
Hidroeléctrica	1.2

Celdas solares

El uso de dispositivos fotovoltaicos abrió un nuevo horizonte para el desarrollo en ciencia y tecnología. La primera celda solar fotovoltaica fue construida por Charles Fritts en 1884, estaba formada por selenio cubierto de una fina capa de oro y presentó una eficiencia de conversión de energía solar en eléctrica de 1% (Cleveland & Morris 2013). Sin embargo, no fue

hasta 1954 cuando los Laboratorios Bell construyeron la primera celda solar comercial basada en silicio con un 6% de eficiencia (Moreira *et al.*, 2008) las cuales se han utilizado y desarrollado enormemente.

El principio en que se basan las celdas solares convencionales o de silicio, consiste en la unión de dos semiconductores con dopajes complementarios entre los cuales se forma la llamada unión p-n, conectadas externamente por un material conductor a través del cual fluyen los electrones generando electricidad (figura 1.1).

El silicio puro cuenta con cuatro electrones de valencia y al añadir impurezas (dopaje) con más o menos electrones de valencia se modifican sus propiedades conductoras. Por ejemplo, el fósforo tiene cinco electrones de valencia, de modo que cuando un átomo de fósforo está rodeado por átomos de silicio, el quinto electrón permanece débilmente ligado. Así puede alcanzar la banda de conducción (nivel de energético que permite a los electrones moverse en el material) más fácilmente, aumentando la conductividad del silicio. Silicio dopado con fósforo es un material tipo-n (tipo negativo) puesto que el dopaje aumenta el número de cargas negativas

(electrones libres). Un material tipo-p (tipo positivo) corresponde por ejemplo a silicio dopado con boro, el cual sólo tiene tres electrones de valencia, por lo tanto faltará un electrón en la red del silicio creando un “hueco”. La interface de contacto p-n es llamada la zona de agotamiento (depletion zone) (figura 1.1), donde los electrones en exceso de la capa n migran hacia los huecos de la capa p, generando cargas positivas en el lado n y negativas en el lado p. La presencia de estos iones de carga opuesta crea un campo eléctrico interno que impide que los electrones en la capa de tipo n llenen agujeros en la capa de tipo p.

Al incidir la luz sobre el panel solar, fotones con suficiente energía provocan una liberación de electrones resultando en la formación de huecos. Si esto sucede en el campo eléctrico interno, los electrones se mueven a la zona tipo-n y los huecos la zona tipo-p, cruzando la zona de agotamiento (resaltado con flechas amarillas en la figura 1). Si ambas capas se conectan con un cable conductor externo, los electrones viajarán desde la capa tipo-n hacia la capa tipo-p a través del conductor, creando un flujo de electricidad (página *web*: [American Chemical Society](#)).

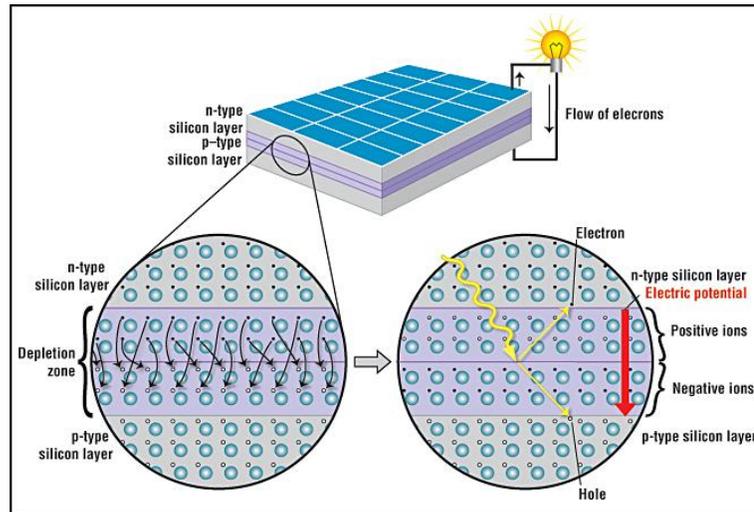


Figura 1.1 Representación esquemática de una celda solar de silicio (página [web American Chemical Society](http://www.americansocietypublishing.com)).



La mayoría de las celdas solares presentes en el mercado están basadas en silicio monocristalino, esta es la llamada tecnología de primera generación, estas celdas solares son amigables con el ambiente y las más eficientes de hoy en día, sin embargo su fabricación es muy costosa (Richhariya *et al.*, 2017). Las celdas fotovoltaicas solares de Silicio, Galio o Arsénico que capturan la energía del sol y la transforman en corriente eléctrica, hoy en día alcanzan sobre el 25 % de eficiencia de conversión de la energía solar en eléctrica (Wright and Uddin, 2012). No obstante la producción de silicio monocristalino encarece el costo de las celdas solares, por lo que no son

competencia frente a las fuentes de energía convencionales, dificultando su masificación (Moreira Gonçalves *et al.*, 2008; Carbó Vela and Rocha, 2013). Esto hace necesario disponer de tecnologías alternativas con menor costo de producción, surgiendo los dispositivos de segunda y tercera generación.

En las celdas solares de segunda generación encontramos tres categorías principales; silicio amorfo, telururo de cadmio (CdTe) o cobre indio galio selenio (CIGS), alcanzando eficiencias de conversión en laboratorio de 10.2%, 16.7% y 19.4% respectivamente (Green *et al.*, 2010). Para la construcción de estas celdas se aplica una capa fina de estos materiales sobre un sustrato como vidrio o cerámica, reduciendo el costo del material y por lo tanto del coste del dispositivo. A pesar de que el costo de fabricación es menor en comparación con las celdas solares de primera generación, los materiales usados continúan siendo costosos, contaminantes y no se encuentran ampliamente a escala comercial.

Las celdas solares de tercera generación son aquellas que no pueden ser clasificadas en la primera ni segunda generación, estas tecnologías se

encuentran en fase de experimentación, y su investigación y desarrollo busca conseguir aumentos sustanciales en la eficiencia, menores costos de fabricación y dispositivos amigables con el medio ambiente. Entre éstas destacan aquellas basadas en materiales orgánicos como las celdas solares de polímeros, las celdas solares de pequeñas moléculas y las celdas solares sensibilizadas con colorante (DSSC, de su nombre en inglés Dye sensitized solar cells) (Corazza, Gevorgyan and Krebs, 2016), estas últimas generan gran interés ya que muestran ventajas como bajo costo de fabricación, disponibilidad de materiales, son amigables con el ambiente y es posible su aplicación a gran escala (Wang *et al.*, 2014).

Celdas solares sensibilizadas con pigmentos (DSSC)

La energía solar es aprovechada por organismos fotoautótrofos en el proceso denominado fotosíntesis, donde la energía de los fotones es captada por pigmentos fotosintéticos y convertida en energía química, a través de la ruptura de la molécula de agua en reacciones acopladas a la síntesis de carbohidratos. Del total de energía que recibe una hoja un 13% es capturado

en energía química (Bolton and Hall, 1991). Sirviendo de inspiración para buscar soluciones a la problemática de generación de energía.

En 1991 se publicó la construcción de una novedosa celda solar basada en la fotosíntesis natural, la cual consta de un fotoelectrodo de óxido de titanio (TiO_2) sensibilizado con un colorante, que luego se conocería como celda solar sensibilizada con pigmento (DSSC) o celda de Grätzel (O'Regan and Gratzel, 1991). Este tipo de celda solar posee cuatro elementos básicos (figura 1.2); 1) un **fotoelectrodo** compuesto de un substrato de vidrio cubierto de una película de óxido de estaño dopado con flúor (FTO, por sus siglas en inglés), el cual cumple la función de óxido conductor transparente, recubierto a su vez por una capa de un material semiconductor nanoparticulado como dióxido de titanio (TiO_2), 2) una capa de **sensibilizador** o colorante sobre el semiconductor, el cual absorbe la energía solar y transfiere electrones al semiconductor, 3) un **contraelectrodo** compuesto de un substrato FTO u óxido de estaño indio (ITO) como en la figura 2a, recubierto con una película de platino y 4) un **electrolito** compuesto de un par rédox como yoduro/triyoduro (I/I_3^-), en sandwich entre los dos electrodos (Quiñones, 2012). Estas celdas han

surgido como una alternativa de bajo costo debido a sus componentes y al proceso de fabricación extremadamente simple. Como se muestra en la figura 1.2b, el colorante en el ánodo actúa como captador de la energía solar, absorbe un fotón elevando el nivel energético de sus electrones de valencia a un estado electrónicamente excitado (dye*), inyecta los electrones al semiconductor de TiO_2 oxidándose (fig. 1.2b número 2), y recupera el electrón cedido por medio del electrolito (fig. 1.2b número 5). El electrón se mueve por el semiconductor de TiO_2 hacia el conductor (electrodo de estaño dopado con flúor (FTO)) y viaja por éste, realizando trabajo y generando energía eléctrica (fig. 2b número 3) hasta llegar al contraelectrodo o cátodo, donde triyoduro es reducido a yoduro usando platino como catalizador y cerrando el circuito (fig. 1.2b número 4) (O'Regan and Gratzel, 1991; Won-yeop *et al.*, 2015; Obotowo, Obot and Ekpe, 2016).

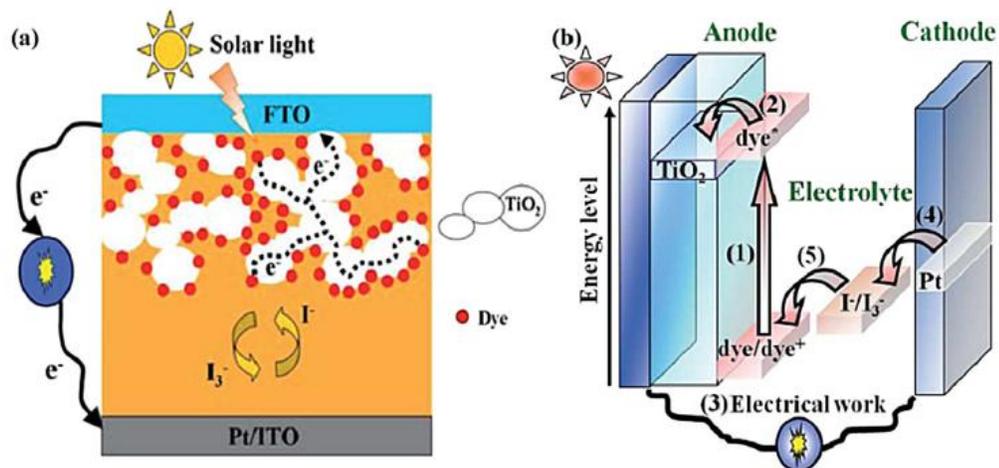


Figura 1.2. Celda solar sensibilizada con pigmentos (DSSC). (a) Esquema de una celda solar sensibilizada con pigmentos. (b) Secuencia básica de eventos en una celda solar sensibilizada con pigmentos (Won-yeop *et al.*, 2015).

Sensibilizadores y optimización de dispositivos DSSC

El óxido de titanio (TiO_2) es un semiconductor de bajo costo e inocuo, pero presenta un bajo rendimiento cuántico y es incapaz de utilizar la luz visible (Seery *et al.*, 2007; Shalini *et al.*, 2015; Lee and Ho, 2017). Es por eso que se ha recurrido a la sensibilización del TiO_2 con diferentes compuestos para aumentar sus propiedades de absorción de luz. En los últimos 20 años se ha desarrollado una intensa investigación en torno al desarrollo de

sensibilizadores para celdas solares. Las DSSC más eficientes están basadas en complejos órgano-metálicos en base a Rutenio alcanzando eficiencias de 11,2% (Buscaino *et al.*, 2008; Ludin *et al.*, 2014) y de mayor estabilidad en el tiempo, respecto a aquellas basadas en colorantes no metálicos (Mehmood *et al.*, 2014). Sin embargo existe una baja disponibilidad del elemento, es costoso y de naturaleza tóxica (Shalini *et al.*, 2016).

Otro tipo de sensibilizadores son compuestos orgánicos libre de metal (colorantes sintéticos), los cuales son obtenidos mediante síntesis química y pueden ser diseñados para mejorar la eficiencia como se presenta en el trabajo de Yang *et al.* (2012) quienes variando los sustituyentes de una molécula de fenotiazina alcanzan una eficiencia de 6.22%. Zhou *et al.* (2012) mediante la síntesis de porfirinas con un bajo band-gap alcanza una eficiencia de 5.46%.

Zhang and Cole (2015) reportan la eficiencia obtenida con moléculas basadas en bitiazol de un 7.86% con BT-T3 (((Z)-2-ciano-3-(5-(4,4 0 -diexyl-5 0 -(5-(4-(p-tolil)-1,2,3,3a,4,8b-hexahidorciclopenta[b] indol-7-yl)tiofen-2-yl)-[2,2 0 -bitiazol]-5-yl)tiofen-2-yl)acido acrílico). Kakiage *et*

al. (2014) reportan una eficiencia de 12,5% usando una molécula basada en alcoxisilano como sensibilizador y par rédox en base a cobalto ($\text{Co}^{+3/+2}$).

Una estrategia para mejorar la eficiencia de las DSSC es la co-sensibilización del semiconductor mediante colorantes con espectros de absorción complementarios para mejorar la absorción de la luz y ampliar la respuesta espectral de las DSSC orgánicas (Palomares *et al.*, 2007; Hardin *et al.*, 2009). Usando sensibilizadores basados en zinc-porfirina (YD2-o-C8) co-sensibilizado con otro colorante (Y123) u otros derivados de porfirinas se reportan eficiencias del orden del 13% (Yella *et al.*, 2011; Mathew *et al.*, 2014). Se reportan múltiples estudios para la optimización de las DSSC, como la incorporación de nano estructuras, diferentes óxidos conductores, electrolitos, mejoras en la fabricación del contraelectrodo, co-sensibilización, entre otras (Sharma *et al.*, 2018; Hilal *et al.*, 2018; Popoola *et al.*, 2018). Otros estudios, por ejemplo, han evaluado el uso de polímeros electrolitos en estado sólido, con los cuales se han reportados eficiencias de un 8.9% con colorantes sintéticos (Cho *et al.*, 2014).

Si bien los sensibilizadores sintéticos presentan buena eficiencia y durabilidad, poseen limitaciones como costosos procesos de síntesis y el

uso de materiales tóxicos. Estas limitaciones, vuelven atractivo el estudio y optimización de DSSC con sensibilizadores alternativos biocompatibles, como los pigmentos naturales (Shalini *et al.*, 2015).

Sensibilizadores de origen natural

Pigmentos naturales son considerados como una alternativa promisoriosa para ser usados como sensibilizadores ya que, pueden ser extraídos con simples procedimientos, por lo tanto resultan de bajo costo, biodegradables, amplia disponibilidad, son amigables con el medio ambiente y evitarían el uso de costosos de colorantes obtenidos mediante síntesis química (Ludin *et al.*, 2014). Los pigmentos naturales de plantas, flores y frutos, como por ejemplo clorofilas, carotenos y antocianinas, han sido extensamente utilizados para sensibilizar semiconductores (Zhou *et al.*, 2011).

En varias publicaciones podemos encontrar revisiones respecto al uso de sensibilizadores extraídos desde fuentes naturales vegetales, en DSSC (Narayan, 2012; Hug *et al.*, 2014; Shalini *et al.*, 2015; Richhariya *et al.*, 2017; Iqbal, Ali and Khan, 2019).

Una de las ventajas de las DSSC es su versatilidad, favoreciendo su optimización al variar uno o más de sus componentes. Como por ejemplo el tipo de sensibilizador, Zhou *et al.*(2011) evalúan 20 plantas, como sensibilizadores obteniendo la mayor eficiencia (1,7 %) con pepicarpio de mangostán. DSSC sensibilizadas con pigmentos de hojas de *Indigofera tinctoria* alcanzan un 0.114 % de eficiencia (Rajan and Cindrella, 2019).

Gu *et al.* (2018) evaluaron exitosamente extractos de espinaca, fruto del dragon (*Pitaya pericarp*), cáscara de naranja, hojas de ginkgo, repollo morado y zanahorias. Destacando el extracto de repollo morado con un 0,157 % de eficiencia de conversión. Los autores señalan que la baja eficiencia obtenida con zanahoria (0,01 %), es resultado de la baja adsorción del pigmento sobre la película de TiO₂, la cual fue evaluada mediante espectros de absorción infrarroja.

Se obtuvo una eficiencia de 1,076 % para jugo de granada (Suria *et al.*, 2012). Calogero *et al.* (2012) obtiene una eficiencia de 1,7 % para rábanos rojos y de un 3,3 % para el colorante sintético en base a rutenio N719 (usado como control). También se ha utilizado co-sensibilización, Kumara *et al.* (2006) alcanzaron una eficiencia de 1,01 % con chisonin (pigmento

rojo de *Perilla ocimoides*) y 0,59 % usando clorofila, mientras que una mezcla de ambos mostró una mayor eficiencia de 1,31 %. Una eficiencia de 4,2 %, es alcanzada con β -caroteno y un derivado de clorofila (Wang *et al.*, 2006).

Con extractos de granada se ha obtenido una eficiencia de conversión de 2 %, registrando una densidad de corriente de 12,2 mA/cm² (Ghann *et al.*, 2017). Así como también se reporta un 2 % de eficiencia de conversión global para una DSSC basados en antocianinas, clorofilas, xantófilas y flavonoides (Calogero *et al.*, 2012; Shalini *et al.*, 2015)

DSSC construidas con Nanopartículas de TiO₂ de 72 nm, un electrolito sólido basado en yodo y yoduro de potasio, sensibilizados con extracto de hojas de henna (*Lawsonia inermis*) o betarraga, presenta una eficiencia de 1,08 % y 1,3 %, respectivamente (Sathyajothi *et al.*, 2017).

Una DSSC basada en nanoparticulas de TiO₂ sintetizadas mediante el método de sol-gel y sensibilizada con un extracto etanolico de *Peltophorum pterocarpum* o *Acalypha amentácea*, mostró una densidad de corriente de

14,95 mA/cm² y una eficiencia de conversión de 8,22% y 7,38 %, respectivamente (Sanjay *et al.*, 2018).

Usando pigmentos naturales y un electrolito sólido compuesto de una mezcla 50% quitosano y 50% óxido de polietileno, y el par redox yoduro/triyoduro, registró una eficiencia de 1,5% con un extracto de sumac rojo (Al-Bat'hi *et al.*, 2013).

Pigmentos captadores de Luz

Los procesos fotosintéticos en plantas, bacterias y algas marinas proporcionan información clave para diseñar sistemas de captación de luz artificial que funcionarán de manera eficiente y robusta.

Los complejos proteicos captadores de luz son estructuras especializadas para la captación y conducción de la energía solar hacia los centros de reacción fotosintéticos. En plantas terrestres se componen de cromóforos como clorofilas, xantófilas y carotenos dispuestos en una matriz proteica (Nagata *et al.*, 2012).

En la búsqueda de sensibilizadores naturales también se han estudiado estos complejos proteicos, como por ejemplo, construyendo un prototipo de DSSC con el complejo proteico captador de luz antena II (LHCII, por sus siglas en inglés), aislado desde espinaca e inmovilizado mediante 3-aminopropyltriethoxysilane (APS), sobre electrodos de óxido de estaño indio (ITO) o sobre TiO_2 , que mostró una eficiencia de 0,13 % con el electrodo de TiO_2 (Nagata *et al.*, 2012). Yu *et al.* (2013) comparan la eficiencia obtenida sensibilizando el semiconductor TiO_2 con el complejo proteico LHCII o sólo con sus pigmentos, obteniendo una mejor eficiencia al usar los pigmentos (0,79 %), además señala que n-dodecyl b-D-maltoside (DDM) es un buen surfactante para solubilizar y estabilizar el sensibilizador por 2 semanas a temperatura ambiente.

Existe una transferencia foto-inducida de electrones, desde proteínas fotoactivas como la proteína fluorescente verde hacia nanoparticulas de TiO_2 , o el complejo proteico RC-LH1 de bacteria púrpura *Rhodospseudomena acidófila* a electrodos de oro (Tan *et al.*, 2012; Acikgoz *et al.*, 2014; Kamran *et al.*, 2014).

Organismos acuáticos como algas rojas y cianobacterias, poseen un sistema proteico de captación lumínica altamente eficiente llamado Ficobilisoma (PBS), el cual permite la absorción de energía solar en longitudes de onda pobremente aprovechadas por la clorofila, en la región de luz visible de 550 a 650 nm. Mediante captación de Luz solar y procesos de transferencia de energía resonante fluorescente (FRET, por sus siglas en inglés), los PBS transforman la longitud de onda de la energía absorbida y la ponen a disposición del sistema biológico para hacer fotosíntesis, emitiendo fotones en la zona de los 660-680 nm (Glazer, 1985; Ducret *et al.*, 1996). De esta manera son capaces de aumentar el rendimiento fotoquímico en ambientes acuáticos con baja intensidad lumínica.

Los Ficobilisomas se componen de Ficobiliproteínas (PBP) que corresponden a proteínas con cromóforos tetrapirroles lineales unidos covalentemente a residuos conservados de cisteínas y proteínas de unión o *linker* que ayudan en el ensamblaje y conducción de energía (Betz, 1997).

En algas rojas como *G. chilensis* encontramos tres tipos de PBP; Aloficocianina (APC) con un máximo de absorción a 650 nm, Ficocianina (PC) con máxima absorción a 620 nm y Ficoeritrina (PE) con máximos de

absorción a 498 nm, 540 nm, 565 nm. El PBS presenta 2 subestructuras principales, un *core* tri o penta cilíndrico y 6 a 8 antenas que radian desde el *core* dependiendo de la especie. Cada cilindro del *core* se compone de 4 trímeros de APC, mientras que las antenas se componen de hexámeros de PC en la zona más cercana al *core* y hexámeros de PE en la zona más distal (Figura 3) (Ducret *et al.*, 1996; Arteni *et al.*, 2008, Mella, 2011).

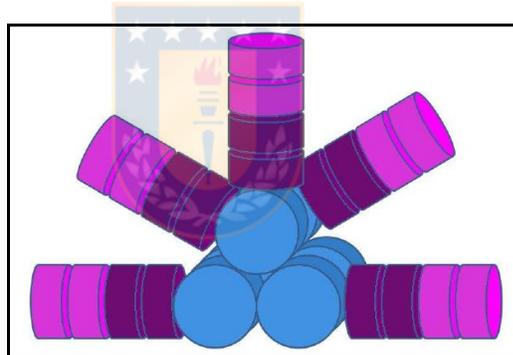


Figura 1.3. Esquema del PBS del alga roja *G. chilensis*. En magenta y morado se representan las varillas compuestas por PE y PC respectivamente, en azul está representado el core tricilíndrico de APC.

La abundancia de algas rojas en la naturaleza, su potencialidad de cultivo y las características espectroscópicas singulares de estas PBP, que presentan

altos coeficientes de absorción de luz visible y alto rendimiento cuántico (Glazer, 1988), las convierten en excelentes candidatas para la sensibilización de semiconductores en dispositivos DSSC.

Berns & MacColl, 1989, mencionan que al exponer electrodos de platino, oro o un semiconductor como SnO₂ cubiertos con PBP, existe una fotorespuesta. Recientemente se han estudiado estas proteínas como sensibilizadores de nanopartículas de TiO₂ concluyéndose que es posible la transferencia de carga (transferencia de electrones) entre las PBP y el semiconductor (Kathiravan and Renganathan, 2009; Kathiravan *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2014; Enciso *et al.*, 2016). Así como también que puntos cuánticos (QDs, quantum dots) de CdSe/ZnS y APC forman un complejo estable mediante entrecruzamiento, mostrando una transferencia de energía no radiativa mediante FRET desde los QDS hacia APC (Karpulevich *et al.*, 2017).

Se ha reportado la sensibilización de una DSSC con trímeros de APC recombinante, registrando una eficiencia de un 0,26% (Pu *et al.*, 2013). Estudios con PC y PE muestran que es adsorbida sobre la superficie de nanopartículas coloidales de TiO₂ (Kathiravan and Renganathan, 2009;

Kathiravan *et al.*, 2009). Enciso *et al.* (2016) estudiaron la influencia de coadsorbentes como clorofila y ácido heptadecanoico, señalando que la mejor condición para sensibilización con PC fue con ácido heptanoico, ya que la producción de las celdas resultó reproducible y con un 0,04 % de eficiencia.

La principal desventaja que presentan los sensibilizadores naturales es su inestabilidad y baja eficiencia (Richhariya *et al.*, 2017). Entre los estudios que apuntan a resolver este problema, podemos mencionar la estabilización de complejos proteicos captadores de luz como los PBS, mediante uso de agentes de entrecruzamiento como formaldehído (Lowe, 2007), o en estado sólido en un *films* de poliacrilamida para su aplicación en concentradores solares (Mulder *et al.*, 2009).

Como se expuso anteriormente, dada la capacidad de las PBP y proteínas fotosintéticas para interactuar con semiconductores, electrodos o nanopartículas metálicas, y la gran versatilidad de las DSSC. Existe un enorme potencial para el diseño y desarrollo de dispositivos fotovoltaicos, que puedan en el futuro reemplazar las DSSC basadas en rutenio o

colorantes sintéticos, ofreciendo menores costos de fabricación y que sean amigables con medio ambiente.

II. HIPOTESIS DE TRABAJO:

Así como la primera celda solar de silicio presentaba una eficiencia del 1 % y gracias a muchos esfuerzos de optimización hoy en día alcanzan un 25 % de eficiencia, se espera que los avances científicos y tecnológicos puedan mejorar la estabilidad y eficiencia de los sensibilizadores naturales. En base a los reportes antes mencionados, podemos decir que variaciones en componentes de DSSC, como tipo y forma de semiconductor, electrolito y tipo de sensibilizador, pueden mejorar su estabilidad y aumentar su eficiencia. Basados en las singulares características espectroscópicas de los complejos proteicos accesorios captadores de luz presentes en el alga roja *G. chilensis* y los antecedentes mencionados, planteamos la siguiente hipótesis:

“Celdas fotovoltaicas sensibilizadas con Ficobiliproteínas, optimizadas mediante funcionalización del fotoelectrodo, presentarán mejor eficiencia, que las celdas fotovoltaicas sensibilizadas con complejos proteicos del aparato fotosintético, reportada por otros autores”.



III. OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo es evaluar y optimizar el uso de Ficobiliproteínas obtenidas desde *Gracilaria chilensis*, como sensibilizadores para DSSC.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS



1. Purificar Ficobiliproteínas desde *Gracilaria chilensis*.
2. Caracterizar las Ficobiliproteínas purificadas.
3. Estabilización térmica de Ficocianina.
4. Sensibilizar celdas solares con Ficobiliproteínas.

5. Ensamblar y caracterizar las celdas solares sensibilizadas con Ficobiliproteínas.

6. Optimización de las celdas solares sensibilizadas con Ficobiliproteínas.



IV. METODOLOGÍA

Objetivo 1: Purificar Ficobiliproteínas desde *Gracilaria chilensis*.

1.1 Extracción de Ficobiliproteínas (PBP)

La extracción de PBP se realizó a partir de 295 g de *Gracilaria chilensis* recolectada en la bahía de Coliumo, playa de Dichato (36° 32'S, 072° 56' W).

El alga fue lavada con agua de mar y agua destilada, secada y picada con tijera, finalmente se congeló con N₂ (l) y se molió en mortero hasta formar un polvillo. Se incubó en 500 ml de tampón fosfato K₂HPO₄/H₂KPO₄ 20mM pH 8,0 durante 16 horas a 4°C. El sobrenadante se filtró con una gasa y fue centrifugado a 4000g por 40min para obtener un extracto acuoso. El material sólido fue re-extraído en similares condiciones.

El extracto acuoso fue precipitado inicialmente con un 25 % de saturación de (NH₄)₂SO₄ el cual fue agregado lentamente con agitación suave, se dejó en reposo 4 horas a 4 °C y fue centrifugado a 10.000 g a 4 °C por 30 minutos. El sobrenadante obtenido se precipitó con un 60 % saturación de (NH₄)₂SO₄ por 16 horas a 4 °C y fue centrifugado a 13000 g por 40 minutos a 4°C. Este procedimiento fue repetido con el extracto acuoso obtenido desde el material

sólido re-extraído. Los pellet fueron juntados y resuspendidos en 35 ml de tampon K_2HPO_4/H_2KPO_4 5 mM pH 7,1 y dializados en este mismo buffer en un volumen de 2L con cambios cada 4 horas (3 recambios de buffer), obteniendo un extracto proteico (EP).

1.2 Purificación de Ficobiliproteínas (PBP)

1.2.1. Cromatografía de intercambio iónico

Posterior a la diálisis, 10 mL de extracto proteico fueron diluidos en 100 mL de tampon K_2HPO_4/H_2KPO_4 5 mM pH 7.1, centrifugado a 10.000 g por 30 min a 4 °C y filtrado con membrana de nitrato de celulosa de 0.45 μ m. La purificación de las Ficobiliproteínas se realizó mediante cromatografía líquida en un cromatógrafo FPLC-Merck Hitachi con detección de absorbancia UV-Vis.

Para la cromatografía de intercambio iónico se usó una columna de intercambio aniónico Waters Protein-Pak Q 15HR (Milford, Massachusetts, USA), la cual fue equilibrada con tampon K_2HPO_4/H_2KPO_4 5 mM pH 7.1. El flujo de inyección fue de 0,5 mL/min y flujo de corrida de 1 mL/min. Luego de cargar la muestra, se lavó con 3 volúmenes de columna (CV) de tampón de

equilibrio, se inició la elusión con 2 CV del tampón de equilibrio conteniendo 50 mM de KCl, seguido de 3 CV del tampón de equilibrio conteniendo 100 mM de KCl y finalmente 2 CV del tampón de equilibrio conteniendo 1 M de KCl.

Se colectaron fracciones 2ml utilizando un colector de fracciones (Super Fraction Collector SF-2120- Advantec), las cuales fueron analizadas espectrofotométricamente en un espectrofotómetro UV-Visible Jasco V-650 (Easton, Maryland, USA) y agrupadas según características espectroscópicas.

1.2.2. Cromatografía de adsorción con hidroxiapatita

Las fracciones enriquecidas en Ficoeritrina (PE) y Aloficocianina (APC) fueron dializadas contra tampón fosfato K_2HPO_4/H_2KPO_4 5 mM pH 7,1 para eliminar sales. La columna de hidroxiapatita (Biorad) fue equilibrada con tampón fosfato 5 mM pH 7,1. Se cargó con 5 mL de muestra concentrada. La columna se lavó con tampón de equilibrio hasta que toda la PE fuera eluida, luego la APC retenida en la columna de hidroxiapatita fue eluida con 50 mM de K_2HPO_4/H_2KPO_4 pH 7,1, El flujo de la cromatografía fue de 1 mL/min y se colectaron fracciones de 5 mL.

1.2.3. Estimación del rendimiento de extracción

El rendimiento de extracción fue calculado respecto a la cantidad inicial de Ficobiliproteínas en el extracto acuoso según (Chuner *et al.*, 2012).

Objetivo 2. Caracterizar las Ficobiliproteínas purificadas.

2.1 Caracterización espectroscópica de Ficobiliproteínas

La caracterización de las PBP se realizó mediante espectroscopia de absorción UV-Visible, en un espectrofotómetro Jasco V-650 (Easton, Maryland, USA), registrando el espectro de absorción en líquido desde 200 a 700 nm y los espectros de emisión de fluorescencia en un espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC excitando a 566, 620 y 650 nm correspondientes a los máximos de absorción de PE, PC y APC respectivamente. El índice de pureza fue determinado mediante la relación entre la absorción a su máximo de absorción y 280 nm (Ecuación 1, 2 y 3). La cuantificación de las Ficobiliproteínas en mg/mL fue realizada usando la fórmula descrita por (Bennett and Bogorad, 1973) (ecuación 4, 5 y 6).

$$\text{Pureza}_{\text{ficoeritrina}} = A_{565\text{nm}}/A_{280\text{nm}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$\text{Pureza}_{\text{ficocianina}} = A_{620\text{nm}}/A_{280\text{nm}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$\text{Pureza}_{\text{aloficocianina}} = A_{650\text{nm}}/A_{280\text{nm}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$[\text{PC}] = \frac{A_{620\text{nm}} - 0.474(A_{650\text{nm}})}{5.34} \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$[\text{APC}] = \frac{A_{650\text{nm}} - 0.208(A_{620\text{nm}})}{5.09} \quad (\text{Ecuación 5})$$

$$[\text{PE}] = \frac{A_{650\text{nm}} - 2.41[\text{PC}] - 0.849[\text{APC}]}{9.62} \quad (\text{Ecuación 6})$$

2.2 Caracterización polipeptídica de Ficobiliproteínas

La composición polipeptídica de las Ficobiliproteínas se analizó mediante geles de poliacrilamida en condiciones nativas (PAGE) y condiciones denaturantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

Para la electroforesis en condiciones denaturantes (SDS-PAGE), las muestras fueron dializadas contra agua destilada y concentradas en un concentrador centrifuga. Posteriormente, fueron incubadas con buffer denaturante en relación (6 x) y calentadas a 100 °C durante 5 minutos. Las muestras fueron cargadas en un gel concentrador 5 % de poliacrilamida en 1 M Tris (pH 6.8), 10 % (0,1 % p/v) dodecilsulfato sódico SDS, 10 % (0,1 % p/v) persulfato de amonio, tetradietilendiamina (TEMED 6,5 mM) y un gel separador de 12 % de poliacrilamida en 1,5 M Tris (pH8.8), 10 % SDS (0,1 % p/v), 10 % persulfato de amonio (0,1 % p/v), TEMED (2,7 mM). La electroforesis fue realizada a un voltaje constante de 100 V. utilizando una cámara Mini Protean 2 BioRad con fuente de poder PowerPac™ HC Bio-Rad. Una vez finalizada la electroforesis, los geles se fijaron con metanol: ácido acético: agua en relación 45: 1: 54, durante 20 min y se tiñeron con Azul de Coomassie Coloidal (sulfato de amonio 17 % p/v, metanol 34 % v/v, ácido acético 0.5 % v/v y Coomassie G250 0.1 % p/v) por toda una noche y finalmente fueron desteñidos con agua destilada.

Objetivo 3. Estabilización térmica de Ficocianina

Ya que el desarrollo de dispositivos bioelectrónicos como son las celdas solares sensibilizadas con proteínas fotosintéticas, requiere de la durabilidad del sensibilizador usado, es importante la estabilidad térmica de las ficobiliproteínas para su uso como sensibilizadores. Existen diferentes métodos para lograr la estabilidad térmica de una proteína, una de las estrategias más comunes son la estabilización térmica mediante métodos químicos, como son el uso de agentes entrecruzantes.

Se evaluó la estabilización térmica de Ficocianina mediante un entrecruzamiento de longitud cero con formaldehído (FA). Se establecieron las condiciones óptimas para el entrecruzamiento y Temperatura de fusión (T_m) y espectros de absorción UV-visible.

En proteínas formaldehído puede reaccionar con grupos N-terminales y cadenas laterales cisteína, histidina, lisina, triptófano y arginina (French and Edsall, 1945). Sin embargo residuos de lisina accesibles al solvente proporcionan los grupos funcionales más reactivos en las proteínas nativas, y además, la modificación de las proteínas nativas por el formaldehído no parece perturbar mucho la estructura terciaria (Toews, Rogalski and Kast,

2010). Primero, el formaldehído reacciona con un nucleófilo relativamente fuerte, con los grupos amino y tiol de los aminoácidos, más comúnmente con un grupo ϵ -amino de lisina de una proteína y forma derivados de metilol. En el caso de grupos amino primarios, los grupos metilol se condensan parcialmente en una imina o base de Schiff. Posteriormente, la imina puede entrecruzarse con glutamina, asparagina, triptofano, histidina, arginina, cisteína y residuos de tirosina (Metz *et al.*, 2004; Hoffman *et al.*, 2015).

3. 1 Estabilización térmica de Ficocianina mediante entrecruzamiento

Se incubó 1 mL de Ficocianina a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ con 0.1, 0.5 y un 1 % (p/v) de formaldehído (FA) en 10% de metanol (Sigma-aldrich), por un periodo de 24 horas, a temperatura ambiente y con agitación suave. El experimento fue realizado con 4 réplicas experimentales, usando el solvente del FA como control (0% FA). La reacción se detuvo con 100 mM de lisina y las muestras fueron dializadas en buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,1 y centrifugadas a 10000g por 5 minutos.

3.2 Evaluación de estabilidad térmica de ficocianina mediante curvas de Denaturación

Las curvas de denaturación térmica fueron realizadas en un espectrofotómetro UV-Visible Jasco V-650, con sistema de control automático de temperatura Jasco PSC-718 (Easton, Maryland, USA). Se usó una rampa de temperatura de 1 °C por minuto y registró la absorción de Ficocianina a 280 nm, 360 nm, 550 nm y 620 nm. El cálculo de la T_m fue realizado usando el programa Graphpad Prisma 6.0, usando un ajuste de regresión no lineal, con el modelo sigmoideo de la curva logística de cuatro parámetros (4PL).



3.2.1 Análisis estadístico

Las temperaturas de fusión determinadas (T_m), fueron analizadas con el software Statistica 9 mediante un análisis de análisis de varianza (ANOVA) usando el test de tukey, un nivel de significancia $p < 0,05$.

Objetivo 4. Sensibilizar celdas solares con Ficobiliproteínas.

Para la construcción de una celda solar sensibilizada con colorante, se necesitan un fotoelectrodo, un contraelectrodo, un sensibilizador o pigmento y un electrolito. El fotoelectrodo se compone de un soporte transparente comúnmente vidrio o algún material orgánico transparente, recubierto de una película conductora como óxido de estaño dopado con flúor llamado FTO por sus siglas en inglés (Fluorine doped Tin Oxide), el cual cumple la función de soporte transparente y conductor de electrones, este a su vez, es recubierto de un semiconductor como dióxido de titanio (TiO_2). El contraelectrodo es un soporte FTO recubierto con una película de platino.

El proceso de sensibilización se refiere a la adsorción del colorante sobre la película de TiO_2 del fotoelectrodo.

4.1 Preparación de fotoelectrodo

4.1.1 Limpieza del vidrio de FTO

Vidrios FTO (Solaronix, Aubonne, Switzerland) de 1,5 X 1,5 cm, fueron sumergidos en sonicador de baño por 10 minutos en una solución de jabón,

agua destilada y acetona 100 %, lavando con agua destilada luego de cada ciclo y secados con argón.

4.1.2 Capa de bloqueo con cloruro de titanio IV (TiCl_4)

El fotoelectrodo es tratado con cloruro de titanio para formar una capa de bloqueo de TiO_2 con el fin de evitar el contacto del electrolito con el vidrio FTO y un consecuente cortocircuito en la celda solar. Se cubrió con cinta termoresistente un extremo de los vidrios FTO y fueron sumergidos en una solución fría de 40 mM de TiCl_4 (Merck), llevados a 75°C por 30 minutos, lavados con agua y etanol, y puestos a 450°C por 30 minutos en un horno tubular (Lenton, Parsons Lane, Hope, United Kingdom).

4.1.3 Preparación y recubrimiento con pasta dióxido de titanio (TiO_2)

Se preparó una pasta con 1 g de nanopartículas de TiO_2 degusa P25 de 21 nm de diámetro (Sigma-Aldrich), 35 μL acetilacetona (Sigma-Aldrich), 35 μL triton x-100 (Sigma-Aldrich) y 0,11 g PEG 20000 (Sigma-Aldrich) disuelto en 2 mL agua destilada y se llevó a agitación suave por 72 horas evitando la formación de burbujas. Luego del tratamiento con TiCl_4 , los vidrios fueron recubiertos con 100 μL de pasta de TiO_2 y sometidos a un ciclo de 1000 rpm por 10 segundos, 2000 rpm por 10 segundos, 3000 rpm por 30 segundos, 2000

rpm por 10 segundos y 1000 rpm por 10 segundos, en un spin-coater (Laurell Technologies, North Wales, USA).

4.2 Sensibilización de fotoelectrodo

El proceso de sensibilización se refiere a la tinción o adsorción, del colorante o sensibilizador sobre un material semiconductor. La primera variable de sensibilización estudiada fue el tampón de disolución de las PBP. Se evaluó la sensibilización en vidrio recubierto con película de TiO_2 según el procedimiento descrito entre desde el punto 4.1.1 hasta 4.1.3, reemplazando el vidrio recubierto con FTO por vidrio normal, simulando la superficie de un fotoelectrodo. Se comparó la adsorción del extracto proteico sobre los vidrios con la película de TiO_2 , en tampón fosfato ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{H}_2\text{KPO}_4$) y Tris-HCl a concentraciones de 5 mM y 20 mM, ambos a pH 7.0. Los vidrios recubiertos fueron sumergidos por 24 horas a 4°C , en una solución del extracto proteico descrito en el punto 1.1 a una concentración de proteínas totales de 5,5 mg/mL basados en la absorción a 280 nm (Desjardins, Hansen and Allen, 2009). Luego de la incubación se lavaron con el tampón correspondiente, secados al aire y se midió la absorbancia de la película de TiO_2 en un espectrofotómetro UV-Visible jasco V-760 (Jasco, Easton, Maryland, USA).

4.3 Funcionalización de fotoelectrodo

Una vez definido el buffer a utilizar, se evaluó la utilización de un mordiente, para aumentar la adsorción de las PBP sobre el fotoelectrodo. Se usó una solución de extracto proteico de una concentración estimada a 280 nm de 2 mg/mL de proteínas totales. Los mordientes evaluados fueron Poli-L-lisina (PLL) (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos), aminopropil trimetoxilano (APTMS) (Sigma-Aldrich), aminopropil trimetoxilano más glutaraldehido (APTMS + GA) y glutaraldehido (Sigma-Aldrich) (GA).

4.3.1 Funcionalización con Poli-L-lisina

Los vidrios recubiertos con TiO_2 fueron sumergidos en una solución de 0,01 % (p/v) de Poli-L-lisina (Sigma-aldrich), por 16 horas a 37 °C, luego de este periodo fueron lavados con buffer Tris-HCl 20 mM pH 7.0 y secados al aire.

4.3.2 Funcionalización con Aminopropil trimetoxilano (APTMS)

Los vidrios recubiertos con TiO_2 fueron sumergidos en una solución de APTMS al 1% en tolueno, llevados por 16 horas a 70 °C en una estufa de secado (Memmert, Schwabach, Alemania), lavados con etanol, seguido de agua y curado a 70 °C por 30 minutos.

4.3.3 Funcionalización con Aminopropil trimetoxilano (APTMS) y Glutaraldehido (GA)

Luego de recubrir los vidrios con APTMS, estos fueron sumergidos en una solución de Glutaraldehido 2,5 % (p/v) por 1 hora a temperatura ambiente, fueron lavados con agua y secados al aire.

4.3.4 Funcionalización con Glutaraldehido

Los vidrios fueron recubiertos con una solución al 2,5 % (p/v) de glutaraldehido por 1 hora a temperatura ambiente y lavados con agua.



4.4 Espectroscopia de absorción infrarroja

La espectroscopia de absorción infrarroja con reflectancia atenuada (FTIR-ATR), funciona mediante la medición de los cambios que se producen en un haz de infrarrojo reflejado cuando entra en contacto con una muestra. El haz de infrarrojo se dirige a un cristal denso ópticamente con un alto índice de refracción en determinado ángulo. Esta reflectancia interna crea una onda evanescente que se extiende más allá de la superficie del cristal llegando a la muestra que está en contacto con el cristal. La muestra absorbe energía en

determinadas regiones del espectro de infrarrojo y la onda evanescente se atenúa. El detector registra el haz de infrarrojos atenuado.

Mediante Espectroscopia de absorción infrarroja con reflectancia atenuada (FTIR-ATR), se evaluó la funcionalización de la película de TiO_2 con APTMS en solventes como DMSO (Lu, Pelton and Brook, 2007; Ye *et al.*, 2009), etanol (Hu *et al.*, 2008; Son *et al.*, 2011) o una mezcla de estos en relación 1:1. La funcionalización fue realizada en triplicado, tomando lecturas en al menos 3 lugares diferentes en cada réplica, con 25 barridos y una resolución de 8 cm^{-1} . Las mediciones de absorción infrarroja fueron realizadas en un equipo FTIR Nicolet™ iS™10 (Thermo Scientific) cordialmente facilitado por el Profesor Dr. Jorge Yañez Solorosa en el laboratorio de Trazas Elementales y Especiación (LabTres), de la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Concepción.

Objetivo 5. Ensamblar y caracterizar las celdas solares sensibilizadas con Ficobiliproteínas.

5.1 Preparación de contraelectrodo o cátodo

Se esparció una solución de 4 mM de ácido cloroplatínico en isopropanol, sobre vidrios FTO previamente lavados. Se Evaporaron a temperatura ambiente y fueron llevados a horno tubular a 400 °C por 20 minutos.



5.2 Preparación del electrolito

El electrolito usado consistió en una mezcla de 0.5 M ioduro de litio (Sigma-aldrich), 0.05 M iodo (Sigma-Aldrich), 0.47 M de 4-tert-butilpiridina en 3-metoxipropilnitrilo.

5.3 Sensibilización de las celdas solares

La sensibilización de las celdas solares con las PBP obtenidas, se realizó mediante la inmersión de los fotoelectrodos en una solución de 7 mL de solución proteica con una densidad óptica cercana a 1 medida a 565 nm, 620, y 650 nm para PE, PC y APC respectivamente, y cuyas concentraciones

estimadas según las ecuaciones 4, 5 y 6 se encontraban entre 100 y 160 μg de ficobiliproteína/mL de solución. La sensibilización se llevo a cabo por un periodo de 24 horas a 4°C en oscuridad, luego de esto los fotoelectrodos fueron lavados con tampón tris-HCl 20 mM pH 7.0 y secados.

5.1.5 Ensamblaje de la celda solar

Entre el fotoelectrodo y el contra electrodo de Platino se inyectan 70 μL de electrolito, la celda es sellada con pinzas y finalmente caracterizada.

5.2 Caracterización de celdas solares sensibilizadas con Ficobiliproteinas

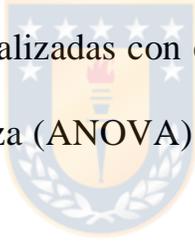
Los parámetros fotovoltaicos fueron determinados en un simulador solar (PET, USA) y un sistema de prueba de corriente-voltaje (I-V). Para obtener las curvas de intensidad de corriente (J) versus voltaje (V), se realizó un barrido desde -1 a 1 volt midiendo la corriente generada por las celdas solares, cuando son expuestas a una condición de luz solar de 1.5 AM, utilizando un simulador solar equipado con una lámpara de Xenón de 300W que produce una potencia uniforme de $760 \text{ W}/\text{cm}^2$ sobre un área de $5 \times 5 \text{ cm}^2$.

Los parámetros eléctricos de las celdas como densidad de corriente en circuito cerrado (J_{sc}), voltaje en circuito abierto (V_{oc}), factor de forma o fill factor

(FF) y eficiencia de conversión (η) definen el rendimiento de la celda solar, y son las características que se calculan a partir de la curva de J-V obtenida para cada una de las celdas construidas. Las mediciones se realizaron con 3 celdas semejantes de la misma serie de preparación y 5 mediciones de cada celda.

5.2.1 Análisis estadístico

Las mediciones de eficiencias obtenidas para las celdas solares sensibilizadas con Ficobiliproteínas, fueron analizadas con el software Statistica 9 mediante un análisis de análisis de varianza (ANOVA) usando el test de tukey, un nivel de significancia $p < 0,05$.



Objetivo 6. Optimización de las celdas solares sensibilizadas con Ficobiliproteínas.

En una primera etapa de optimización se consideró la medición de los parámetros eléctricos de las celdas solares funcionalizadas con APTMS, comparando con los resultados obtenidos de las celdas sin funcionalizar. Como una segunda etapa en la optimización y por motivos de disponibilidad de las Ficobiliproteínas se evaluó la caracterización de las celdas solares sensibilizadas con Ficocianina estabilizada térmicamente y Ficocianina sin estabilizar. Las condiciones de sensibilización empleadas fueron las señaladas en el punto 5.1.4, con un número de 6 réplicas con 5 mediciones para cada una.



V. RESULTADOS

1. Purificación Ficobiliproteínas desde *Gracilaria chilensis*.

1.1 Extracción de Ficobiliproteínas

Las Ficobiliproteínas (PBP) de *Gracilaria chilensis* obtenidas mediante extracción acuosa en tampon fosfato K_2HPO_4/H_2KPO_4 20 mM pH 8,0 y precipitación en sulfato de amonio, fueron analizadas por SDS-PAGE.

La figura 5.1 A, se muestra un gel SDS-PAGE teñido con azul de coomassie y en la figura 5.1 B, este mismo gel rociado con $ZnSO_4$ e iluminado con luz UV, lo que permite apreciar la subunidades cromoforiladas de las PBP, al emitir fluorescencia. En el carril 1 de la figura 5.1 A, se observan las bandas correspondientes a las subunidades proteicas que componen el extracto acuoso de *G. chilensis*, destacando en la figura 5.1 B, carril 1, aquellas subunidades características de las Ficobiliproteínas, que emiten fluorescencia luego de ser expuestas a luz UV. Luego de la precipitación con un 25 % de saturación de sulfato de amonio, el sobrenadante obtenido sembrado en el carril 2, muestra un patrón de bandas similar al observado en el carril 1 (figura 5.1 A) y

conserva la emisión de fluorescencia de las subunidades de Ficobiliproteínas (figura 5.1 B). Mientras que en el pellet obtenido luego de precipitar con un 25 % de saturación de sulfato de amonio (carril 3), la fluorescencia observada es menor, indicando que la precipitación de proteínas con un 25 % de sulfato de amonio, elimina parte de los restos celulares y contaminantes proteicos presentes en el extracto, conservando en el sobrenadante la mayor parte de las PBP. Este sobrenadante fue nuevamente precipitado con 60 % de saturación de sulfato de amonio, logrando que la totalidad de las proteínas y PBP presentes en el extracto acuoso fueran precipitadas y conservadas en el pellet (carril 4), ya que el sobrenadante obtenido (carril 5) no mostró presencia de bandas polipeptídicas. En el carril 6 se muestra el patrón polipeptídico del extracto proteico (carril 4) luego de ser dializado en buffer fosfato 5 mM pH 7.0.

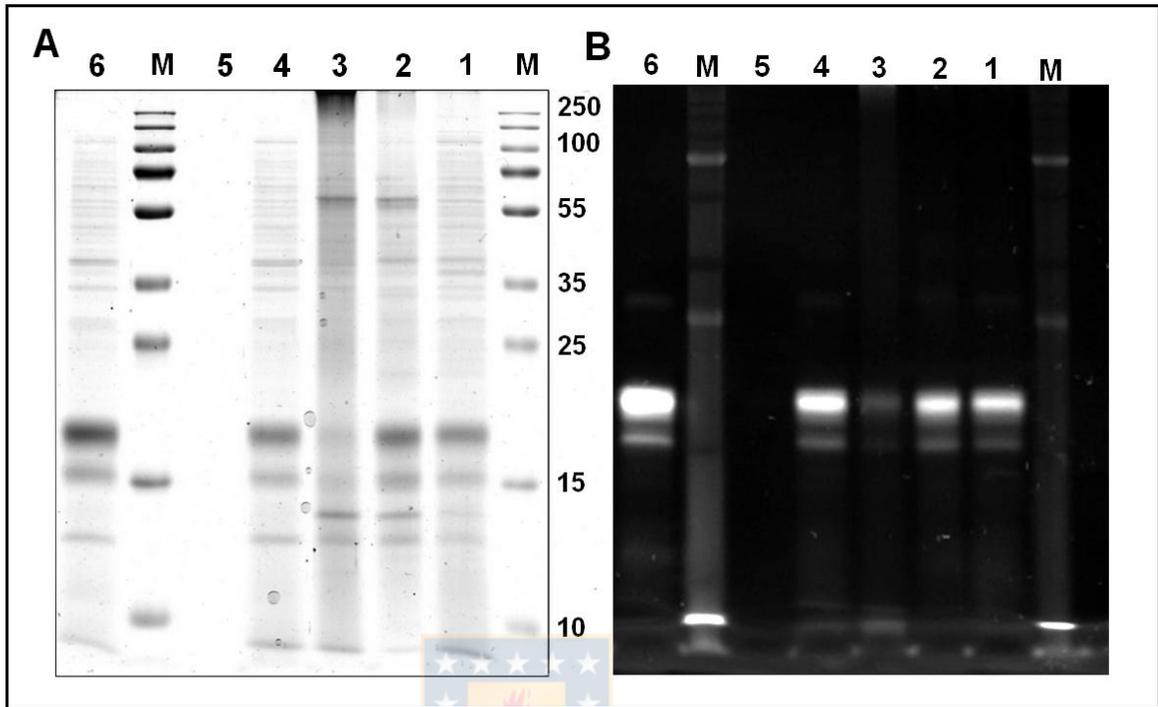


Figura 5.1 Análisis electroforético en condiciones denaturantes (SDS-PAGE) del proceso de extracción de Ficobiliproteínas de *Gracilaria chilensis*. A, gel de poliacrilamida al 12 % cargado con 15 μ g de proteínas totales, teñido con azul de coomasie; B, gel de poliacrilamida al 12 % expuesto a luz uv luego de ser rociado con sulfato de zinc al 37 %; M, marcador de peso molecular (KDa). En el **carril 1** Extracto acuoso en 20 mM buffer fosfato K_2HPO_4/H_2KPO_4 , **carril 2** Sobrenadante 25 % saturación con $(NH_4)_2SO_4$, **carril 3** Pellet 25 % saturación con $(NH_4)_2SO_4$, **carril 4** Pellet 60% saturación con $(NH_4)_2SO_4$, **carril 5** Sobrenadante 60% saturación con $(NH_4)_2SO_4$, **carril 6** Pellet 60 % saturación con $(NH_4)_2SO_4$ dializado.

En la figura 5.2 A y B se muestra respectivamente, el espectro de absorción UV-Visible del extracto acuoso de *G. chilensis* y el espectro de absorción UV-Visible del extracto proteico (EP), obtenido luego del proceso de precipitación del extracto acuoso con sulfato de amonio. Se observa que el proceso de precipitación con sulfato de amonio, permite la obtención de un extracto proteico enriquecido en Ficobiliproteínas, ya que los máximos de absorción característicos de Ficoeritrina (PE) (497, 540, 565 nm), Ficocianina (PC) 620 nm y Aloficocianina (APC) 650 nm, son más intensos y definidos que en el extracto acuoso inicial (figura 5.2 A). El procedimiento de extracción utilizado que consideró la extracción acuosa de las PBP y su posterior precipitación con un 25 % de saturación con sulfato de amonio seguido de un 60 % de saturación, permitió su extracción desde el alga conservando sus características espectroscópicas.

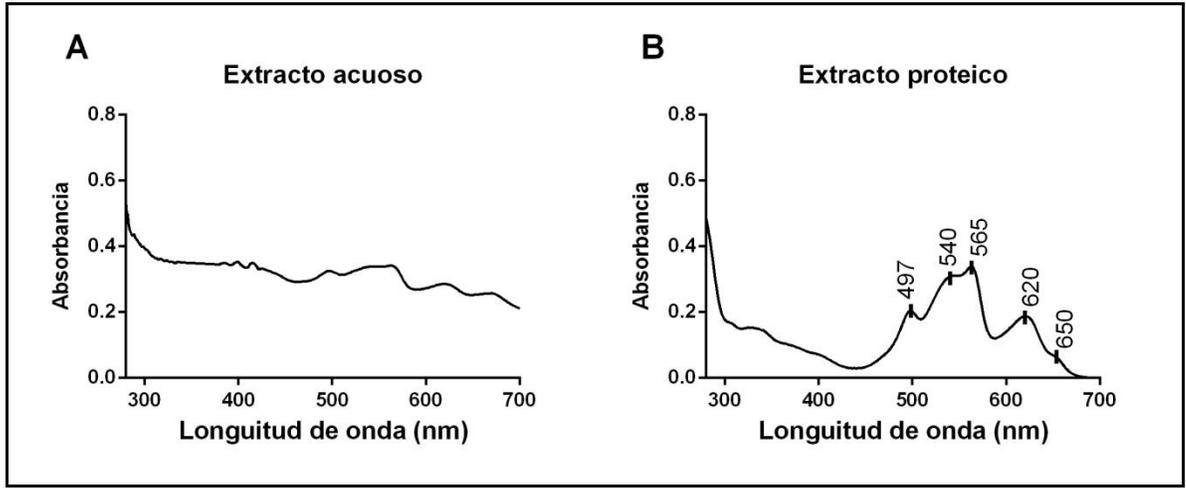


Figura 5.2 Espectros de Absorción UV-Visible de 0,5 mg/mL de proteínas totales de (A) extracto acuoso de *G. chilensis* y (B) Extracto Proteico de Ficobiliproteínas (EP) obtenido mediante precipitación con 60 % saturación de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.



1.2 Purificación de Ficobiliproteínas

Luego de la obtención de un EP enriquecido en PBP, se realizó su purificación mediante cromatografía líquida en columna de intercambio aniónico e hidroxapatita.

La primera Ficobiliproteína purificada desde el EP, mediante cromatografía de intercambio aniónico fue Ficocianina. En la figura 5.3, se muestra el cromatograma de absorción a 280 nm de la cromatografía de intercambio aniónico, destacando 3 máximos cromatográficos obtenidos luego de aumentar escalonadamente la concentración de KCl. El primer máximo corresponde al eluido con 50 mM de KCl colectado como fracción 5, el segundo máximo cromatográfico corresponde a la fracción 16 eluída con 100 mM de KCl, mientras que la fracción 21 es obtenida producto del lavado de la columna con esta misma concentración de buffer. El tercer máximo cromatográfico corresponde la fracción 41 eluída con 1 M de KCl.

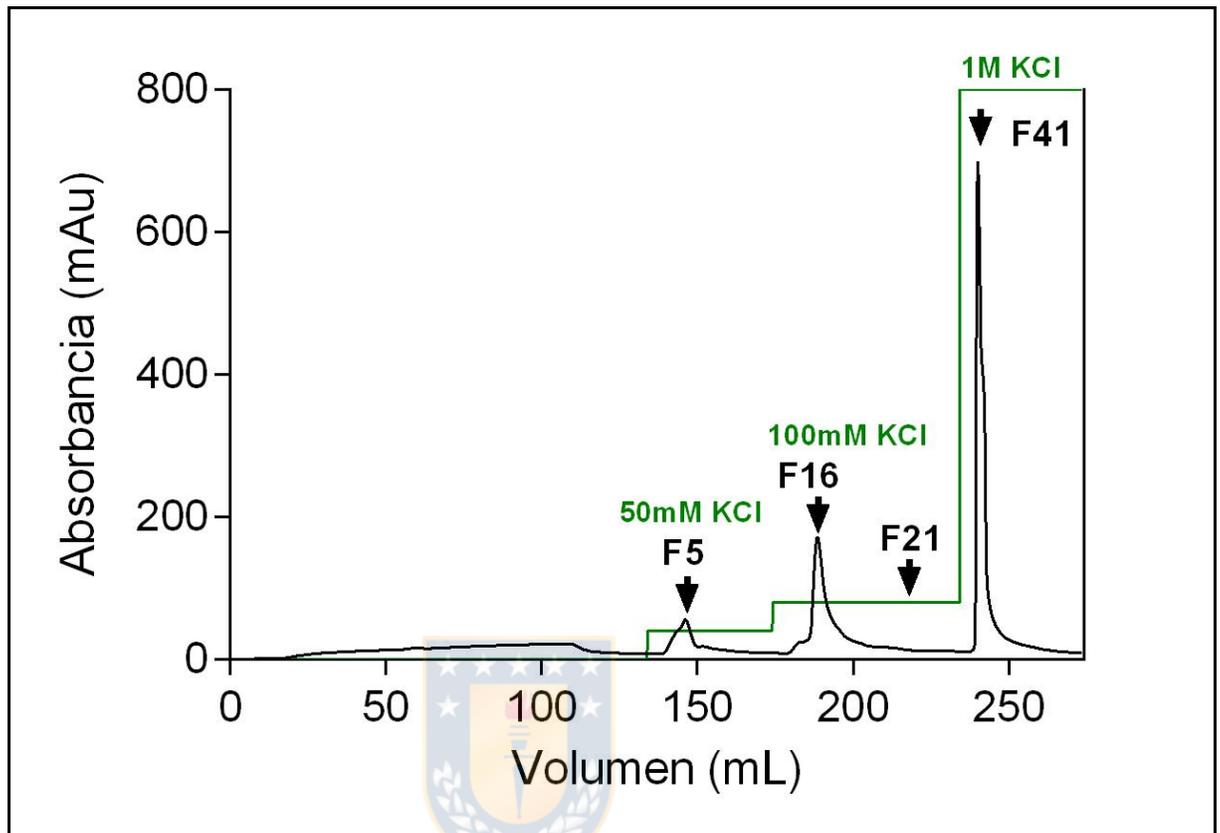


Figura 5.3 Cromatograma de purificación de Ficocianina mediante cromatografía de intercambio aniónico. En negro se muestra la absorción a 280 nm y la línea verde representa el gradiente de buffer de elusión (K_2HPO_4/H_2KPO_4 5 mM con 1M KCl pH 7.1), indicando la concentración de KCl empleada.

La figura 5.4 A muestra el espectro de absorción en el rango UV-visible de la muestra entrada, que corresponde al EP. El espectro de absorción de la primera fracción eluída, presentado como F5 en la figura 6, presenta

componentes proteicos caracterizados por su máximo de absorción a 280 nm, Por lo cual el espectro de absorción UV-Visible en esta fracción se compone de proteínas contaminantes y podría contener fragmentos de Ficobiliproteínas y cromóforos libres.

La fracción 16 (F16) eluída con 100mM de KCl corresponde a la primera ficobiliproteína purificada, Ficocianina. La cual presentó los máximos de absorción característicos a 550 nm y 620 nm, y un índice de pureza $A_{620\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ de 3 (figura 5.4 A, fracción 16).

Ficoeritrina y Aloficocianina son retenidas en la columna hasta eluir con 1 M de KCl, colectando ambas en la fracción 41, el espectro de absorción de esta fracción (figura 5.4 A) muestra los máximos de absorción característicos de Ficoeritrina a 497, 540 y 565 nm y Aloficocianina a 650 nm.

En el gel SDS-PAGE teñido con azul de comassie la primera fracción eluída, presentado como F5 en la figura 5.4 B, no presenta las subunidades polipeptídicas fluorescentes características de las Ficobiliproteínas, cuando es visto bajo luz UV (figura 5.4 C). En el gel de poliacrilamida (figura 5.4 C) se observa una intensa emisión de fluorescencia correspondiente a las

subunidades cromoforiladas que componen estas Ficobiliproteínas. Se observan 2 bandas mayoritarias correspondientes a las subunidades α y β de ficocianina, las cuales poseen cromóforos en sus estructuras y emiten fluorescencia luego de ser excitadas con luz UV. Luego de lavar con la misma concentración salina, eluye la fracción 21 (F21), la cual corresponde a PC con bajo índice de pureza ($A_{620\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1$).



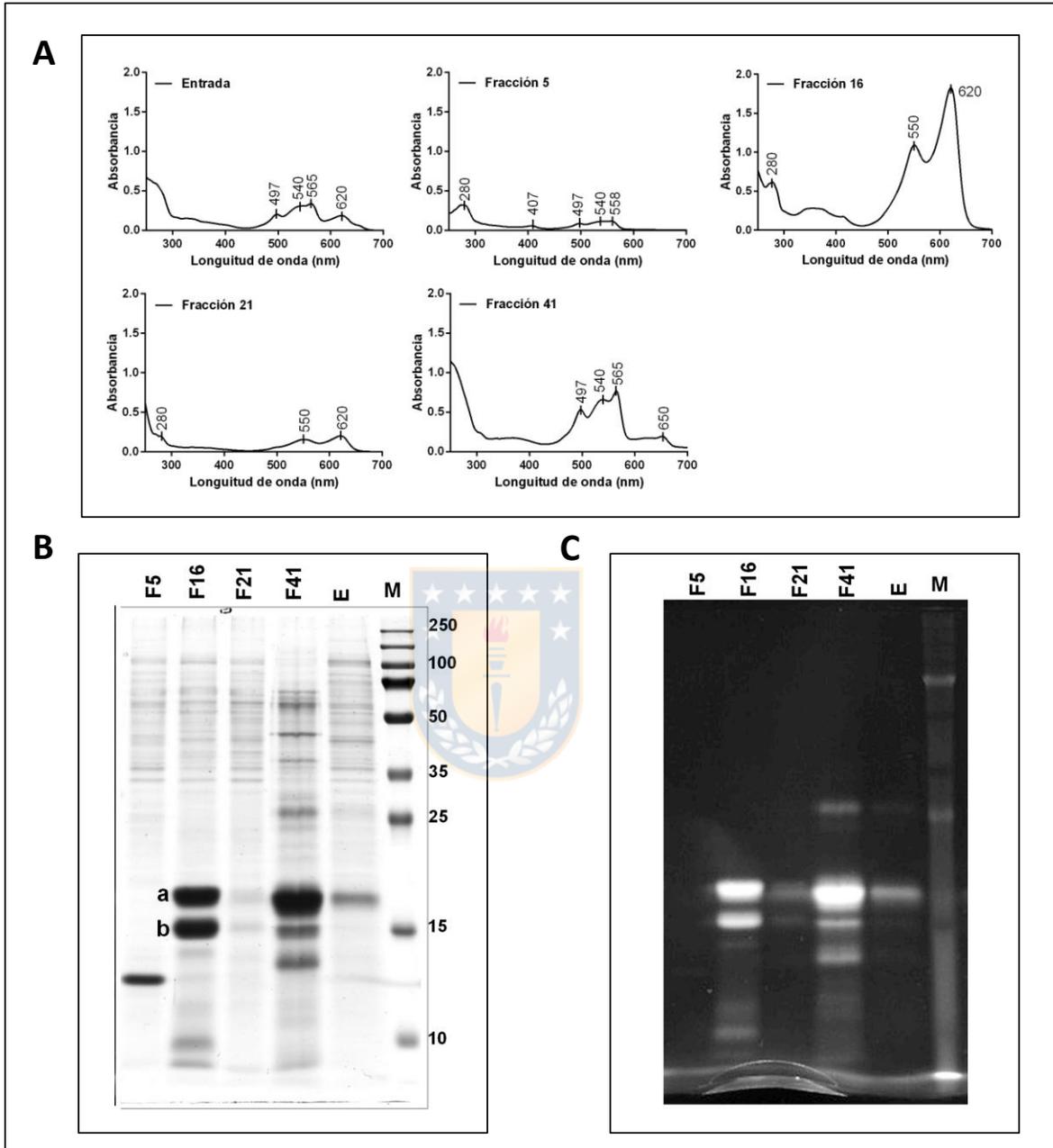


Figura 5.4 A, Espectros de absorción UV-Visible de fracciones colectadas en cromatografía de intercambio aniónico. B, Análisis electroforético en condiciones denurantes (SDS-PAGE) de fracciones colectadas en cromatografía de intercambio

iónico, gel de poliacrilamida al 15 % teñido con azul de coomasie. C, SDS-PAGE poliacrilamida al 15 % expuesto a luz UV luego de ser rociado con sulfato de zinc al 37%; M, marcador de peso molecular (KDa). Fracción eluída en cromatografía de intercambio iónico (F), F16 corresponde fracción enriquecida en Ficocianina (a y b son las subunidades α y β de Ficocianina, respectivamente), F41 elusión enriquecida en ficoeritrina y aloficocianina, E corresponde a la muestra de entrada. Gel cargado con 15 μg de proteína.

El segundo paso de purificación para la separación de Ficoeritrina y Aloficocianina fue mediante cromatografía por afinidad en columna de hidroxiapatita (HP), el cual fue repetido 4 veces para lograr una óptima purificación de APC. Ya que el comportamiento cromatográfico en la columna de hidroxiapatita fue similar en todas las corridas, en la figura 5.5, se muestra un cromatograma representativo de las cromatografías realizadas.

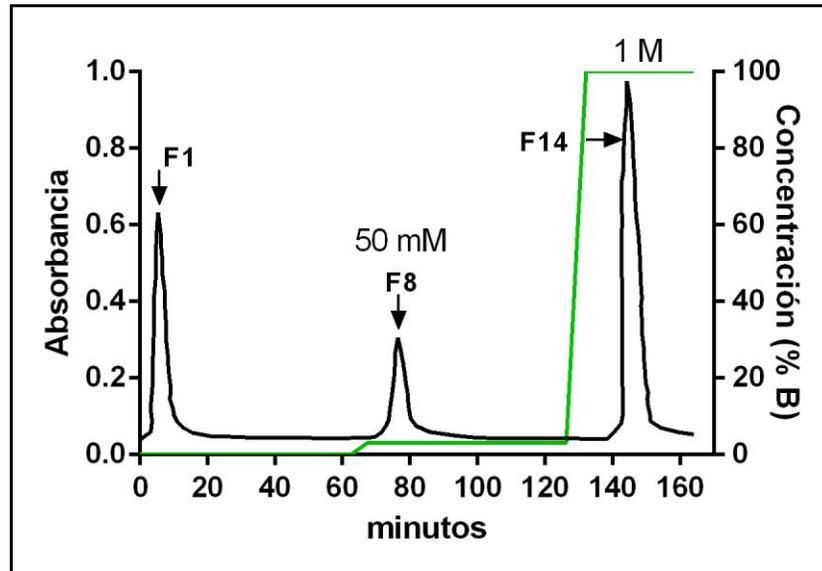


Figura 5.5 Cromatograma obtenido con columna de hidroxapatita para purificación de Ficoeritrina y Aloficocianina. La línea negra corresponde a la absorbancia 280 nm y la línea verde al porcentaje del buffer de elución usado (1 M buffer K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 7,1).

El espectro de absorción de la muestra de entrada en la columna de HP (Figura 5.6 A, E_HP1), presenta una mayor absorción en longitudes de onda correspondientes a PE y una proporción mucho menor de APC. Luego de cargar la muestra de entrada, PE no es retenida por la columna y eluye como el pico cromatográfico registrado como fracción 1 (F1) (figura 5.6). Su espectro de absorción UV-Visible (Figura 5.6 B, F1_HP1) presenta los

máximos de absorción a 497, 540, 565 nm característicos de PE y un índice de pureza de $A_{565 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ superior a 4. Luego de que PE saliera, se aumento la concentración salina a 50 mM de buffer fosfato eluyendo la fracción 8 (figura 5.5, F8), enriquecida en APC, presentando el máximo de absorción característico de ésta PBP a 650 nm (Figura 5.6 B, F8_HP1). La elusión con 1 M de buffer fosfato colectada como fracción F14 (figura 5.5) se compone mayormente de proteínas contaminantes al mostrando una alta absorción a 280 nm y baja absorción en las longitudes de onda características de las Ficobiliproteínas mencionadas anteriormente (Figura 5.6 B, F14_HP1). Con la cuarta corrida columna de hidroxiapatita, se observa un enriquecimiento de APC en la muestra entrada (Figura 5.6 A, E_HP4), producto de los repetidos procesos de purificación. La fracción eluída con 50 mM de buffer fosfato (figura 5.6 C, F10_HP4), corresponde a APC obtenida con un índice de pureza $A_{650 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ superior a 4.

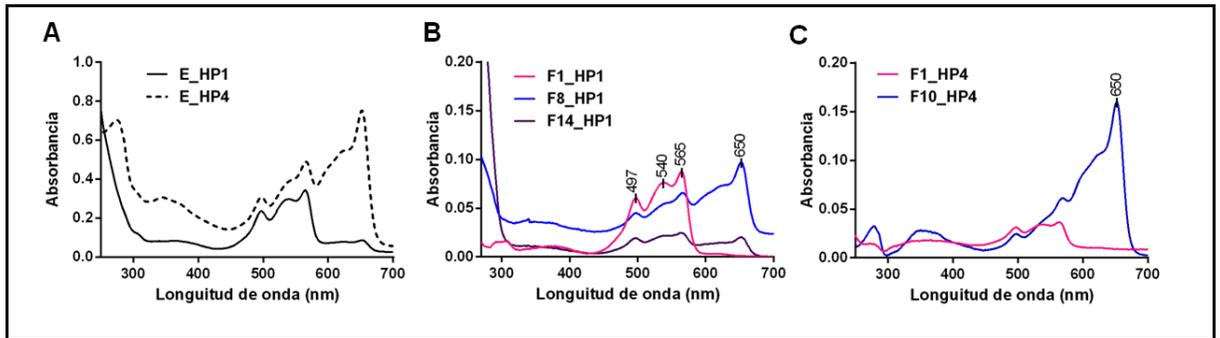


Figura 5.6 Espectro de absorción UV-Visible de (A) muestras de entrada a columna de hidroxiapatita en la primera (E_HP1) y cuarta (E_HP4) corrida, (B) fracciones eluidas en la primera corrida cromatográfica y (C) fracciones eluidas en la cuarta corrida cromatográfica en columna de hidroxiapatita.



Ya que la proyección para el desarrollo de celdas solares sensibilizadas con PBP es su futura fabricación industrial, se calculó el rendimiento de extracción del proceso de purificación empleado en este trabajo.

El contenido de PBP en el EA de *G. chilensis* fue de 290 mg de PE/kg de alga, 260 mg de PC/kg y 130 mg de APC/kg de alga. El rendimiento del proceso de extracción y purificación calculado desde el extracto acuoso (EA) es resumido en la tabla 5.1, obteniendo un 61 % para Ficoeritrina, 58 % para Ficocianina y 3 % de extracción para Aloficocianina. El rendimiento del proceso de purificación cromatográfico fue de 85 % para Ficoeritrina,

69% para Ficocianina y 9 % de extracción para Aloficocianina. El rendimiento de extracción respecto al peso húmedo de alga fue 176 mg de Ficoeritrina/Kg de alga, 154 mg de Ficocianina/ Kg de alga y 4 mg de Aloficocianina/Kg de alga.

Tabla 5.1 Rendimiento de purificación de Ficobiliproteínas obtenidas desde el extracto acuoso (EA) y extracto proteico (EP) de *G. chilensis*, indicando el índice de pureza entre paréntesis.

Ficobiliproteína	EA [mg]	EP [mg] ($A_{\lambda_{máx}}/A_{\lambda_{280}}$)	Cantidad obtenida [mg]	Rendimiento respecto EA	Rendimiento (mg /Kg de alga húmeda)
PE	84,4	60,7 (0,4)	51,9 (8,7)	61%	176
PC	78,1	65,5 (0,2)	45,3 (5,3)	58 %	154
APC	38,9	13,0 (0,1)	1,2 (5,1)	3 %	4

2. Caracterización las Ficobiliproteínas purificadas.

Las ficobiliproteínas purificadas fueron caracterizadas mediante técnicas espectroscópicas y electroforesis en gel de poliacrilamida. En la Figura 5.7, se observan los espectros de absorción UV-Visible de las Ficobiliproteínas purificadas, señalando sus máximos de absorción, y sus espectros de emisión de fluorescencia, luego de ser excitadas con la máxima longitud de onda de absorción de cada una. PE se caracteriza por presentar una elevada intensidad de fluorescencia a los 575 nm luego de ser excitada a su máximo de absorción (565 nm), al excitar con los máximos de absorción correspondientes a PC (620 nm) y APC (650 nm) no se observa emisión de fluorescencia, indicando que no existe contaminación con otras PBP. PC emite fluorescencia a los 645 nm luego de ser excitada a 620 nm, al ser excitada a 565 nm y 651 nm, no se aprecia emisión de fluorescencia descartando la presencia de PE o APC. Cuando APC es excitada en su máximo de absorción (651 nm) emite fluorescencia a 665 nm, al ser excitada a 565 nm se observa emisión de fluorescencia a 575 nm correspondiente a trazas de contaminación con PE.

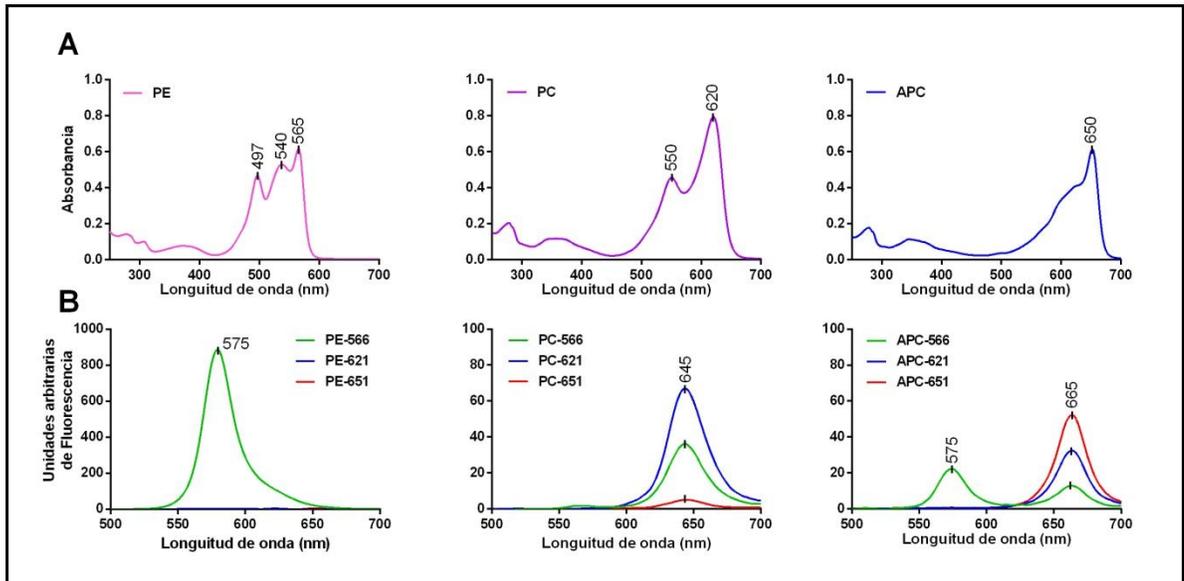


Figura 5.7 Caracterización espectroscópica de Ficobiliproteínas. **A**, Espectro UV–VIS de Aloficocianina (APC), Ficocianina (PC) and Ficoeritrina (PE) aislado desde *G. chilensis*. **B**, Espectro de emisión de fluorescencia de Aloficocianina (APC) 100 µg/mL, Ficocianina (PC) 141 µg/mL y Ficoeritrina (PE) 64 µg/mL, aisladas desde *G. chilensis*.

El color característico de cada una de las ficobiliproteínas se puede apreciar en el gel de poliacrilamida en condiciones nativas (figura 5.8 A), y en la figura 5.8 B, se muestra este mismo gel teñido con azul comassie.

En el gel SDS-PAGE de la fracción purificada de Ficocianina (figura 5.4 B, F16), resaltan 2 bandas polipeptídicas indicadas en letras minúsculas (a y b), correspondientes a la subunidades α y β Ficocianina, con un peso

molecular de 16 y 19 kDa respectivamente, estimados mediante la comparación de su movilidad electroforética (Rf), con la del marcador de peso molecular.

En la figura 5.8 C, se observan las bandas polipeptídica de PE y APC, y bajo luz UV las subunidades cromoforiladas que emiten fluorescencia (figura 5.8 D). En el patrón polipeptídico de PE las subunidades cromoforiladas α , β y γ , son claramente identificadas (c, d y e), ya que fluorescen bajo luz UV. Sus pesos moleculares son estimados en 17 kDa y 20 kDa (letras c y d) correspondientes a las subunidades α y β , respectivamente. Se observa otra banda polipeptídica de 34 kDa, la cual corresponde a la subunidad γ^{33} de PE. En el patrón de bandas de APC destacan las bandas g y f con tamaños estimados de 21 kDa y 19 kDa correspondientes a las subunidades β y α , respectivamente. En la figura 5.8 D, se observa emisión de fluorescencia, en un tamaño inferior a los 19 kDa, sin embargo esta no puede ser identificada en el gel teñido con azul de coomassie, la misma situación con mayor intensidad es observada para PE. Esta emisión de fluorescencia podría ser producto de pequeños fragmentos de proteína o cromóforos libres.

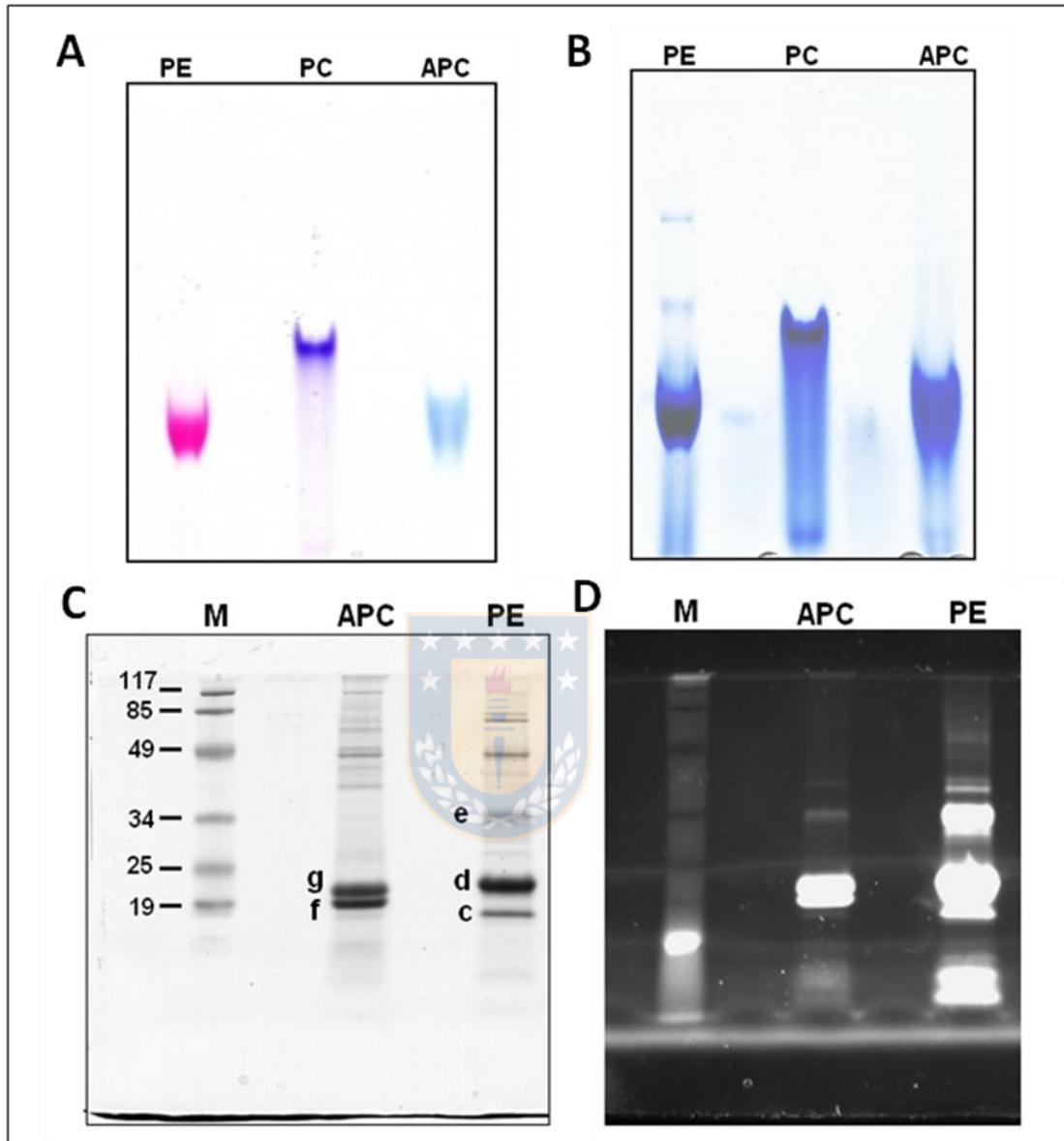


Figura 5.8 Caracterización polipeptídica de ficobiliproteínas. A, Gel PAGE (7.5%) nativo de ficobiliproteínas (50 µg de proteína cargada), B, Gel PAGE (7,5%) nativo teñido con azul de coomasie. C, Emisión de fluorescencia de gel SDS-PAGE (15%) con ZnSO₄ (15 µg de proteína cargada), D, gel SDS-PAGE (15%) teñido con azul de coomasie.

3. Obtención de Ficocianina estabilizada térmicamente.

La estabilización térmica de proteínas puede ser llevada a cabo por diferentes métodos físicos o químicos. Entre los métodos químicos es común el uso de agentes entrecruzantes, como formaldehído (FA) (HCHO), clasificado como un agente entrecruzante de longitud cero por su tamaño (2.3–2.7 Å), posibilitando el entrecruzamiento entre grupos amino libres cercanos entre sí.

Para llevar a cabo la estabilización térmica primero se estableció la temperatura de fusión (T_m) de PC sin estabilizar, como aquella en que el 50% de la proteína se encuentra desnaturalizada. En la figura 5.9 se muestra su curva de denaturación térmica seguida a 280 nm, longitud de onda de absorción de residuos aromáticos, a 360 nm cuyo aumento es relacionado con la agregación proteica (Primm, Walker and Gilbert, 1996; Famm and Winter, 2006), y a 550 nm y 620 nm máximas longitudes de absorción de Ficocianina. Bajo las condiciones de estudio la T_m calculada para Ficocianina fue de 55 ± 1 °C.

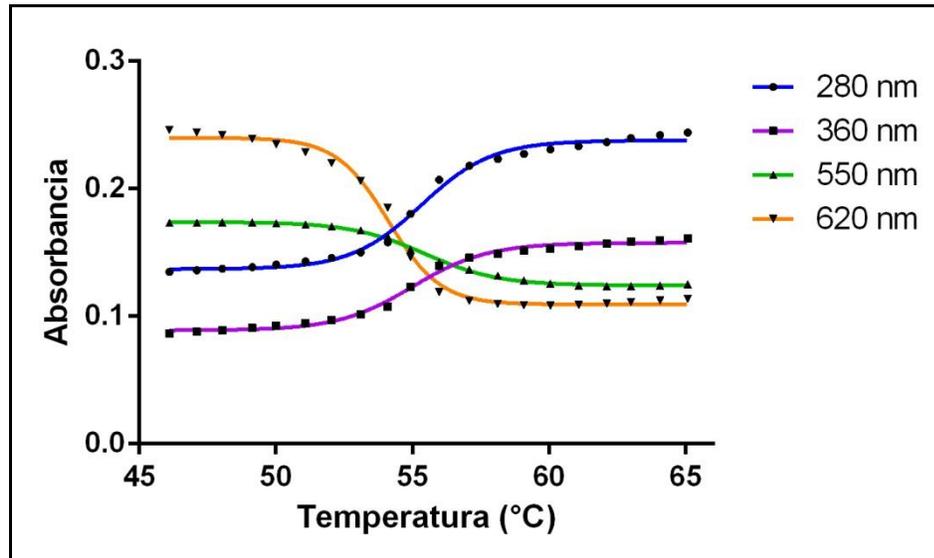


Figura 5.9 Curva de denaturación térmica de Ficocianina.

Al comparar los espectros de absorción de Ficocianina antes y después del tratamiento con FA (figura 5.10), se observan diferencias en su espectro de absorción, a pesar de que todas las muestras se encontraban a una concentración de PC de 100 $\mu\text{g/mL}$. La absorción a 620 nm disminuye en todas las muestras y aumenta notoriamente la absorción a 280 nm de la muestra control, probablemente producto de la manipulación durante el tratamiento de 24 horas. El índice de pureza ($A_{620\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) de Ficocianina pre-tratamiento fue de 3.3, mientras que post-tratamiento, la muestra control (0% FA) presentó un índice de pureza ($A_{620\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) de

0.9, probablemente debido de una denaturación parcial, luego de la agitación por 24 horas a temperatura ambiente, a la cual fueron sometidas las muestras para llevar a cabo el entrecruzamiento. El índice de pureza de las muestras tratadas con FA es mayor que el de la muestra control, con una relación $A_{620\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ de 3,3, 3,2 y 2,3 para 1, 0,5 y 0,1 % de FA respectivamente.

La muestra tratada con 1% de FA presentó la formación de precipitado y una disminución de la absorción a 620 nm (figura 5.10).

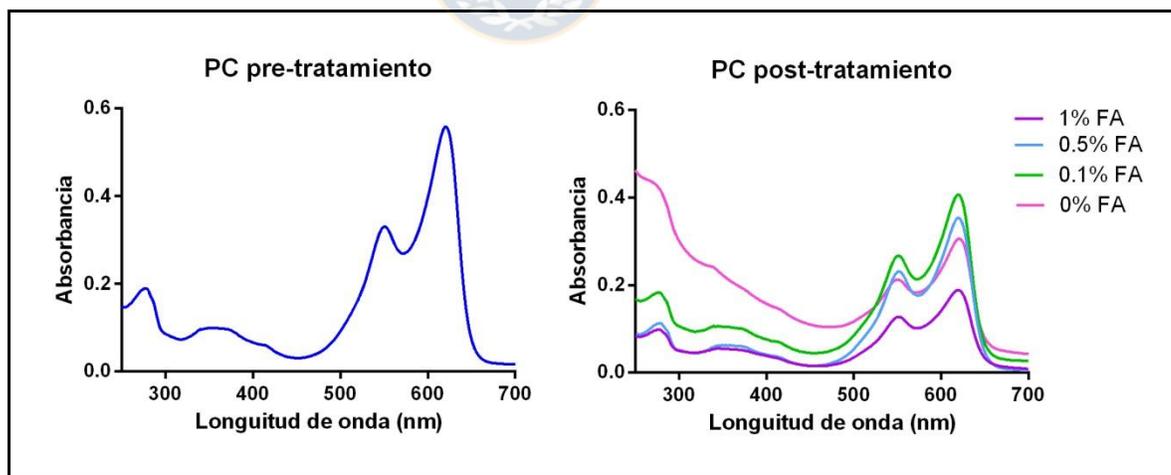


Figura 5.10 Espectros de absorción UV-visible de 100 µg/mL de Ficocianina antes y después del tratamiento con formaldehído.

Las curvas de denaturación para las muestras tratadas con formaldehído son presentadas en la figura 5.11. La muestra control sin tratamiento con FA (0 % FA) presenta una curva de denaturación similar a la determinada anteriormente (figura 5.9). Con un 0.1 % de FA la curva de denaturación obtenida muestra 2 transiciones, esta diferencia podría ser resultado de que en esta condición, una porción de Ficocianina no fuera estabilizada presentando una T_m similar a la muestra control y otra porción si es afectada por el tratamiento con FA elevando su T_m a 75 °C (tabla 5.2). Todas las T_m determinadas son estadísticamente diferentes a la T_m control, excepto la T_m de la primera transición obtenida con 0,1 % de FA. Las muestras tratadas con 0.5 y 1 % de FA muestran solo una transición, indicando PC logró ser estabilizada, elevando su T_m a 280 nm hasta 80 °C y 83 °C respectivamente, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambas.

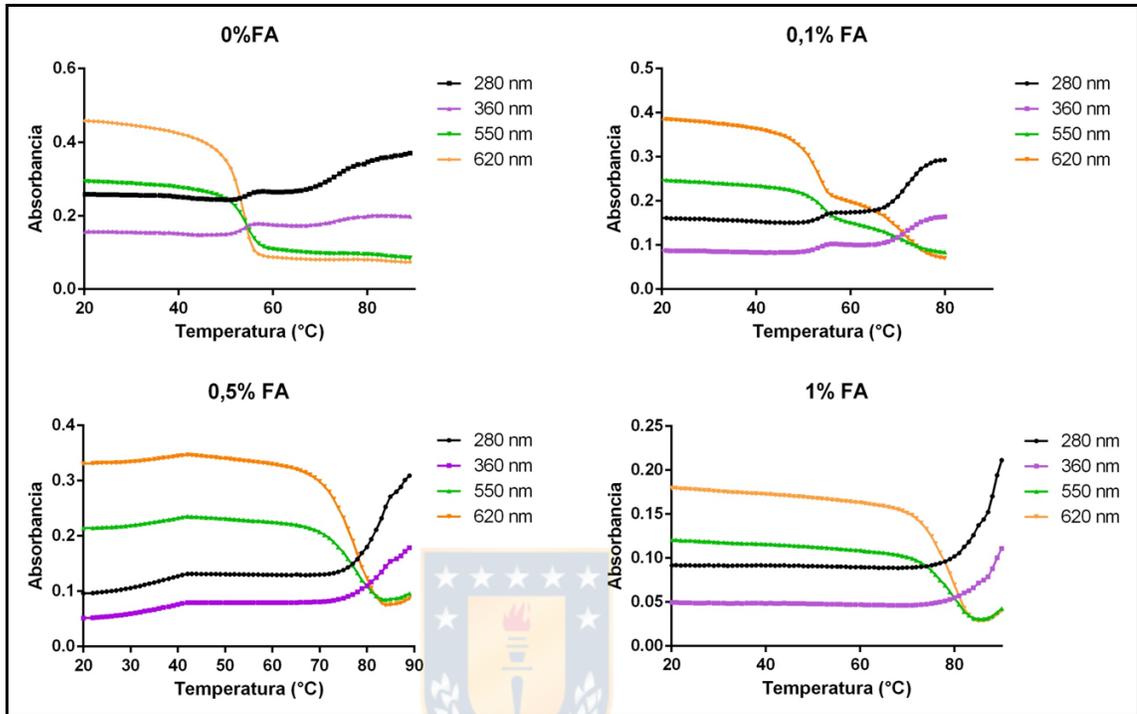


Figura 5.11 Curvas de denaturación para Ficocianina estabilizada con formadehído (FA).

Tabla 5.2 Tabla resumen de temperaturas de melting calculadas con una rampa de 1 °C/minuto, para Ficocianina estabilizada mediante entrecruzamiento con formaldehído (FA). El * indica las 2 transiciones presentadas por la condición de 0,1% (p/v) de FA y R denota el número de réplicas experimentales realizadas.

Condición	Tm°C (280 nm)	Tm°C (360 nm)	Tm°C (550 nm)	Tm°C (620 nm)
0% FA (5R)	55,8 ± 1,0	55,2 ± 2,1	54,2 ± 0,4	53,2 ± 0,6
0,1% FA* (5R)	55,4 ± 1,9	55,1 ± 2,4	55,0 ± 1,2	53,8 ± 1,3
0,1% FA* (5R)	72,2 ± 1,8	74,1 ± 2,4	76,3 ± 7,8	77,8 ± 8,0
0,5% FA (4R)	79,6 ± 0,5	80,1 ± 0,5	72,7 ± 6,5	77,8 ± 0,3
1% FA (5R)	83,0 ± 2,0	83,7 ± 1,7	76,9 ± 1,2	77,5 ± 0,6



En la figura 5.12 se muestra gráficamente la relación entre temperatura de melting determinada a 280 nm y 360 nm, y la concentración de FA, observando un aumento de ésta al aumentar la concentración de FA utilizado. Para las Tm determinadas a 550 nm y 620 nm, muestran una mayor dispersión y no se aprecia un aumento en función de la concentración de FA, alcanzando un máximo cercano a los 77 °C. Ficocianina fue estabilizada con concentraciones de 0,5 % y un 1 % (p/v) de FA, elevando la Tm respecto al control entre 25 °C y 28 °C respectivamente. Sin embargo en la condición de 1 % (p/v) de FA se

observó la formación de precipitado, por lo cual, la condición escogida para la estabilización térmica de Ficocianina fue la incubación por 24 horas con 0,5 % (p/v) de FA.

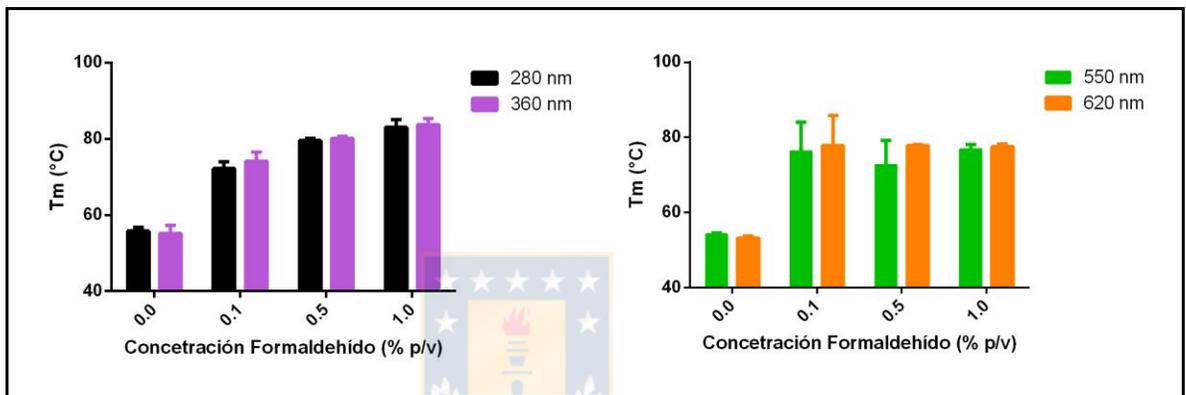


Figura 5.12 Gráfico de temperatura de fusión (Tm) calculadas y concentración de formaldehído usada en la estabilización.

Objetivo 4. Sensibilización de fotoelectrodos con Ficobiliproteínas.

4.1 Sensibilización del fotoelectrodo

La utilización de fotoelectrodos en celdas solares sensibilizadas con colorantes, requiere de la adsorción del sensibilizador, idealmente recubriendo toda la superficie expuesta de éste, por lo cual, la elección del tampón utilizado para la sensibilización con Ficobiliproteínas, fue el primer factor evaluado. Para esto se compararon los espectros de absorción en sólido, de la superficie de vidrios recubiertos con una película de TiO_2 , post-sensibilización con un extracto proteico (EP) de Ficobiliproteínas en tampón fosfato y Tris-HCl, ambos a pH 7.0. Los espectros de absorción en líquido para la solución de extracto proteico (EP) en 5 mM o 20 mM, de tampón fosfato o Tri-HCl pH 7.0 son similares entre sí (figura 5.13).

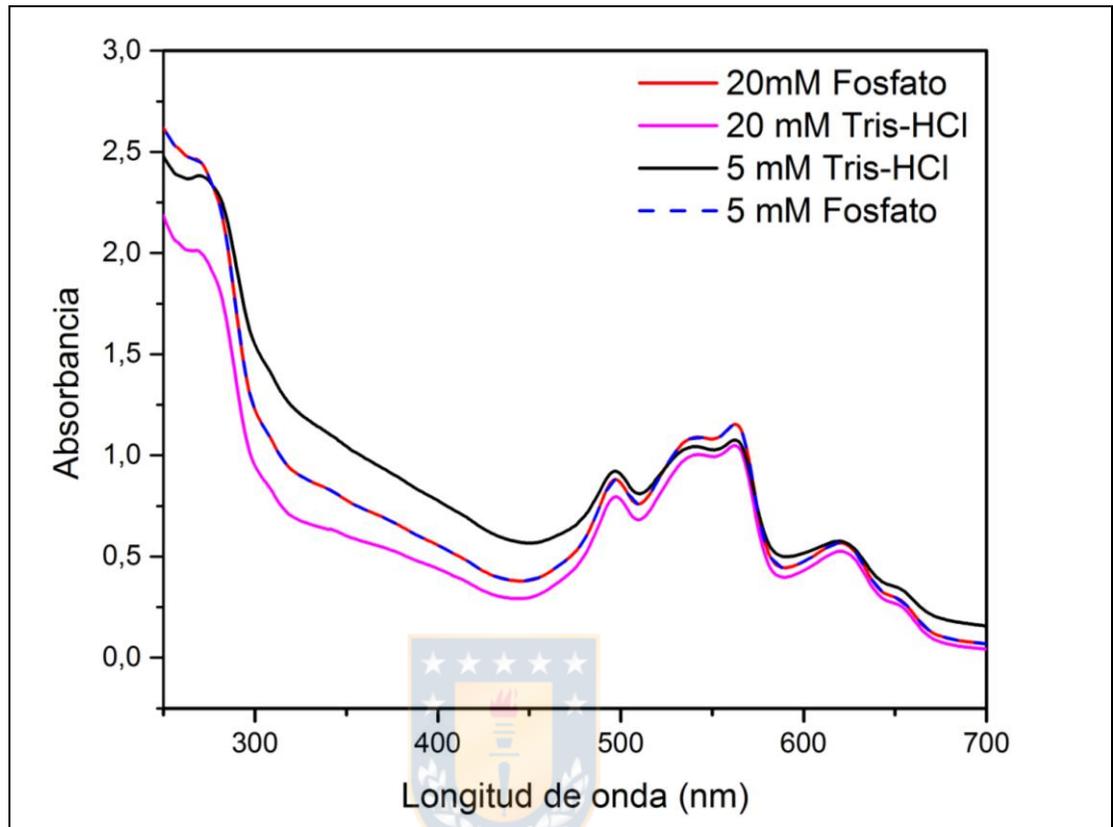


Figura 5.13 Espectro de absorción en líquido del extracto proteico en 5 mM o 20 mM de tampón fosfato o Tris-HCl pH 7,0. El experimento se realizó por triplicado mostrando un espectro de absorción representativo.

Sin embargo la adsorción en sólido del EP de Ficobiliproteínas sobre la película de TiO_2 es notoriamente afectado por el tampón utilizado (figura 5.14). La comparación de la sensibilización en tampón fosfato y Tris-HCl se muestra cualitativamente en la figura 5.14 A y C, mediante una

fotografía del experimento realizado con sus respectivas réplicas. Donde la solución proteica en tampón fosfato casi no es adsorbida sobre la película de TiO_2 .

La figura 5.14 B y D, muestran cuantitativamente esta diferencia, mediante el espectro de absorción en sólido de la película de TiO_2 sensibilizado con EP en ambos tampones. En la tabla 5.3, la comparación de la absorción en sólido de la película de TiO_2 , en longitudes de onda que abarcan el espectro de luz absorbido por las Ficobiliproteínas. La mayor absorbancia en sólido es obtenida cuando la superficie de TiO_2 es sensibilizado con PBP en una concentración de 20 mM en ambos tampones. Sin embargo a 565 nm que corresponde al máximo de absorción del EP (figura 5.2 B y 5.13) la película sensibilizada con Tris-HCl 20 mM pH7.0 muestra mayor absorción. Además, el espectro de absorción en sólido obtenido con éste tampón, es similar al espectro de absorción en líquido del extracto proteico, presentando sus máximos de absorción característicos de las PBP (figura 5.2 B y 5.13).

Ya que el tampón 20 mM de Tris-HCL pH 7.0, conserva las características espectroscópicas del extracto proteico y favorece su adsorción sobre la película de TiO_2 , es escogido como tampón para la sensibilización con PBP.

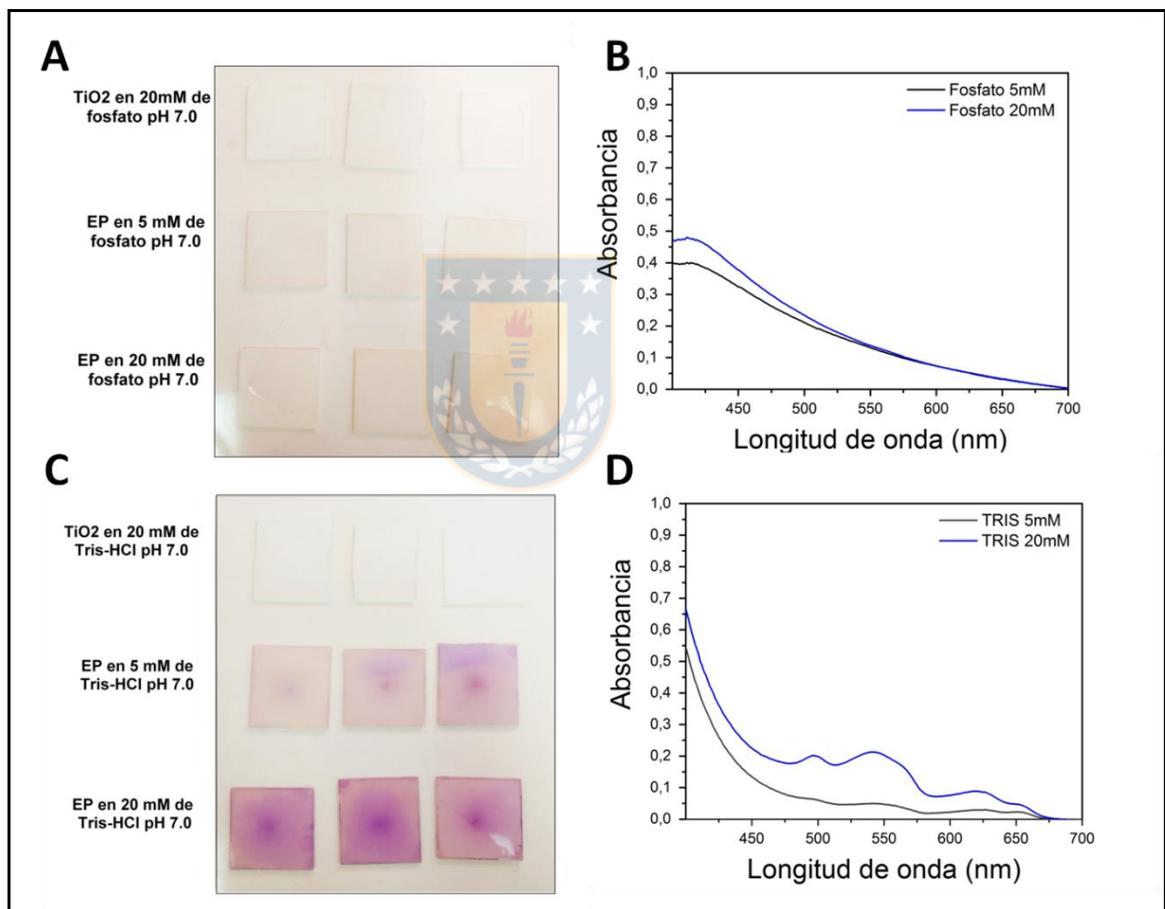


Figura 5.14 Sensibilización de vidrios recubiertos con TiO_2 , con 5.5 mg/mL de extracto proteico de ficobiliproteínas (EP) en diferentes tampones. **A**, fotografía de vidrios con película de TiO_2 , sensibilizados con EP en tampón fosfato ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{H}_2\text{KPO}_4$). **B**,

Espectro de absorción en sólido después de la sensibilización en tampón fosfato. **C**, fotografía de vidrios con película de TiO₂, sensibilizados con EP en tampón Tris-HCL. **D**, Espectro de absorción en sólido después de la sensibilización en tampón Tris-HCL. Para la determinación del espectro de absorción en sólido, la absorbancia en sólido del control (vidrio recubierto con TiO₂, sensibilizado en su respectivo tampón sin EP) fue restada a los vidrios sensibilizados. El experimento se realizó por triplicado y se muestra un espectro de absorción en sólido representativo de cada condición.

Tabla 5.3. Tabla comparativa de unidades arbitrarias de absorción en sólido de la película de TiO₂ sensibilizada con extracto proteico de Ficobiliproteínas en diferentes tampones a pH 7.0.



Absorción	5 mM Tris-HCl	20 mM Tris-	5mM Fosfato	20 mM
500 nm	0.13	0.20	0.21	0.23
565 nm	0.036	0.16	0.11	0.12
650 nm	0.023	0.048	0.032	0.033

4.2 Funcionalización del fotoelectrodo

La funcionalización de superficie consiste en la adición o recubrimiento con determinados grupos funcionales, para favorecer interacción entre dos materiales. La funcionalización puede ser alcanzada mediante enlaces covalentes, fuerzas electrostáticas, entre otras. En este estudio se evaluó la funcionalización de la superficie de una película de TiO_2 , para potenciar la adsorción de las ficobiliproteínas sobre los fotoelectrodos. Se evaluó la funcionalización con poli-L-lisina (PLL), con el objetivo de recubrir con grupos aminos la superficie del TiO_2 y cargar positivamente la superficie hidroxilada de las nanopartículas de TiO_2 (Wang et al., 2014). La funcionalización con aminopropiltrimetoxilano (APTMS) buscando recubrir la superficie con grupos amino mediante el enlace covalente entre grupos hidroxilos del TiO_2 y el grupo silano del APTMS (Meroni *et al.*, 2017). Se evaluó también la funcionalización de superficie con grupos APTMS más glutaraldehído (GA) y GA solo, buscando recubrir la superficie con grupos aldehídos para favorecer la interacción con grupos aminos de las Ficobiliproteínas y generar un enlace covalente vía base de schiff (C=N) (Saengdee *et al.*, 2015).

Luego de la sensibilización con el EP, cualitativamente se observa en la figura 5.15 A, una coloración de tono marrón en los vidrios tratados con APTMS + GA, la cual podría ser producto de la oxidación del GA. El espectro de absorción en sólido de APTMS + GA (figura 5.15 B) a diferencia de las otras funcionalizaciones evaluadas, presenta una mayor absorción entre los 400 nm y 600 nm, sin absorber el rango entre los 600 nm y 700 nm. Cuando la película de TiO₂ es tratada con PLL o APTMS, se observa mayor coloración en tonos morados, indicando que la adsorción de las ficobiliproteínas mejora en estas condiciones (figura 5.15 A). La absorción en sólido de la funcionalización con PLL o APTMS es superior a la absorción en sólido del experimento control sin funcionalización (extracto proteico en 20 mM de Tris-HCl pH 7.0, en vidrio con TiO₂ sin funcionalizar). La mayor absorción en sólido en el rango visible evaluado (400 nm – 700 nm) es presentada por la superficie funcionalizada con APTMS, por lo cual esta funcionalización, es empleada para aumentar la adsorción de las ficobiliproteínas sobre la película de TiO₂.

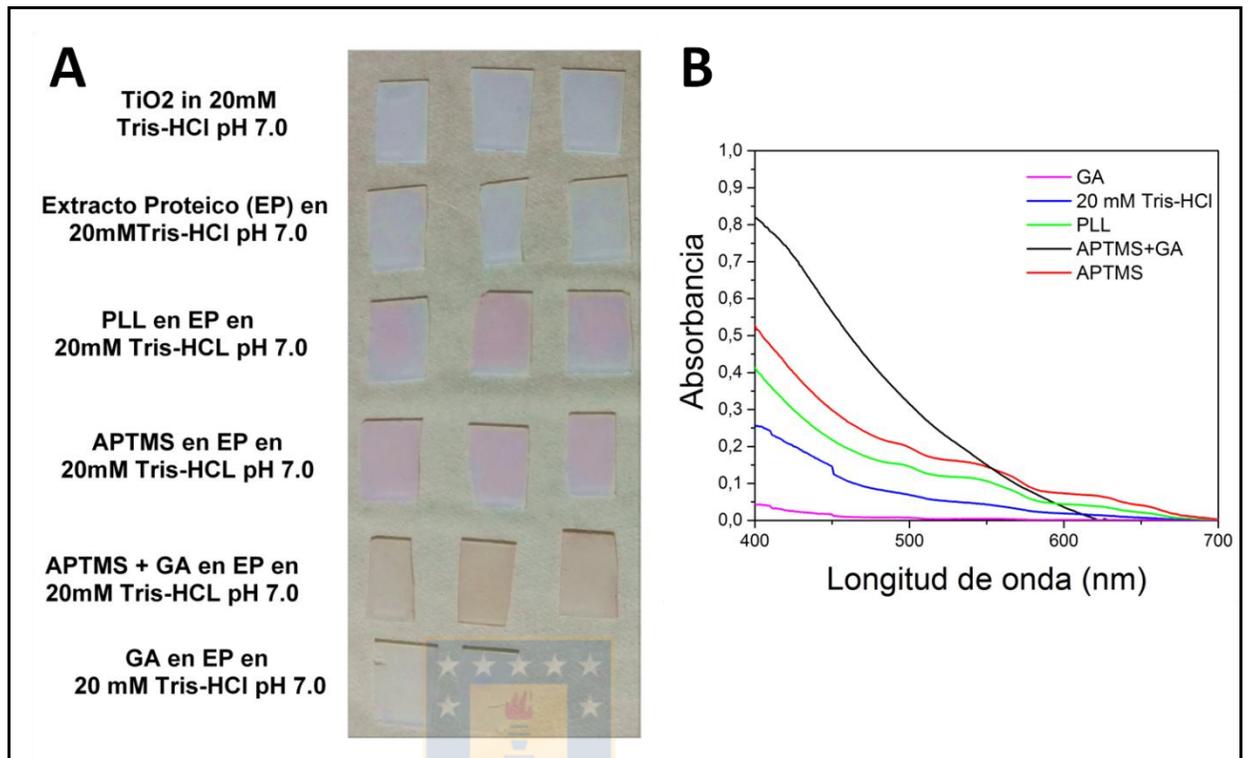


Figura 5.15 Sensibilización de vidrios recubiertos con TiO₂, con 2 mg/mL de extracto proteico (EP). **A**, fotografía de vidrios funcionalizados con 1mg/ml de poli-Lisina (PLL), 1% (3-Aminopropil)trimetoxisilano (APTMS) y 2,5% (p/v) de glutaraldehido (GA). **B**, Espectro de absorción en sólido resultante luego de la sustracción de blanco (película de TiO₂ en tampón 20 mM de Tris-HCl pH 7.0, sin EP).

Debido a que en el protocolo utilizado para la funcionalización de la película de TiO₂ con APTMS, se emplea un solvente tóxico como es el tolueno, se optimizó la funcionalización con APTMS empleando solventes

como dimetil sulfóxido y etanol. La evaluación de la funcionalización con APTMS usando diferentes solventes fue evaluada mediante espectroscopia de absorción infrarroja con reflectancia atenuada (FTIR-ATR).

En un espectro de absorción infrarrojo se presenta la transmitancia (o bien, absorción de luz infrarroja absorbida) versus el número de onda, destacando 2 áreas principales. Una zona entre 4000 cm^{-1} a 1500 cm^{-1} conocida como zona de diagnóstico, en la cual se puede distinguir la presencia de grupos funcionales y una zona de huella dactilar que comprende la región desde los 1500 cm^{-1} a 400 cm^{-1} , la cual es única para cada molécula y usualmente posee espectros de absorción más complicados, ya que aquí se presentan todas las formas de vibraciones de estiramiento y flexión dentro de la molécula.

En la región de diagnóstico del espectro FTIR de APTMS en solución (figura 5.16), se observa la absorción de enlaces N-H de grupos aminos a 3370 cm^{-1} y 3280 cm^{-1} que corresponden a los estiramientos asimétrico y simétrico respectivamente (Majoul, Aouida and Bessaïs, 2015; Watté *et al.*, 2016). La región espectral previa a 3000 cm^{-1} absorbida por los enlaces C-

H, muestra 2 señales a 2938 cm^{-1} y 2840 cm^{-1} atribuibles a los modos de estiramiento asimétricos y simétricos de cadenas de alcanos (CH_2) respectivamente (Williams and Fleming, 1995). Vibraciones de flexión de enlaces N-H de las aminas primarias son reconocidas por su absorción a 1597 cm^{-1} y 1462 cm^{-1} . En la región de la huella digital entre los $1500 - 500\text{ cm}^{-1}$ destaca la absorción 1080 cm^{-1} , característica de vibraciones de estiramiento de los grupos silanos como Si-O-Si (Williams and Fleming, 1995; Meroni *et al.*, 2017), así como también las señales a 1190 cm^{-1} (Si-O-R), y la banda de absorción a los 2359 y 860 cm^{-1} , asignadas a vibraciones de los enlaces Si-H (Williams and Fleming, 1995).

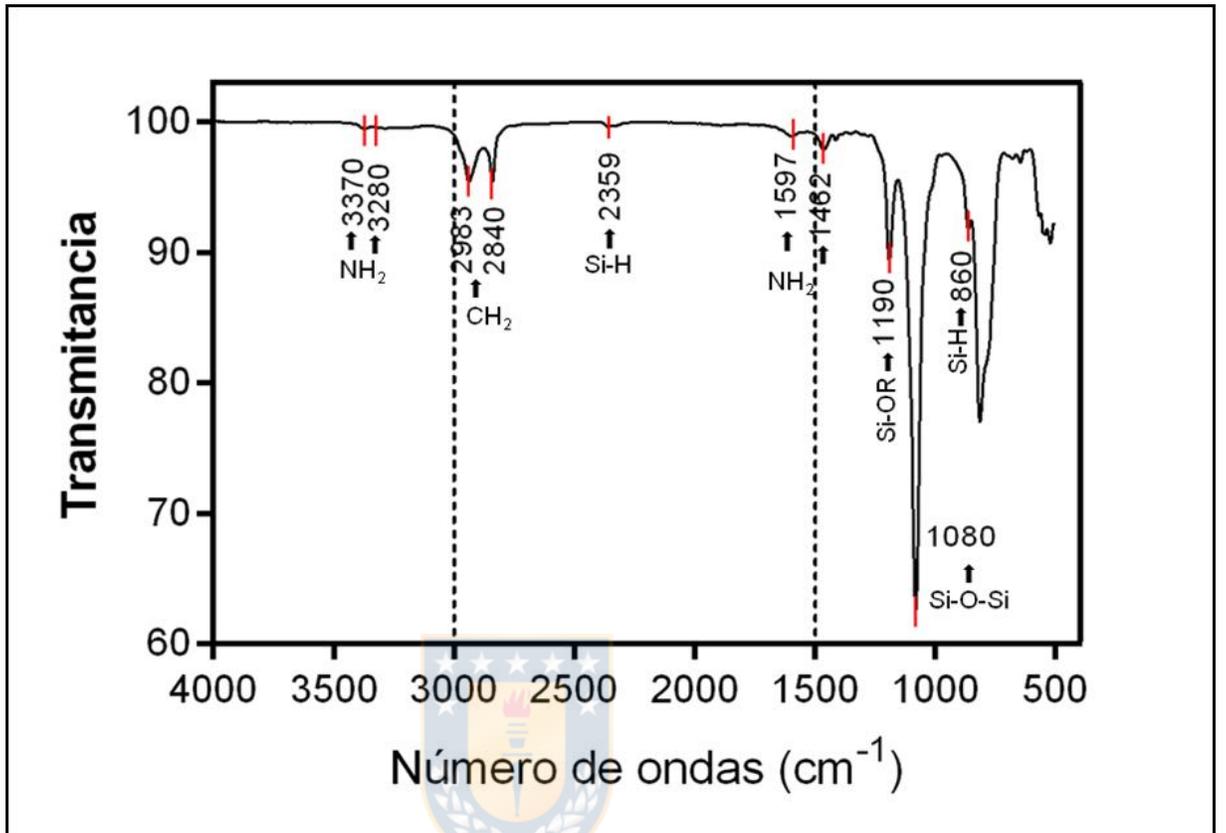


Figura 5.16 Espectro de absorción infrarrojo (FTIR) de 3-Aminopropiltrimetoxilano (APTMS) en solución.

En la figura 5.17 se muestra el espectro de FTIR de la superficie de la película de TiO₂ no funcionalizado. En la zona de diagnóstico aparece una señal entre 3200-3500 cm⁻¹. La amplia y débil señal a 3379 cm⁻¹, corresponde en este caso al estiramiento de los grupos hidroxilos (Wu *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2016; Meroni *et al.*, 2017) ya que está acompañada de una señal a 1642 cm⁻¹ correspondiente vibraciones de flexión O-H de moléculas de agua, así como formas Ti-OH (Bouachiba *et al.*, 2013). A 1420 cm⁻¹ se observa una vibración que podría atribuirse a flexiones de grupos C-O-H (Meroni *et al.*, 2017). Señales en la banda de absorción cercana a los 600 cm⁻¹ son asociadas a vibraciones de flexión de Ti-O y O-Ti-O (Nam, Cho and Boo, 2012; Sikong *et al.*, 2012; Bouachiba *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2013) así como también a 498 cm⁻¹ aparece una señal característica de absorción de los grupos Ti-O-Ti (Wu *et al.*, 2015).

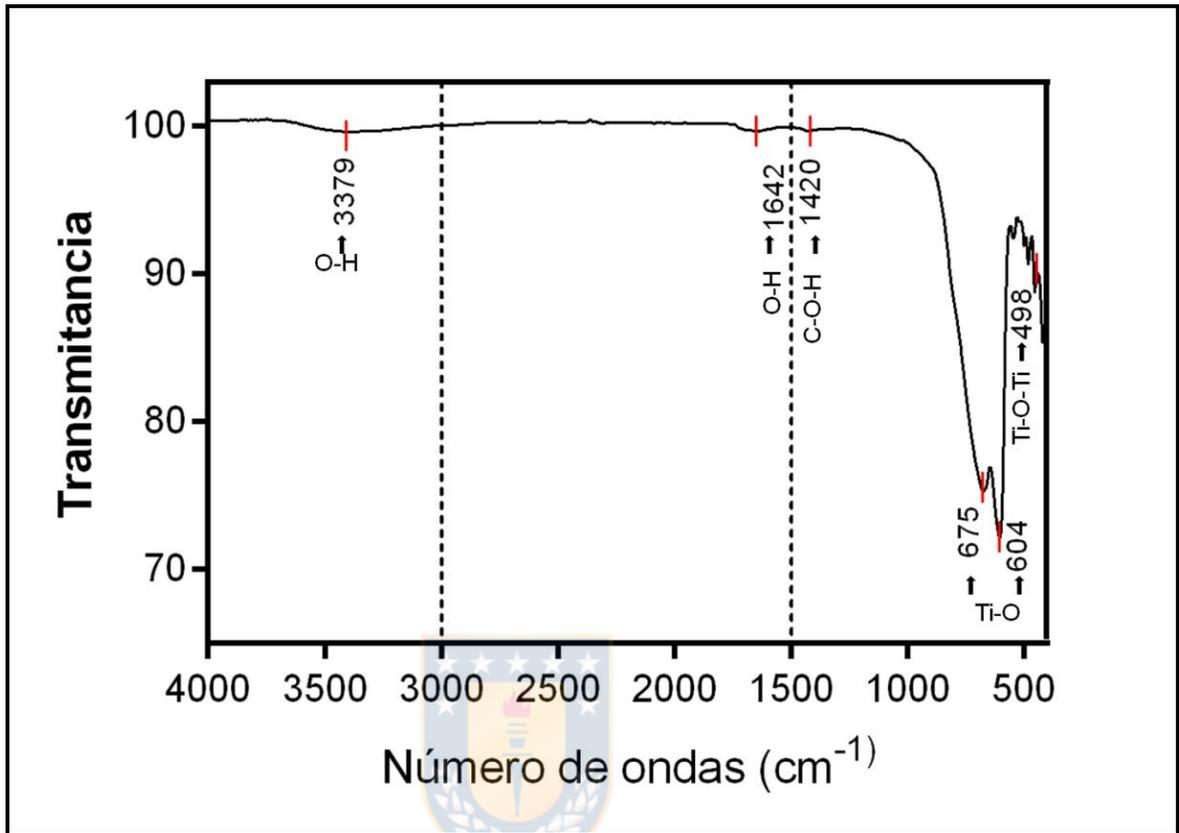


Figura 5.17 Espectro de absorción infrarrojo (FTIR) de película de TiO₂ degussa P25 sin funcionalizar.

La funcionalización de la película de TiO₂ con APTMS en etanol (ETOH), resultó heterogénea, ya que a simple vista se observaron zonas con apariencia vitrificada y zonas opacas. El espectro FTIR mostrado en la figura 5.18 corresponde a una zona con apariencia vitrificada, donde se observan las vibraciones de grupos hidroxilos a 3351 cm⁻¹ y aparecen señales correspondientes a grupos aminos a 3288 cm⁻¹, las cuales provocan que la banda entre 3200-3500 cm⁻¹ sea de mayor intensidad que el TiO₂ sin funcionalizar (espectro en línea gris, figura 5.18). A los 2931 cm⁻¹ y 2878 cm⁻¹ absorben los estiramientos de enlaces C-H del grupo CH₂. También se observan las señales de los enlaces N-H de las aminos primarias a 1566 cm⁻¹ y 1483 cm⁻¹ (Watté *et al.*, 2016). La vibración 1320 cm⁻¹ corresponde a los enlaces C-N (Meroni *et al.*, 2017), mientras que la señal a 1191 cm⁻¹ es característica de grupos Si-O-CH₂CH₃ (Vashist *et al.*, 2014) y 1099 cm⁻¹ correspondientes a grupos Si-OR, a 1012 cm⁻¹ absorben los enlaces Si-O-Si y a 927 cm⁻¹ los enlaces Ti-O-Si (Mansur *et al.*, 2002; Watté *et al.*, 2016; Meroni *et al.*, 2017).

La presencia señales correspondientes a grupos silanos y aminos en la superficie funcionalizada con APTMS en etanol, sugieren la presencia de moléculas de APTMS sobre la superficie de TiO₂.

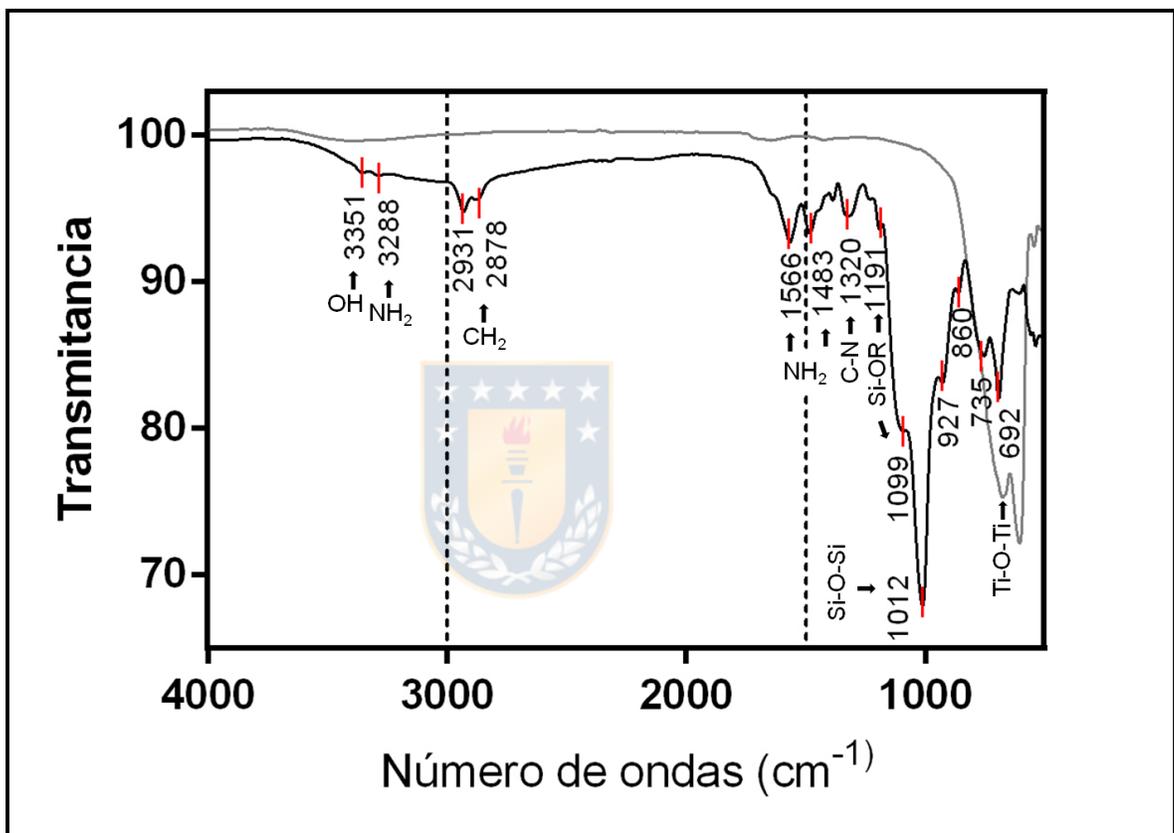


Figura 5.18 Espectro de absorción infrarrojo (FTIR) de película de TiO₂ funcionalizado con APTMS usando etanol como solvente destacado en negro y de la película de TiO₂ sin funcionalizar en gris.

La figura 5.19, muestran los espectros de FTIR representativos de estas dos zonas, y en ambas están presentes las vibraciones relacionadas con aquellas

bandas que indican la presencia de moléculas de APTMS sobre la superficie, como los enlaces N-H de los grupos amina, C-H de alcanos y grupos silanos, pero con intensidades muy diferentes entre ellas.

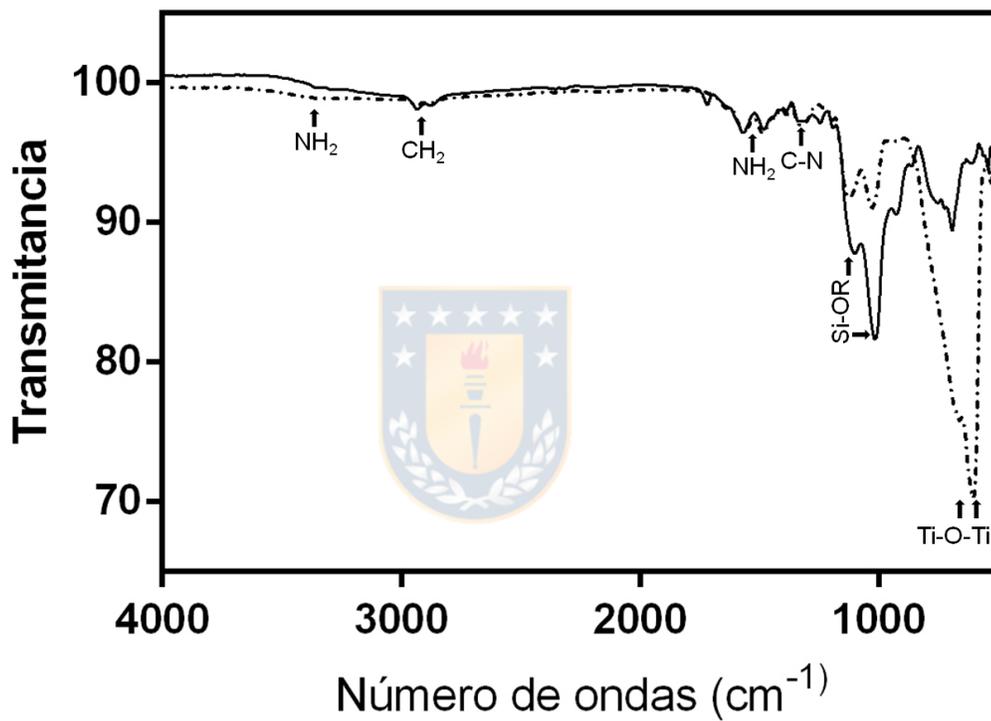


Figura 5.19 Espectro de absorción infrarrojo (FTIR) de las dos zonas de obtenidas sobre la película de TiO₂, luego de funcionalizar con APTMS usando etanol como solvente. La línea negra corresponde a la zona con apariencia vítrea y la línea punteada a la zona de apariencia opaca.

La funcionalización con APTMS usando Dimetilsulfóxido, no presentó problemas de heterogeneidad, su espectro de absorción FTIR (figura 5.20) muestra las bandas que pueden ser asignadas a vibraciones N-H de las aminas primarias cercana a 3280 cm^{-1} y entre 1560 y 1480 cm^{-1} , grupos alcanos en una banda previa a 3000 cm^{-1} y silanos en la zona entre 1150 y 1000 cm^{-1} .

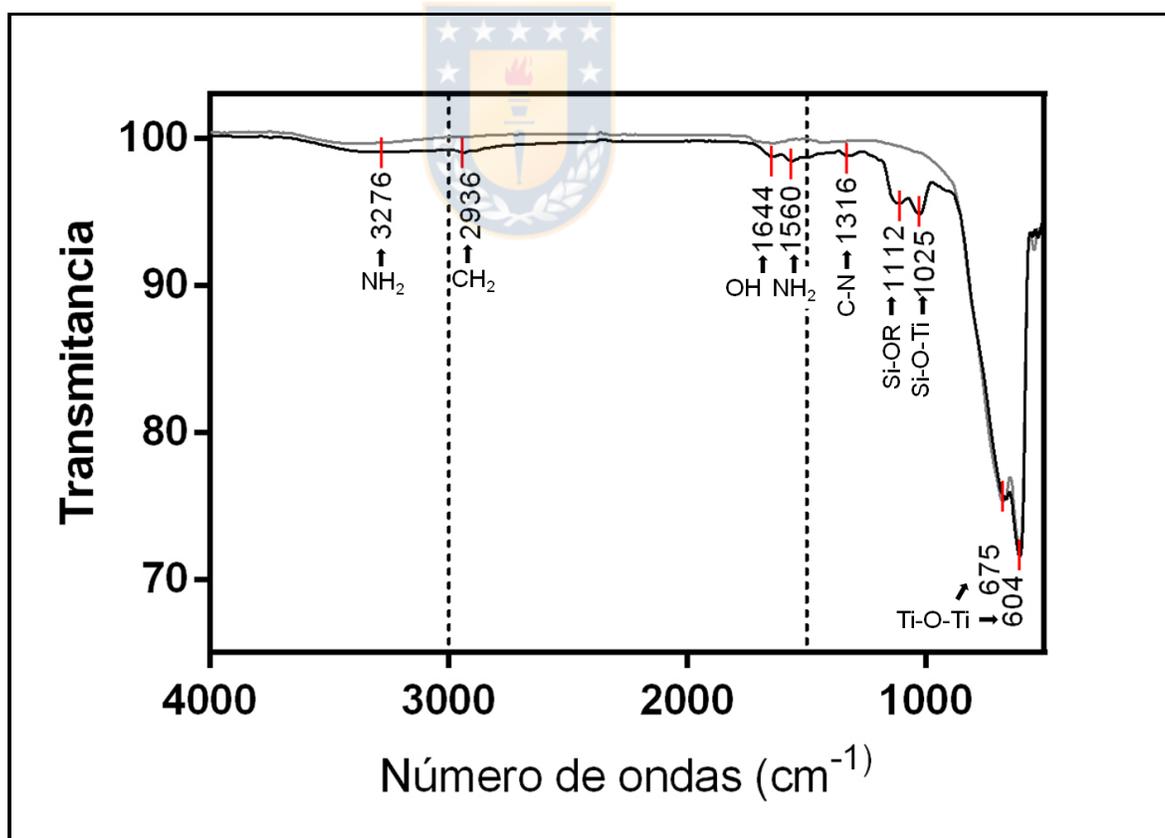


Figura 5.20 Espectro de absorción infrarrojo (FTIR) de película de TiO_2 funcionalizado con APTMS usando DMSO como solvente destacado en negro y de la película de TiO_2 sin funcionalizar en gris.

La figura 5.21, muestra el espectro de FTIR de la superficie funcionalizada usando una mezcla de etanol y DMSO en razón 1:1. Como en las otras condiciones, se observan señales atribuibles a la presencia de moléculas de APTMS en la superficie, como grupos NH_2 , CH_2 y silanos.



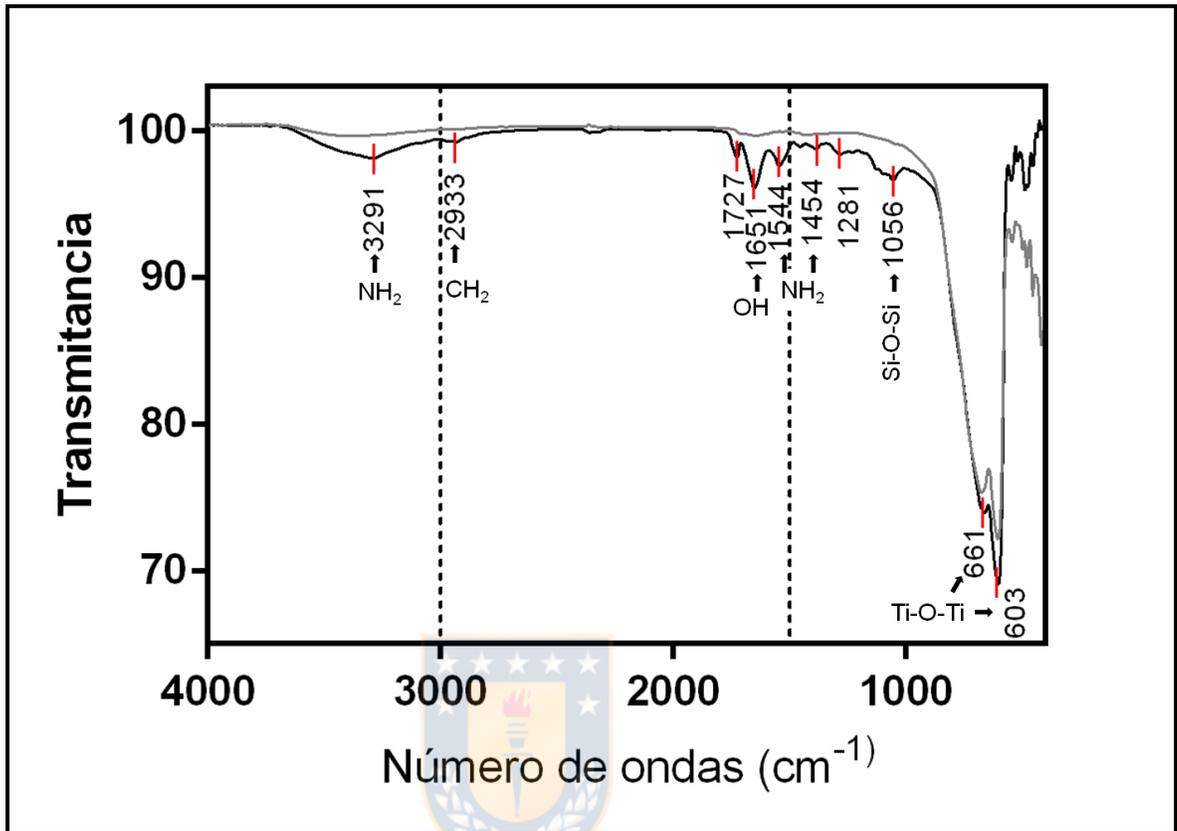
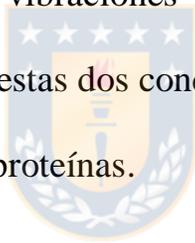


Figura 5.21 Espectro de absorción infrarrojo (FTIR) de película de TiO₂ funcionalizado con APTMS usando una mezcla de Etanol y DMSO (1:1) como solvente, destacando en negro y espectro FTIR de la película de TiO₂ sin funcionalizar en gris.

En la figura 5.22 son mostrados los espectros de FTIR de cada condición evaluada, señalando aquellas bandas atribuibles a la presencia de APTMS como enlaces N-H de aminas primarias entre 3291 cm^{-1} y 3276 cm^{-1} , y luego entre 1566 cm^{-1} y 1544 cm^{-1} , bandas que pueden ser asignadas a grupos CH_2 a cercanas a 2930 cm^{-1} y grupos silanos entre 1200 cm^{-1} y 1000 cm^{-1} . Destaca la intensidad observada con la mezcla ETOH/DMSO de grupos aminos, así como también la intensidad de los grupos silanos y reducción de la banda de vibraciones de TiO_2 obtenidas al usar ETOH como solvente. Por lo cual estas dos condiciones son escogidas para evaluar la adsorción de las Ficobiliproteínas.



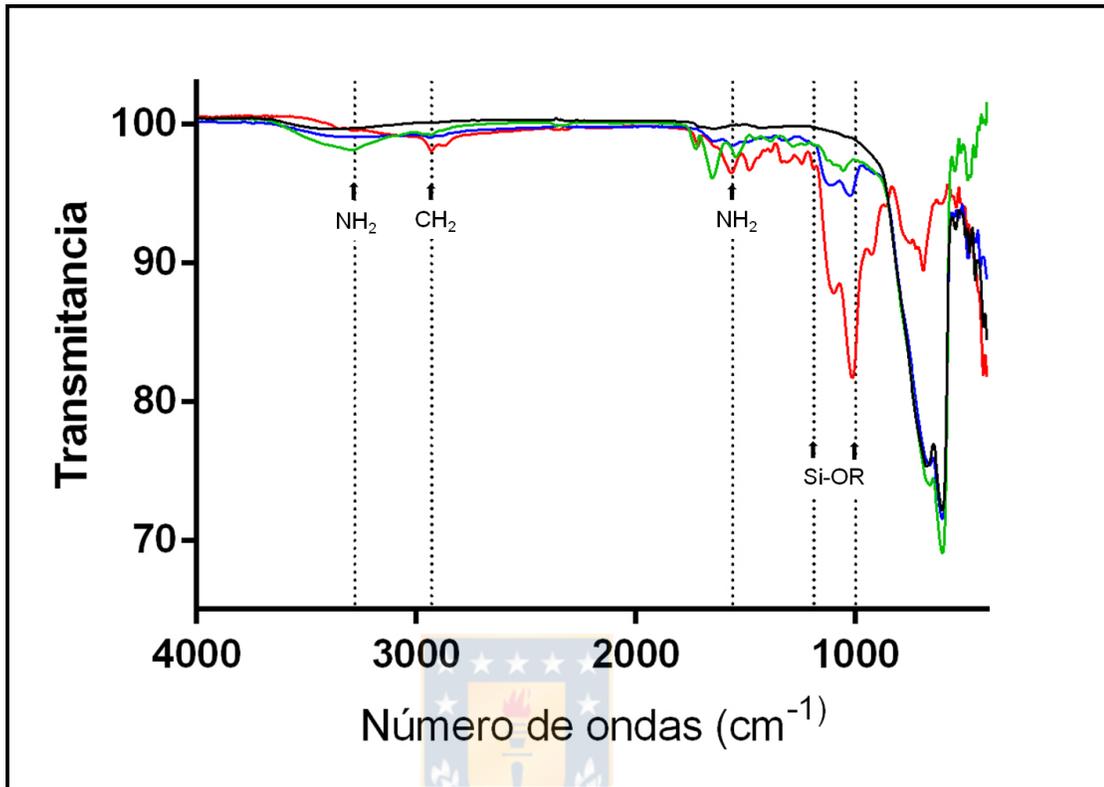


Figura 5.22 Comparación de los espectros de absorción infrarrojo (FTIR) de película de TiO₂ funcionalizado con APTMS usando como solvente etanol (rojo), dimetilsulfóxido (azul), mezcla etanol y dimetilsulfóxido (1:1) (verde) y película de TiO₂ sin funcionalizar (negro).

En la figura 5.23 se muestra el resultado de la sensibilización de la película de TiO_2 funcionalizada con APTMS en etanol o en una mezcla etanol/DMSO (1:1) como solvente. En la figura 5.23 A, se observa a simple vista que la adsorción de Ficoeritrina sobre la superficie del semiconductor sin funcionalización es muy baja, mientras que hay una mayor coloración sobre la película de TiO_2 funcionalizada con APTMS, la cual es más intensa usando la mezcla de ETOH/DMSO como solvente. La figura 5.23 B, presenta el espectro de absorción en sólido de las superficies funcionalizadas de TiO_2 con APTMS post-sensibilización, donde el uso de una mezcla ETOH/DMSO como solvente, resulta en una mayor absorción de luz en el espectro visible, en comparación con el uso de ETOH como solvente, o la película de TiO_2 sin funcionalizar.

Por lo cual, bajo nuestras condiciones experimentales el tratamiento de la superficie de TiO_2 con 1% de APTMS en una mezcla de ETOH/DMSO como solvente, es escogida como metodología para la funcionalización de la superficie del semiconductor y así aumentar la adsorción de las Ficobiliproteínas, para la construcción de celdas solares sensibilizadas con colorantes.

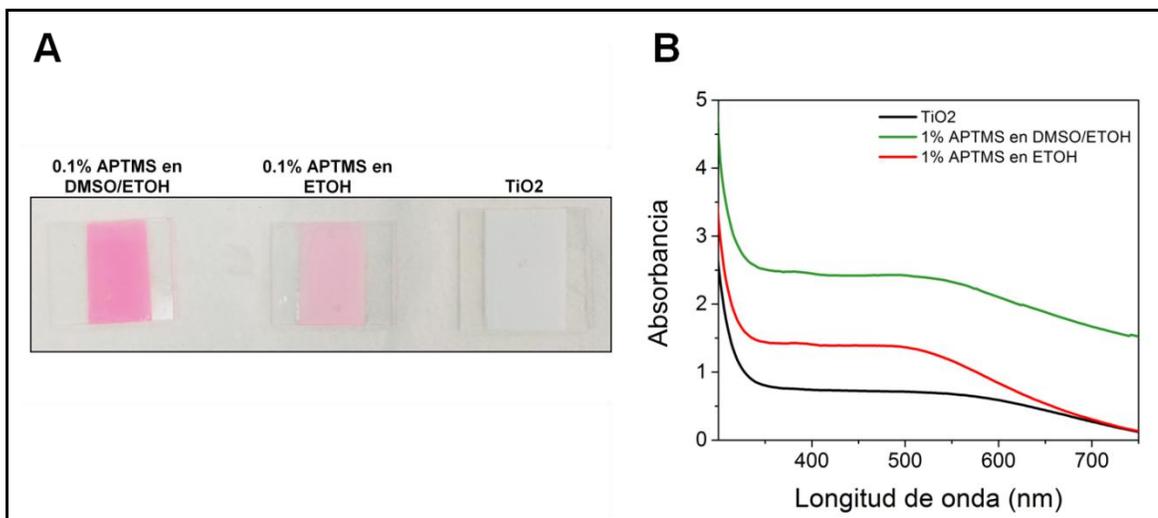


Figura 5.23 A, Fotografía post-sensibilización con una solución de 0,3 mg/mL de Ficoeritrina en tampón 20mM Tris-HCl pH 7.0. B, Espectro de absorción en sólido de película de TiO₂ funcionalizado con APTMS en etanol (ETOH) o una mezcla ETOH/dimetilsulfóxido (DMSO).

5. Construir y caracterizar las celdas solares sensibilizadas con Ficobiliproteínas.

Luego de definir el tampón adecuado para la sensibilización de los fotoelectrodos utilizando el extracto proteico descrito en el punto 1.1, se construyeron celdas solares sensibilizadas con las Ficobiliproteínas, Ficocianina (PC), Ficoeritrina (PE) y Aloficocianina (APC). Las celdas solares fueron caracterizadas en un simulador solar graficando las mediciones de intensidad de corriente versus voltaje (curva JV), para calcular sus parámetros eléctricos, como corriente de circuito cerrado (I_{sc}) (cuando la resistencia en la celda solar es mínima), densidad de corriente (J_{sc}), que corresponde a la corriente en circuito cerrado dividido por área de la celda solar, voltaje de circuito abierto (V_{oc}), corresponde a la diferencia de potencial de la celda solar, el factor de forma o Fill Factor (FF), este parámetro indica la forma de la curva densidad de corriente versus voltaje, depende de factores como las resistencias de la celda y el electrolito, La potencia de salida máxima (P_{max}), la potencia corresponde al producto de la corriente con el voltaje, por lo tanto P_{max} es igual al producto de la corriente en el punto de máxima potencia (I_{max}) y del voltaje de punto de

máxima potencia ($V_{\text{máx}}$) y la eficiencia de conversión de la celda solar (η), que corresponde al porcentaje de energía electromagnética, absorbida y convertida en electricidad, cuando la celda solar es conectada a un circuito eléctrico.

En la figura 5.24, se muestran las curvas de densidad de corriente versus voltaje obtenidas para las celdas solares sensibilizadas con ficobiliproteínas y para el fotoelectrodo sin sensibilizar, mostrando valores de densidad de corriente más altos cuando el fotoelectrodo es sensibilizado con ficoeritrina. Los parámetros eléctricos calculados son presentados en la tabla 5.4, donde la eficiencia alcanzada sensibilizando el fotoelectrodo con ficobiliproteínas, es cercana a 0,02%, con valores de eficiencia para APC de 0.023 ± 0.0024 %, 0.027 ± 0.0082 % para PC y 0.025 ± 0.0071 % para PE, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellas, al ser analizadas mediante test de Tukey. Las eficiencias alcanzadas con las celdas solares sensibilizadas con ficobiliproteínas son superiores y estadísticamente diferentes, a la eficiencia obtenida con la película de TiO_2 sin sensibilizar de 0,016%.

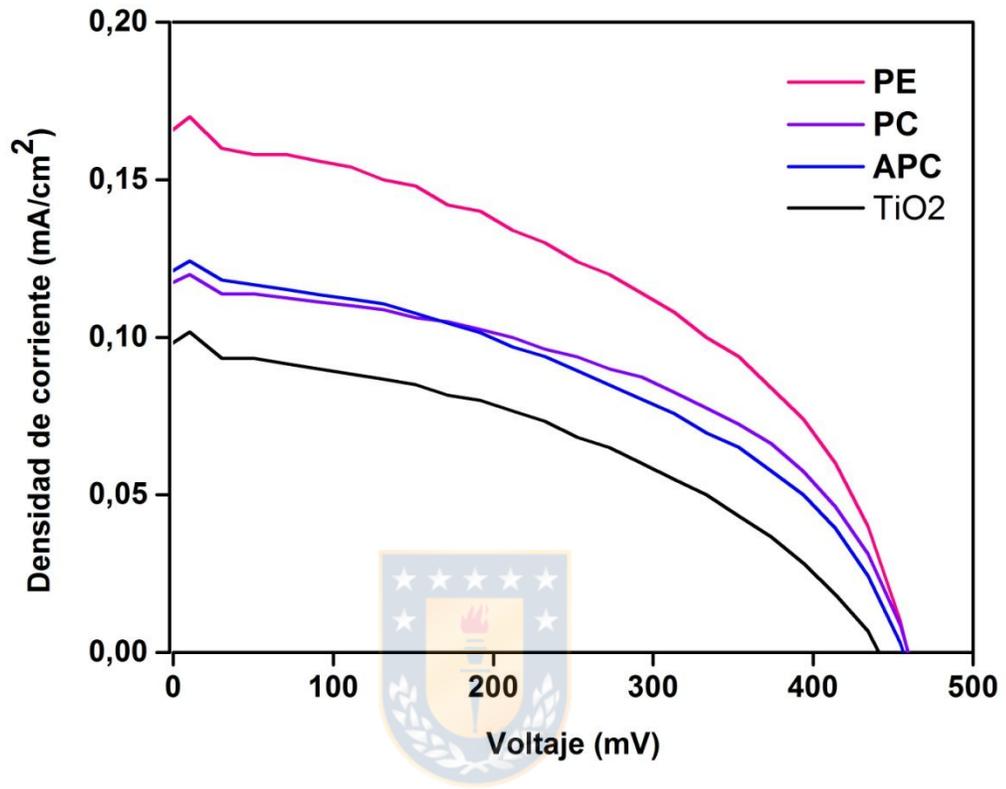


Figura 5.24 Curvas de intensidad de corriente versus voltaje (JV) de las celdas solares sensibilizadas con Ficobiliproteínas.

Tabla 5.4 Parámetros eléctricos para celdas solares sensibilizadas con Ficobiliproteínas.

Corriente de corto circuito (I_{sc}), densidad de corriente (J_{sc}), voltaje en circuito abierto (V_{oc}), factor de forma o fill factor (FF) y eficiencia de conversión (%).

Parámetro	APC	PC	PE	TiO2
Isc (mA)	0,080	0,082	0,084	0,061
Jsc (mA/cm²)	0,122	0,124	0,128	0,092
Voc (mV)	448	441	455	444
Vmax (mV)	300	306	320	283
Imax (mA)	0,051	0,054	0,052	0,039
Pmax (mWatts)	0,015	0,017	0,017	0,011
Fill Factor (FF)	0,425	0,455	0,431	0,405
Efficiency (η)	0,023	0,025	0,025	0,016



6. Optimización de las celdas solares sensibilizadas con Ficobiliproteínas.

Con base en los resultados obtenidos en el objetivo 4, la funcionalización de la película de TiO_2 con APTMS, favorece la adsorción de las ficobiliproteínas sobre los fotoelectrodos. Por lo cual se midió nuevamente la eficiencia de conversión, en celdas solares sensibilizadas con Ficobiliproteínas, previamente funcionalizadas con APTMS. Las curvas de intensidad de corriente versus voltaje (JV) y los parámetros eléctricos calculados, son presentadas en la figura 5.25 y tabla 5.5.

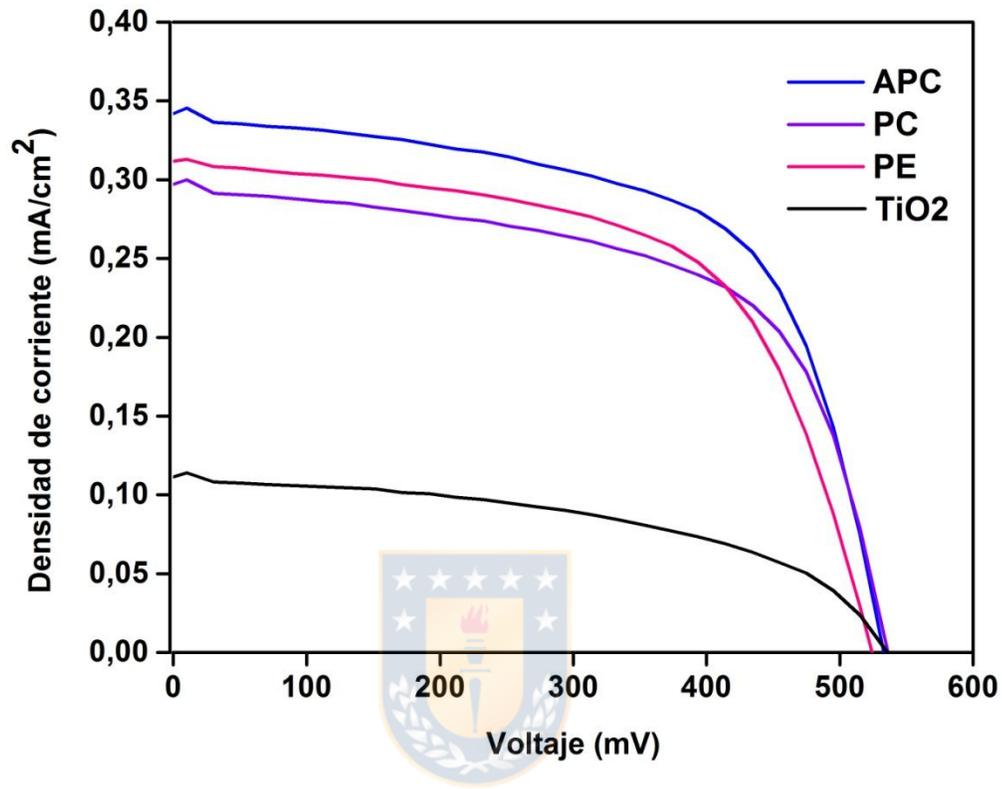


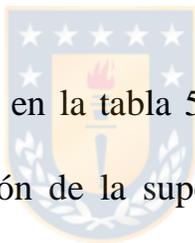
Figura 5.25 Curvas de intensidad de corriente versus voltaje (JV) de las celdas solares funcionalizadas con APTMS, sensibilizadas con ficobiliproteínas a una concentración de 1 mg/mL de proteínas totales.

Tabla 5.5 Parámetros eléctricos para celdas solares funcionalizadas con APTMS y sensibilizadas con Ficobiliproteínas. Corriente de corto circuito (I_{sc}), densidad de corriente (J_{sc}), voltaje en circuito abierto (V_{oc}), factor de forma o fill factor (FF) y eficiencia de conversión (%).

Parámetro	APC	PC	PE	TiO ₂
Isc (mA)	0,749	0,601	0,630	0,168
Jsc (mA/cm ²)	0,375	0,301	0,315	0,136
Voc (mV)	525	535	515	551
Vmax (mV)	419	414	394	434
Imax (mA)	0,587	0,465	0,497	0,117
Pmax (mWatts)	0,247	0,192	0,196	0,051
Fill Factor (FF)	0,62541	0,598	0,603	0,546
Efficiency (η)	0,176	0,137	0,140	0,042

Cuando las celdas solares son sensibilizadas con alguna de las Ficobiliproteínas evaluadas, la densidad de corriente en circuito cerrado alcanzada por el circuito eléctrico, es notablemente mayor al obtenido con el fotoelectrodo sin sensibilizar, así como también el voltaje de circuito abierto (Figura 5.25). Los parámetros eléctricos obtenidos de 4 réplicas de celdas solares con 6 mediciones por celda ensambladas, con fototelectrodos funcionalizados y sensibilizadas con PBP (tabla 5.5), muestra que la eficiencia de conversión alcanzada es similar entre sí, con un valor más alto

para APC con $0,176 \pm 0,0038$ %, seguido de PC con $0,137 \pm 0,00044$ % y PE con $0,14 \pm 0,00024$ %. En contraste con la eficiencia obtenida con el fotoelectrodo sin sensibilizar ($0,042 \pm 0,0089$ %). La sensibilización del fotoelectrodo aumenta la eficiencia de conversión aproximadamente 3,5 veces equivalente, a un aumento del 352 %. Las eficiencias alcanzadas con las celdas solares sensibilizadas con ficobiliproteínas son superiores y estadísticamente diferentes, a la eficiencia obtenida con la película de TiO_2 sin sensibilizar.



Los resultados presentados en la tabla 5.4 y 5.5, muestran claramente que gracias a la funcionalización de la superficie de la película de TiO_2 con APTMS, los parámetros eléctricos de las celdas solares, como la eficiencia de conversión, pueden aumentar hasta 7.6 veces para APC, 5 veces para PC y 5.6 veces para PE, respecto a las celdas solares sin funcionalizar.

Demostrada la utilidad de la funcionalización con APTMS en la construcción de las celdas solares sensibilizadas con PBP, se evaluaron los parámetros eléctricos de celdas solares construidas con PC estabilizada mediante entrecruzamiento con FA. En la figura 5.26 se presentan las curvas JV obtenidas y en la tabla 5.6 se muestra un promedio de las 6 celdas

solares construidas para cada condición y la desviación estándar (SD) de los parámetros eléctricos calculados.

Las eficiencias obtenidas con las celdas solares sensibilizadas con PC, son estadísticamente diferentes a las obtenidas con PC estabilizada, con parámetros eléctricos más bajos para estas últimas. Sin embargo las eficiencias obtenidas para ambas condiciones se encuentran en el rango entre 0,15- 0,1 %, superior a la eficiencia de 0,042 % obtenida con la película de TiO₂ sin sensibilizar.



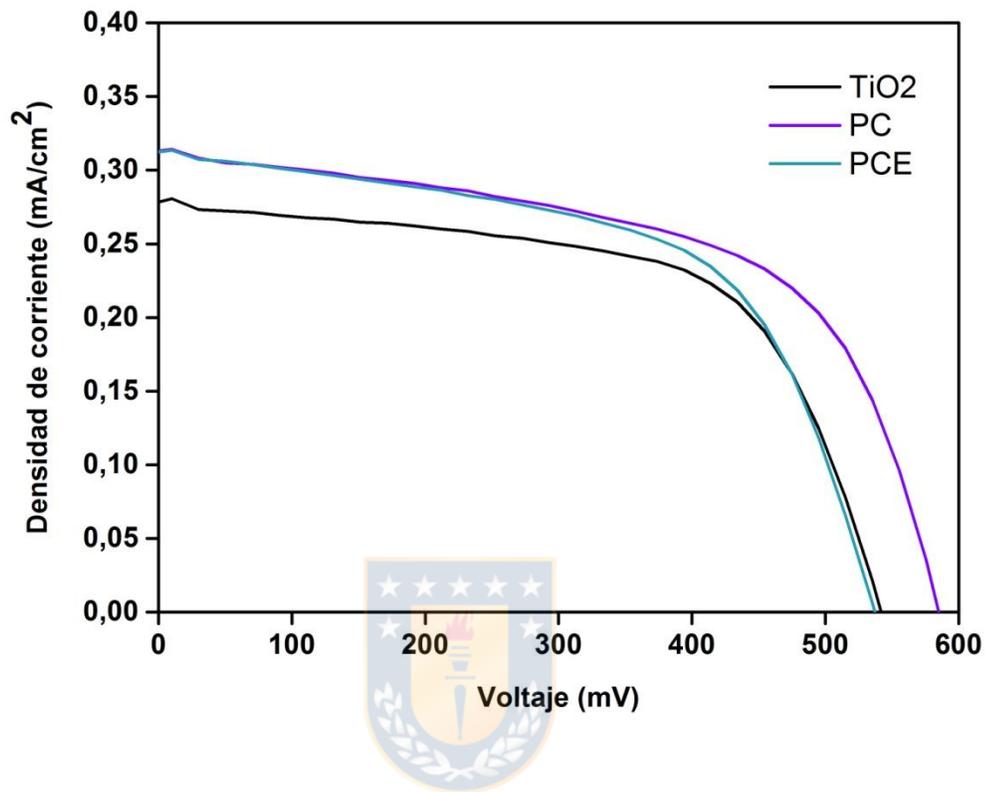


Figura 5.26 Curvas de intensidad de corriente versus voltaje (JV) de las celdas solares funcionalizadas con APTMS, sensibilizadas con PC nativa y PCE estabilizadas con formaldehído. PC a una concentración de 1 mg/mL de proteínas totales.

Tabla 5.6 Comparación de parámetros eléctricos para celdas solares funcionalizadas con APTMS y sensibilizadas con Ficocianina o Ficocianina térmicamente estabilizada. Corriente de corto circuito (I_{sc}), densidad de corriente (J_{sc}), voltaje en circuito abierto (V_{oc}), factor de forma o fill factor (FF) y eficiencia de conversión (%), desviación estándar (SD).

Parámetros	PC	SD	PCE	SD
Isc (mA)	0,278	0,05	0,229	0,02
Jsc (mA/cm ²)	0,313	0,01	0,270	0,03
Voc (mV)	581	9	523	13
Vmax (mV)	458	8	399	10
I _{max} (mA)	0,223	0,02	0,180	0,02
Pmax (mWatts)	0,102	0,01	0,072	0,01
Fill Factor (FF)	0,603	0,01	0,601	0,01
Efficiency (η)	0,152	0,01	0,118	0,01

VI. DISCUSIÓN

Los organismos fotosintéticos acuáticos como algas rojas y cianobacterias presentan un particular sistema de transferencia energética que les permite absorber la energía solar y transferirla hacia los centros de reacción fotosintéticos con una eficiencia cercana al 100%. Este particular sistema se compone de proteínas fotosintéticas conocidas como Ficobiliproteínas (PBP), que se encuentran organizadas en un complejo macromolecular llamado Ficobilisoma. Las características espectroscópicas de las PBP las convierten en un interesante campo de estudio para el desarrollo de dispositivos biomiméticos. Este trabajo de tesis, ha abordado el estudio de la aplicación Ficobiliproteínas obtenidas del alga roja *Gracilaria chilensis*, como sensibilizadores en celdas solares.

Gracilaria chilensis es principalmente exportada para la producción de agentes espesantes y gelificantes como el agar-agar. Sin embargo pigmentos fotosintéticos como las Ficobiliproteínas, son parte importante de sus componentes y el uso de éstas con fines biotecnológicos, es cada vez más

atractivo debido a la gran cantidad de aplicaciones cosméticas, alimenticias y biomédicas que poseen (Manirafasha *et al.*, 2016).

El contenido de PBP determinado en el extracto acuoso de *G. chilensis* (Tabla 1.1), muestra una composición mayoritaria de Ficoeritrina (PE) y Ficocianina (PC), con menor proporción de Aloficocianina (APC). Esto es similar a lo reportado previamente para esta especie (Tello-Ireland *et al.*, 2011) y comparable también al descrito para otro tipo de macroalgas rojas (Senthilkumar, *et al.*, 2013) (tabla 6.1). Aunque otras especies como *Gracilaria gracilis* pueden presentar otra composición de pigmentos, con una mayor concentración de PE, seguido por APC y PC como la PBP menos abundante (Francavilla *et al.*, 2013, 2014). Esta diferencia es coherente, ya que la composición de Ficobiliproteínas en algas cambia entre especies y es susceptible a variación ambiental (Gómez *et al.*, 2005; Francavilla *et al.*, 2013; Ismail and Osman, 2016).

Tabla 6.1 Contenido de Ficobiliproteínas en [mg/g de peso húmedo] para diferentes especies de algas.

Nombre de la especie	PE	PC	APC	Referencia
<i>Acanthophora spicifera</i>	0,421	0,34	0,121	Senthilkumar, Kurinjimalar <i>et al.</i> , 2013
<i>Gracilaria corticata</i>	0,781	0,32	0,092	Senthilkumar, Kurinjimalar <i>et al.</i> , 2013
<i>G. edulis</i>	0,762	0,33	0,081	Senthilkumar, Kurinjimalar <i>et al.</i> , 2013
<i>G. salicornia</i>	0,573	0,23	0,074	Senthilkumar, Kurinjimalar <i>et al.</i> , 2013
<i>Gelidiella acerosa</i>	0,545	0,19	0,062	Senthilkumar, Kurinjimalar <i>et al.</i> , 2013
<i>Gelidium pusillum</i>	0,403	0,18	0,085	Senthilkumar, Kurinjimalar <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypnea esper</i>	0,416	0,18	0,046	Senthilkumar, Kurinjimalar <i>et al.</i> , 2013
<i>Laurencia papillosa</i>	0,182	0,36	0,043	Senthilkumar, Kurinjimalar <i>et al.</i> , 2013
<i>Portieria hornemannii</i>	1.232	0,2	0,061	Senthilkumar, Kurinjimalar <i>et al.</i> , 2013
<i>Sarconema filiform</i>	0,397	0,19	0,056	Senthilkumar, Kurinjimalar <i>et al.</i> , 2013
<i>Jania rubens</i>	0,91	0,51	2,05	Ismail and Osman, 2016.
<i>Polysiphonia elengata</i>	3,7	2,38	6,23	Ismail and Osman, 2016.
<i>Gracilaria chilensis</i>	0,549	0,249	No informado	Tello-Ireland <i>et al.</i> , 2011

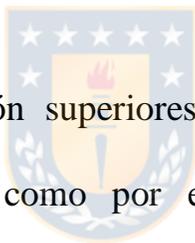
En literatura se describen numerosos métodos para la obtención de PBP desde macroalgas rojas, los que generalmente incluyen, una extracción acuosa, la precipitación de proteínas con sulfato de amonio, diferentes tipos de cromatografías, como intercambio iónico, filtración en gel, cromatografía de afinidad en columna de hidroxapatita (Wang, 2002; Sudhakar *et al.*, 2015), así como también métodos basados en líquidos iónicos (Martins *et al.*, 2016), sistemas acuoso de dos fases (Benavides and Rito-Palomares, 2008), hidrólisis enzimática (Mensi *et al.*, 2012), entre otros.

La metodología para purificación de PBP empleada en este trabajo, permitió la obtención PE, PC y APC con pureza de grado analítico > 4.0.

(Rito-palomares *et al.*, 2001), desde una única materia prima. Combinando la precipitación de proteínas mediante sulfato de amonio, una cromatografía de intercambio iónico para la purificación de Ficocianina, seguida de una cromatografía de absorción en columna de hidroxiapatita para la purificación de Ficoeritrina y Aloficocianina.

Los rendimientos de extracción obtenidos se presentan en la tabla 5.1. El rendimiento de purificación de PE respecto al extracto acuoso, e índice de pureza, fue similar al obtenido desde las algas rojas *Portieria hornemannii*, *Polysiphonia urceolata*, *Gracilaria verrucosa* y *Porphyra yezoensis*, empleando precipitación de proteínas mediante sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, adsorción hidrófoba y/o filtración en gel (Wang, 2002; Lu-Ning *et al.*, 2005; Chuner *et al.*, 2012; Senthilkumar *et al.*, 2013). Por otra parte, el rendimiento de extracción de PE obtenido desde *G. corticata*, luego de la precipitación de proteínas con 65% de saturación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico en una columna DEAE celulosa-52, fue de 0.24 mg/g, casi 2 veces mayor al obtenido en este trabajo, aunque con un menor índice de pureza (1.10) (Sudhakar *et al.*, 2014).

El rendimiento y grado de pureza obtenido para PE y PC, es similar al reportado para microalgas como *Anabaena variabilis* y *Spirulina spp.* (Chakdar & Pabbi, 2012; Cruz De Jesús *et al.*, 2016). En general los rendimientos de extracción para las diferentes PBP desde diferentes cianobacterias, se encuentran entre 8 a 80 %. Con valores más altos para PE entre 60-70 %, para PC entre 60-80 % y APC 70-80% (Sonani *et al.*, 2016), este último valor contrasta con el 3 % de rendimiento, obtenido en este estudio para APC.



Rendimientos de extracción superiores a los obtenidos en este trabajo, también son reportados, como por ejemplo, para PE desde el alga *Gracilaria lemaneiformis* el rendimiento de extracción fue de 360 mg/Kg (Niu *et al.*, 2013), un rendimiento de 1,7g /Kg de alga, fue obtenido desde *Polysiphonia urceolata*, mediante un método de elusión con gradiente de pH en cromatografía de intercambio iónico (Lu-Ning *et al.*, 2005). Un método alternativo mediante el uso de líquidos iónicos logra un rendimiento de 380 mg de PE/Kg de alga, obtenidos desde *Gracilaria sp.* (Martins *et al.*, 2016).

Si bien, el rendimiento de extracción de PBP obtenido fue inferior a los mencionados anteriormente, los procedimientos descritos muchas veces se enfocan en la purificación de la PBP presente en mayor proporción. La metodología de extracción presentada en este trabajo, permite la purificación de todas las PBP presentes en *G. chilensis*, con un grado de pureza analítico. Los múltiples pasos por la columna de hidroxiapatita para la obtención de APC con grado de pureza analítico, resultan en un bajo rendimiento de extracción. Sin embargo, dada la escasa proporción de APC presente en *G. chilensis*, la purificación de APC puede ser omitido para fines productivos.



Las características espectroscópicas presentadas por las PBP purificadas, muestran un espectro de absorción y emisión de fluorescencia característico de *G. chilensis* (Bunster et al., 1997), correspondientes a R-PE, R-PC y APC (Manirafasha et al., 2016), demostrando su integridad estructural.

Los tamaños moleculares determinados en el gel SDS-PAGE (Figura 5.4 y 5.8) para las bandas presentadas en PBP de *G. chilensis*, son cercanos a los descritos para otras especies de algas rojas, microalgas rojas y cianobacterias (Glauser et al., 1992; Lu-Ning et al., 2005; Básaca-loya et

al., 2009; Sun *et al.*, 2009; Kawsar *et al.*, 2011; Chakdar and Pabbi, 2012; Senthilkumar, Suresh, *et al.*, 2013; Kannaujiya & Sinha, 2016; Malairaj *et al.*, 2016).

La caracterización polipeptídica de Ficoeritrina en gel de poliacrilamida, presenta bandas con tamaños moleculares estimados de 17 kDa y 20 kDa identificadas como las subunidades α y β , respectivamente, similares a las determinadas anteriormente (Contreras-Martel, 2000). La subunidad de 34 kDa (Figura 5.8 C, letra e), es identificada como una de las dos proteínas de unión cromoforiladas descritas para *G. chilensis*, conocidas como subunidades γ^{31} y γ^{33} (Vásquez-Suárez *et al.*, 2018). Las subunidades γ también pueden ser observadas en otro tipo de algas rojas (Yu *et al.*, 1981; Apt *et al.*, 1993; Pons *et al.*, 2000; Niu *et al.*, 2006).

El uso de tinción con ZnSO_4 , permite que iones de Zn^{+2} se adhieran a las bilinas de las subunidades, intensificando la fluorescencia emitida cuando son excitadas con radiación ultravioleta, permitiendo así su detección (Niu *et al.*, 2006; Williams, 2007; Raps, 2008). En el gel SDS-PAGE teñido con azul de coomasie, se observa en el patrón de banda de PE, la subunidad γ^{33} (Figura 5.8 C, letra e). Sin embargo, bajo luz UV luego de la tinción con

ZnSO₄ (figura 5.6 D) se aprecia una banda correspondiente a la subunidad γ^{33} y otra banda cromoforilada de menor tamaño que podría corresponder a la subunidad gamma γ^{31} .

Para Ficocianina se reportan subunidades α y β con tamaños entre 14 - 15 y 18 - 19 kDa, respectivamente (Redlinger & Gantt, 1981; Ducret *et al.*, 1996; Kannaujiya & Sinha, 2016). La estimación de los tamaños moleculares de las subunidades α y β de R-Ficocianina de *G. chilensis* (16 kDa y 19 kDa, respectivamente), coinciden con los reportado anteriormente (Morales, 2012).

Además de las subunidades α y β , en Aloficocianina se describe la presencia de subunidades α^B , $\beta^{18.5}$ (Dagnino-Leone, 2013; Chang *et al.*, 2015). En el gel de SDS-PAGE (Figura 5.8 C), solo se aprecian las subunidades α y β de Aloficocianina de *G. chilensis* con tamaños determinados de 19 y 21 kDa, respectivamente. Tamaños similares para estas subunidades se describen en literatura (Lundell *et al.*, 1981; Ducret *et al.*, 1996; Glazer & Cohen-Bazire, 2006). El core de los Ficobilisomas, está constituido por 2 tipos de trimeros de Aloficocianina que emiten a 660 o 680 nm. La presencia de las subunidades α^B y $\beta^{18.5}$ son responsables de la

emisión a 680 nm (Jallet *et al.*, 2012). El máximo de emisión de fluorescencia para la Aloficocacina purificada fue de 650nm (Figura 5.7 B), consistente con la única presencia de las subunidades α y β presentes en el gel SDS-PAGE.

La aplicación de colorantes o Ficobiliproteínas como sensibilizadores en celdas solares, requiere la durabilidad del sensibilizador. Por lo cual, se evaluó la estabilidad térmica de Ficocianina mediante curvas de denaturación, y su estabilización mediante entrecruzamiento.

Existen múltiples métodos para la estabilización de proteínas como polímeros redox, glicerol, agarosa, azúcares, otros agentes entrecruzantes (Mateo *et al.*, 2006; Vagenende *et al.*, 2009; Chaiklahan, Chirasuwan *et al.*, 2012a; Martelli *et al.*, 2014; Suarez, 2014; Sokol *et al.*, 2018).

Formaldehído (FA) es el adhéido más pequeño, rutinariamente empleado para fijación de células, tejidos, inactivar toxinas y virus, el estudio de interacciones entre proteínas y/o ADN, entre otros usos. Debido al pequeño tamaño del FA, sus grupo de unión deben estar separados por aproximadamente 2 Å, lo cual, lo hace muy adecuado para el estudio de

interacciones entre macromoléculas que están muy cerca (Metz *et al.*, 2004; Kast & Klockenbusch, 2010; Kennedy-darling & Smith, 2014; Hoffman *et al.*, 2015)

En general, se ha reportado que las Ficobiliproteínas obtenidas desde organismos mesófilos, son estables bajo los 60°C (Pons *et al.*, 2000; Chaiklahan *et al.*, 2012b; Martelli *et al.*, 2014; Munier *et al.*, 2014; Suarez, 2014; Rastogi *et al.*, 2015). La temperatura de fusión determinada para Ficocianina de *G. chilensis* es coherente con esto. El comportamiento de las curvas de denaturación para Ficocianina (figura 5.9) es similar a lo presentado anteriormente por (Morales, 2012). La absorción a los 620 nm y 550 nm comienza a decaer con una pendiente pronunciada aproximadamente sobre los 53°C, mientras que aumenta la absorción a los 360 nm, relacionada con un aumento en la agregación proteica (Famm & Winter, 2006) y el aumento de la absorbancia a 280 nm es debido a la exposición de los anillos aromáticos de ciertos residuos al solvente como triptófano.

Agentes químicos como FA y glutaraldehído (GA) han sido usados para estabilizar Ficobiliproteínas mediante entrecruzamiento, tanto para

aplicaciones biomédicas y/o biomiméticas (Clement-Metral & Lefort-Tran, 1971; Telford *et al.*, 2001; Wilson, 2005; Sridharan *et al.*, 2008; Nwagu *et al.*, 2011; Jesionowski *et al.*, 2014). Como una forma de potenciar el uso de PBP como sensibilizadores, Ficocianina fue estabilizada químicamente a través de un entrecruzamiento con FA.

El uso de FA como agente de entrecruzamiento para proteínas, confiere una mayor estabilidad térmica sin generar cambios estructurales (Mason & O'leary, 1991; Metz *et al.*, 2003; Rait *et al.*, 2004; Salnikova *et al.*, 2008). Por lo cual es escogido para la estabilización térmica de PC. Con base en trabajos reportados anteriormente, se optimizaron las condiciones para el entrecruzamiento de Ficocianina de *G. chilensis* (Cubicciotti, 1997; Lowe, 2007; Mulder *et al.*, 2009; Lu-Ning *et al.*, 2011).

Luego de la incubación de Ficocianina con un 0,5 % p/v de FA por 24 horas, la T_m calculada a 280 nm se eleva desde 56°C hasta 80°C (Tabla 5.2). Este desplazamiento de 23°C en la T_m , es evidencia de que Ficocianina fue térmicamente estabilizada. Estudios con toxoides de difteria A y B entrecruzados con FA, revelaron una estabilidad térmica mejorada, donde los cambios en la estructura secundaria, terciaria y la agregación

proteica, se retrasó en aproximadamente 10°C, confiriendo más resistencia al desplegamiento (Metz *et al.*, 2003; Salnikova *et al.*, 2008).

La estabilización de Ficocianina de la cianobacteria *Spirulina platensis*, con un 2.7 % (p/v) de FA por 12 horas, mostró también propiedades espectroscópicas similares a PC nativa y demostrando mediante SDS-PAGE, que el entrecruzamiento covalente entre las subunidades a través del FA evita eficazmente que la PC estabilizada se disocie en sus subunidades, en condiciones de desnaturalización (60 °C por 3 h y 100 °C por 10 min) (Sun *et al.*, 2006). Respecto a los resultados obtenidos, podemos señalar que una concentración de FA (1 %) aumenta la T_m a valores cercanos a los obtenidos con 0,5 % de FA, pero se observa la precipitación de PC. Concentraciones de 0,1 % de FA, no son suficientes para el entrecruzamiento de PC en las condiciones evaluadas, ya que en esta condición se presenta una curva de denaturación de térmica con 2 transiciones. Las propiedades espectroscópicas de PC estabilizada con 0,5 % de FA, no son alteradas con el tratamiento (figura 5.10), lo cual permite suponer que la estructura secundaria y terciaria tampoco.

PC de *G. chilensis* fue térmicamente estabilizada, probablemente mediante un entrecruzamiento intracatenario con FA. La no alteración de las propiedades espectroscópicas luego de la estabilización química con FA, observada en este trabajo y por otros autores (Sun, *et al.*, 2006; Lowe, 2007), favorece la aplicación FA como estabilizador térmico.

La estabilidad del entrecruzamiento de PC con FA, en el tiempo o expuesto a temperatura por periodos prolongados, es un parámetro que no fue evaluado en este trabajo. Sin embargo es necesario su estudio en el futuro, para la aplicación de PC en celdas solares, ya que se ha determinado que la unión covalente producto del entrecruzamiento con FA, es reversible (Kennedy-darling & Smith, 2014; Hoffman *et al.*, 2015).

Si bien se logró la estabilización térmica de PC, se debe continuar su estudio para la generación de una estabilización permanente, con materiales inocuos que potencien la aplicación de PBP en dispositivos fotovoltaicos, frente a los colorantes obtenidos mediante síntesis química.

La sensibilización de la superficie de TiO_2 con colorantes naturales y sintéticos, muchas veces se realiza empleando metodologías que involucran altas temperaturas y solventes orgánicos.

La metodología para sensibilización con Ficobiliproteínas fue ajustada a condiciones que favorecieran su estabilidad conformacional. Comparando el espectro de absorción UV-Visible de la superficie de la película de TiO_2 sensibilizada, se evaluó la adsorción del extracto proteico de Ficobiliproteínas (EP) sobre la superficie de TiO_2 en tampón fosfato ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{H}_2\text{KPO}_4$) y Tris-HCl pH 7.0. Del mismo modo se evaluó la adsorción del EP sobre la superficie de TiO_2 funcionalizada con Poli-L-Lisina (PLL), Glutaraldehído (GA), Aminopropil trimetoxisilano (APTMS) y GA+APTMS.

Ambos tampones son conocidos por favorecer la estructura nativa de proteínas y como se observa en la Figura 5.13, preservan las propiedades de absorción de las Ficobiliproteínas en solución. La baja adsorción del EP en tampón fosfato sobre la superficie de TiO_2 (Figura 5.14), es consistente con reportes anteriores. Análisis mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), mediciones de fluorescencia de rayos X

(XRD) y Dispersión de luz electroforética (ELS), señalan una fuerte interacción de los aniones fosfato con la superficie de TiO_2 , generando una carga neta negativa en la superficie del TiO_2 (Connor & McQuillan, 1999; Moulton *et al.*, 2003; Marucco *et al.*, 2013, 2015; Wang *et al.*, 2014; Loreto *et al.*, 2017). Esto disminuye drásticamente la capacidad de carga sobre la superficie, debido a la fuerza de repulsión electrostática. Proteínas como Albúmina de Suero Bovino (BSA), mioglobina de caballo, IgG, también son pobremente adsorbidas sobre la superficie en presencia de tampón fosfato (Moulton *et al.*, 2003; Parkes *et al.*, 2014; Loreto *et al.*, 2017).

El pH de los tampones utilizados, es superior al punto isoeléctrico de las PBP, proporcionando una carga neta negativa de las PBP. La mayor adsorción del EP sobre la superficie de TiO_2 , con la concentración más alta de tampón Tris-HCl (20 mM pH 7.0), podría ser producto de la interacción de moléculas de Tri-HCl con la superficie de TiO_2 , exponiendo sus grupos amino y generando cargas positivas, que favorecerían la interacción electrostática entre el TiO_2 y las Ficobiliproteínas. Los resultados muestran que el tampón 20 mM de Tris-HCl pH 7.0 favorece la adsorción de PBP, en

comparación con tampón fosfato, por lo cual fue subsecuentemente utilizado para la sensibilización.

La funcionalización con poli-L-lisina (PLL), amino propil trimetoxisilano (APTMS), Glutaraldheído (GA) y APTMS + GA, se realizó para modificar las propiedades de la superficie del TiO₂, con el objetivo de mejorar la adsorción de las PBP.

La presencia de abundantes grupos amino libres, en PLL que llevan cargas positivas (Xia *et al.*, 2013), cambia la superficie del TiO₂ y favoreciendo la adsorción electrostática de proteínas como bacteriorodopsina (BR), sacarosa isomerasa, centro de reacción fotosintético de *Rhodospseudomonas viridis*, antígenos, entre otras moléculas (Ma *et al.*, 1991; Noda *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2015; Stearns *et al.*, 2016). Un factor que podría explicar la pobre adsorción obtenida usando PLL, es la baja concentración de PLL empleada en este trabajo (0,1 mg/mL). La inmovilización de BR sobre electrodos de oro, mostró ser dependiente de la concentración de PLL, siendo eficientemente adsorbida con una concentración de 1mg/mL de PLL, preservando su actividad fotoeléctrica (Li *et al.*, 2010).

El glutaraldehído contiene dos grupos aldehídos reactivos. Se utiliza como desinfectante, conservante y varias publicaciones lo señalan como un buen inmovilizador de proteínas y ácidos nucleicos (Monsan, 1978; Nwagu, 2011; Jesionowski *et al.*, 2014; Zhu, 2017). La funcionalización de superficies con GA busca la interacción de grupos NH_2 de cadenas laterales de la proteína, con su grupo aldehído libre para formar una base de Schiff. También ha sido usado en la inmovilización de proteínas fotosintéticas como Bacteriorodopsina (BR) y Ficoeritrina en diferentes matrices como grafito altamente orientado (HOPG, Highly Oriented Pyrolytic Graphite), membrana de cáscara de huevo y nanotubos de carbono (Facci *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 2010; Nagy *et al.*, 2014). Otra estrategia de funcionalización con GA, es el acoplamiento de la superficie con una primera capa de moléculas de silano que presenten grupos NH_2 libre como aminopropil trimetoxisilano (APTMS) o aminopropil trietoxisilano (APTES), seguido de GA, para de que el grupo aldehído libre del GA reaccione con grupos NH_2 libres de las proteínas. Esta estrategia que es ampliamente reportada en literatura, con múltiples aplicaciones (Yagiuda *et al.*, 1996; Mansur *et al.*, 2002; Wilson, 2005; Hu *et al.*, 2008; Son *et al.*, 2011; Killian, 2013;

Baranowski *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2016) y también ha sido utilizada para la inmovilización de proteínas fotosintéticas (Hajdu *et al.*, 2012; Nagata *et al.*, 2012). La funcionalización llevada a cabo GA, o GA+APTMS, no logró la adsorción de las PBP de *G. chilensis* sobre la superficie de TiO₂ (Figura 5.15). La superficie de TiO₂ funcionalizada con GA, no adsorbe las PBP, la tonalidad blanca presentada post-sensibilización (Figura 5.15 A), es evidencia de una baja interacción de la superficie de TiO₂ con grupos aldehídos y por lo tanto, una baja adsorción de las PBP. La funcionalización con APTMS + GA, muestra una perturbación de la coloración de las PBP. Adamov *et al.*, 2008, señala que la funcionalización con GA es sensible a la oxidación por O₂ atmosférico, destruyendo parcialmente las moléculas de BR sobre la superficie.

La mayor adsorción de las PBP sobre la superficie de TiO₂ se logró mediante la funcionalización con moléculas de APTMS. Los grupos metoxi del APTMS, son hidrolizados en un ambiente acuoso con etanol o solventes anhidros, forman grupos silanol (Si-OH) (Yadav *et al.*, 2014). Estos grupos silanol pueden reaccionar con la superficie de TiO₂ formando enlaces (Ti-O-Si). También pueden experimentar una condensación con una superficie

hidroxilada de TiO_2 a través del enlace de hidrógeno y luego formar enlaces siloxano ($\text{Si} - \text{O} - \text{Si}$) con moléculas de APTMS vecinas, generando una matriz polimérica mediante enlaces $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ (Gunda et al., 2014; Yadav et al., 2014), resultando expuestos sus grupos NH_2 . Las terminaciones amino de las moléculas de APTMS pueden reaccionar con moléculas biológicas vía adsorción física, fuerza electrostática, uniones hidrógenos, entre otras (Saengdee et al., 2015).

Luego de funcionalizar la superficie de TiO_2 con APTMS en una mezcla etanol/dimetil sulfóxido (1:1) como solvente (Figura 5.20), los análisis de Espectroscopia de absorción infrarroja muestran entre $500 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ que se asignan al estiramiento de los grupos $\text{Ti}-\text{O}$ o $\text{Ti}-\text{O}-\text{Ti}$. (Nam et al., 2012; Choi et al., 2013), así como también señales atribuibles de enlaces a enlaces $\text{Si}-\text{OH}$ y $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ (Mansur et al., 2002; Watté et al., 2016; Meroni et al., 2017). Están presentes también las vibraciones características de los grupos aminos libres del APTMS (Majoul et al., 2015; Watté et al., 2016). La presencia de la vibración a 1055 cm^{-1} nos entrega información respecto a la presencia de moléculas de APTMS en monocapa sobre la superficie (Pop-Georgievski et al., 2015).

La evaluación de diferentes entrecruzantes alcanotioles, sobre electrodos de oro, para la formación de monocapas autoensambladas del complejo captador de luz antena 1 y el centro de reacción (RC-LH1) de las bacterias fotosintéticas de color púrpura, demostró que la inmovilización depende del grupo terminal del entrecruzante empleado, obteniendo una mejor adsorción de las proteínas cuando el grupo terminal es un amino (Kondo *et al.*, 2007).

Los grupos aminos expuestos en la superficie funcionalizada con APTMS, pueden formar uniones covalentes con grupos carboxilos de proteínas como las PBP (Gunda *et al.*, 2014). La mayor adsorción de las PBP, alcanzada cuando la superficie de TiO₂ es funcionalizada con moléculas de APTMS, respalda reportes previos en los cuales esta funcionalización fue exitosa para la inmovilización de biomoléculas (Meroni *et al.*, 2017).

El término celdas solares biohíbridas se usa para describir celdas solares hechas de materiales biológicos (usualmente proteínas fotosintéticas) y materiales inorgánicos (semiconductores o electrodos metálicos) (Ben-Harosh, 2014). En las últimas dos décadas muchos estudios han sido publicados sobre diversos tipos de electrodos biohíbridos, principalmente

enfocados en el complejo proteico fotosistema I y II, centro de reacción y complejos antenas captadores de luz (Tan *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2014; Zaitsev *et al.*, 2014; Musazade *et al.*, 2018). El diseño de un fotoelectrodo basado en Ficobiliproteínas obtenidas desde la macroalga roja *G. chilensis*, fue abarcado en este trabajo.

Para que una celda solar sensibilizada con proteínas fotoactivas funcione, debe existir una transferencia de electrones desde el sensibilizador hacia la banda de conducción del semiconductor. Experimentos de apagamiento de fluorescencia y mediciones del potencial de oxidación, confirman un proceso de inyección de electrones desde el estado excitado de PC o PE hacia la banda de conducción de nanopartículas de TiO₂ en solución. Proceso que es energéticamente favorable (Kathiravan & Renganathan, 2009; Kathiravan *et al.*, 2009; Enciso *et al.*, 2013).

Las curvas JV obtenidas para las celdas solares sensibilizadas con PE, PC y APC (Figura 5.24), presentan un comportamiento típico de una celda solar, por lo cual se puede inferir, que la generación de fotocorriente en las celdas solares construidas, es producto de la transferencia de electrones desde las PBP hacia banda de conducción del semiconductor TiO₂.

Sin embargo, una baja adsorción de las PBP sobre la superficie de TiO_2 fue observada, obteniendo eficiencias de conversión global (η) del orden de 0,02 % para las 3 PBP estudiadas. A pesar de esto, las eficiencias de conversión determinadas en este trabajo, son comparables a las reportadas en literatura.

Por ejemplo, celdas solares biohíbridas basadas en PC de *Thermosynechococcus Vulcanus*, con electrodos de TiO_2 y un contraelectrodo de Pt, alcanzan un 0.0265 % de eficiencia de conversión global (η) (Ben-Harosh, 2014). Fotoelectrodos de TiO_2 sensibilizados con Bacteriorodopsina de *Halobacterium salinarum*, mostró una η 0.09 % (Janfaza *et al.*, 2014). DSSC ensambladas usando un extracto acuoso compuesto por PE, PC y clorofila a, de las algas rojas antárticas *Iridaea obovata*, *Delesseria lancifolia* y *Plocamium hookeri* alcanzan valores de η de 0.022 %, 0.045 % y 0.027 %, respectivamente (Enciso & Cerdá, 2016).

Por otro lado, la sensibilización de fotoelectrodos con PE obtenida del alga antártica *Palmaria decipiens* y *Delesseria lancifolia*, muestra eficiencias de conversión muy diferentes entre ambas especies, con un η de 0.12 % para PE de *Palmaria decipiens*, y un η de 0.08 % para PE de *Delesseria*

lancifolia. Aunque en ambos caso corresponde a R-PE, los autores sugieren que la diferencia en la cantidad de subunidad γ entre ambas algas, podría influir en adsorción de PE sobre el fotoelectrodo y consecuentemente en la eficiencia de conversión (Enciso *et al.*, 2018).

La baja adsorción de PC sobre electrodos de TiO_2 ha sido reportada previamente y mediante mediciones de microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), se evaluó el uso de coadsorventes como colorofila o ácido heptadecanoico (HA), señalando que clorofila muestra una fuerte competición con PC por el fotoelectrodo, mientras que con HA hay mayor adsorción de PC sobre la película de TiO_2 , mejorando su reproducibilidad, y alcanzando un η de 0.04 % (Enciso *et al.*, 2016).

Dado que la adsorción del sensibilizador, sobre el fotoelectrodo afecta la eficiencia de la celda solar ensamblada (Enciso *et al.*, 2016; Enciso *et al.*, 2018). La funcionalización de la superficie de TiO_2 con moléculas tipo APTMS para la inmovilización de proteínas fotosintéticas, es una estrategia que ha sido previamente empleada en el desarrollo de DSSC. Específicamente, podemos mencionar que el complejo captador de luz antena II (LHCII), asilado desde espinaca, fue inmovilizado sobre un

fotoclectrodo con APTES, gracias a las interacciones electrostáticas entre la superficie catiónica del electrodo y la superficie aniónica del lado estromal del LHCII. En este trabajo las características de la curva JV entregan un voltaje de circuito abierto (V_{oc}) de 0.47 V, una densidad de corriente en circuito cerrado (J_{sc}) de 0,49 (mA/cm^2), un facto de forma o fill factor (FF) de 0.58 y un η de 0,13 % (Nagata *et al.*, 2012).

Nuestros resultados indican que la funcionalización del fotoclectrodo con APTMS, favorece la adsorción de las PBP (figura 5.15) y como se discutió anteriormente, efectivamente hay una mayor adsorción sobre el fotoclectrodo, lo cual se traduce en una mayor eficiencia de conversión global (figura 5.25, tabla 5.5), aumentando el η desde 0,02 % a un 0,10 % aproximadamente, cuando la superficie de TiO_2 fue funcionalizada con APTMS (tabla 5.5).

La mayor eficiencia de conversión fue obtenida sensibilizando los fotoclectrodos con APC. Como discuten otros autores, el gran tamaño de las proteínas fotosintéticas respecto a las partículas nanoporosas del TiO_2 , dificultaría la transferencia de carga hacia el semiconductor, señalando, que un menor tamaño de complejo fotosintético o el uso de subunidades

aisladas, favorecerían los parámetros fotoeléctricos de las DSSC (Yu *et al.*, 2015; Karpulevich *et al.*, 2017; Musazade *et al.*, 2018). La estructura trimérica de APC de *G. chilensis*, respecto a la estructura hexamérica de PE y PC (Contreras-Martel *et al.*, 2001, 2007; Dagnino- Leone *et al.*, 2017), podría ser de gran influencia en la obtención de un mayor rendimiento fotoeléctrico.

Como una estrategia para mejorar la estabilidad de las DSSC basadas en PBP, se llevo a cabo la estabilización térmica de PC, mediante entrecruzamiento con formaldehido, logrando desplazar su T_m cerca de 25°C . El entrecruzamiento de PC con formaldehido reduce la η desde 0,16 % obtenido con PC nativa, a un 0,12 % obtenido con PC estabilizada. Sin embargo, en este trabajo no fue abordada la comparación de los parámetros fotoeléctricos, entre ambos dispositivos, en el transcurso del tiempo. Por lo cual no se puede concluir respecto a las ventajas o desventajas de la utilización de PC térmicamente estabilizada en el desarrollo de dispositivos DSSC.

El aumento en el rendimiento y estabilidad de las DSSC, es uno de los principales focos de la investigación actual y muchas estrategias han sido

abordadas en este ámbito. Como por ejemplo, el uso de tecnología recombinante es una herramienta que también ha sido explorada en el desarrollo de dispositivos biohíbridos, para mejorar la adsorción y/o estabilidad de las proteínas fotosintéticas sobre los electrodos o la formación de complejos proteicos que no se presentan naturalmente, (Das *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2011; Yaghoubi *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2019). Gracias a la tecnología recombinante, eficiencias de un 0.26% son reportadas para un dispositivo DSSC basado en APC recombinante con His-tag, facilitando su purificación y adsorción sobre el semiconductor de TiO₂ (Pu *et al.*, 2013). Así como también una variante recombinante de proteína fluorescente verde (GFP) con incorporación de 3, 4-dihydroxy-L-phenylalanine (dopa) (GFP-dopa), mostró una mayor adsorción orientada sobre la superficie de TiO₂, aumentando la eficiencia de transferencia de carga en la interfase TiO₂/GFPdopa, con un η de 0,94 %, (Deepankumar *et al.*, 2017).

El uso de celdas solares basadas en polímeros conductores es otra de las alternativas empleadas para mejorar el desempeño de las DSSC (Cho *et al.*, 2014). Respecto a los dispositivos biohíbridos, se reporta una celda solar

basada en polímeros, compuesta de ITO como sustrato conductor, seguido del polímero conductor poli(3-hexiltiofeno-2,5-diil): indene-C₆₀ bisadduct (P3HT:ICBA), el fotosistema I asilado de espinaca y aluminio, alcanzando un η de 4.53 %, aunque es importante mencionar que éste dispositivo sin el fotosistema I presentó también una alta eficiencia de 4.3 % (Molamohammadi *et al.*, 2018).

Los parámetros fotoeléctricos obtenidos para las celdas solares sensibilizadas con PBP, empleando fotoelectrodos funcionalizados con APTMS, se encuentran en el rango de lo reportado previamente para otros complejos proteicos fotosintéticos. El diseño de las DSSC biohíbridas es fundamental para la optimización de los dispositivos fotovoltaicos en desarrollo, los cuales pueden ser mejorados mediante múltiples aproximaciones, como el uso de tecnología recombinante o electrolitos en estado sólido.

VII. CONCLUSIONES

El proceso de purificación integrado de PBP desde *G. chilensis* permite la obtención de R-PE y R-PC con rendimientos aceptables, por lo cual, existe potencial para el estudio de factibilidad técnico-económica, de la obtención de estas PBP desde *G. chilensis* con fines comerciales.

Las ficobiliproteínas de *G. chilensis* R-PE, R-PC y APC, pueden actuar como sensibilizadores en celdas solares sensibilizadas, generando una corriente eléctrica foto-inducida, producto de la transferencia de electrones hacia la banda de conducción del semiconductor TiO₂.

La adsorción de las PBP en la superficie del electrodo desempeña un papel relevante en el desempeño de una DSSC. Diferentes estrategias son reportadas para mejorar la adsorción de complejos proteicos fotosintéticos sobre los fotoelectrodos, en nuestro caso la funcionalización de la superficie del semiconductor de TiO₂, con moléculas de APTMS, favorece la adsorción de la PBP sobre éste. Probablemente producto de interacciones electrostáticas entre los grupos amino del APTMS y la superficie aniónica de las PBP.

La funcionalización de superficie de TiO_2 y la estabilización térmica de PC mediante entrecruzamiento con FA, es un acercamiento al diseño y optimización de dispositivos fotovoltaico biohíbridos, los cuales pueden ser constantemente mejorados, con el fin de conseguir eficiencias y estabilidad similar a las presentadas con tintes sintéticos u organometálicos, para su proyección comercial.

Finalmente se logró ensamblar celdas solares fotovoltaicas sensibilizadas con Ficobiliproteínas obtenidas desde *Gracilaria chilensis* de eficiencias semejantes a las obtenidas en literatura para otras proteínas fotosintéticas.



VIII. GLOSARIO

Corriente de circuito cerrado (I_{sc}) = Corriente cuando la resistencia en la celda solar es cero.

Densidad de corriente (J_{sc}) = Corriente en circuito cerrado dividido por área de la celda solar.

Eficiencia de conversión de la celda solar (η) = Corresponde al porcentaje de energía electromagnética, absorbida y convertida en electricidad, cuando la celda solar es conectada a un circuito eléctrico.

Potencia de máxima (P_{max}) = Corresponde al producto de la corriente por el voltaje cuando ambos son máximos.

Voltaje de circuito abierto (V_{oc}) = Diferencia de potencial de la celda solar



VIII. REFERENCIAS

- Acikgoz S., Ulusu Y., Akin, S. & Sonmezoglu S. (2014). Photoinduced electron transfer mechanism between green fluorescent protein molecules and metal oxide nanoparticles, *Ceramics International* 40(2), pp. 2943–2951.
- Adamov G., Devyatkov A., Gnatyuk L., Goldobin I. & Grebennikov E. (2008). Bacteriorhodopsin-Perspective biomaterial for molecular nanophotonics. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 196(2–3), pp. 254–261.
- Al-Bat'hi S., Alaei I. & Sopyan I. (2013). Natural photosensitizers for dye sensitized solar cells. *International Journal of Renewable Energy Research* 3(1), pp. 138–143.
- Arteni A., Ajlani G. & Boekema E. (2008). Structure and organization of phycobilisomes on membranes of the red alga *Porphyridium cruentum*. *Photosynthesis Research*, 95(2–3), pp. 169–174.
- Apt K., Hoffman N. & Grossman A. (1993). The γ subunit of R-phycoerythrin and its possible mode of transport into the plastid of red algae. *Journal of Biological Chemistry*, 268(22), pp. 16208–16215.
- Baranowski A., Klein A., Ritz U., Ackermann A., Anthonissen J., Kaufmann K., Brendel C., Götz H., Rommens P. & Hofmann, A. (2016). Surface functionalization of orthopedic titanium implants with bone sialoprotein. *PLoS ONE*, 11(4), pp. 1–23.
- Básaca-loya G., Valdez M., Enríquez-Guevara E., Gutiérrez-millán L. & Burboa M. (2009). Extraction and purification of B-phycoerythrin from the red microalga *Rhodorus marinus*. *Ciencias Marinas*, 35, pp. 359–368.
- Benavides J. & Rito-Palomares M. (2008). Generic application of Polyethylene glycol - Salt Aqueous Two-Phase Systems for the development of processes to biological products primary recovery. *Revista Mexicana de Ingenieria Química*, 7(2), pp. 99–111.
- Ben-Harosh R. (2014). 'Energy Transfer and Charge Separation in Phycocyanin: Developing a Bio-DSSC'. *Master of thesis, Israel Institute of Technology*.
- Bennett A. & Bogorad L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of Cell Biology*, 58, pp. 419–435. B
- Berns D. & MacColl R. (1989). Phycocyanin in Physical-Chemical Studies. *Chemical Reviews*, 89, pp. 807–825.

Betz M. (1997). One century of protein crystallography: the phycobiliproteins. *Biol. Chem.*, 378, pp.167–176.

Bolton J. & Hall D. (1991). The Maximum Efficiency of Photosynthesis. *Photochemistry and Photobiology*, 53(4), pp. 545–548.

Bouachiba, Y., Hanini F., Bouabellou A., Kermiche F., Taabouche A., Bouafia M., Amara S., Sahli S. & Boukhedden K. (2013). TiO₂ thin films studied by FTIR, AFM and spectroscopic ellipsometry. *International Journal of Nanoparticles*, 6(2/3), p. 169.

Bründermann E., Hübers H. & Kimmitt M. (2012). Springer Series in Optical Sciences: High-Efficient Low-Cost Photovoltaics. Eds.: V.Petrova-Koch, R.Hezel and A.Goetzberger, Springer Series in Optical Sciences, vol. 140, pp. 101-228.

Bunster M., Tellez J. & Candia A. (1997). Characterization of phycobiliproteins present in *Gracilaria chilensis*. *Bol. Soc. Chil. Quim.*, 42, pp. 449-455.

Buscaino R., Baiocchi C., Barolo C., Medana C., Grätzel M., Nazeeruddin M. & Viscardi G. (2008). A mass spectrometric analysis of sensitizer solution used for dye-sensitized solar cell. *Inorganica Chimica Acta*, 361(3), pp. 798–805.

Calogero G., Yum J., Sinopoli A., Di Marco G., Gratzel M. & Nazeeruddin M. (2012). Anthocyanins and betalains as light-harvesting pigments for dye-sensitized solar cells. *Solar Energy*, 86(5), pp. 1563–1575.

Carbó Vela P. & Rocha R. (2013). Proceso electroquímico en celdas solares sensibilizadas con un colorante natural. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), pp. 1689–1699.

Chaiklahan R., Chirasuwan N. & Bunnag B. (2012a) ‘Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives’, *Process Biochemistry*, 47(4), pp. 659–664.

Chaiklahan R., Chirasuwan N. & Bunnag B. (2012b). Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochemistry*, 47(4), pp. 659–664.

Chakdar H. & Pabbi, S. (2012). Extraction and purification of Phycoerythrin from *Anabaena variabilis* (CCC421). *Phykos* 42(1), pp. 25–31.

Chang L., Liu X., Li Y., Liu C., Yang F., Zhao J. & Sui S. (2015). Structural organization of an intact phycobilisome and its association with photosystem II. *Cell research* 25(6), pp. 726–37.

Chen Y., Liu S., Cui Y., Jiang P., Chen H., Li F. & Qin, S. (2011), Biosynthesis and immobilization of biofunctional allophycocyanin. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, p. 751452.

Cho W., Kim Y., Song D., Choi H. & Kang Y., (2014). High-efficiency solid-state polymer electrolyte dye-sensitized solar cells with a bi-functional porous layer. *J. Mater. Chem. A*, 2(42), pp. 17746–17750.

Choi K., Woo J., Joo Y., Chun Y. & Kim C. (2013). Dry etching properties of TiO₂ thin films in O₂/CF₄/Ar plasma. *Vacuum*, 92, pp. 85–89.

Chuner C., Li C., Wu S., Wang Q., Guo Z. & He P. (2012). Large scale preparation of phycobiliproteins from *Porphyra yezoensis* using co-precipitation with ammonium sulfate. *Natural Science*, 04(08), pp. 536–543.

Clement-Metral J & Lefort-Tran L. (1971). Fluorescence transfer in glutaraldehyde fixed particles of the red alga *Porphyridium cruentum*. *FEBS Journal*, 12(4), pp. 225–228.

Cleveland C. & Morris C. (2013). Handbook of energy, Volume II, Chronologies, top ten lists, and word clouds. Amsterdam: Elsevier. pp 484.

Connor P. & McQuillan A. (1999). Phosphate adsorption onto TiO₂ from aqueous solutions: an in situ internal reflection infrared spectroscopic study. *Langmuir*, 15(8), pp.

Contreras-Martel C. (2000) Resolución de la estructura terciaria de R-ficoeritrina de *Gracilaria chilensis*. *Tesis Doctoral, Universidad de Concepción*.

Contreras-Martel C., Martínez-Oyanedel J., Bunster M., Legrand P., Piras, C., Vernede X. & Fontecilla-Camps J. (2001). Crystallization and 2.2 Å resolution structure of R-phycoerythrin from *Gracilaria chilensis*: A case of perfect hemihedral twinning. *Acta Crystallographica Section D*, 57(1), pp. 52–60.

Contreras-Martel C., Matamala A., Bruna C., Poo-Caamaño G., Almonacid D., Figueroa M., Martínez-Oyanedel, J. & Bunster, M. (2007). The structure at 2 Å resolution of Phycocyanin from *Gracilaria chilensis* and the energy transfer network in a PC-PC complex. *Biophysical Chemistry*, 125(2–3), pp. 388–396.

Costa V., De Souza M., Fachine P., Macedo A. & Gonçalves L. (2016). Nanobiocatalytic systems based on lipase-Fe₃O₄ and conventional systems for isoniazid synthesis: A comparative study. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 33(3), pp. 661–673.

Corazza M., Gevorgyan S. & Krebs F. (2016). Characterization of Organic Solar Cell Devices and their Interfaces under Degradation: Imaging , Electrical and Mechanical Methods . *Tesis Doctoral, Technical University of Denmark*.

Cruz De Jesús V., Gutiérrez-rebolledo G., Hernández-Ortega M., Valadez-Carmona L., Mojica-Villegas A., Gutiérrez-Salmeán, G. & Chamorro-Cevallos G. (2016). Methods for extraction, isolation and purification of C-phycoyanin: 50 years of research in review. *International Journal of Food and Nutritional Science Research*, 3(3), pp. 1–10.

Cubicciotti R. (1997) 'Phycobilisomes, derivatives and uses therefor'. United States Patent 5,695,990.

Dagnino-Leone, J. (2013) 'Un modelo del core del ficobilisoma de *Gracilaria chilensis*. Estudios estructurales y funcionales', *Tesis de Magister, Universidad de Concepción*.

Dagnino- Leone J., Figueroa M., Mella C., Kerff F., Vásquez J., Martínez-Oyanedel, J., Bunster, M. & Vorpal, A. (2017). Structural models of the different trimers present in the core of phycobilisomes from *Gracilaria chilensis* based on crystal structures and sequences. *PLoS ONE* 12(5), pp. 1–15.

Das R., Kiley Patrick J., Segal M., Norville J., Yu A., Wang L., Trammell S., Reddick L., Kumar R., Stellacci F., Lebedev N., Schnur J., Bruce B., Zhang S. & Baldo M. (2004). Integration of photosynthetic protein molecular complexes in solid-state electronic devices. *Nano Letters*, 4(6), pp. 1079–1083.

Deepankumar K., George A., Krishna P., Ilamaram M., Kamini N., Senthil T., Easwaramoorthi S. & Ayyadurai N. (2017). Next Generation Designed Protein as a Photosensitizer for Biophotovoltaics Prepared by Expanding the Genetic Code. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 5(1), pp. 72–77.

Desjardins P., Hansen J. & Allen M. (2009). Microvolume Protein Concentration Determination Using the NanoDrop 2000c Spectrophotometer. *Journal of Visualized Experiments*, (33), pp. 3–5.

Ducret A., Sidler W., Wehrli E. & Zuber H. (1996). Isolation, characterization and electron microscopy analysis of a hemidiscoidal phycobilisome type from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *European journal of biochemistry / FEBS*, 236, pp. 1010–1024.

Enciso P., Cabrerizo F., Gancheff J., Denis P. & Cerdá M. (2013). Phycocyanin as Potential Natural Dye for its Use in Photovoltaic Cells. *Journal of Applied Solution Chemistry and Modeling*, 2, pp. 225–233.

Enciso P., Decoppet J., Moehl T., Grätzel M., Wörner M. & Cerdá M. (2016). Influence of the adsorption of phycocyanin on the performance in DSS cells: And electrochemical and QCM evaluation. *International Journal of Electrochemical Science*, 11(5), pp. 3604–3614.

Enciso P. & Cerdá, M. (2016). Solar cells based on the use of photosensitizers obtained from Antarctic red algae. *Cold Regions Science and Technology*, 126, pp. 51–54.

- Enciso P., Woerner M. & Cerdá M. (2018). Photovoltaic cells based on the use of natural pigments : Phycoerythrin from red-antarctic algae as sensitizers for DSSC. *MRS Advances*, 3(68), pp. 3557–3562.
- Facci P., Erokhin V. & Nicolini C. (1994). Scanning tunnelling microscopy of a monolayer of reaction centres. *Thin Solid Films*, 243(1–2), pp. 403–406.
- Famm K. & Winter G. (2006). Engineering aggregation-resistant proteins by directed evolution. *Protein Engineering, Design and Selection*, 19(10), pp. 479–481.
- Francavilla M., Franchi M., Monteleone M. & Caroppo C. (2013). The red seaweed *Gracilaria gracilis* as a multi products source. *Marine Drugs*, 11(10), pp. 3754–3776.
- Francavilla M., Manara P., Kamaterou P., Monteleone M. & Zabaniotou A. (2014). Cascade approach of red macroalgae *Gracilaria gracilis* sustainable valorization by extraction of phycobiliproteins and pyrolysis of residue, *Bioresource Technology*, 184, pp. 305–313.
- French D. & Edsall J. (1945). The Reactions of Formaldehyde with Amino Acids and Proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 2(C), pp. 277–335.
- Ghann W., Kang H., Sheikh T., Yadav S., Chavez-Gil T. & Nesbitt F. (2017). Fabrication , Optimization and Characterization of Natural Dye Sensitized Solar Cell. *Nature Publishing Group*, (June 2016), pp. 1–12.
- Glauer M., Sidler W., Graham K., Bryant D., Frank G., Wehrli E. & Zuber H. (1992). Three C-phycoerythrin-associated linker polypeptides in the phycobilisome of green-light-grown *Calothrix* sp. PCC 7601 (cyanobacteria), *FEBS Letters*, 297(1–2), pp. 19–23.
- Glazer A. (1985). Light harvesting by phycobilisomes. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*, 14(64), pp. 47–77.
- Glazer, A. (1988). Phycobilisomes. *Methods Enzymol.*, 167(1980), pp. 304–312.
- Glazer A. & Cohen-Bazire G. (2006). Subunit Structure of the Phycobiliproteins of Blue Green Algae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(7), pp. 1398–1401.
- Gómez I., Figueroa F., Huovinen P., Ulloa N. & Morales V. (2005). Photosynthesis of the red alga *Gracilaria chilensis* under natural solar radiation in an estuary in southern Chile. *Aquaculture*, 244(1–4), pp. 369–382.
- González-Mendoza L. (2014). Diseño de un fotoánodo para celdas fotoelectroquímicas empleando técnicas electroquímicas. *Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del estado de Mexico*.

Green M., Emery K., Hishikawa Y. & Warta W. (2010). Solar cell efficiency tables (version 36). *Progress in Photovoltaics: Research and Applications*, 18(5), pp. 346–352.

Gu P., Yang D., Zhu X., Sun H. & Li J. (2018). Performance of dye - sensitized solar cells based on natural dyes. *Optical and Quantum Electronics*, 50(5), p. 223.

Gunda N., Singh M., Norman L., Kaur K. & Mitra S. (2014). Optimization and characterization of biomolecule immobilization on silicon substrates using (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde linker. *Applied Surface Science*, 305, pp. 522–530.

Hajdu K., Gergely C., Martin M., Cloitre T., Zimányi L., Tenger K., Khoroshyy P., Palestino G., Agarwal V., Hernádi K., Németh Z. & Nagy L. (2012). Porous Silicon/Photosynthetic Reaction Center Hybrid Nanostructure. *Langmuir*, 28(32), pp. 11866–11873.

Hardin, B., Hoke E., Armstrong P., Yum J., Comte P., Torres T., Fréchet J., Nazeeruddin M., Grätzel M. & McGehee M. (2009). Increased light harvesting in dye-sensitized solar cells with energy relay dyes. *Nature Photonics*, 3(7), pp. 406–411.

Hilal H., El M., Nehme B. & Ghaddar T., (2018). Large Enhancement of Dye Sensitized Solar Cell Efficiency by co-Sensitizing Pyridyl- with Carboxylic Acid-based Dyes Large Enhancement of Dye Sensitized Solar Cell Efficiency by co-Sensitizing Pyridyl- with Carboxylic Acid-based Dyes. *Appl. Energy Mater*, 1(6), pp. 2776–2783.

Hoffman E., Frey B., Smith L. & Auble D. (2015). Formaldehyde crosslinking: A tool for the study of chromatin complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 290(44), pp. 26404–26411.

Hu P., Cheng Z., Yuan F., Ling J., Yu L. & Liang R. (2008). Magnetic particle-based sandwich sensor with DNA-modified carbon nanotubes as recognition elements for detection of DNA hybridization. *Analytical Chemistry*, 80(5), pp. 1819–1823.

Hug H., Bader M., Mair P. & Glatzel T. (2014). Biophotovoltaics: Natural pigments in dye-sensitized solar cells. *Applied Energy*, 115, pp. 216–225.

Ismail M. & Osman M. (2016). Seasonal fluctuation of photosynthetic pigments of most common red seaweeds species collected from Abu Qir, Alexandria, Egypt. *Revista de Biologia Marina y Oceanografía*, 51(3), pp. 515–525.

Iqbal M., Ali S. & Khan S. (2019). Progress in dye sensitized solar cell by incorporating natural photosensitizers. *Solar Energy*, 181(15), pp. 490–509.

Jallet D., Gwizdala M. & Kirilovsky D. (2012). ApcD, ApcF and ApcE are not required for the Orange Carotenoid Protein related phycobilisome fluorescence quenching in the

cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817(8), pp. 1418–1427.

Janfaza S., Janfaza S., Molaeirad A., Mohamadpour R., Khayati M. & Mehrvand J. (2014). Efficient Bio-Nano Hybrid Solar Cells via Purple Membrane as Sensitizer. *BioNanoScience*, 4(1), pp. 71–77.

Jesionowski T., Zdarta J. & Krajewska B. (2014). Enzyme immobilization by adsorption: A review. *Adsorption*, 20(5–6), pp. 801–821.

Kakiage K., Aoyama Y., Yano T., Otsuka T., Kyomen T., Unno M. & Hanaya M. (2014). An achievement of over 12 percent efficiency in an organic dye-sensitized solar cell. *Chemical communications*, 50(48), pp. 6379–81.

Kamran M., Delgado J., Friebe V., Aartsma T. & Frese R. (2014). Photosynthetic Protein Complexes as Bio-photovoltaic Building Blocks Retaining a High Internal Quantum Efficiency. *Biomacromolecules*, 15(8), pp. 2833–2838.

Kannaujiya V. & Sinha R. (2016). An Efficient Method for the Separation and Purification of Phycobiliproteins from a Rice-Field Cyanobacterium *Nostoc* sp. Strain HKAR-11. *Chromatographia*, 79(5–6), pp. 335–343.

Karpulevich A., Maksimov E., Gorokhov V., Churin A., Ivanov M. & Paschenko V. (2017). Covalently linked hybrid structures of semiconductor nanocrystals and allophycocyanin. *Nanotechnologies in Russia*, 12(1–2), pp. 98–106.

Kast J. & Klockenbusch C. (2010). Optimization of formaldehyde cross-linking for protein interaction analysis of non-tagged integrin $\beta 1$. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, pp. 1-13.

Kathiravan A., Chandramohan M., Renganathan R. & Sekar S. (2009). Photoinduced electron transfer from phycoerythrin to colloidal metal semiconductor nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A*, 72(3), pp. 496–501.

Kathiravan A. & Renganathan R. (2009). Photosensitization of colloidal TiO₂ nanoparticles with phycocyanin pigment. *Journal of Colloid and Interface Science*, 335(2), pp. 196–202.

Kawsar S., Fujii Y., Matsumoto R., Yasumitsu H. & Ozeki Y. (2011). Protein R-phycoerythrin from marine red alga *Amphiroa anceps*: extraction, purification and characterization. *Phytologia Balcanica*, 17(3), pp. 347–354.

Kennedy-darling J. & Smith L. (2014). Measuring the Formaldehyde Protein–DNA Cross-Link Reversal Rate. *Annal.Chem.*, 86, pp. 5678-5681.

Killian M. (2013). Organic Modification of TiO₂ and other Metal Oxides with SAMs and Proteins a Surface Analytical Investigation. *Tesis Doctoral, Universidad de Erlangen-Nürnberg, Alemania.*

Kim Y., Shin S., Lee J., Yang K. & Nam K. (2014). Hybrid system of semiconductor and photosynthetic protein. *Nanotechnology*, 25(34), p. 342001.

Kondo M., Nakamura Y., Fujii K., Nagata M., Suemori Y., Dewa T., Iida K., Gardiner A., Cogdell R. & Nango M. (2007). Self-Assembled Monolayer of Light-Harvesting Core Complexes from Photosynthetic Bacteria on a Gold Electrode Modified with Alkanethiols. pp. 2457–2463.

Kumara G., Kaneko S., Okuya M., Onwona-Agyeman B., Konno A. & Tennakone K. (2006). Shiso leaf pigments for dye-sensitized solid-state solar cell. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 90(9), pp. 1220–1226.

Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp. 680–685.

Lee C., Li C. & Ho K. (2017). Use of organic materials in dye-sensitized solar cells. *Materials Today*, 20(5), pp. 267–283.

Li R., Cui X., Hu W., Lu Z. & Li C. (2010). Fabrication of oriented poly-l-lysine/bacteriorhodopsin-embedded purple membrane multilayer structure for enhanced photoelectric response. *Journal of Colloid and Interface Science*, 344(1), pp. 150–157.

Liu, J. Friebe V., Frese R. & Jones M. (2019). Polychromatic solar energy conversion in pigment-protein chimeras that unite the two kingdoms of (bacterio)chlorophyll-based photosynthesis. *bioRxiv*, p. 565283.

Lu-Ning L., Xiu-Lan C., Yu-Zhong Z. & Bai-Cheng Z. (2005). Characterization, structure and function of linker polypeptides in phycobilisomes of cyanobacteria and red algae: An overview. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1708(2), pp. 133–142.

Lu-Ning L., Xiu-Lan C, Xi-Ying Z., Yu-Zhong Z. & Bai-Cheng Z. (2005) ‘One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*’, *Journal of Biotechnology*, 116(1).

Lu-Ning L., Xiu-Lan C, Xi-Ying Z., Yu-Zhong Z. & Bai-Cheng Z. (2011). Spectroscopic identification of interactions of formaldehyde with bovine serum albumin. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 25(2), pp. 95–100.

Loreto S., Cuypers B., Brokken J., Van Doorslaer S., De Wael K. & Meynen V. (2017a). The effect of buffer solution on the adsorption and stability of horse heart myoglobin in

commercial mesoporous titanium dioxide : a matter of the right choice. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19, pp. 13503–13514.

Lowe C. (2007). Optimization and Stabilization of Phycobilisomes for use in Applied Phototechnology. *Honors Thesis Projects, University of Tennessee, Knoxville*.

Lu Y., Pelton R. & Brook M. (2007). Biotinylation of TiO₂ nanoparticles and their conjugation with streptavidin. *Langmuir*, 23(10), pp. 5630–5637.

Ludin N., Mahmoud A., Bakar A., Amir A., Kadhun H., Sopian K., Shazlinah N. & Karim A. (2014). Review on the development of natural dye photosensitizer for dye-sensitized solar cells. *Renewable and Sustainable Energy Review*, 31, pp. 386–396.

Lundell D., Yamanaka G & Glazer A. (1981). A terminal energy acceptor of the phycobilisome: The 75,000-dalton polypeptide of *Synechococcus* 6301 phycobilisomes - A new biliprotein. *Journal of Cell Biology*, 91(1), pp. 315–319.

Ma X., Mohammad S. & Kim S. (1991). Heparin binding on poly(L-lysine) immobilized surface. *Journal of Colloid And Interface Science*, 147(1), pp. 251–261.

Majoul N., Aouida S. & Bessaïs B. (2015). Progress of porous silicon APTES-functionalization by FTIR investigations. *Applied Surface Science*, 331, pp. 388–391.

Malairaj S., Muthu S., Gopal V., Perumal P. & Ramasamy R. (2016). Qualitative and quantitative determination of R-phycoerythrin from *Halymenia floresia* (Clemente) C. Agardh by polyacrylamide gel using electrophoretic elution technique. *Journal of Chromatography A*, 1454(July), pp. 120–126.

Manirafasha E., Ndikubwimana T., Zeng X., Lu Y & Jing K. (2016). Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. *Biochemical Engineering Journal*, 109, pp. 282–296.

Mansur H., Oréface R., Pereira M., Lobato Z., Vasconcelos W. & Machado L. (2002). FTIR and UV–vis study of chemically engineered biomaterial surfaces for protein immobilization. *Spectroscopy*, 16(3–4), pp. 351–360.

Martelli G., Folli C., Visai L., Daglia M. & Ferrari D. (2014). Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. *Process Biochemistry*, 49(1), pp. 154–159.

Martins M., Vieira F., Correia I., Ferreira R., Abreu H., Coutinho J. & Ventura S. (2016). Recovery of phycobiliproteins from the red macroalga *Gracilaria sp.* using ionic liquid aqueous solutions. *Green Chem.*, 1, pp. 63–68.

- Marucco A., Fenoglio I., Turci F. & Fubini B. (2013). Interaction of fibrinogen and albumin with titanium dioxide nanoparticles of different crystalline phases. *Journal of Physics: Conference Series*, 429(June 2016), p. 012014.
- Marucco A., Catalano F., Fenoglio I., Turci F., Martra G. & Fubini, B. (2015). Possible chemical source of discrepancy between in vitro and in vivo tests in nanotoxicology caused by strong adsorption of buffer components. *Chemical Research in Toxicology*, 28(1), pp. 87–91.
- Mason J. & O’leary T. (1991). Effects of Formaldehyde Fixation on Protein Secondary Structure: A Calorimetric and Infrared Spectroscopic Investigation. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 39(2), pp. 225–229.
- Mateo C., Palomo J., Fuentes M., Betancor L., Grazu V., López-Gallego F., Pessela B., Hidalgo A., Fernández-Lorente G., Fernández-Lafuente R. & Guisán, J. (2006). Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), pp. 274–280.
- Mathew S., Yella A., Gao P., Humphry-Baker R., Curchod B., Ashari-Astani N., Tavernelli I., Rothlisberger U., Nazeeruddin K. & Grätzel M. (2014). Dye-sensitized solar cells with 13% efficiency achieved through the molecular engineering of porphyrin sensitizers. *Nature Chemistry*, 6(3), pp. 242–247.
- Mehmood U., Rahman S., Harrabi K., Hussein I. & Reddy B. (2014). Recent Advances in Dye Sensitized Solar Cells. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2014, pp. 1–12.
- Mella C. (2011). Estudio de la arquitectura de un ficobilisoma de *Gracilaria chilensis*. *Tesis para optar al título de Magíster en Bioquímica y Bioinformática. Universidad de Concepción*.
- Mensi F., Ksouri J., Seale E., Romdhane M. & Fleurence, J. (2012). A statistical approach for optimization of R-phycoerythrin extraction from the red algae *Gracilaria verrucosa* by enzymatic hydrolysis using central composite design and desirability function. *Journal of Applied Phycology*, 24(4), pp. 915–926.
- Meroni D., Lo Presti L., Di Liberto G., Ceotto M., Acres R., Prince K., Bellani R., Soliveri G. & Ardizzone S. (2017). A close look at the structure of the TiO₂-APTES interface in hybrid nanomaterials and its degradation pathway: An experimental and theoretical study. *Journal of Physical Chemistry C*, 121(1), pp. 430–440.

Metz B., Jiskoot W., Hennink W., Crommelin D. & Kersten G., (2003). Physicochemical and immunochemical techniques predict the quality of diphtheria toxoid vaccines. *Vaccine* 22, pp. 156–167.

Metz B., Kersten G., Hoogerhout P., Brugghe H., Timmermans H., de Jong A., Meiring H., Hove J., Hennink W., Crommelin D., & Jiskoot W. (2004). Identification of Formaldehyde-induced Modifications in Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8), pp. 6235–6243.

Molamohammadi S., Seyed Jalili Y. & Riazi G. (2018). Photosystem I application in biohybrid polymer solar cells. *AIP Advances*, 8(9), 95319.

Monsan P. (1978). Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization. *Journal of Molecular Catalysis*, 3(5), 371- 384.

Moreira L., de Zea Bermudez V., Aguilar H. & Magalhães A. (2008). Dye-sensitized solar cells: A safe bet for the future. *Energy & Environmental Science*, 1(6), p. 655. doi: 10.1039/b807236a.

Morales M. (2012). Estudios in vitro e in silico de la estabilidad espectroscópica de Ficocianina presente en *Gracilaria chilensis*. *Tesis para optar al grado de Bioquímico. Universidad de Concepción*.

Moulton S., Barisci J., McQuillan A. & Wallace G. (2003). ATR-IR spectroscopic studies of the influence of phosphate buffer on adsorption of immunoglobulin G to TiO₂. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 220(1-3), 159-167.

Mulder C., Theogarajan L., Currie M., Mapel J., Baldo M., Vaughn M., Willard P., Bruce B., Moss M., McLain C. & Morseman, J. (2009). Luminescent solar concentrators employing phycobilisomes. *Advanced Materials*, 21(31), pp. 3181–3185.

Munier M., Jubeau S., Wijaya A., Morançais M., Dumay J., Marchal L., Jaouen P. & Fleurence J. (2014). Physicochemical factors affecting the stability of two pigments: R-phycoerythrin of *Grateloupia turuturu* and B-phycoerythrin of *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry*, 150, pp. 400–407.

Musazade E., Voloshin R., Brady N., Mondal J., Atashova S., Zharmukhamedov S., Huseynova I., Ramakrishna S., Najafpour M., Shen J., Bruce B. & Allakhverdiev S. (2018). Biohybrid solar cells: Fundamentals, progress, and challenges. *Journal of Photochemistry and Photobiology C*, 35, pp. 134–156.

Nagata M., Amano M., Joke T., Fujii K., Okuda A., Kondo M., Ishigure S., Dewa T., Iida K., Secundo F., Amao Y., Hashimoto H. & Nango M. (2012). Immobilization and photocurrent activity of a light-harvesting antenna complex II, LHCII, isolated from a plant on electrodes. *ACS Macro Letters*, 1(2), pp. 296–299.

- Narayan M. (2012). Review: Dye sensitized solar cells based on natural photosensitizers. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(1), pp. 208–215.
- Nagy L., Magyar M., Szabó T., Hajdu K., Giotta L., Dorogi M. & Milano F. (2014). Photosynthetic Machineries in Nano-Systems. *Current protein & peptide science*, 15, pp. 363–373.
- Nam S., Cho S. & Boo J. (2012). Growth behavior of titanium dioxide thin films at different precursor temperatures. *Nanoscale Research Letters*, 7(1), pp. 1–6.
- Niu J., Xu M., Wang G., Zhang K. & Peng G. (2013). Comprehensive extraction of agar and R-phycoerythrin from *Gracilaria lemaneiformis* (Bangiales, Rhodophyta). *Indian Journal of Marine Sciences*, 42(1), pp. 21–28.
- Niu J., Wang G. & Tseng C. (2006). Method for large-scale isolation and purification of R-phycoerythrin from red alga *Polysiphonia urceolata*. *Protein Expression and Purification*, 49(1), pp. 23–31.
- Noda K., Akutsu H., Miyake J., Nakamura C. & Hara M. (1998). Interaction of poly-L-lysine with photosynthetic reaction center for the Langmuir-Blodgett film preparation. *Supramolecular Science*, 5(5–6), pp. 773–775.
- Nwagu T, Okolo B & Aoyagi H. (2011). Immobilization of raw starch digesting amylase on silica gel: A comparative study. *African Journal of Biotechnology*, 10(71).
- O'Regan B. & Gratzel M. (1991). A Low-Cost, High-Efficiency Solar-Cell Based on Dye-Sensitized Colloidal TiO₂ Films. *Nature*, 353(6346), pp. 737–740.
- Obotowo I., Obot I. & Ekpe U. (2016). Organic sensitizers for dye-sensitized solar cell (DSSC): Properties from computation, progress and future perspectives. *Journal of Molecular Structure*, 1122, pp. 80–87.
- Palomares E., Jang S., Nazeeruddin M., Cid J., Martínez-Ferrero E., Grätzel M., Yum J., Torres T. & Ko J. (2007). Molecular Cosensitization for Efficient Panchromatic Dye-Sensitized Solar Cells. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(44), pp. 8358–8362.
- Park J., Schwartz Z., Olivares-Navarrete R., Boyan B. & Tannenbaum R. (2011). Enhancement of surface wettability via the modification of microtextured titanium implant surfaces with polyelectrolytes. *Langmuir*, 27(10), pp. 5976–5985.
- Parkes M., Myant C., Cann P. & Wong J. (2014). The effect of buffer solution choice on protein adsorption and lubrication. *Tribology International*, 72, pp. 108–117.

Pons L., Luc M., Villaume C., Mrabet N., Gueant J. & Fleurence J. (2000). One-step purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Palmaria palmata* using preparative polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 739, pp. 117–123.

Pop-Georgievski O., Kubies D., Zemek J., Neykova N., Demianchuk R., Chánová E., Šlouf M., Houska M. & Rypáček, F. (2015). Self-assembled anchor layers/polysaccharide coatings on titanium surfaces: A study of functionalization and stability. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6(1), pp. 617–631.

Popoola I., Idris K., Gondal M., Alghamdi J. & Qahtan T. (2018). Photofabrication of Highly Transparent Platinum Counter Electrodes at Ambient Temperature for Bifacial Dye Sensitized Solar Cells. *Scientific Reports*. Springer US, 8, pp. 1–12.

Primm T., Walker K. & Gilbert H. (1996). Facilitated Protein Aggregation. *Biochemistry*, 271(52), pp. 33664–33669.

Pu Y., Zhu G., Ge B., Yu D., Wang Y. & Qin S. (2013). Photocurrent generation by recombinant allophycocyanin trimer multilayer on TiO₂ electrode. *Chinese Chemical Letters*, 24(2), pp. 163–166.

Quiñones C. (2012). Síntesis de películas transparentes y conductoras utilizadas en celdas solares sensibilizadas por colorantes. *Elementos*, 2(1), pp. 169–180.

Radovic L. & Schobert, H. (1997). Energy and fuels in society, Chapter 11: Fossil Fuels: Environmental effects. New York: McGraw-Hill. pp. 484.

Rait V., Leary T. & Mason J. (2004). Modeling formalin fixation and antigen retrieval with bovine pancreatic ribonuclease A : I — Structural and functional alterations, *Laboratory Investigation* 84, pp. 292–299.

Rajan A. & Cindrella L. (2019). Studies on new natural dye sensitizers from *Indigofera tinctoria* in dye- sensitized solar cells. *Optical Materials*, 88, pp. 39–47.

Raps S. (2008). Differentiation between Phycobiliprotein and Colorless Linker Polypeptides by Fluorescence in the Presence of ZnSO₄. *Plant Physiology*, 92(2), pp. 358–362.

Rastogi R., Sonani R. & Madamwar D. (2015). Physico-chemical factors affecting the in vitro stability of phycobiliproteins from *Phormidium rubidum* A09DM. *Bioresource Technology*, 190, pp. 219–226.

Redlinger T. & Gantt E. (1981). Phycobilisome Structure of *Porphyridium cruentum*: Polypeptide composition. *Plant physiology*, 68(6), pp. 1375–1379.

Richhariya, G., Kumar A., Tekasakul P. & Gupta B. (2017). Natural dyes for dye sensitized solar cell: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 69, pp. 705–718.

Rito-Palomares M., Nun L. & Amador D. (2001). Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for c-phycoerythrin recovery from *Spirulina maxima*. 1280, pp. 1273–1280.

Saengdee P., Chaisriratanakul W., Bunjongpru W., Sripumkhai W., Srisuwan A., Jeamsaksiri W., Hruanun C., Poyai A. & Promptmas C. (2015). Surface modification of silicon dioxide, silicon nitride and titanium oxynitride for lactate dehydrogenase immobilization. *Biosensors and Bioelectronics*, 67, pp. 134–138.

Salnikova M., Joshi S., Howard R., Warny M. & Russell M. (2008). Physical Characterization of Clostridium Difficile Toxins and Toxoids: Effect of the Formaldehyde Crosslinking on Thermal Stability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(9), pp. 3735–3752.

Sanjay P., Deepa K., Madhavan J. & Senthil S. (2018). Performance of TiO₂ based dye-sensitized solar cells fabricated with dye extracted from leaves of *Peltophorum pterocarpum* and *Acalypha amentacea* as sensitizer. *Materials Letters*, 219(15), pp. 158–162.

Sathyajothi, S., Jayavel, R. & Dhanemozhi, A. C. (2017) ‘ScienceDirect The Fabrication of Natural Dye Sensitized Solar Cell (Dssc) based on TiO₂ Using Henna And Beetroot Dye Extracts’, *Materials Today: Proceedings*. Elsevier Ltd, 4(2), pp. 668–676.

Seery M., George R., Floris P. & Pillai S. (2007). Silver doped titanium dioxide nanomaterials for enhanced visible light photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 189(2–3), pp. 258–263.

Senthilkumar N., Suresh V., Thangam R., Kurinjimalar C., Kavitha G., Murugan P. & Rengasamy R. (2013). Isolation and characterization of macromolecular protein R-Phycoerythrin from *Portieria hornemannii*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 55, pp. 150–160.

Shalini S., Balasundara P., Prasanna S., Mallick T. & Senthilarasu S. (2015). Review on natural dye sensitized solar cells: Operation, materials and methods. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 51, pp. 1306–1325.

Shalini S., Balasundaraprabhu R., Kumar S., Prabavathy N., Senthilarasu S. & Prasanna S. (2016). Status and outlook of sensitizers/dyes used in dye sensitized solar cells (DSSC): a review. *International Journal of Energy Research*, 40(10), pp. 1303–1320.

Sharma K., Sharma V. & Sharma S. (2018). Dye-Sensitized Solar Cells : Fundamentals and Current Status. *Nanoscale Research Letters*, 13, pp. 381.

Sikong L., Masae M., Kooptarnond K., Taweepreda W. & Saito F. (2012). Improvement of hydrophilic property of rubber dipping former surface with Ni/B/TiO₂ nano-composite film. *Applied Surface Science*, 258(10), pp. 4436–4443.

Sridharan A., Muthuswamy J., LaBelle J. & Pizziconi V. (2008). Immobilization of functional light antenna structures derived from the filamentous green bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *Langmuir*, 24(15), pp. 8078–8089.

Sokol K., Robinson W., Warnan J., Kornienko N., Nowaczyk M., Ruff A., Zhang J. & Reisner E. (2018). Bias-free photoelectrochemical water splitting with photosystem II on a dye-sensitized photoanode wired to hydrogenase. *Nature Energy*, 3(11), pp. 944–951.

Son K., Ahn S., Kim J. & Koh W. (2011). Graft copolymer-templated mesoporous TiO₂ films micropatterned with poly(ethylene glycol) hydrogel: Novel platform for highly sensitive protein microarrays. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 3(2), pp. 573–581.

Sonani R., Rastogi R., Patel R., Madamwar R. & Madamwar D. (2016). Recent advances in production, purification and applications of phycobiliproteins. *World J Biol Chem*, 7(71), pp. 100–109.

Sridharan, A., Muthuswamy J., LaBelle J. & Pizziconi V. (2008). Immobilization of functional light antenna structures derived from the filamentous green bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *Langmuir*, 24(15), pp. 8078–8089.

Stearns N., Zhou S., Petri M., Binder S. & Pisetsky D. (2016). The use of Poly-L-Lysine as a capture agent to enhance the detection of antinuclear antibodies by ELISA. *PLoS ONE*, 11(9), pp. 1–25.

Suarez J. (2014). Estudio de la estabilidad de la b-ficoeritrina procedente del alga roja *porphyridium cruentum* en función de la temperatura, para su utilización como colorante natural. *Tesis, Departamento de Química y Física, Universidad de Almería*, p. 55.

Sudhakar M., Jagatheesan A., Perumal K. & Arunkumar K. (2015). Methods of phycobiliprotein extraction from *Gracilaria crassa* and its applications in food colourants. *Algal Research*, 8, pp. 115–120.

Sudhakar M., Saraswathi M. & Nair B. (2014). Extraction, purification and application study of R-Phycoerythrin from *Gracilaria corticata* (J. Agardh). *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 5(4), pp. 371–374.

Sun L., Wang S. & Qiao Z. (2006). Chemical stabilization of the phycocyanin from cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Journal of Biotechnology*, 121(4), pp. 563–569.

Sun L., Wang S., Gong X., Zhao M., Fu X. & Wang L. (2009). Isolation, purification and characteristics of R-phycoerythrin from a marine macroalga *Heterosiphonia japonica*. *Protein Expression and Purification*, 64(2), pp. 146–154.

Suria S., Pewarna T., Jadi S. & Nanohablur B. (2012). Natural Dye-Sensitized Solar Cell Based on Nanocrystalline TiO₂. *Sains Malaysiana*, 41(8), pp. 1011–1016.

Tan S., Crouch L., Jones M. & Welland M. (2012). Generation of alternating current in response to discontinuous illumination by photoelectrochemical cells based on photosynthetic proteins. *Angewandte Chemie - International Edition*, 51(27), pp. 6667–6671.

Tan S., Yan F., Crouch L., Robertson J., Jones M. & Welland M. (2013). Superhydrophobic Carbon Nanotube Electrode Produces a Near-Symmetrical Alternating Current from Photosynthetic. *Adv. Funct. Mater*, 23, pp. 5556–5563.

Tang J., Liu Z., Kang J. & Zhang Y. (2010). Determination of salbutamol using R-phycoerythrin immobilized on eggshell membrane surface as a fluorescence probe. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(7), pp. 3015–3022.

Telford W., Moss M., Morseman J. & Allnut F. (2001). Cyanobacterial stabilized phycobilisomes as fluorochromes for extracellular antigen detection by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 254(1–2), pp. 13–30.

Tello-Ireland C., Lemus-Mondaca R., Vega-Gálvez A., López J. & Di Scala K. (2011). Influence of hot-air temperature on drying kinetics, functional properties, colour, phycobiliproteins, antioxidant capacity, texture and agar yield of alga *Gracilaria chilensis*. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), pp. 2112–2118.

Toews J., Rogalski J. & Kast J. (2010). Analytica Chimica Acta Accessibility governs the relative reactivity of basic residues in formaldehyde-induced protein modifications. *Analytica Chimica Acta*, 676(1–2), pp. 60–67.

Vashist S., Lam E., Hrapovic S., Male K. & Luong J. (2014). Immobilization of antibodies and enzymes on 3-aminopropyltriethoxysilane-functionalized bioanalytical platforms for biosensors and diagnostics. *Chemical Reviews*, 114(21), pp. 11083–11130.

Vagenende V., Yap M. & Trout B. (2009). Mechanisms of Protein Stabilization and Prevention of Protein Aggregation by Glycerol. *Biochemistry. American Chemical Society*, 48(46), pp. 11084–11096.

Vásquez-Suárez A., Lobos-González F., Cronshaw A., Sepálveda-Ugarte J., Figueroa M., Dagnino-Leone J., Bunster M., Martínez-Oyanedel J. (2018). The γ^{33} subunit of R-phycoerythrin from *Gracilaria chilensis* has a typical double linked phycourobilin similar to γ subunit. *PLoS ONE* 13(4), pp. 1-13.

Wang G. (2002). Isolation and purification of phycoerythrin from red alga *Gracilaria verrucosa* by expanded-bed-adsorption and ion-exchange chromatography. *Chromatographia*, 56(7–8), pp. 509–513.

- Wang L., Tian L., Deng X., Zhang M., Sun S., Zhang W. & Zhao L. (2014). Photosensitizers from spirulina for solar cell. *Journal of Chemistry*, pp. 1-5.
- Wang X., Matsuda A., Koyama Y., Nagae H., Sasaki S., Tamiaki H. & Wada Y. (2006). Effects of plant carotenoid spacers on the performance of a dye-sensitized solar cell using a chlorophyll derivative: Enhancement of photocurrent determined by one electron-oxidation potential of each carotenoid. *Chemical Physics Letters*, 423(4–6), pp. 470–475.
- Watté J., Van Gompel W., Lommens P., De Buysser K. & Van Driessche I. (2016). Titania Nanocrystal Surface Functionalization through Silane Chemistry for Low Temperature Deposition on Polymers. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 8(43), pp. 29759–29769.
- Williams, D. & Fleming, I. (1995). Spectroscopic methods in organic. London: McGraw Hill.
- Williams Shervonda. (2007). Characterization of Enzymes Involved in Bilin Attachment to Allophycocyanin in the *Cyanobacterium Synechococcus* sp. PCC 7002. *Thesis, University of New Orleans*, pp. 624.
- Wilson M. (2005). Electrochemical immunosensors for the simultaneous detection of two tumor markers. *Analytical Chemistry*, 77(5), pp. 1496–1502.
- Won-yeop R., Hojin J., Ho-sub K., Woo-jae C., Jung Sang S. & Bong-hyun Jun. (2015). Recent Progress in Dye-Sensitized Solar Cells for Improving Efficiency: TiO₂ Nanotube Arrays in Active Layer. *Journal of Nanomaterials*, 2015, pp. 1–17.
- Wu L., Liu Y., Chi B., Xu Z., Feng X. & Li S. (2015). An innovative method for immobilizing sucrose isomerase on ϵ -poly-L-lysine modified mesoporous TiO₂. *Food Chemistry*, 187, pp. 182–188.
- Wright M. & Uddin A. (2012). Organic-inorganic hybrid solar cells: A comparative review. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 107, pp. 87–111.
- Xia J., Xu H., Feng X., Xu Z. & Chi B. (2013). Poly(L-diaminopropionic acid), a novel non-proteinic amino acid oligomer co-produced with poly(ϵ -L-lysine) by *Streptomyces albulus* PD-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(17), pp. 7597–7605.
- Yang Ch., Chang Y., Watanabe M., Hon Y. & Chow T. (2012). Phenothiazine derivatives as organic sensitizers for highly efficient dye-sensitized solar cells. *Journal of Materials Chemistry*, 22(3), p. 4040.

- Yang Y., Jankowiak R., Lin C., Pawlak K., Reus M., Holzwarth A. & Li J. (2014). Effect of the LHCII pigment-protein complex aggregation on photovoltaic properties of sensitized TiO₂ solar cells. *Physical chemistry chemical physics*, 16(38), pp. 20856–65.
- Yaghoubi H., Lafalce E., Jun D., Jiang X., Beatty J. & Takshi A. (2015). Large Photocurrent Response and External Quantum Efficiency in Biophotoelectrochemical Cells Incorporating Reaction Center Plus Light Harvesting Complexes. *Biomacromolecules*, 16(4), pp. 1112–1118.
- Yagiuda K., Hemmi A., Ito S., Asano Y., Fushinuki Y., Chen C. & Karube I. (1996). Development of a conductivity-based immunosensor for sensitive detection of methamphetamine (stimulant drug) in human urine. *Biosensors and Bioelectronics*, 11(8), pp. 703–707.
- Yella A., Lee H., Tsao H., Yi C., Chandiran A., Nazeeruddin M., Diao E., Yeh C., Zakeeruddin S. & Gratzel M. (2011). Porphyrin-Sensitized Solar Cells with Cobalt (II/III)-Based Redox Electrolyte Exceed 12 Percent Efficiency. *Science*, 334(6056), pp. 629–634.
- Yu M., Glazer A., Spencer K. & West J. (1981). Phycoerythrins of the Red Alga *Caiithamnion*. *Plant Physiology*, pp. 482–488.
- Yu D., Zhu G., Liu S., Ge B. & Huang F. (2013). Photocurrent activity of light-harvesting complex II isolated from spinach and its pigments in dye-sensitized TiO₂ solar cell. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(36), pp. 16740–16748.
- Yu D., Wang M., Zhu G., Ge B., Liu S. & Huang F. (2015). Enhanced photocurrent production by bio-dyes of photosynthetic macromolecules on designed TiO₂ film. *Scientific Reports*, 5, pp. 9375–9384.
- Zaitsev S., Solovyeva D. & Nabiev I. (2014). Nanobiohybrid structures based on the organized films of photosensitive membrane proteins. *Russian Chemical Reviews*, 83(1), pp. 38–81.
- Zhang L. & Cole, J. M. (2015). Anchoring groups for dye-sensitized solar cells. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(6), pp. 3427–3455.
- Zhou H., Wu L., Gao Y. & Ma T. (2011). Dye-sensitized solar cells using 20 natural dyes as sensitizers. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 219(2–3), pp. 188–194.
- Zhou W., Cao Z., Jiang S., Huang H., Deng L., Liu Y., Shen P., Zhao B., Tan So. & Zhang X. (2012). Porphyrins modified with a low-band-gap chromophore for dye-sensitized solar cells. *Organic Electronics: physics, materials, applications*, 13(4), pp. 560–569.

Zhu Z. (2017). An Overview of Carbon Nanotubes and Graphene for Biosensing Applications. *Nano-Micro Letters*, 9(3), pp. 1–24.

Página web: American Chemical Society. (n.d). How a Solar Cell Works - American Chemical Society. Disponible en : <https://www.acs.org/content/acs/en/education/resources/highschool/chemmatters/past-issues/archive-2013-2014/how-a-solar-cell-works.html>

