



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**SINTESIS ENZIMÁTICA DE POLÍMEROS POTENCIALMENTE CONDUCTORES A PARTIR DE
COMPUESTOS AROMÁTICOS**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. KAREM ZUÑIGA SANCHEZ



TUTOR: Dr. JORGE A. ABURTO ANELL AÑO:2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México al permitirme ampliar en sus aulas mis horizontes dentro del Programa de Posgrado en Ciencias Químicas.

A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), por su apoyo en la realización de este trabajo.

Al Instituto Mexicano del Petróleo por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones bajo la dirección del Dr. Jorge A. Aburto Anell.

DEDICATORIA

A Dios, A mis Padres
A Rosendo Díaz, Diana León Betancourt, Verónica Nava, Beatriz Castro, Martha Rosales y
Carmina Montiel, ya que cada uno de ustedes contribuyó de forma espectacular para que lograra
terminar este trabajo.

INDICE GENERAL

	pág.
Índice General.....	1
Índice de Tablas y Figuras.....	2
Justificación.....	4
Objetivo General.....	6
Objetivos particulares.....	6
Capítulo I	
Introducción.....	7
❖ Síntesis enzimática de polímeros.....	7
❖ Polímeros enzimáticos con propiedades conductoras.....	11
Capítulo II	
Materiales y métodos.....	19
❖ Polimerización enzimática.....	19
❖ Caracterización de los polímeros.....	20
Capítulo III	
Resultados y Discusión.....	22
❖ Características generales.....	22
❖ Espectroscopía UV- Vis.....	26
❖ Espectroscopía de Fluorescencia.....	31
❖ Espectroscopía de Infra- rojo.....	36
❖ Resonancia Magnética Nuclear ^1H y ^{13}C	42
❖ Propiedades Térmicas.....	52
Capítulo IV	
Conclusiones.....	55
Capítulo V	
Referencias.....	57

INDICE DE TABLAS Y FIGURA

	pág.
Figura 1. Ciclo Catalítico general de la peróxidasa de rábano (HRP).....	9
Figura 2. Poliindol _{ACN} , poliindol _{acetona} , poliindol _{dioxano} disueltos en THF.....	23
Figura 3. Polianilina, Polifenol, Poliindol _{acetona} y Heteropolímero disueltos en THF	23
Figura 4. Espectros de UV-Vis de indol y poliindol _{acetona} , poliindol _{ACN} y poliindol _{dioxano}	27
Figura 5. Espectros de UV-Vis del poliindol _{ACN} enzimático y poliindol químico.....	28
Figura 6. Espectros de UV-Vis y de emisión de fenol y polifenol.....	29
Figura 7. Espectros de UV-Vis y de emisión de anilina y polianilina.....	30
Figura 8. Espectros de UV-Vis del copolímero enzimático y sus espectros de emisión.....	31
Figura 9. Espectros de emisión de indol, poliindol _{acetona} , poliindol _{ACN} , poliindol _{dioxano} y poliindol químico.....	33
Figura 10. Espectros de FTIR de los homopolímeros de indol.....	36
Figura 11. Espectros de FTIR de poliindol _{ACN} enzimático y poliindol químico.....	38
Figura 12. Espectros de FTIR de fenol y polifenol.....	39
Figura 13. Espectros de FTIR de anilina y polianilina.....	40
Figura 14. Espectro de FTIR del copolímero.....	41
Figura 15. Espectro de ¹ H RMN de poliindol _{acetona}	44
Figura 16. Espectro de ¹ H RMN de poliindol _{dioxano}	44
Figura 17. Espectro de ¹ H RMN de poliindol _{ACN} enzimático.....	45
Figura 18. Espectro de ¹ H RMN de poliindol químico.....	45
Figura 19. Espectro de ¹ H RMN de polianilina.....	46
Figura 20. Espectro de ¹ H RMN de polifenol.....	46
Figura 21. Espectro de ¹ H RMN del copolímero.....	47

Figura 22. Espectro de ^{13}C RMN de poliindol _{acetona}	48
Figura 23. Espectro de ^{13}C RMN de poliindol _{dioxano}	48
Figura 24. Espectro de ^{13}C RMN de poliindol _{ACN} enzimático.....	49
Figura 25. Espectro de ^{13}C RMN de poliindol químico.....	49
Figura 26. Espectro de ^{13}C RMN de polianilina.....	50
Figura 27. Espectro de ^{13}C RMN de polifenol.....	50
Figura 28. Espectro de ^{13}C RMN del copolímero.....	51
Figura 29. Termogramas de los diferentes poliindoles sintetizados.....	52
Figura 30. Termogramas de los homopolímeros y del copolímero.....	53
Tabla I. Polímeros típicamente producidos por diferentes enzimas.....	11
Tabla II. Resumen de alternativas de síntesis de polímeros conductores y sus desventajas.	13
Tabla III. Formulaciones probadas y características de polifenol y polianilina enzimáticamente sintetizados.....	15
Tabla IV. Características de los polímeros enzimáticamente sintetizados.....	26
Tabla V. Valores de CEM de monómeros y polímeros.....	33

JUSTIFICACIÓN

Un campo que ha atraído un gran interés durante la década pasada es la síntesis y caracterización de polímeros conductores, debido a sus potenciales aplicaciones en muy diversos campos, como diodos emisores de luz, baterías (Saraswathi *et. al.*, 1999), dispositivos electrocrómicos, sensores, escudos electromagnéticos, inhibidores de corrosión y matrices para inmovilización de enzimas (Alvarez *et. al.*, 2003).

Las moléculas con dobles enlaces conjugados y/o capacidad de donar protones son características estructurales que sugieren una potencial utilidad para polímeros conductores. Polímeros, como la polianilina (Sayed y Salem, 2000; Cataldo y Maltese, 2001), el policarbazol (Grazulevicius *et. al.*, 2003), poliindol, polipirrol (Ingnas *et. al.*, 1997), politiofeno (Bakhshi *et. al.*, 1987, Cirpan *et. al.*, 2002), polifenol (Akkara *et. al.*, 1991; Ayyagari *et. al.*, 1996) y polifurano (Bakhshi *et. al.*, 1987) etc., han sido estudiados.

Estos polímeros son excelentes conductores, pero el desarrollo de aplicaciones no ha sido fácil debido a la existencia de inconvenientes como baja procesabilidad, baja solubilidad o inestabilidad de los polímeros obtenidos (MacDiarmid y Epstein, 1994).

El empleo de enzimas en síntesis orgánica presenta varias ventajas como: i) catálisis bajo condiciones de reacción moderadas (pH, presión y temperatura) lo cual frecuentemente conlleva una remarcable eficiencia energética, ii) alta enantio, regio y quimioselectividad permitiendo el desarrollo de nuevas reacciones para obtener compuestos funcionales de utilidad, y iii) catálisis natural que permite beneficios comerciales cumpliendo a su vez con requerimientos ecológicos (Kobayashi *et. al.*, 2001).

La técnica de polimerización enzimática ha tenido mucho interés debido a la posibilidad de utilizar diferentes sustratos, entre los que se encuentran los sacáridos, las lactonas (ϵ -caprolactona), el xilano, la quitina, compuestos poliaromáticos (Kobayashi, 1999; Uyama y Kobayashi, 2002), y algunos otros como la anilina y el fenol (Shan y Cao, 2000; Shan *et. al.*, 2003; Fukuoka *et. al.*, 2003; Kobayashi, 1999).

En vista de lo innovador del campo de polimerizaciones enzimáticas y el gran número de polímeros conductores sintetizables, es necesario profundizar en este campo de investigación que permita la obtención de polímeros conductores. Por este motivo, el presente estudio propone la síntesis enzimática de polímeros conductores a partir de compuestos aromáticos utilizando peróxidasa de rábano (HRP).

OBJETIVO GENERAL

- II Obtención de homopolímeros potencialmente conductores a partir de anilina, fenol e indol mediante catálisis enzimática mediada por peroxidasa de rábano.

OBJETIVOS PARTICULARES

- II Definir las condiciones generales de reacción (concentración de sustrato, concentración de catalizador, concentración de agente oxidante y medio de reacción) que permitan la síntesis enzimática de polímeros de fenol, anilina e indol por peroxidasa de rábano.
- II Realizar la síntesis enzimática de homopolímeros a partir de anilina, fenol e indol.
- II Realizar la síntesis enzimática de un heteropolímero a partir de la mezcla de anilina, fenol e indol.
- II Realizar la caracterización de los polímeros obtenidos mediante técnicas cromatográficas, espectroscópicas y térmicas.

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

SINTESIS ENZIMÁTICA DE POLÍMEROS

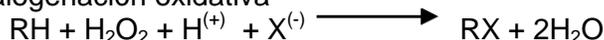
En los últimos años se ha incrementado el interés en el área de reacciones orgánicas catalizadas con enzimas *in vitro*, ya que muchas familias de enzimas pueden ser utilizadas en la transformación de un amplio rango de compuestos.

Las enzimas son generalmente clasificadas en seis grupos, de acuerdo a la naturaleza catalítica de las mismas: Oxidoreductasas, Transferasas, Hidrolasas, Liasas, Isomerasas y Ligasas. Dentro de las oxidoreductasas se encuentran las peroxidasas, las cuales son un tipo de enzimas ampliamente extendido en plantas, tejidos animales y microorganismos. Las peroxidasas catalizan reacciones que pueden ser agrupadas dentro de cuatro categorías (Colonna *et. al.*, 1999):

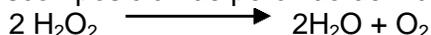
1. Deshidrogenación oxidativa



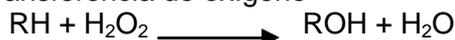
2. Halogenación oxidativa



3. Descomposición de peróxido de hidrógeno



4. Transferencia de oxígeno



Las peroxidasas pueden comportarse como monooxigenasas al catalizar la oxidación de heteroátomos (S-oxidación, y N-oxidación); epoxidación y oxidación de enlace carbono-hidrógeno (oxidación alílica/bencílica, oxidación de alcoholes y oxidación de indoles; Colonna *et. al.*, 1999). La gran mayoría de las peroxidasas contienen una protoporfirina IX (hemo) como grupo prostético, por lo que son consideradas hemoproteínas.

La peroxidasa de rábano (HRP) contiene dos diferentes tipos de centros metálicos el hierro (III) de la protoporfirina IX y dos átomos de calcio. Ambos esenciales para la estructura e integridad funcional de la enzima. El hierro del grupo hemo está pentacoordinado a cuatro nitrógenos pirrólicos; como quinto ligando presenta a un nitrógeno del grupo imidazol de la Histidina proximal (His170). El segundo sitio de coordinación axial está desocupado en el estado basal de la enzima, pero disponible para peróxido de hidrógeno en el proceso de biotransformación. Pequeñas moléculas como monóxido de carbono, cianuro, fluoruro y azida se enlazan al átomo de hierro en este sitio distal dando un complejo sextacoordinado que no presenta actividad catalítica.

Los dos sitios de enlace de calcio están localizados en posiciones distal y proximal al plano del hemo, los cuales se encuentran unidos al hemo por una red de puentes de hidrógeno. Cada sitio está heptacoordinado con ligandos donadores de oxígeno. La pérdida de calcio resulta en un decremento tanto de actividad como de estabilidad térmica, así como un sutil cambio en el ambiente del grupo hemo que puede ser detectado espectroscópicamente. La estructura de la enzima, es casi en su totalidad, α -hélice; aunque también presenta una pequeña región compuesta por una cadena tipo β . Los substratos aromáticos son oxidados en la periferia del grupo hemo pero no se enlazan al hierro del hemo. La HRP es la peroxidasa con la más amplia especificidad para deshidrogenación oxidativa, siendo capaz de producir una gran variedad de compuestos útiles (Veitch, 2004).

El ciclo catalítico general de la peroxidasa de rábano presenta en un inicio a la porfirina con el Fe(III) pentacoordinado en estado basal, a partir del cual la catálisis se inicia por la reducción de una molécula de peróxido de hidrógeno, para dar una oxo Fe(IV) porfirina, la cual es llamada **Compuesto I**. A partir de dicho compuesto se pueden dar tres rutas (Figura 1).

La primera ruta da lugar a la actividad de deshidrogenación oxidativa (peroxidasa), en donde el compuesto I es reducido por ganancia de un electrón para formar un centro oxiferril coordinado a una porfirina (**Compuesto II**) con la respectiva oxidación de una molécula de sustrato orgánico. El compuesto II es reducido nuevamente por un electrón a su estado basal con la oxidación simultánea de otra molécula de sustrato.

La segunda ruta corresponde a la actividad de descomposición de peróxido (catalasa) que consiste en la descomposición de una segunda molécula de H_2O_2 , presentándose la liberación de O_2 y el retorno del grupo hemo al estado basal.

La tercera ruta es la halogenación oxidativa en donde el compuesto I reacciona con un halógeno para formar un intermediario hipohalogenado con una forma de hierro llamada **Compuesto X**. El halógeno es transferido a una molécula de sustrato con la regeneración del estado basal de la peroxidasa.

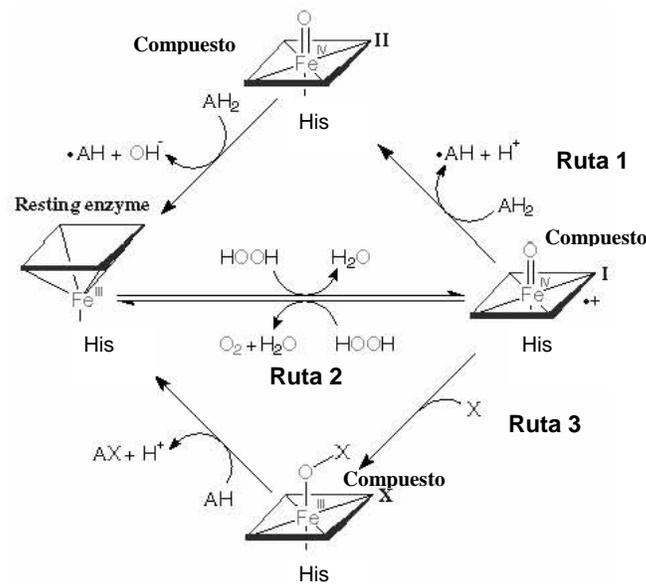


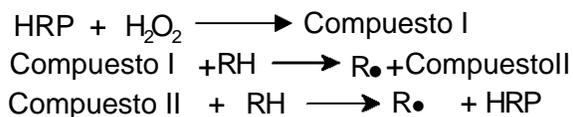
Figura 1. Ciclo catalítico general de la peroxidasa de rábano (HRP).

Muchos roles fisiológicos han sido asignados a las diferentes isoenzimas de la peroxidasa de rábano en la naturaleza, incluyendo el metabolismo del ácido-3-indolin-acético, lignificación, entrecruzamiento de polímeros de la pared celular y resistencia a la infección. El estudio de la combinación entre HRP y el ácido-3-indolin-acético ó sus derivados está siendo evaluado hoy en día como una potencial alternativa de terapia en cáncer (Veitch, 2004).

En la actualidad, se cree que la interacción enzima-sustrato se debe al reconocimiento molecular de la enzima por el sustrato a través de interacciones supramoleculares y no a una estricta relación llave-cerradura. Al no ser absoluta la relación enzima-sustrato, las enzimas pueden, en algunas ocasiones, reconocer sustratos no naturales *in vitro*, situación que ha permitido la síntesis de algunos polímeros no naturales que han llegado a ser de utilidad (Kobayashi *et. al.*, 2001).

Recientemente, HRP ha recibido mucha atención como catalizador de polimerizaciones oxidativas en condiciones suaves de reacción utilizando compuestos fenólicos y derivados de la anilina para producir nuevos compuestos poliaromáticos.

El proceso de polimerización de HRP en presencia de H₂O₂ se simplifica a continuación:



Donde RH corresponde al sustrato (monómero o oligómero) y R[•] son las especies radicales formadas. Estos radicales libres se enlazan para producir el dímero y mediante oxidaciones sucesivas se forma el polímero (Xu *et. al.*, 1996).

La reacción general de acoplamiento puede ser expresada como:



La catálisis enzimática ha provisto de una nueva estrategia de síntesis de polímeros, los cuales han resultado útiles en diversas áreas y muchos de los cuales son difícilmente producidos mediante catálisis química convencional. Kobayashi (1999), informa de la síntesis enzimática *in vitro* de celulosa, amilosa, xilano, quitina y polimerización de azúcares, ésteres, fenol y anilina (Tabla I). Las macromoléculas blanco de la polimerización enzimática se han diversificado desde compuestos como la *o*-toluidina (Nabid y Entezami, 2003), hasta poliaromáticos como antraceno, fluoreno, acenafteno y acenaftileno (Johannes y Majcherczyk, 2000).

Tabla I. Polímeros típicamente producidos por diferentes enzimas (Uyama y Kobayashi, 2002).

Enzimas	Polímero típico
Oxidoreductasas	Polifenoles, polianilinas, vinilpolímeros
Transferasas	Polisacáridos, oligosacáridos cíclicos, poliésteres
Hidrolasas	Polisacáridos, poliésteres, Policarbonatos, poli(aminoácido)s

La polimerización enzimática presenta ventajas en comparación con la catálisis química, como el ser ambientalmente benigno, ofrecer un alto grado de control sobre la temperatura, pH, presión y cinética de la reacción, así como tener el potencial de producir un producto con alto rendimiento. El mayor inconveniente de la síntesis enzimática es que, tan pronto como el polímero se forma en soluciones acuosas, precipita y únicamente se obtienen polímeros de bajo peso molecular (oligómeros; Rao *et. al.*, 1993).

Con el fin de mejorar la procesabilidad y la estabilidad a la oxidación de polímeros obtenidos por vía enzimática, se ha estudiado el efecto del medio de reacción (Akkara *et. al.*, 1991; Ikeda *et. al.*, 1996), la modificación de monómeros en solución acuosa (Ghioureliotis y Nicell 1999), el uso de micelas (Liu *et. al.*, 1999), micelas inversas (Xu *et. al.*, 1996), así como realizar la polimerización en la interfase agua-aire (Bruno *et. al.*, 1995).

POLÍMEROS ENZIMATICOS CON PROPIEDADES CONDUCTORAS

Dentro de la gran variedad de polímeros que pueden ser sintetizados por vía enzimática, es de destacar el esfuerzo reciente en la obtención de aquellos que presentan propiedades conductoras o semi-conductoras. Tales polímeros, son de gran interés en aplicaciones como sensores, baterías recargables y solares, capacitores, membranas, diodos emisores de luz, pantallas ópticas, dispositivos electrocrómicos, matrices para inmovilización de enzimas, inhibición de la corrosión, recubrimientos antiestáticos, etc. (Yagci y Toppare, 2003; Cirpan *et. al.*, 2002; Kizilyar *et. al.*, 1999; Bakhshi *et. al.*, 1987).

Los polímeros con propiedades conductoras que han sido sintetizados se caracterizan por la presencia alternada de enlaces dobles y simples (conjugación) proveyendo un sistema de electrones π altamente deslocalizados a lo largo de las cadenas poliméricas. Las propiedades conductoras o semiconductoras de estos materiales están relacionadas con el traslape de los orbitales p_z de dobles o triples enlaces, lo cual conlleva una buena deslocalización de los electrones de valencia y bandas de conductividad (Alvarez *et. al.*, 2003). Adicionalmente, la geometría planar del sistema aromático extiende el sistema de electrones π conjugados. Por otro lado, los polímeros de heterociclos de cinco miembros tienen una conformación coplanar que se mantiene cuando los heterociclos son unidos por sus posiciones α como en el caso del poliazuleno (Hino *et. al.*, 1994).

Desde 1976 se conocen materiales orgánicos semiconductores como el poli(acetileno), poli(*p*-fenil vinileno), poli(fenileno) y politiofeno (Allard *et. al.*, 2003). La polianilina (PANI) fue sintetizada por primera vez en la segunda mitad del siglo pasado y recientemente re-descubierta como una consecuencia de la investigación de polímeros conductores (Lim *et. al.*, 2000; Liu *et. al.*, 1999; Samuelson *et. al.*, 1998).

Así, el interés en la polianilina (PANI) se ha retomado debido al bajo costo del monómero, la tecnología de síntesis simple, así como su estabilidad química y ambiental (Samuelson *et. al.*, 1998). Por su parte, los polifenoles son de suma importancia en el campo industrial, particularmente las resinas, las cuales son comercialmente producidas como “novolacs” y “resoles” por condensación del fenol con formaldehído a diferentes relaciones molares, dependiendo del tipo de polímero que se pretenda diseñar. A pesar de que el formaldehído es un confirmado carcinógeno y su uso a gran escala en la industria representa riesgos a la salud, su presencia en el producto final es inevitable e indeseable en los métodos de síntesis convencional (Dordick *et. al.*, 1986; Uyama *et. al.*, 1996; Ayyagary *et. al.*, 1996).

Los intentos por obtener materiales con tantas posibilidades de aplicación ha llevado a la investigación en la polimerización de compuestos que contienen átomos de azufre o nitrógeno en su estructura, como los politiofenos y policarbazoles los cuales han mostrado mucho mayor estabilidad térmica, fotoquímica y ambiental que la de polianilinas ó polipirroles (Abthagir *et. al.*, 1998; Cirpan *et. al.*, 2002).

En efecto, los polímeros basados en carbazol son atractivos como fotoconductores o materiales transportadores de carga debido a que los grupos carbazoilo forman fácilmente radicales catiónicos estables, permitiendo la obtención de compuestos que exhiben relativamente alta movilidad de cargas, además de ser un material barato fácilmente obtenido por destilación de alquitrán de carbón (Grazulevicius, *et. al.*, 2003).

Existe una gran cantidad de estudios que refieren las ventajas y desventajas en la síntesis química y/o electroquímica de polímeros conductores a partir de compuestos aromáticos (Tabla II). Sin embargo, la presencia de compuestos altamente tóxicos, condiciones de reacción severas así como propiedades físicas y químicas inadecuadas de los productos son una desventaja.

Tabla II. Resumen de alternativas de síntesis de polímeros conductores y sus desventajas.

Polímero	Métodos de polimerización comúnmente usados	Tipos de polímeros obtenidos	Inconvenientes	Alternativas usadas
Polianilina	Química Electroquímica Galvanostática ó Potenciostática	Homopolímeros y Heteropolímeros en sólidos o películas	<p>Condiciones de síntesis drásticas. (Oxidación de anilina en H₂SO₄ usando dicromato de potasio, persulfato de amonio, peroxidisulfato, nitrato o sulfato cérico como oxidante (Genies <i>et. al.</i>, 1990)).</p> <p>Se requieren pasos adicionales de purificación y separación antes de que el procesado del polímero sea posible. (Samuelson <i>et. al.</i>, 1998)</p> <p>Baja solubilidad en disolventes comunes, poca procesabilidad, estabilidad eléctrica y ambiental (Sun <i>et. al.</i>, 1999)</p>	<p>Utilización de polielectrolitos (lignina sulfonada o poliestireno sulfonado)</p> <p>Utilización de diferentes monómeros. (N,N- alquilanilinas, N-fenil-anilina, o,m,p-toluidina, o,m,p-anilinahalogenada, fenilendiaminas, m-acidoaminobenzensulfónico etc.)</p> <p>Utilización de diferentes tipos de sistemas de reacción. (Mezclas de disolventes orgánicos con agua, micelas inversas, Monocapas de Langmuir (Premachandran <i>et. al.</i>, 1996; Dordick <i>et. al.</i>, 1987))</p> <p>Polimerización oxidativa con enzimas como catalizadores. (Bilirrubin oxidasa, lacasas, Peroxidasa de soya (SBP) o de rábano (HRP))</p>

Polifenol	Química	Resoles y Novolacs (Dordick <i>et. al.</i> , 1987)	<p>Condiciones de síntesis drásticas (Uso limitado de formaldehído a causa de su toxicidad (Ayyagari <i>et. al.</i>, 1995))</p> <p>Pérdida de la conjugación por metilenos o enlaces éter en el proceso de polimerización (Ayyagari <i>et. al.</i>, 1996)</p>	<p>Utilización de diferentes monómeros. (p-fenilfenol, alquilfenol, p-cresol, p- metoxifenol, p-clorofenol, 2,6-dimetilfenol, 4,4 -bifenol etc. (Uyama <i>et. al.</i>, 1994; Kurioka <i>et. al.</i>, 1994))</p> <p>Utilización de diferentes tipos de sistemas de reacción. (Mezclas de disolventes orgánicos con agua, micelas inversas, Monocapas de Langmuir (Premachandran <i>et. al.</i>, 1996; Dordick <i>et. al.</i>, 1987))</p> <p>Utilización de catalizadores inorgánicos (Ayyagari <i>et. al.</i>, 1996)</p> <p>Polimerización oxidativa con enzimas como catalizadores. (Bilirrubin oxidasa, lacasas, Peroxidasa de soya (SBP) o de rábano (HRP))</p>
Politiofeno y Polipirrol	Química Electroquímica	Homopolímeros y heteropolímeros en películas y sólidos.	<p>Presentan baja solubilidad y malas propiedades mecánicas y físicas.</p> <p>Pérdida de la conjugación debido a la obtención de polímeros ramificados.</p>	<p>Utilización de diferentes alquil-monómeros.</p> <p>Utilización de diferentes tipos de sistemas de reacción.</p> <p>Mediante la técnica de polimerización viviente o macromoléculas.</p>
Policarbazol	Química Electroquímica	Poli(N-vinilcarbazol (PVK), poli(N-epoxipropilcarbazol (PEPK) y polímeros que presentan al grupo carbazol en la cadena	Condiciones de síntesis drásticas.	Utilización de diferentes tipos de sistemas de reacción. (mezclas, disoluciones, suspensiones, estado sólido cristalino ó por procesos de deposito de vapor)

De entre los polímeros conductores sintetizados, es notable destacar el poliacetileno, la polianilina, el poli-*p*-fenileno, el poliazuleno, polipirrol, politiofeno, poli(3-metiltiofeno), poli(2-metilanilina) y poli (N-vinilcarbazol). La Tabla III muestra las condiciones de reacción que han sido probadas para algunos de ellos y las características de los polímeros obtenidos en investigaciones previas. De estos, el polipirrol y la polianilina fueron recientemente comercializados por BASF (Alemania) y Corporación Bridgestone (Japón), respectivamente, para aplicaciones en baterías (Saraswathi *et. al.*, 1999). En tanto que las propiedades fotoconductoras y fotorefractivas del poli N-vinilcarbazol permitieron que IBM introdujera al mercado su copiadora serie I como resultado de las aplicaciones prácticas de las propiedades de este polímero (Grazulevicius *et. al.*, 2003).

Tabla III. Formulaciones probadas y características de polifenol y polianilina enzimáticamente sintetizados.

Polímero sintetizado	Condiciones de obtención	Características reportadas del producto
POLIANILINA (orto- fenilendiamina) (Kobayashi <i>et. al.</i> , 1992)	La polimerización fue realizada con sustrato (10mmol) en una mezcla de 1,4-dioxano (80mL) con amortiguador de fosfatos (20mL) pH 7.0 utilizando 10mg de HRP. La polimerización fue iniciada por la adición de peróxido de hidrógeno al 30% (230 μ L, 2mmol) a temperatura ambiente. La misma cantidad fue adicionada 4 veces en un intervalo de 1hr.	Obtención de un sólido negro Rendimiento 33% $M_w = 20\ 000$
POLIANILINA (Lim y Yoo, 2000)	La anilina (12.5mmol) fue polimerizada usando HRP (20mg) en una mezcla de amortiguador de fosfato de sodio 1M (10mL) y disolvente orgánico (40mL). La polimerización fue iniciada por la adición de peróxido de hidrógeno (142 μ L, 1.25mmol), el cual fue adicionado a la mezcla cada 5 min. por 10 veces a temperatura ambiente.	La polianilina obtenida está compuesta de unidades enlazadas mediante las posiciones orto y para del monómero. La relación de unidades orto/para depende de las condiciones como el pH y las características del solvente utilizado (log P, constante dieléctrica ϵ). La PANI en la cual las unidades son predominantemente enlazadas por la posición orto puede ser obtenida por un incremento del pH (hasta 10.0) del amortiguador o adoptando un solvente con alta constante dieléctrica o log de P

		La PANI enlazada principalmente por la posición orto en comparación con la PANI enlazada por la posición para se estimo termalmente mas flexible, eléctricamente conductora y soluble en N-metilpirrolidona.
POLIANILINA (Diaminas) (Shan y Cao, 2000)	Se utilizaron 5mmol de sustrato en una mezcla de 10mL de 1,4-dioxano con 2.5mL de amortiguador de fosfatos pH 6.0-7.0 utilizando 5mg de HRP. La reacción fue iniciada después de la adición de 115-460μL de una solución de peróxido de hidrógeno (30%). La reacción se llevo a cabo a temperatura ambiente. Una hora después se adicionaron 0.46-1.84mL de H ₂ O ₂ adicionales en 4hr. La reacción continúo por un total de 45hr.	Poli (fenilendiaminas) Los polímero son obtenidos como sólidos negros, cuya solubilidad en solventes orgánicos varia dependiendo de la posición relativa de los dos grupos amina en el monómero. Rendimiento 77.8%. Poli (4-aminofenol) El polímero obtenido es un sólido negro soluble en DMF y DMSO y parcialmente soluble en acetona y THF. Rendimiento 64.6%.
Polianilinas (Shan <i>et. al.</i> , 2003)	El sustrato (5mmol) fue disuelto en 10mL de 1,4-dioxano y 2.5mL de amortiguador de fosfatos pH 7.0 y 5mg de HRP. La reacción fue iniciada por la adición de 230μL de solución de peróxido de hidrógeno al 30% a temperatura ambiente. Una hora después se adicionaron 0.92μL dentro de 4hr. La reacción continúo por un total de 45hr.	Poli (4-aminofenol) Sólido negro, soluble en DMF, DMSO y parcialmente soluble en acetona y THF. Rendimiento 92% $M_w = 1.11 \times 10^4$ Poli (2-aminofenol) Sólido café-morado soluble en DMF y DMSO y parcialmente soluble en acetona y THF. Rendimiento 82.5% $M_w = 0.49 \times 10^4$
POLIFENOL (Dordick <i>et. al.</i> , 1987)	En una mezcla de 85% de 1,4-dioxano y 15% de amortiguador de acetatos (10mM, pH 5.0) con fenol (5mM-100mM) utilizando HRP (0.5mg/mL) y 10mM de H ₂ O ₂ (un total de 1M de H ₂ O ₂ fue adicionado en un periodo de 75hr).	Poli (p-fenilfenol) Polímero gris oscuro parcialmente soluble en Dioxano y DMF Peso molecular 2.6×10^4 D Rendimiento 86% Poli (p-cresol) Polímero naranja Peso molecular 1.9×10^3 D
POLIFENOL	La polimerización fue realizada con	Producto parcialmente soluble en DMF y

(Uyama <i>et. al.</i> , 1994)	fenol (0.47g, 5.0mmol) y 10mg de HRP fueron disueltos en 20mL de 1,4-dioxano y 5mL de amortiguador de fosfatos pH 7.0 mediante la adición de peróxido de hidrógeno al 30% (28µL, 0.25mmol). La misma cantidad de H ₂ O ₂ fue adicionada 19 veces más a intervalos de 15min. Después de 24hr el polímero fue colectado por filtración. Lavado y secado	DMSO. La fracción soluble en DMF presentó un peso molecular de 3.5 x10 ⁴ Rendimiento 72%
POLIFENOL (Uyama <i>et. al.</i> , 1996)	<p>La polimerización fue realizada con fenol (0.47g, 5mmol) y HRP (10mg) en una mezcla de 1,4-dioxano y 0.1M de amortiguador de fosfatos pH -7.0 (80:20 vol%). El peróxido de hidrógeno (30% sol. acuosa, 28µL, 0.25mmol) fue adicionado a la mezcla cada 15min por 20 veces. La reacción fue realizada a 20 °C por 24hr.</p> <p>Polimerización de fenol (0.47g, 5mmol) catalizada por HRP (10mg) en una mezcla de acetona y amortiguador de fosfatos pH 7.0 (80:20 vol%) a 20°C por 24hr</p>	<p>Materiales sólidos, solubles en DMF y DMSO. El peso molecular de la parte soluble en DMF fue de 3.5x10⁴ Rendimiento 75%</p> <p>Si se aumenta el amortiguador al 60% en la mezcla de reacción el rendimiento es del 95% con un M_n= 0.62x10⁴</p> <p>Rendimiento del 71% M_n >40x10⁴</p>
POLIFENOL (Oguchi <i>et. al.</i> , 2000)	<p>Se colocó fenol (1.00g, 10.6mmol) y HRP-C (20mg) en una mezcla de 10mL de metanol y 10mL de 0.05M de amortiguador de fosfatos pH 7.0. La reacción se realizó por la adición de peróxido de hidrógeno al 6% (10.6mmol) mediante goteo durante 25hr.</p> <p>La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y 5hr después el precipitado fue colectado por filtración, lavado y secado.</p>	<p>Rendimiento 86%</p> <p>Polímero soluble en DMF M_n aprox. 3 000</p>

Actualmente se están realizando nuevas investigaciones en el campo de polímeros conductores debido al potencial de este campo y al número ilimitado de posibles polímeros conductores a sintetizar. En particular, se han propuesto compuestos heterocíclicos con anillos de cinco y seis miembros.

El indol contiene un anillo aromático de cinco miembros lo que da la posibilidad que el poliindol presente conformación planar. El indol tiene una estructura de un anillo pirrólico fusionado con un anillo de benceno que incrementa el sistema de electrones π conjugados. Si el grado de polimerización de poliindol y polipirrol es de orden similar, y si hay una relación entre la longitud de la cadena conjugada y la conductividad a causa del grado de deslocalización de electrones π , la conductividad de poliindol deberá ser mucho mayor que la de polipirrol (Suematsu, *et. al.*, 2000; Cirpan, *et. al.*, 2002; Yagci y Toppare, 2003; Allard, *et. al.*, 2003).

El poliindol ha sido previamente sintetizado por vía química y electroquímica (Billaud *et. al.*, 1995; Abthagir *et. al.*, 1998; Tüken *et. al.*, 2004). Sin embargo, la eficiencia en la polimerización y la conductividad del poliindol son menores que en otros polímeros conductores. Una de las razones es que los esquemas de acoplamiento resultan en variadas formas de ramificación y pérdida de la planaridad, lo que ocasiona un grado de conjugación menor al deseado (Yurtsever y Yurtsever, 2002).

El objetivo del presente estudio es sintetizar tres homopolímeros a partir de anilina, fenol e indol, así como el correspondiente copolímero en presencia de la enzima peroxidasa de rábano. Tales polímeros serán caracterizados por espectrometría UV-Vis, Fluorometría, CCF, FTIR, ^1H y ^{13}C RMN así como calorimetría diferencial de barrido (DSC). Se espera que la síntesis por vía enzimática permita la obtención de nuevos polímeros con una potencial aplicación en el campo de polímeros conductores o semi-conductores.

Capítulo II

MATERIALES Y MÉTODOS

La peroxidasa de rábano (HRP, EC 1. 11. 1. 7) Tipo VI fue adquirida a Sigma y el peróxido de hidrógeno (30% w/v) fue adquirido en Fermont. El fenol se adquirió en Sigma, el indol en Aldrich y la anilina en Baker. La anilina fue purificada mediante destilación antes de su uso. El fosfato monobásico y dibásico de sodio utilizados para la preparación del amortiguador de fosfatos se adquirieron con Spectrum Chemical. La acetona fue proporcionada por J.T. Baker, el acetonitrilo por Burdick & Jackson y el 1,4-dioxano se adquirió con Sigma-Aldrich.

POLIMERIZACION ENZIMATICA

En el presente trabajo se definió polimerización enzimática como síntesis química de polímeros *in vitro* (en tubos de ensayo) catalizada por una enzima aislada mediante una vía no-biosintética (no-metabólica) de la misma (Kobayashi *et. al.*, 2001).

La polimerización enzimática se realizó a 25°C con una agitación de 140 rpm en tubos de 20 mL en los que se colocó indol (0.20 mmol) y HRP (0.20 mg) en una solución compuesta de un disolvente orgánico (2 mL) y amortiguador de fosfatos 60 mM pH-7.0 (8 mL) (Fig. 2). Los disolventes orgánicos utilizados fueron acetonitrilo, acetona y 1,4-dioxano. La reacción se inició mediante la adición de peróxido de hidrógeno (100 µL, 50 mM) el cual se adicionó siete veces cada hora para disminuir el riesgo de la inactivación por peróxido del biocatalizador. Al término de la reacción, el polímero se separó por centrifugación, se lavó con una mezcla de disolvente/amortiguador en la que fue sintetizado y se llevó hasta sequedad a 100 °C durante 24h. El producto así obtenido se caracterizó mediante técnicas espectroscópicas, cromatográficas y térmicas.

A partir del sobrenadante se determinó la cantidad de sustrato consumido mediante Cromatografía de Líquidos a Alta Presión (HPLC) en un equipo Hewlett Packard Serie 1100, con una columna C₈ SUPELCO y un detector UV-Visible de arreglo de diodos. El homopolímero de anilina (PANI) y el de fenol (Polifenol) fueron sintetizados bajo las mismas condiciones que el poliindol utilizando acetona como codisolvente.

La polimerización de indol en ausencia del catalizador se realizó en 20:80 %v/v de disolvente/amortiguador, mediante la adición de peróxido de hidrógeno cada 24 h durante 14 días. El polímero se separó por filtración, se lavó con una mezcla de disolvente/amortiguador en el que fue sintetizado y se secó a 100 °C durante 24 h. El producto así obtenido se caracterizó mediante técnicas espectroscópicas, cromatográficas y térmicas.

La síntesis del copolímero se realizó en las condiciones ya descritas anteriormente utilizando acetona como disolvente con una concentración 20 mM de cada sustrato, es decir, indol, fenol y anilina. A partir del sobrenadante se cuantificó la cantidad consumida de cada uno de los sustratos. El producto se separó por centrifugación, se lavó y secó para su caracterización como el resto de los polímeros sintetizados.

CARACTERIZACIÓN DE LOS POLIMEROS

La cromatografía en capa fina (TLC) se realizó en placas flexibles de silica gel (grosor 250 μm) de Whatman. El sistema de elución fue hexano-acetato de etilo (de 1:1 v/v) para los homopolímeros enzimáticos a partir de indol. El resto de productos se eluyeron en un sistema hexano-acetato de etilo (7:3 v/v).

Para cada producto se obtuvo su espectro de UV-Vis en un Espectrofotómetro UV-Visible marca ThermoSpectronic, modelo Helios α . Los espectros de los polímeros fueron realizados a una concentración de 0.05 mg/ml en acetonitrilo. Los espectros de UV-Vis de cada monómero se realizaron a una concentración 0.1 mM en acetonitrilo. Los espectros de fluorescencia de los monómeros y los polímeros se obtuvieron en una concentración de 10 μM y 50 ng/ml respectivamente, en un Espectrofotómetro de Fluorescencia RF-5301PC SHIMADZU equipado con una lámpara de Xe 150 W. A partir de los espectros de emisión así obtenidos se calculó el centro espectral de masas (CEM), el cual es una prueba del microambiente en el que se encuentran los cromóforos, ya que su valor cambia con la temperatura y la polaridad.

En esta técnica se relacionan los cambios de intensidad con la longitud de onda dentro de un intervalo establecido. Un desplazamiento batocrómico o hipsocrómico está asociado con un ambiente polar y no polar respectivamente. El valor de CEM de cada monómero y su respectivo polímero se calcularon en el mismo intervalo de longitud de onda usando la siguiente ecuación:

$$CEM = \frac{\sum (I_{(\lambda)} * \lambda)}{\sum I_{(\lambda)}}$$

Los espectros de infrarrojo se obtuvieron por dos técnicas, la de reflectancia difusa depositando una película por evaporación sobre un cristal de ZnSeGe o bien dispersando la muestra en KBr previamente secado a 100 °C por 24 h utilizando un Espectrofotómetro de infrarrojo (FTIR) 470 Nicolet.

Los espectros RMN de ¹H (300 ó 400 MHz) y ¹³C (75.5 ó 100 MHz) de los productos fueron realizados en la USAI, Facultad de Química, UNAM en equipos Variant modelo Unity Inova. El disolvente utilizado para cada polímero fue N,N-dimetilformamida d₇.

La caracterización térmica de los polímeros se realizó en un Calorímetro Shimadzu modelo DSC-60, con una muestra de aprox. 4.0 mg en un intervalo de temperatura de -30 a 300 °C y flujo de 20 mL/min de N₂. Previa a la obtención de los correspondientes termogramas, los productos se acondicionaron a un 30% de humedad relativa para lo cual se colocaron en un desecador con una solución saturada de CaCl₂ durante 24h. Se realizaron dos a tres barridos en el intervalo de temperatura indicado con el fin de obtener transiciones térmicas no debidas a la historia térmica del material en estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CARACTERISTICAS GENERALES

Se sintetizaron tres polímeros de indol usando Peroxidasa de rábano (HRP) como catalizador en un sistema disolvente-amortiguador de fosfatos 20:80 (%v/v), pH-7.0. Los disolventes orgánicos utilizados (ACN, acetona, 1,4-dioxano) fueron elegidos con la finalidad de obtener un polímero de indol con alta conjugación de dobles enlaces y adecuado rendimiento y que han sido ampliamente utilizados en otros estudios (Dordick *et. al.*, 1986; Uyama *et. al.*, 1996; Lim y Yoo, 2000). Se ha observado que la naturaleza del sistema de reacción afecta de manera importante las interacciones moleculares entre la enzima, el disolvente y el substrato; por lo que las propiedades fisicoquímicas y rendimiento del polímero obtenido pueden ser muy diferentes (Akkara *et. al.*, 1999; Ayyagary *et. al.*, 2002).

Adicionalmente, se efectuó la síntesis de un polímero de indol en el sistema descrito anteriormente pero en ausencia de HRP, como ensayo control de la polimerización química provocada por la presencia de peróxido de hidrogeno (1 mM) que funciona como iniciador. El tiempo de síntesis sin biocatalizador fue de 336 h comparado con las 8 h en presencia de la enzima.

Los homopolímeros de indol obtenidos en sistemas con acetona y dioxano fueron sólidos café claro, en tanto, que el homopolímero sintetizado en acetonitrilo fue un sólido claro amarillo-verdoso. La disolución de los anteriores sólidos en tetrahidrofurano (THF) presentaron una coloración similar entre ellos (café ladrillo, ver Figura 2). La Figura 3 muestra la apariencia de la polianilina, el polifenol, el poliindol_{acetona} y del copolimero disueltos en THF.

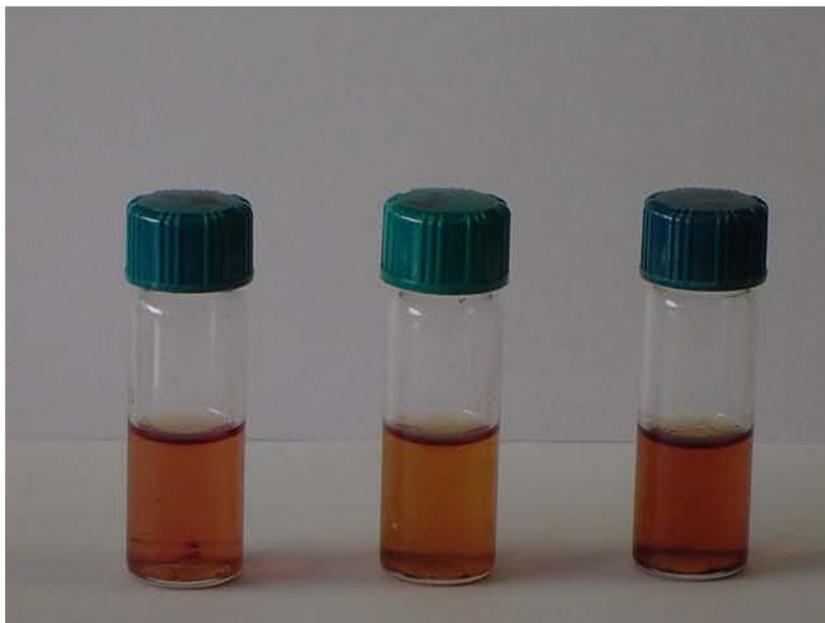


Figura 2. Poliindol_{ACN}, poliindol_{acetona} y poliindol_{dioxano} disueltos en THF (de izquierda a derecha).

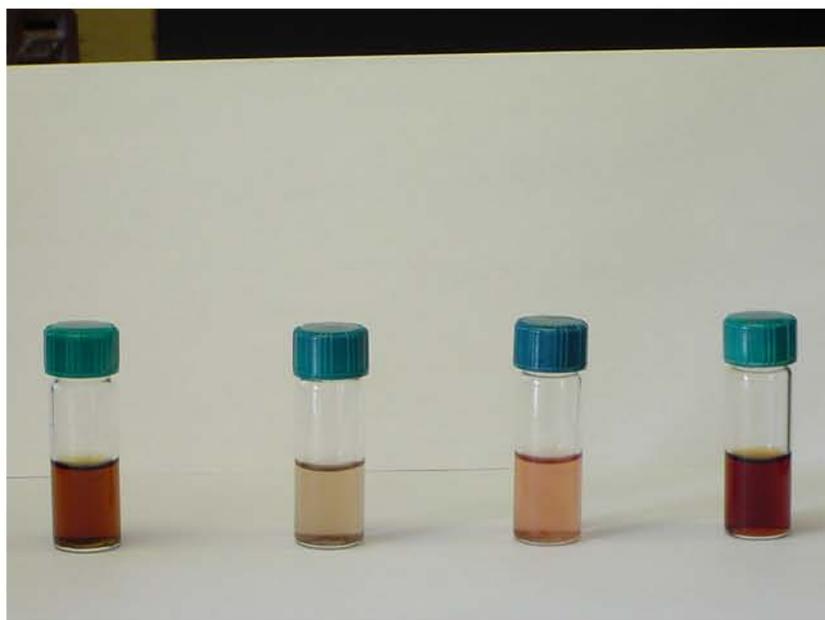


Figura 3. Polianilina, polifenol, poliindol_{acetona} y copolímero disueltos en THF (de izquierda a derecha).

En el análisis por cromatografía de capa fina (CCF) se observó más de una banda para cada poliindol, sin embargo, dada la capacidad de quimioselectividad que presentan las enzimas (HRP), atribuimos cada banda observada a productos de diferente tamaño con la misma estructura (ver más adelante). Los tres polímeros enzimáticos presentaron una fracción con valor de r_f de 0.37 la cual correspondería al producto con menor peso molecular si se considera que a menor tamaño de la molécula existirá un mayor desplazamiento de la molécula y por lo tanto un r_f mayor. Así, los polímeros sintetizados en acetonitrilo y acetona que presentaron una banda adicional con r_f de 0.26, se debe a un producto de mayor grado de polimerización, mayor tamaño, y por lo tanto de menor capacidad de migración en CCF.

Por otro lado, se obtuvo el mayor rendimiento de producto seco en acetona (0.3870 g producto/g iniciales) y el menor en acetonitrilo (0.2520 g producto/g iniciales, Tabla IV). Dado el resultado anterior y los múltiples factores que intervienen en la polimerización enzimática (reconocimiento del sustrato por HRP, concentración de oxidante y reactivos, baja precipitación de oligómeros, etc.), se determinó utilizar el sistema con acetona, para sintetizar los homopolímeros enzimáticos de fenol y anilina. Estos homopolímeros fueron sintetizados como referencia para el estudio de un copolímero que contuviera las tres unidades.

Así, el polifenol obtenido fue un sólido de color lila-grisáceo que, disuelto en THF, presentó una coloración café ladrillo. Dicho polímero no eluyó en la fase móvil utilizada observándose sólo el punto de aplicación. Lo anterior puede explicarse por la obtención de un polifenol de alto peso molecular. El rendimiento de polifenol fue de 0.646 g producto/g iniciales.

Estudios anteriores sobre la polimerización de fenol catalizada por HRP en una mezcla de 1,4-dioxano y amortiguador de fosfatos pH-7.0 (80:20 vol%) y ante la presencia de peróxido de hidrógeno indican que el medio de reacción se torna negro y se forma un fino precipitado negro ($M_n = 3.5 \times 10^4$). Uyama *et. al.* (1996) reportaron que en un sistema con 60% de 1,4-dioxano se obtiene polifenol cuantitativamente (100%) como un sólido de color amarillo pálido. Sin embargo, el uso de acetona al 80% en lugar de dioxano permite la obtención de un polímero de mayor peso molecular ($M_n > 40 \times 10^4$).

Los resultados proporcionados en estos reportes nos permiten vislumbrar que el polifenol sintetizado probablemente presentaría alto peso molecular (no determinado) en tanto que la apariencia y el rendimiento presentan una estrecha relación con el disolvente y la cantidad del mismo en el sistema de reacción.

La polianilina (PANI) obtenida fue un sólido de color negro que, en disolución en THF, presentó una coloración amarillo ámbar. El análisis por CCF reveló la presencia de tres productos con r_f 's de 0.6, 0.43, 0.22 y el punto de aplicación. Estos resultados nos indican la existencia de al menos tres productos de diferente peso molecular, si se considera la posibilidad de una relación entre el tamaño y la capacidad de movilidad en CCF de una molécula además de su polaridad. El rendimiento de polianilina fue de 0.504 g producto/g iniciales. Para los polímeros de derivados de anilina y fenol se ha indicado que presentan color negro (Shan *et al.*, 2000). Sin embargo, hay diversos estudios que muestran que existe una clara relación entre el pH del medio de reacción y los diferentes estados de oxidación de la polianilina que otorga diferentes coloraciones (Samuelson *et al.*, 1998).

La síntesis del copolímero se realizó en presencia de fenol, anilina e indol, con una concentración de 20 mM de cada monómero en un sistema acetona-amortiguador. El producto de dicha reacción fue un sólido café oscuro que, disuelto en THF, presentó una coloración naranja. En CCF se observaron dos manchas con r_f de 0.6 y 0.3 los cuales no corresponden con los valores de r_f de los monómeros, lo que nos permitió asegurar la ausencia de los monómeros como contaminantes. La cuantificación por HPLC de consumo de sustratos reveló que el fenol se consume mayoritariamente (70%) seguido de anilina (56%) e indol (39%), obteniéndose un rendimiento de 0.214 g de producto/g iniciales con base en un peso molecular promedio de las tres unidades.

Por último, el poliindol sintetizado en ausencia de HRP, es un polvo grueso de color verde, el cual presentó cuatro manchas con valores de r_f de 0.5, 0.42, 0.25, 0.11, y el punto de aplicación en CCF. Diferentes autores han reportado que la polimerización de indol ya sea mediante oxidación química (Billuad *et al.*, 1995) o bien electroquímica en acetonitrilo (Tüken *et al.*, 2004), presenta color verde en estado dopado y exhibe propiedades electrocrómicas. Ellos reportan que las propiedades morfológicas y de conductividad son fuertemente dependientes de las condiciones experimentales de síntesis.

Tabla IV. Características de los polímeros enzimáticamente sintetizados.

Polímero		Rendimiento ($g_{\text{producto}}/g_{\text{inicial}}$)	Rf	Color	
				Producto	Disuelto en THF
Poliindol	ACN	0.2520	0.37, 0.26	Amarillo-verdoso	Café ladrillo
	Acetona	0.3870	0.37, 0.26	Café claro	Café ladrillo
	Dioxano	0.3120	0.37	Café claro	Café ladrillo
Polifenol		0.646	N.E. ^a	Lila grisáceo	Café ladrillo
Polianilina		0.504	0.6, 0.22, 0.43	Negro	Amarillo ámbar
Copolímero		0.214	0.6, 0.3	Café oscuro	Naranja

Valores de rf de los monómeros: Indol (0.65), Anilina (0.48) y Fenol (0.57). a) No Eluye

Cada uno de los homopolímeros de indol, fenol y anilina, así como el copolímero se caracterizaron por UV-VIS, Fluorescencia, FTIR, ^1H y ^{13}C RMN y Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

ESPECTROSCOPIA UV-VIS

Los espectros de UV-Vis del indol y de sus respectivos polímeros enzimáticos se muestran en la Figura 4. La banda I (220 nm aprox.) correspondiente a la transición $\pi-\pi^*$ etilénica se observó tanto para el monómero como en los polímeros, sin embargo, en éstos últimos se observó un incremento de la absorbancia que podría corresponder a un aumento del sistema de enlaces conjugados. El indol presenta un máximo de absorción ($\lambda_{\text{máx}}$) a 270 nm correspondiente a la transición $\pi-\pi^*$ bencenoide. Los tres polímeros presentan un máximo de absorción entre 250-280 nm que indica la existencia de diferentes transiciones $\pi-\pi^*$ bencénicas. La aparición de una señal ancha con máximo de absorción a 379 nm en los polímeros podría explicarse por una sustitución cromófora (transición $n-\pi^*$) (Silverstein, 1991) que ocasiona una conjugación más compleja que la observada en el monómero. Adicionalmente, la presencia de la banda a 524 nm de baja absorptividad se explicaría por dichas transiciones $n-\pi^*$ (Silverstein, 1991).

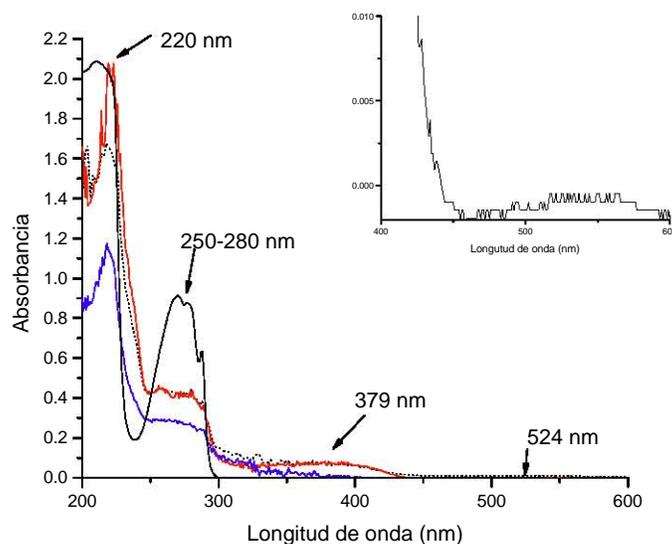


Figura 4. Espectros de UV-Vis del indol (línea negra continua), poliindol_{acetona} (línea negra punteada); poliindol_{ACN} (línea roja), y poliindol_{dioxano} (línea azul). El inserto muestra la banda de absorción del poliindol_{ACN} a 524 nm.

El espectro del polímero sintetizado por vía química (ensayo control) mostró tres bandas de absorción a 229, 392 y 595 nm (Figura 5). De esta forma, se observó un desplazamiento batocrómico con respecto al monómero de la banda II (Silverstein, 1991) y que puede estar asociado a la presencia de transiciones $n-\pi^*$ (banda R) que desplazaron la banda bencénica a mayor longitud de onda. Dichas transiciones se explican por la presencia de grupos cromóforos en el anillo bencénico a lo largo de la cadena polimérica.

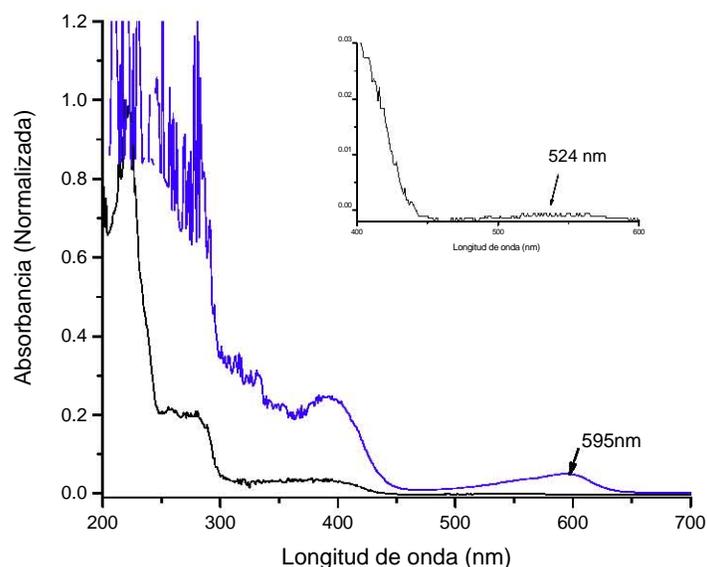


Figura 5. Espectros de UV-Vis del poliindol_{ACN} enzimático (línea negra) y poliindol químico (línea azul). El inserto muestra la banda de absorción del poliindol_{ACN} a 524 nm.

La comparación del espectro de UV-Vis del homopolímero de indol enzimático versus el químico (Figura 5), muestra que ambos polímeros presentaron bandas a altas longitudes de onda; sin embargo, el poliindol químico presentó una mayor absorción en tales bandas lo que implicaría la presencia de una mayor cantidad de grupos cromóforos producidos por la baja selectividad de la reacción química con respecto al homopolímero de indol enzimático.

La Figura 6 muestra los espectros UV-Vis de fenol y polifenol. El fenol presenta dos $\lambda_{\text{máx.}}$ a 216 nm (banda E₂) y a 272 nm (banda B) (Silverstein, 1991). Ambas bandas corresponden a transiciones $\pi - \pi^*$, la primera de tipo etilénica y la segunda de tipo bencenoide. Por otra parte, el polifenol presenta una absorción constante con dos máximos a 250 y 352 nm. Dado el proceso de polimerización, las bandas etilénicas presentan un desplazamiento batocrómico y cubren a la banda bencénica.

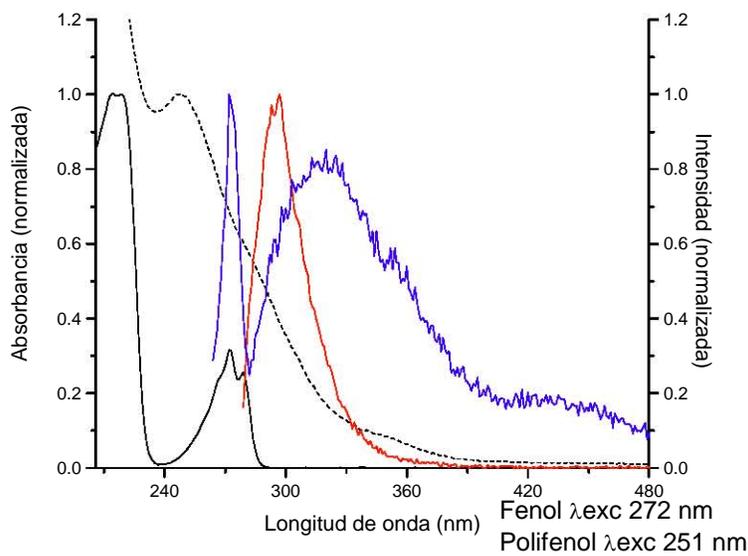


Figura 6. Espectros de UV-Vis del fenol (línea negra), polifenol (línea punteada) y los espectros de emisión del fenol (línea roja) y polifenol (línea azul).

Desde los primeros estudios en polimerización enzimática de fenol (poli(4-etilfenol)) (Premachandran *et. al.*, 1996), los máximos a longitudes mayores de 385 nm se atribuyeron a transiciones $n-\pi^*$ de grupos carbonilo quinoidales. En tales estudios se concluye que, pese a que el principal acoplamiento de las unidades es *orto-orto*, el acoplamiento *orto-para* lleva a la formación de estructuras cetónicas en la cadena polimérica (Premachandran *et. al.*, 1996). En el presente estudio, la presencia de un máximo a 352 nm en el polifenol puede estar asociado con dicho tipo de estructuras en la cadena polimérica.

La Figura 7 muestra el espectro UV-Vis de la anilina y la polianilina. El espectro de anilina presenta dos bandas de absorción a 240 (banda E_2) y 290 nm (banda B) (Silverstein, 1991). Por su parte, la polianilina presenta dos bandas de absorción a 300 y 412 nm. El desplazamiento batocrómico de la banda etilénica se asoció a un aumento en el sistema de conjugación. Lo anterior, ocasionó un desplazamiento de la banda bencénica. El máximo a 412 nm se asoció a la presencia de grupos amina que presentan transiciones $n-\pi^*$.

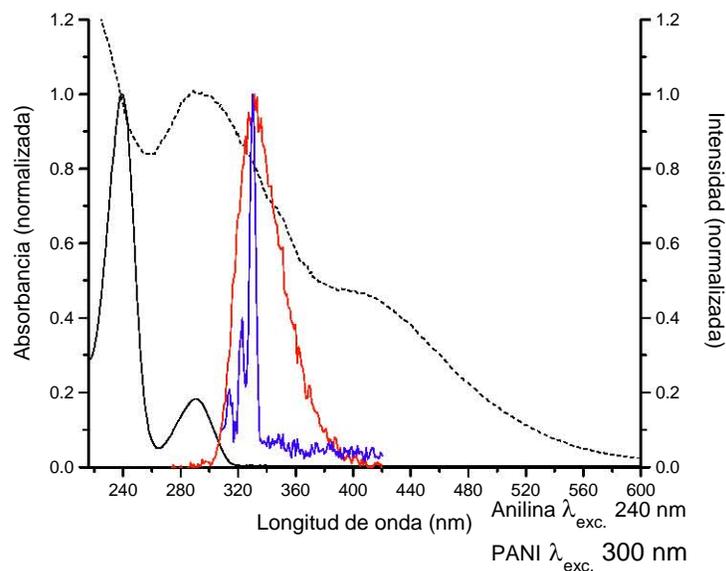


Figura 7. Espectros de UV-Vis de la anilina (línea negra), PANI (línea punteada) y de emisión de anilina (línea roja) y de polianilina (línea azul).

Diferentes estudios mencionan que la absorción a 414 y 843 nm son consistentes con la forma de sal de emeraldina (PANI) y que tales se deben a transiciones de bandas polarón (Liu *et. al.*, 1999; Samuelson *et. al.*, 1998). Estos reportes nos sugieren que el máximo observado a 412 nm en PANI podría deberse a que, al menos, una parte del polímero se encuentra en forma de dicha sal.

Por último, se obtuvo el espectro UV-Vis del copolímero enzimático que contiene unidades de anilina, fenol e indol (Figura 8). Se observó una banda ancha de absorción entre 240 a 320 nm seguido de una segunda banda ancha entre 360-400 nm que se atribuyen a las transiciones π - π^* bencénicas y cromofóricas (n - σ^*), respectivamente. Lo anterior implica que el copolímero posee una estructura electrónica diferente con respecto a los homopolímeros de cada unidad estructural.

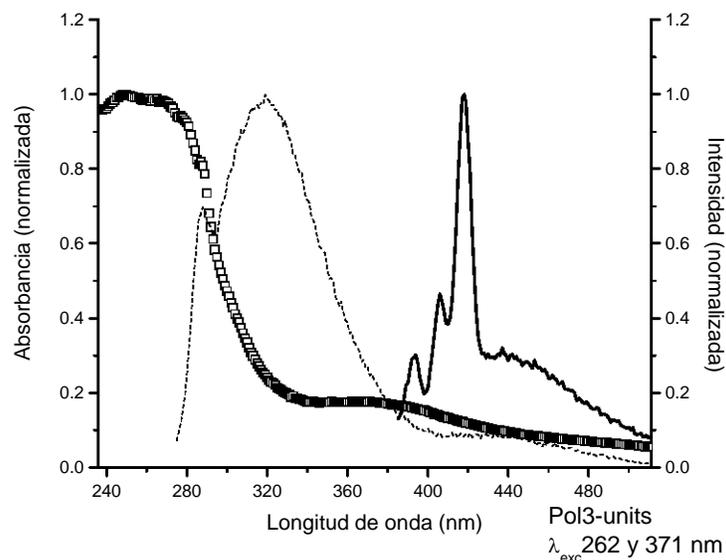


Figura 8. Espectro UV-Vis del copolímero enzimático (□□□) y de emisión a $\lambda_{exc.}=262$ nm (línea punteada) y $\lambda_{exc.}=371$ nm (línea continua).

ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

En la Figura 9 se muestran los espectros de fluorescencia del indol, de los poliindoles enzimáticos y del poliindol químico. El espectro de emisión del monómero presentó una banda correspondiente a la emisión de fluorescencia con máximo a 341 nm, mientras que a 530 nm se observa una banda ancha característica de fosforescencia de excímeros. Un excímero es un complejo entre una molécula en estado basal y una en estado excitado. Los tres polímeros enzimáticos presentaron una banda angosta con máximo a 292 nm, la cual podría atribuirse a una parte de la cadena polimérica que presenta un arreglo estructural, más ordenado que el monómero.

De igual forma, en los tres homopolímeros se presentó una banda con máximo a 320 nm, cuyos valores de CEM presentados en la Tabla V mostraron que los poliindoles sintetizados en dioxano y acetona (353.9 y 360.4 nm, respectivamente) presentaron un desplazamiento hipsocrómico con respecto al valor del monómero (366.2 nm), lo que indica que en estos polímeros existe una región polimérica en la cual los grupos cromóforos presentes se encuentran en un ambiente no polar con respecto al monómero, lo cual puede deberse al aumento de enlaces C-C en la polimerización.

Adicionalmente, el homopolímero sintetizado en acetonitrilo presentó otro máximo a 360 nm que se atribuyó a una región polimérica con arreglo diferente al atribuido a las bandas anteriormente presentadas. El valor del CEM de dicho polímero (370.1 nm) presentó un desplazamiento batocrómico con respecto al monómero, lo que implica que el ambiente en el polímero es polar con respecto al monómero (Aburto y Le Borgne, 2004). Lo anterior sugiere la presencia de grupos polares en la cadena polimérica.

El poliindol químico presenta un espectro de emisión con bandas finas, lo que implica que este polímero presenta un arreglo más ordenado que el monómero, lo cual podría explicarse por una imposibilidad de formar puentes de hidrógeno. Adicionalmente, su valor de CEM (437.9 nm) presentó un marcado desplazamiento batocrómico con respecto al valor del monómero, lo que puede ser indicativo de la presencia de un mayor grado de inserción de oxígeno que de formación de enlaces C-C.

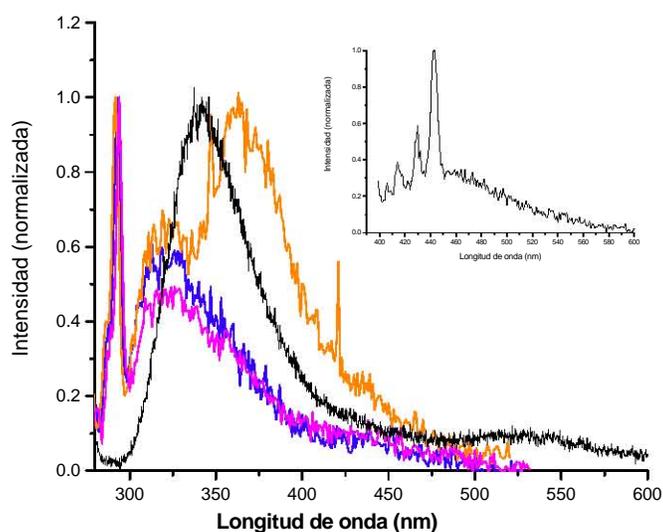


Figura 9. Espectros de emisión indol (línea negra), poliindol_{acetona} (línea azul), poliindol_{ACN} (línea amarilla), poliindol_{dioxano} (línea rosa). El inserto muestra el espectro de emisión del poliindol químico.

Indol λ_{exc} . 280nm; poliindol_{ACN} λ_{exc} . 267nm; poliindol_{acetona} λ_{exc} .268nm; poliindol_{dioxano} λ_{exc} .269nm; poliindol químico λ_{exc} 391nm.

Tabla V. Valores de CEM de monómeros y polímeros

Monómero	CEM (nm)	Polímero	CEM (nm)
FENOL	304.3	POLIFENOL	334.5
ANILINA	339.6	POLIANILINA	336.5
INDOL	366.2	POLIINDOL _(acetona)	360.4
		POLIINDOL _(dioxano)	353.9
		POLIINDOL _(ACN)	370.1
		POLIINDOL _(QUIMICO)	437.9
FENOL, ANILINA, INDOL		COPOLIMERO λ_{exc} . 262 nm	335.6
		COPOLIMERO λ_{exc} . 371 nm	393.3

Los espectros de emisión del fenol y el polifenol se muestran en la Figura 6. El fenol presenta una banda con máximo a 296 nm. Por su parte, el espectro del polifenol presenta una banda a 272 nm que coincide con la longitud de excitación del monómero, lo cual sugiere la presencia del grupo fenol en la cadena polimérica. Las bandas anchas con máximo a 320 y 443 nm pueden corresponder a fracciones poliméricas que presentan grupos cetónicos y/o quinoidales que favorecen la formación de puentes de hidrógeno.

En este respecto, existen estudios como el de Premachandran *et. al.* (1996), de polímeros fluorescentes con moléculas de naftol (poli-(2-naftol)) en el que el máximo de emisión del polímero coincide con el del monómero. Esto se asignó a la presencia de residuos del monómero en el polímero en tanto que los máximos entre 450 y 485 nm se atribuyeron a la presencia de segmentos quinoidales en el polímero.

El valor de CEM del polifenol (334.5 nm) presentó un desplazamiento batocrómico con respecto al monómero (304.3 nm), lo que indica el paso a un ambiente polar (Aburto y Le Borgne, 2004) que en este caso puede ser explicado por el aumento en el número de grupos OH ó cetónicos presentes en la cadena polimérica.

El espectro de emisión de PANI (Figura 7) muestra bandas más finas que la anilina y que se puede atribuir a una estructura con mayor conjugación y que, a diferencia del monómero, no favorece la formación de puentes de hidrógeno. Ya que el máximo de emisión del polímero coincide con el del monómero (331 nm), los grupos NH₂ de la unidad se mantienen a pesar del proceso de polimerización.

El valor del CEM de la anilina de 339.6 nm pasó a 336.5 nm en la polianilina, este desplazamiento hipsocrómico refleja el paso a un ambiente no polar de los grupos cromóforos, que puede deberse al aumento de enlaces C-C en el polímero.

La Figura 8 muestra los espectros de emisión del copolímero obtenidos a dos longitudes de excitación. Con base en los datos de CCF y UV-Vis se presume corresponden a dos fracciones poliméricas estructuralmente diferentes. El espectro de emisión obtenido a una $\lambda_{exc.}$ de 262 nm presenta una banda ancha con dos máximos, el primero a 290 nm y el segundo a 320 nm, los cuales corresponden con los máximos de emisión observados en poliindol sintetizado en acetona y en polifenol, lo que sugiere que está región del polímero presenta un arreglo en el que fenol e indol presentes mantienen su capacidad de emisión y de formación de puentes de hidrógeno.

El valor del CEM de este espectro (335.6 nm) comparado con el de polianilina (336.5 nm) y poliindol (353.4 nm) presenta un desplazamiento hipsocrómico, lo que indicaría que esta fracción polimérica presenta un mayor grado de enlaces C-C que estos homopolímeros, lo que explicaría que los grupos cromóforos reflejen un ambiente no polar. Así, el desplazamiento batocrómico que presenta el copolímero con respecto al polifenol (334.5 nm) puede deberse a un mayor número de fenoles en estructuras quinoidales y/o su grupo OH libre ocasionando un ambiente polar con respecto al homopolímero.

Por otra parte, el espectro de emisión obtenido a una $\lambda_{exc.}$ de 371 nm muestra bandas angostas que reflejan una fracción polimérica estructuralmente más conjugada, cuyo valor de CEM se desplazó batocrómicamente (393.3 nm) con respecto al CEM de cada uno de los homopolímeros lo que indica que en esta fracción polimérica los grupos cromóforos se encuentran en un ambiente polar con respecto a cómo se encuentran en los homopolímeros.

Adicionalmente, se observa una banda ancha con máximo a aprox. 443 nm que se presenta en ambos espectros de emisión y la cual podría atribuirse a la presencia de grupos cetónicos en ambas fracciones poliméricas.

Tal parece que el ambiente oxidante que proporciona la presencia del H₂O₂ y HRP favorece reacciones laterales sobre los grupos hidroxilo y amina.

ESPECTROSCOPIA DE INFRA-ROJO (FTIR)

El espectro de infra-rojo del poliindol sintetizado en acetonitrilo (Figura 10) presenta una banda a 3399 cm^{-1} ($\nu\text{N-H}$), $3128\text{-}2975\text{ cm}^{-1}$ ($\nu\text{C-H}$ aromáticos), la banda de 1687 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$ de amida), y la banda en 1486 cm^{-1} (δNH). Los homopolímeros de indol sintetizados en acetona y dioxano presentan el mismo espectro infra-rojo descrito anteriormente. Se realizó el análisis cuantitativo de relación de áreas de las señales correspondientes a (νNH)/($\nu\text{C-H}$) con el objeto de observar el efecto de la polimerización enzimática sobre el contenido del grupo amina y metileno del mismo. Se encontró que tal relación es aproximadamente cinco veces mayor en los polímeros con respecto al indol. Lo anterior muestra que la unión de las unidades de indol se realiza principalmente a través del anillo bencénico y no del grupo amina, lo que confirma lo observado en UV-Vis y fluorescencia.

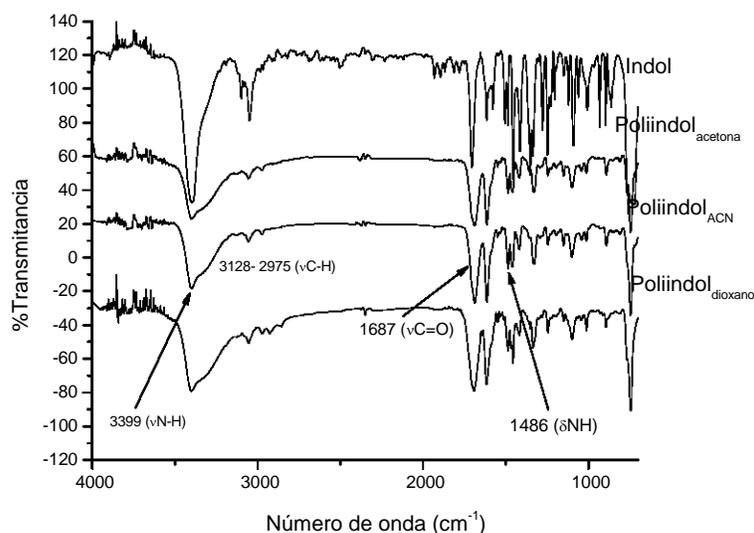
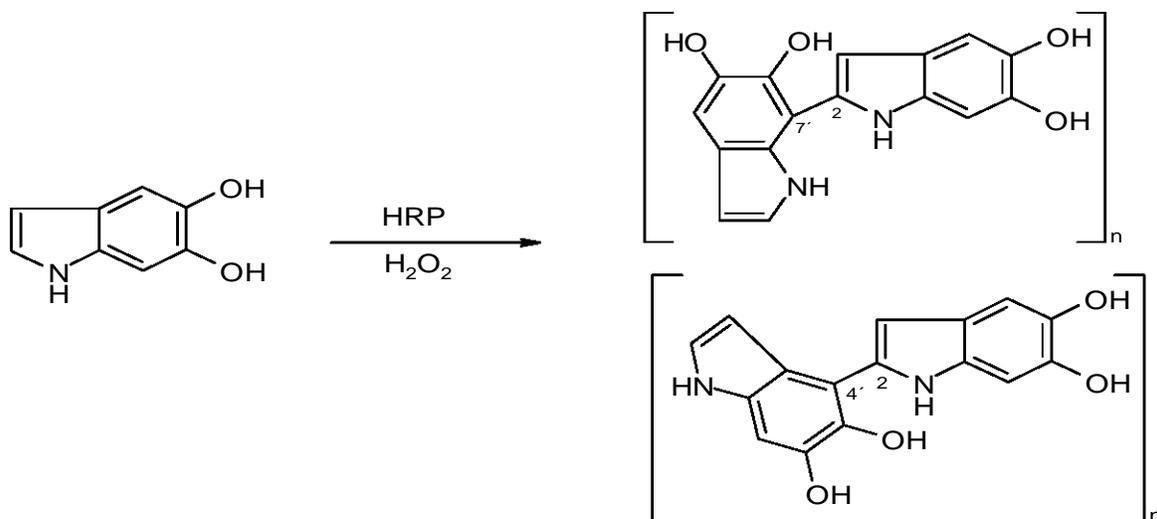
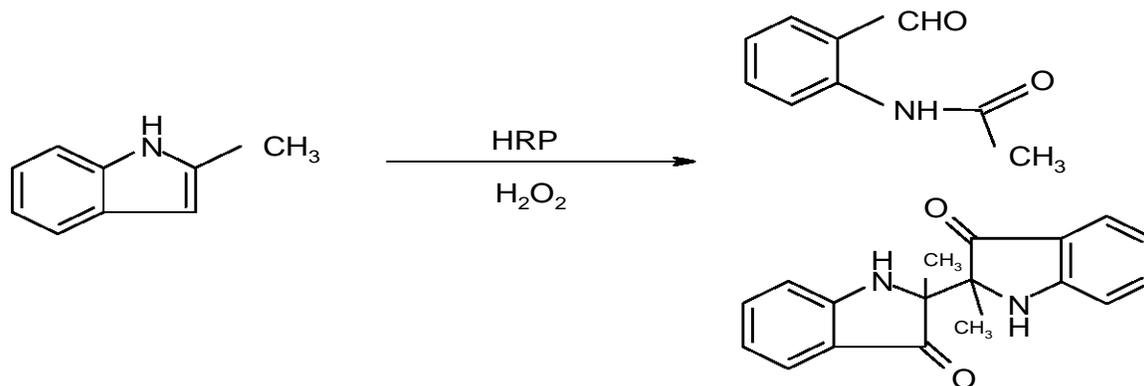


Figura 10. Espectros de FTIR de los homopolímeros de indol.

En efecto, diferentes autores (D'Ischia *et. al.*, 1990; D'Ischia *et. al.*, 1991; Pezzella *et. al.*, 1996), concluyen que en la polimerización de 5,6-dihidroxiindoles con peroxidasa, la unión de las unidades de indol se da en las posiciones 2,7' y 2,4'.



Asimismo, se ha reportado que HRP puede oxidar al ácido-3-indolin acético a 3-metileno-2-oxindol (Veitch, 2004), en tanto que Ximenes *et. al.* (2001), reportaron que la oxidación del 2-metil-indol da como productos el *orto*-acetamidobenzaldehído, la *orto*-acetamidoacetofenona y el 2,2'-dimetil-2'2-diindoxilo. Por su parte, Van de Velde *et. al.* (1999), encontraron que la CPO en presencia de H_2O_2 oxida al indol a 2-oxindol y bajo condiciones de saturación, tal reacción es muy rápida ($k_{cat.} = 740s^{-1}$, Van Rantwijk y Sheldon, 2000).



El homopolímero de indol sintetizado por vía química (control) mostró una baja solubilidad en varios disolventes, por lo que su espectro de FTIR se obtuvo por la técnica de reflectancia difusa, empleando para ello KBr (Figura 11). El homopolímero presentó bandas en 3342 cm^{-1} ($\nu\text{N-H}$), $3121\text{-}3056\text{ cm}^{-1}$ ($\nu\text{C-H}$, aromáticos), 1725 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$), 1662 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$ de amida). El polímero presentó un valor 1.33 veces mayor con respecto al monómero en la relación de áreas de las bandas correspondientes a $(\nu\text{N-H})/(\nu\text{C-H})$ lo que sugiere un menor grado de polimerización así como la inserción de oxígeno en el carbono alfa al nitrógeno. Al comparar la relación de áreas de $(\nu\text{N-H}/\nu\text{C-H})$ del poliindol enzimático frente a la del químico, el primero presenta un valor 4 veces mayor que sugiere un mayor grado de polimerización del poliindol enzimático.

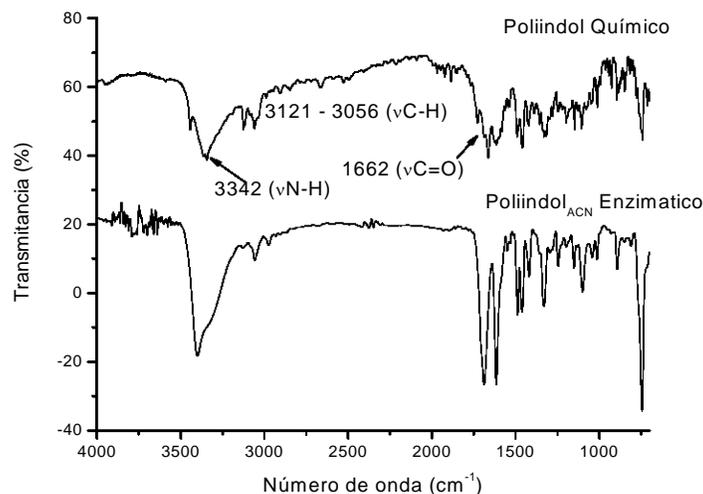


Figura 11. Espectros de FTIR de poliindol_{ACN} enzimático y poliindol químico.

Estudios teóricos de la polimerización de indol, como el realizado por Talbi *et. al.* (1998 y 1999) ó el de Yurtsever y Yurtsever (2002), han determinado que, de los 7 posibles sitios de acoplamiento del indol, la posición 2 es la más favorable para la polimerización debido a que la unión a partir de este sitio resulta en un ángulo de torsión muy pequeño entre las moléculas de indol, lo que permite que se mantenga la planaridad que se observa en el monómero. Las posiciones 3 y 7 son muy cercanas en reactividad a la posición 2, en tanto que las posiciones 4 y 6 son las menos reactivas y que el átomo de nitrógeno no está involucrado en los enlaces entre las unidades de indol ya que es un acoplamiento poco estable.

El polifenol mostró una banda ancha con centro en 3330 cm^{-1} ($\nu\text{O-H}$), $3064\text{-}2979\text{ cm}^{-1}$ ($\nu\text{C-H}$, aromáticos), 1699 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$), 1588 y 1487 cm^{-1} correspondientes a enlaces C-C de aromáticos (Figura 12). El análisis de dicho espectro mostró que la relación de áreas de ($\nu\text{O-H}$)/($\nu\text{C-O}$) en el polímero fue mayor que en el monómero, lo cual indica que la formación de un grupo éter no es favorecida frente a la existencia del grupo OH libre. La banda $\nu\text{C-O}$ en el monómero permanece en el polímero, de existir un grupo éter desaparecería la banda de aprox. 1210 cm^{-1} y sería sustituida por otra en 1250 cm^{-1} ($1270\text{-}1280$ de éteres aromáticos no aparece).

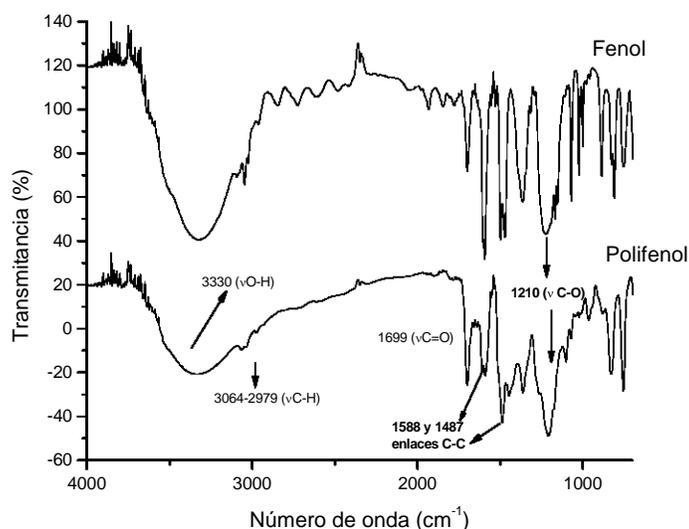


Figura 12. Espectro de FTIR de fenol y polifenol.

Asimismo, hay un decremento en la intensidad de la banda de 1365 cm^{-1} correspondiente al $\delta\text{O-H}$ en el plano, lo cual implica que algunos grupos OH se pierden durante la polimerización. Sin embargo, la banda de νOH prácticamente se mantiene tanto en el monómero como en el polímero. Estos datos indican que la estructura del polímero está conformada mayoritariamente por unidades de fenileno que por unidades oxifenileno (Uyama *et. al.*, 1996; Premachandran *et al.*, 1996; Kurioka *et. al.*, 1994). En efecto, el trabajo de Uyama *et. al.* (1996), demostró que la oxidación enzimática de fenol produce una mezcla de unidades de fenileno y oxifenileno.

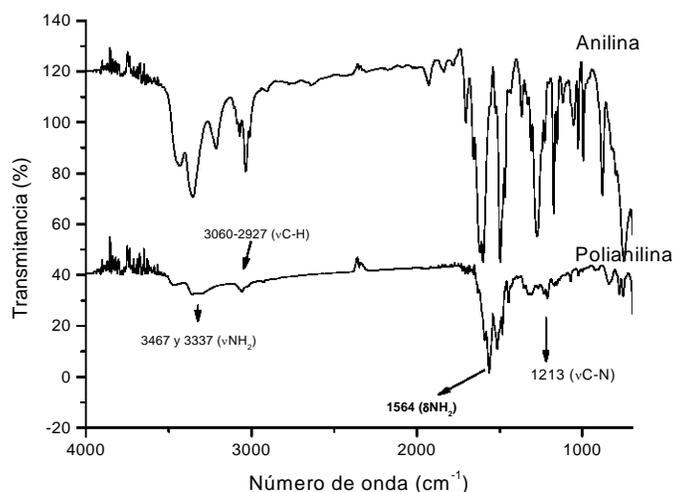


Figura 13. Espectro de FTIR de anilina y polianilina.

Con respecto al polímero de anilina (PANI), se observan bandas en 3467 cm^{-1} , 3337 cm^{-1} (νNH_2), en $3060\text{-}2927\text{ cm}^{-1}$ ($\nu\text{C-H}$), en 1564 cm^{-1} (δNH_2), y en 1213 cm^{-1} ($\nu\text{C-N}$). La presencia de la banda en 3337 cm^{-1} en el polímero indica la presencia de una amina primaria aromática (Figura 13). La relación de áreas de (νNH_2)/($\nu\text{C-N}$) presenta aproximadamente el mismo valor en el polímero que en el monómero, lo cual indica que en el polímero se mantiene el enlace C-N. La relación de áreas de (νNH_2)/($\nu\text{C-H}$) fue tres veces menor en el polímero con respecto al monómero y que se debe a que el área de νNH_2 se mantiene con la disminución del área de $\nu\text{C-H}$, lo que implica que el polímero presenta grupos amino libres.

El infra-rojo del copolímero (Figura 14) presenta una banda en $3500\text{-}3200$ con centro en 3345 cm^{-1} similar en forma a la banda $\nu\text{N-H}$ del indol, Sin embargo, el que dicha banda sea un poco ancha puede deberse a νOH fenólicos y a la formación de puentes de hidrógeno entre las unidades estructurales. La banda a 3058 cm^{-1} corresponde a los grupos metilo-metileno, la cual presenta una relación de áreas de ($\nu\text{N-H}/\nu\text{C-H}$) mucho mayor a la observada en los homopolímeros. La presencia de una pequeña banda a 1700 cm^{-1} puede corresponder a grupos quinoidales formados a partir del fenol, sin embargo la mayor intensidad de la banda de 1225 cm^{-1} atribuida a la $\nu\text{C-O}$ de fenoles con OH's libres indican que en la cadena polimérica persisten los fenoles sobre la formación de los grupos quinoidales.

Las bandas a 1588 y 1496 cm^{-1} pueden deberse a la $\nu\text{C}=\text{C}$ de anillos aromáticos ó al δNH_2 . Sin embargo, la primera de estas dos bandas sólo aparece cuando un grupo fenilo está conjugado con grupos insaturados o con grupos que presentan pares de electrones desapareados. Estos datos en conjunto pueden proponer que la unión de los monómeros se da mayoritariamente a través de enlaces C-C favoreciendo el aumento en la conjugación y permaneciendo los grupos NH_2 de la anilina y OH del fenol.

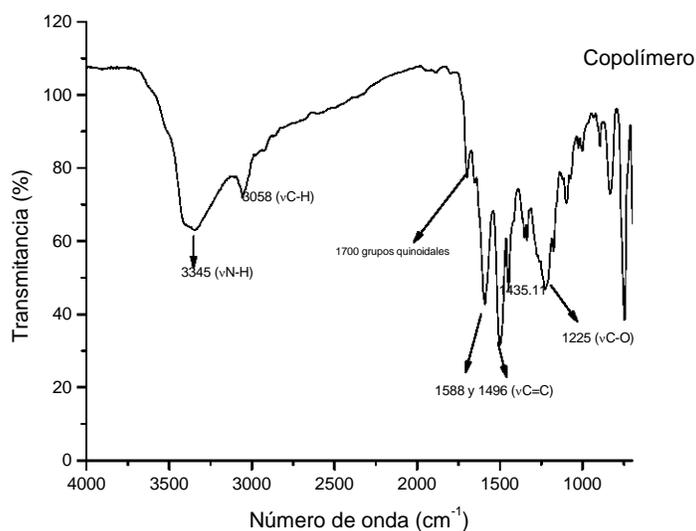
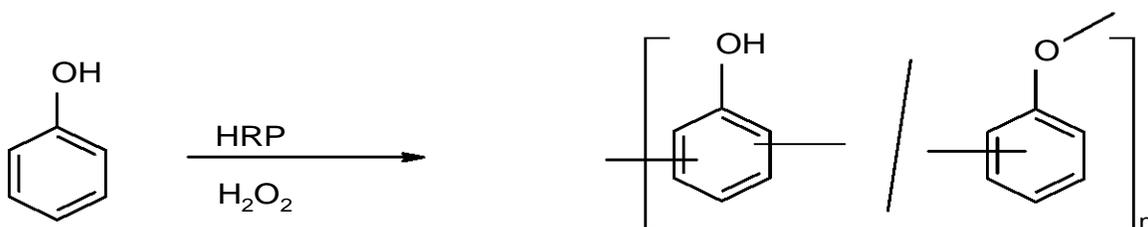


Figura 14. Espectro de FTIR del copolímero.

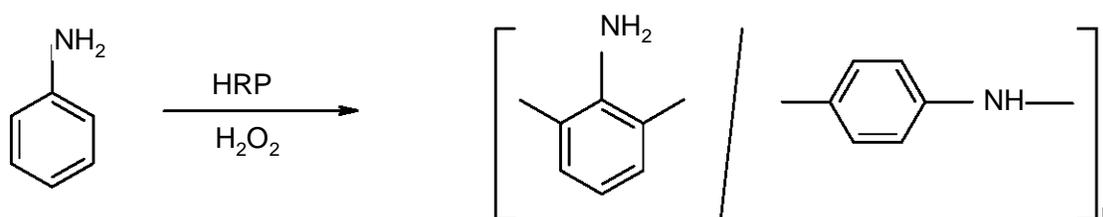
RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H y ^{13}C

Los espectros ^1H RMN del homopolímero de indol sintetizado enzimáticamente en diferentes disolventes mostraron un patrón de señales similar entre ellos, lo que nos indica que poseen la misma estructura (Figura 15, 16 y 17). El espectro presenta 3 zonas características, 3.6 ppm (2H, $-\text{CH}_2-$), 6.7-8.1 ppm (protones aromáticos) y 11.1 ppm (1H, $-\text{NH}-\text{C}-\text{OH}$). El polímero sintetizado por vía química muestra una relación de áreas $\delta_{6.7-8.1}/\delta_{11.1}$ menor con respecto al polímero enzimático, lo que indica un menor número de protones aromáticos (Figura 17 y 18). Esto implica menor grado de formación de enlaces C-C y por tanto, un menor grado de polimerización. El espectro ^{13}C NMR presenta 2 zonas características en los homopolímeros enzimáticos de indol, la primera entre $\delta 140-100$ ppm correspondiendo a carbonos aromáticos, y la segunda a $\delta 161$ ppm perteneciente al grupo carbonilo adyacente a la amina secundaria del indol (Figura 22, 23, 24).

El espectro de ^1H RMN de polifenol presenta tres zonas, la primera a $\delta 3.9$ ppm que puede deberse a grupos cetónicos presentes (Premachandran *et. al.*, 1996), la tercera correspondiente a protones aromáticos $\delta 6.0-8.0$ ppm y por último, un ancho pico $\delta 9.6$ ppm correspondiente a protones fenólicos (Figura 20). El espectro de ^{13}C RMN presentó señales entre $\delta 115-135$ y $\delta 151-162$ ppm. No se observan señales entre $\delta 140-150$ ppm indicando que un acoplamiento oxifenileno es descartado (Figura 27). Uyama *et. al* (1996), reportaron que en ^{13}C RMN las señales a $\delta 115$, 123, 130 y 154 ppm corresponden a carbonos de poli(fenileno) 2,6 disustituido, en tanto que las señales $\delta 119$ y 157 ppm se asignaron a carbonos de poli(oxifenileno) 1,4-disustituidos. A partir de estos datos espectrales y los estudios mostrados se consideró que la polimerización de fenol se llevó a cabo principalmente a través de acoplamientos orto-carbono-carbono y para-carbono-oxígeno.



En el espectro ^1H RMN de PANI se observan dos zonas de interés, la primera a $\delta 3.5$ ppm (1H , $-\text{NH}_2$), la segunda a $\delta 6.0\text{-}9.2$ ppm ($-\text{CH}_2-$) correspondiente a los protones aromáticos (Figura 19). El espectro de ^{13}C RMN del polímero presenta la señal característica de carbonos aromáticos entre $\delta 100\text{-}130$ ppm así como una señal a $\delta 162$ ppm correspondiente a una amina primaria (Figura 26). A partir de estos datos espectrales, se consideró que la polimerización se llevó a cabo mayoritariamente a través de uniones orto-carbono-carbono.



El copolímero presentó tres zonas características en ^1H RMN (Figura 21). La primera a $\delta 4.1$ ppm que puede corresponder a los protones de aminas, la segunda a $\delta 6.0\text{-}8.0$ ppm correspondiente a protones aromáticos y, por último, a $\delta 11.1$ ppm que correspondería a protones fenólicos y/o cetónicos. El espectro de ^{13}C RMN muestra dos señales importantes, la primera de los carbonos aromáticos ($\delta 115\text{-}140$ ppm) y la segunda correspondiente a $\delta 162$ ppm que se atribuyó a una amina primaria (Figura 28).

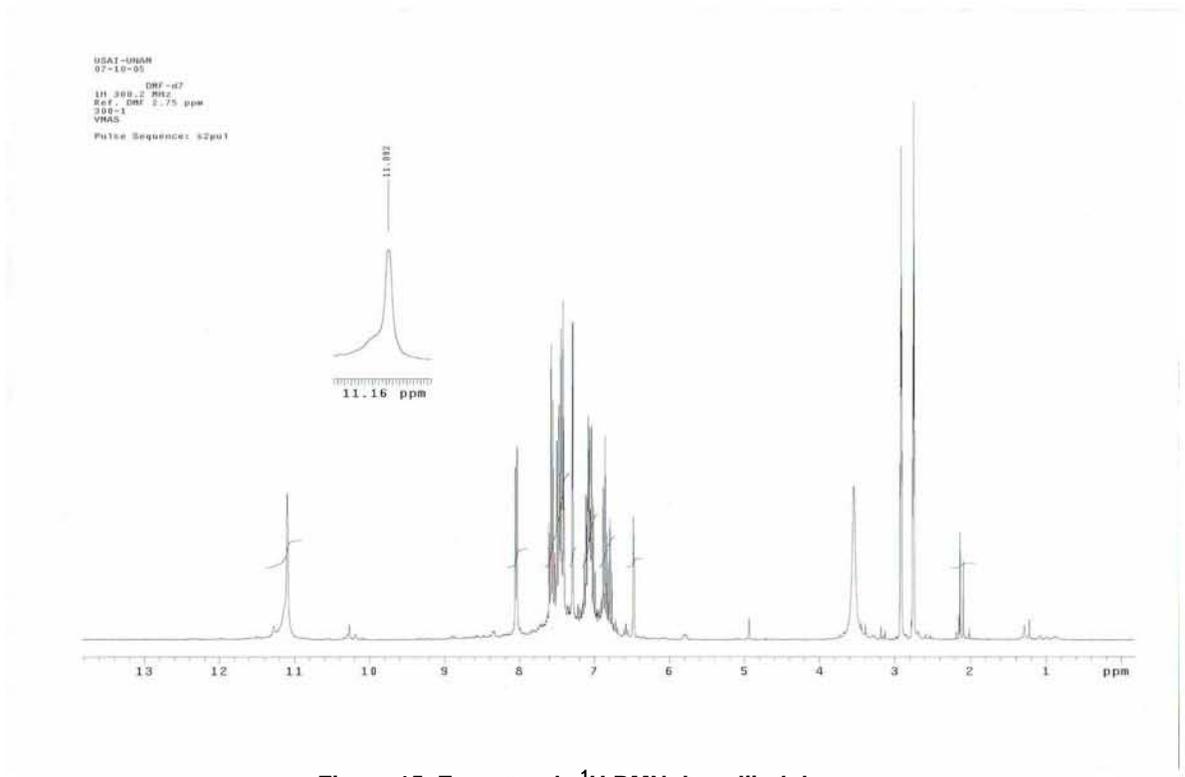


Figura 15. Espectro de ^1H RMN de poliindol_{acetona}

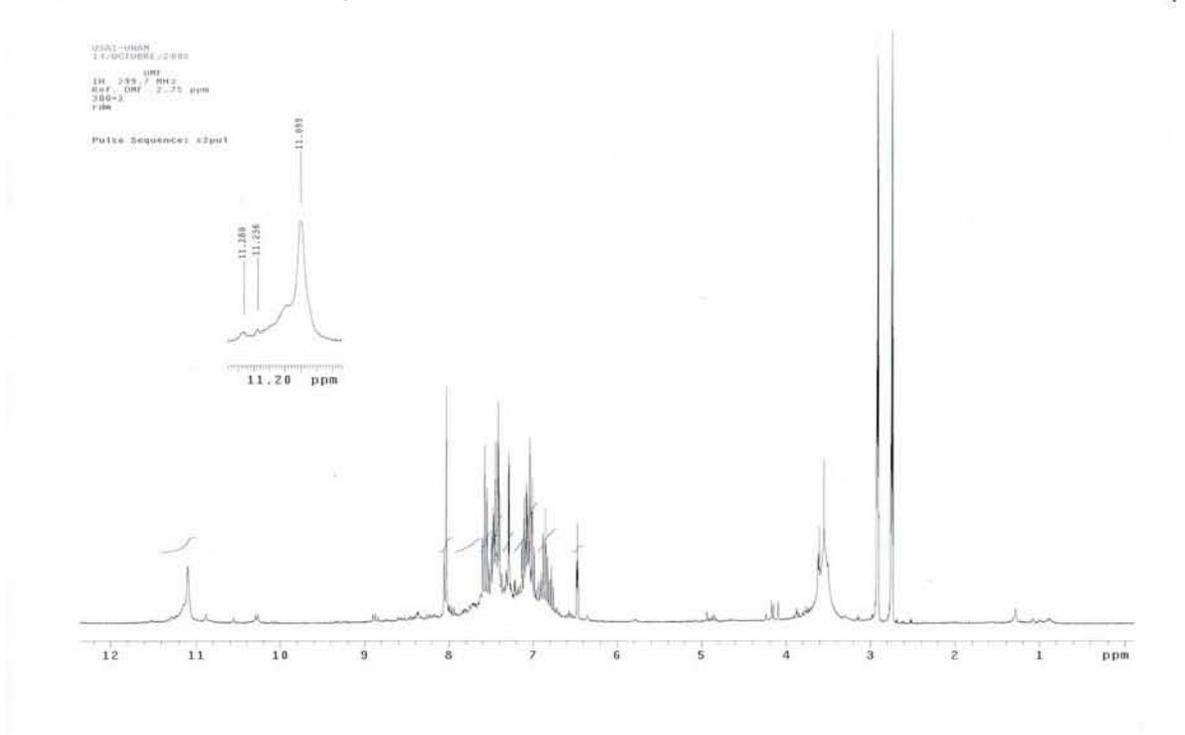


Figura 16. Espectro de ^1H RMN de poliindol_{dioxano}

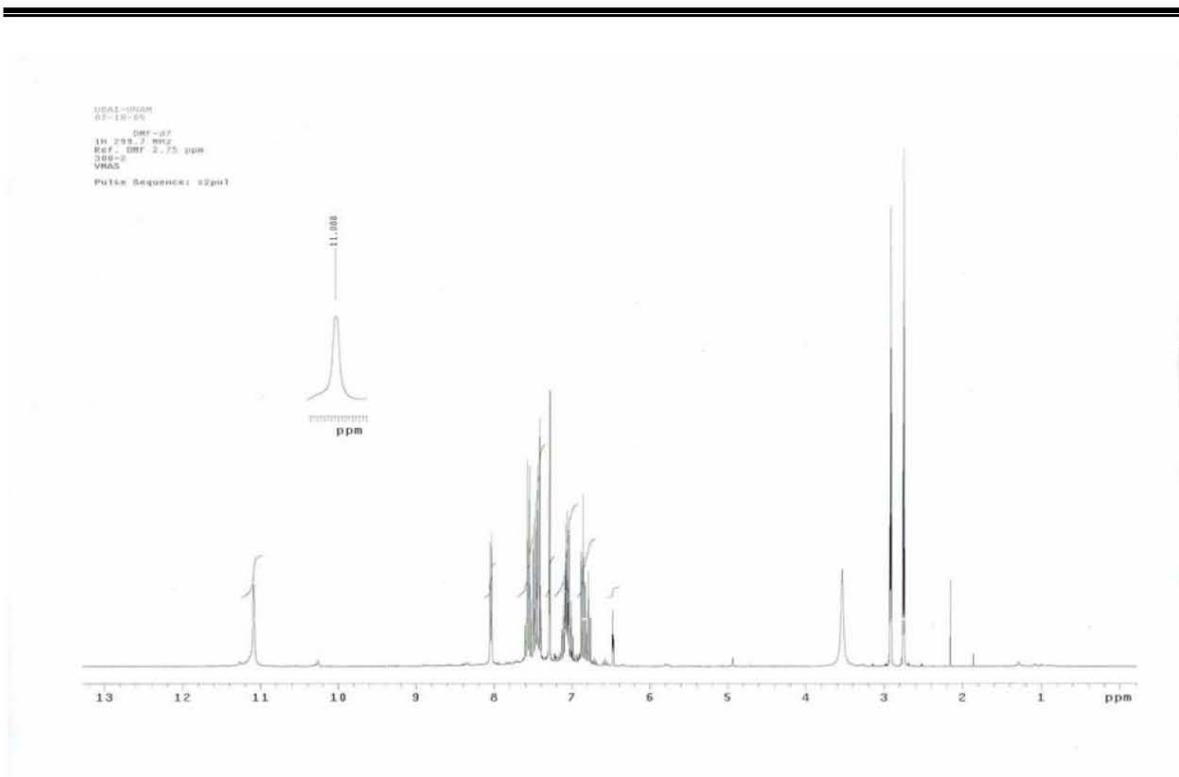


Figura 17. Espectro de ^1H RMN de poliindol_{ACN} enzimático.

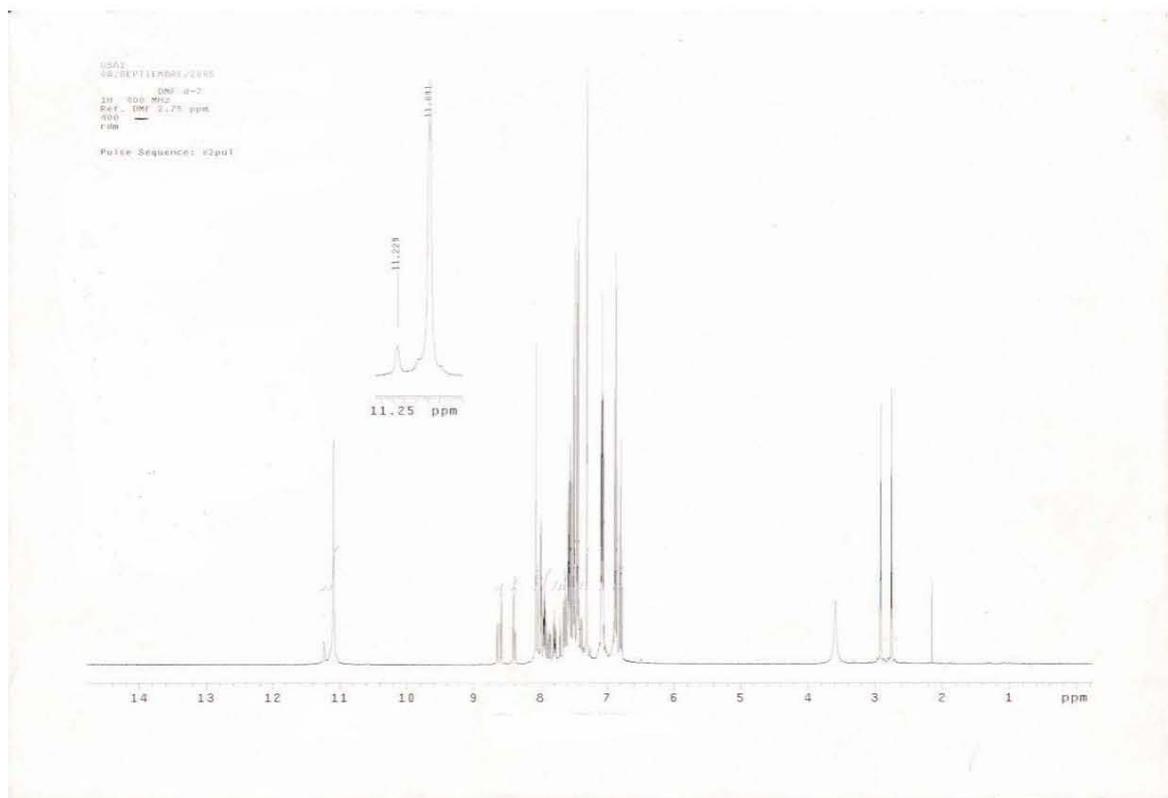


Figura 18. Espectro de ^1H RMN de poliindol químico.

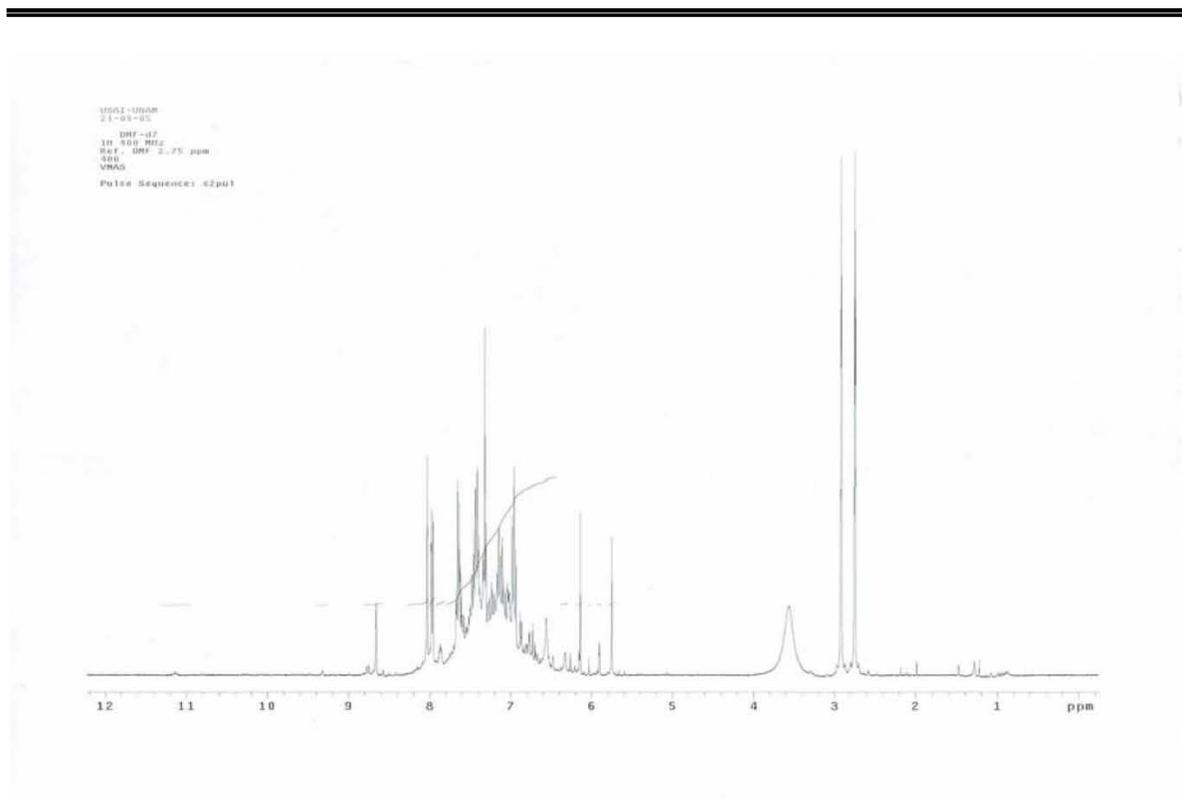


Figura 19. Espectro de ^1H RMN de polianilina.

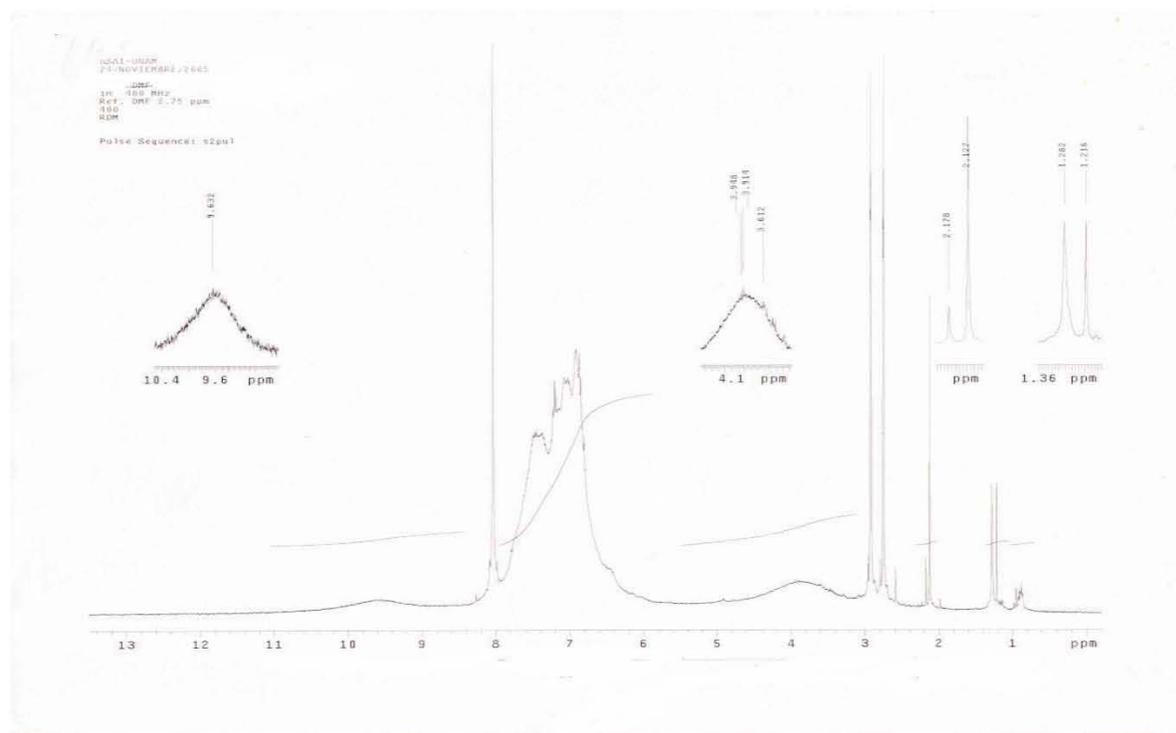


Figura 20. Espectro de ^1H RMN de polifenol.

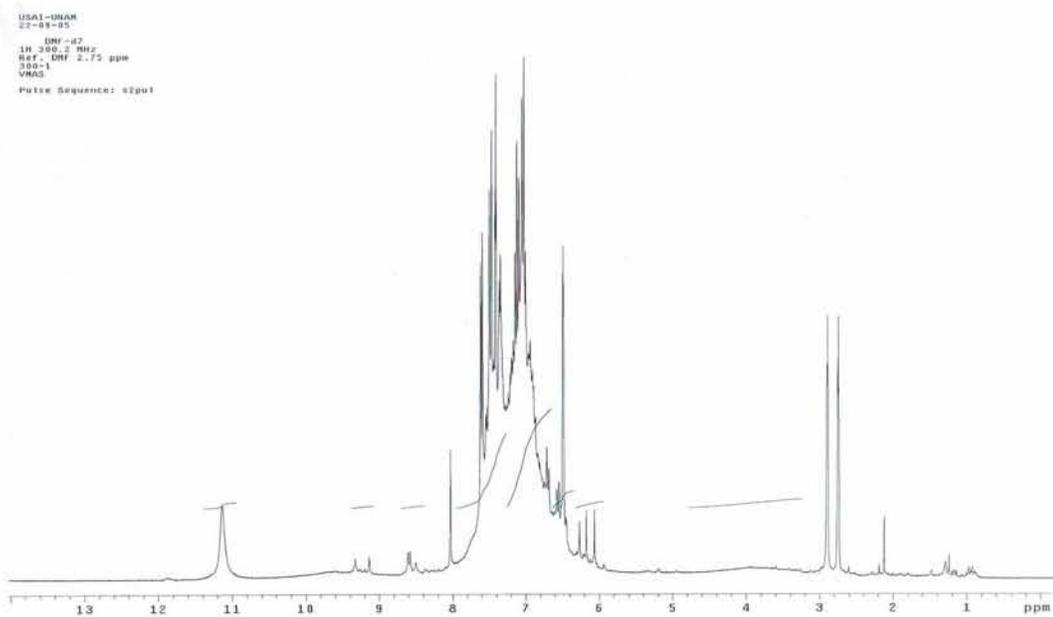


Figura 21. Espectro de ^1H RMN del copolímero.

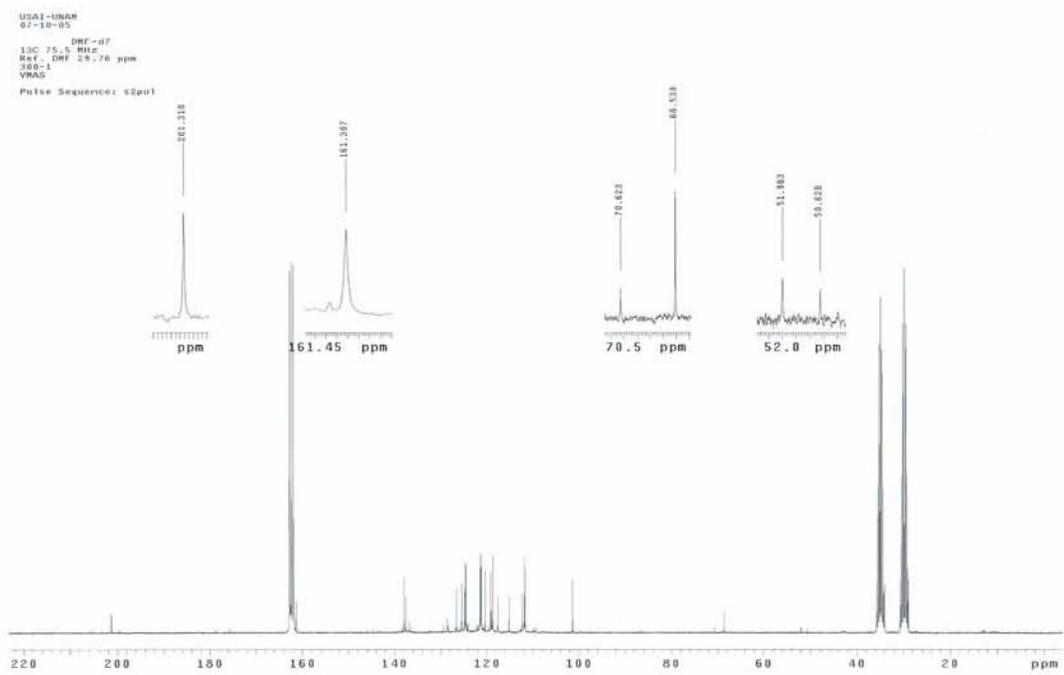


Figura 22. Espectro de ^{13}C RMN de poliindol_{acetona}.

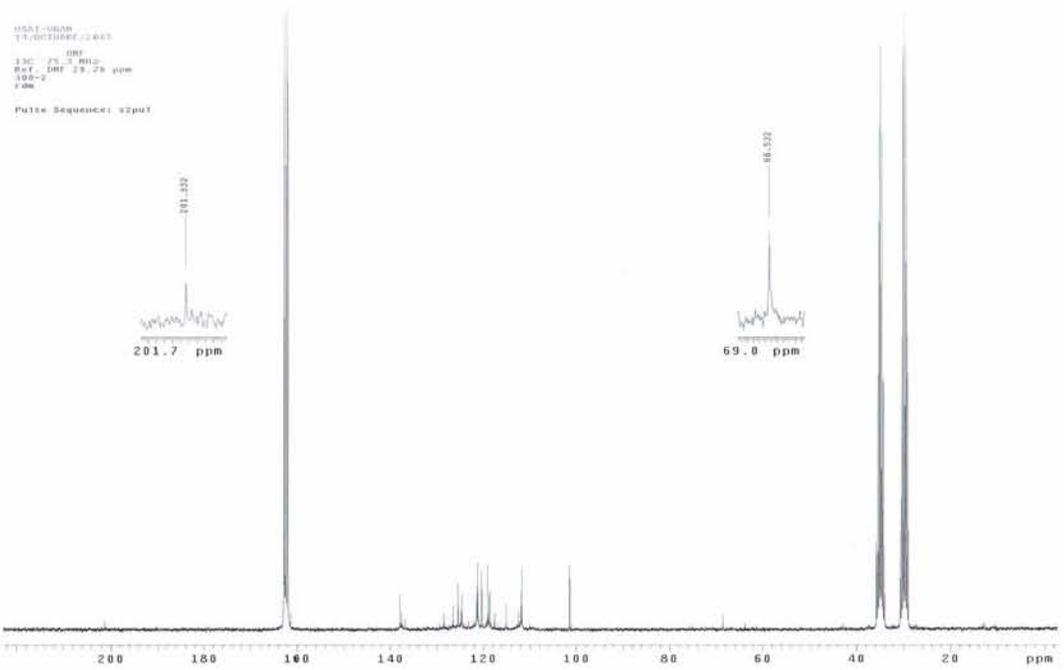


Figura 23. Espectro de ^{13}C RMN de poliindol_{dioxano}.

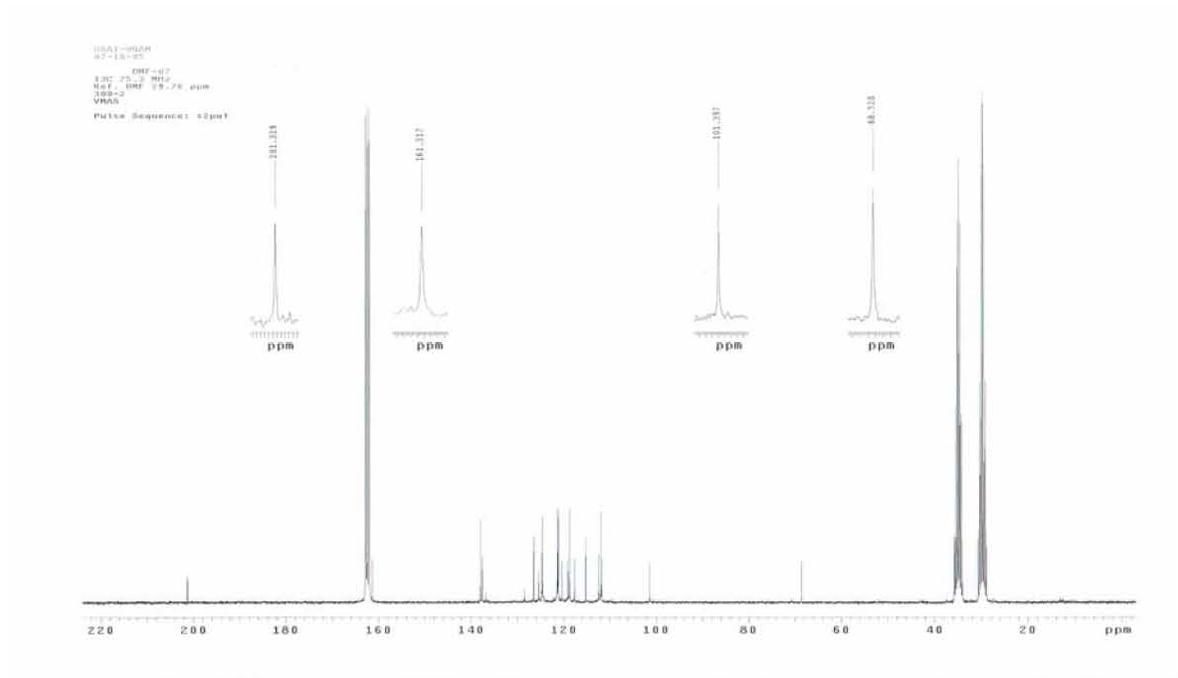


Figura 24. Espectro de ^{13}C RMN de poliindol_{ACN} enzimático.

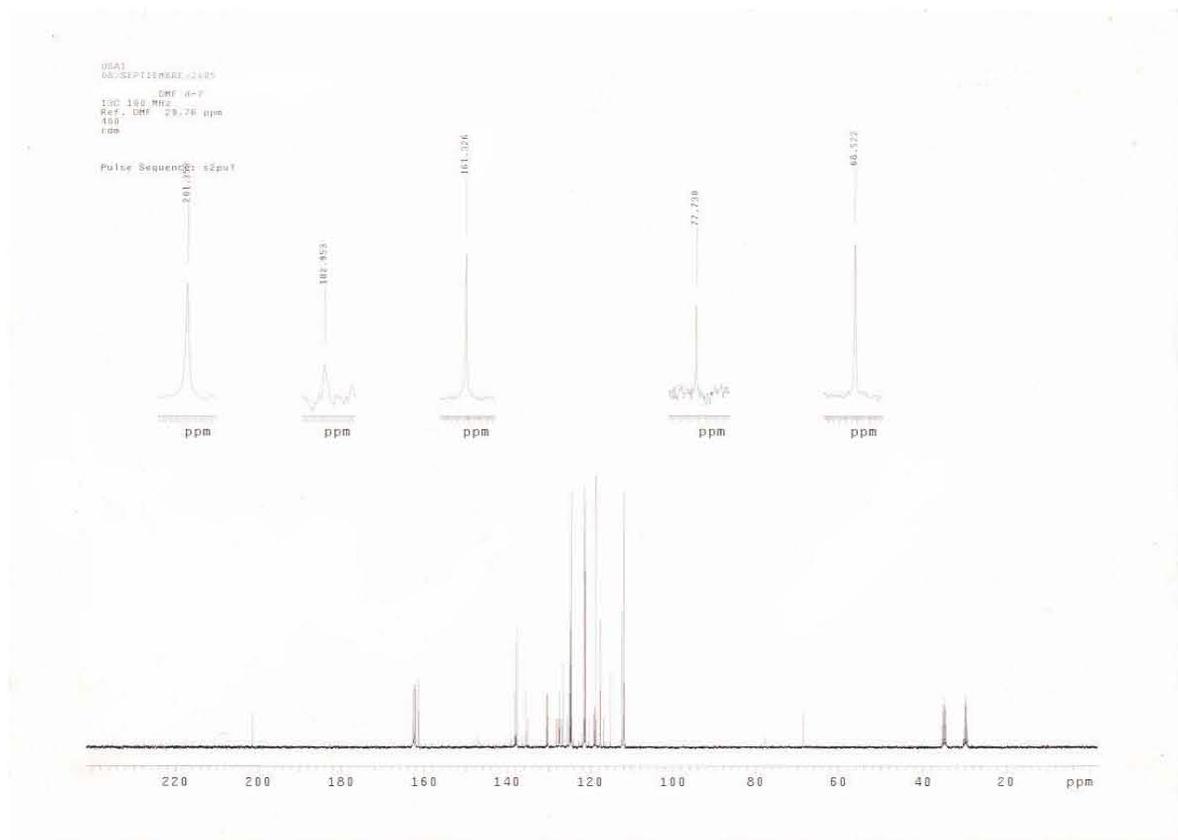


Figura 25. Espectro de ^{13}C RMN de poliindol químico.

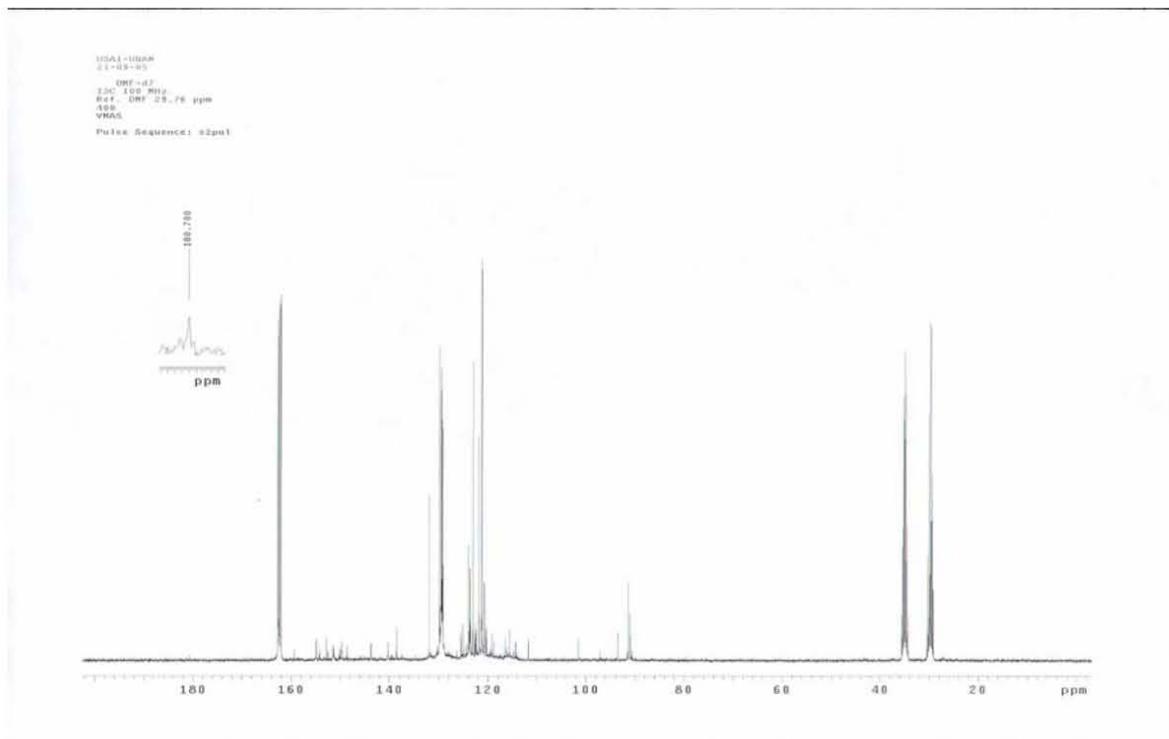


Figura 26. Espectro de ^{13}C RMN de polianilina.

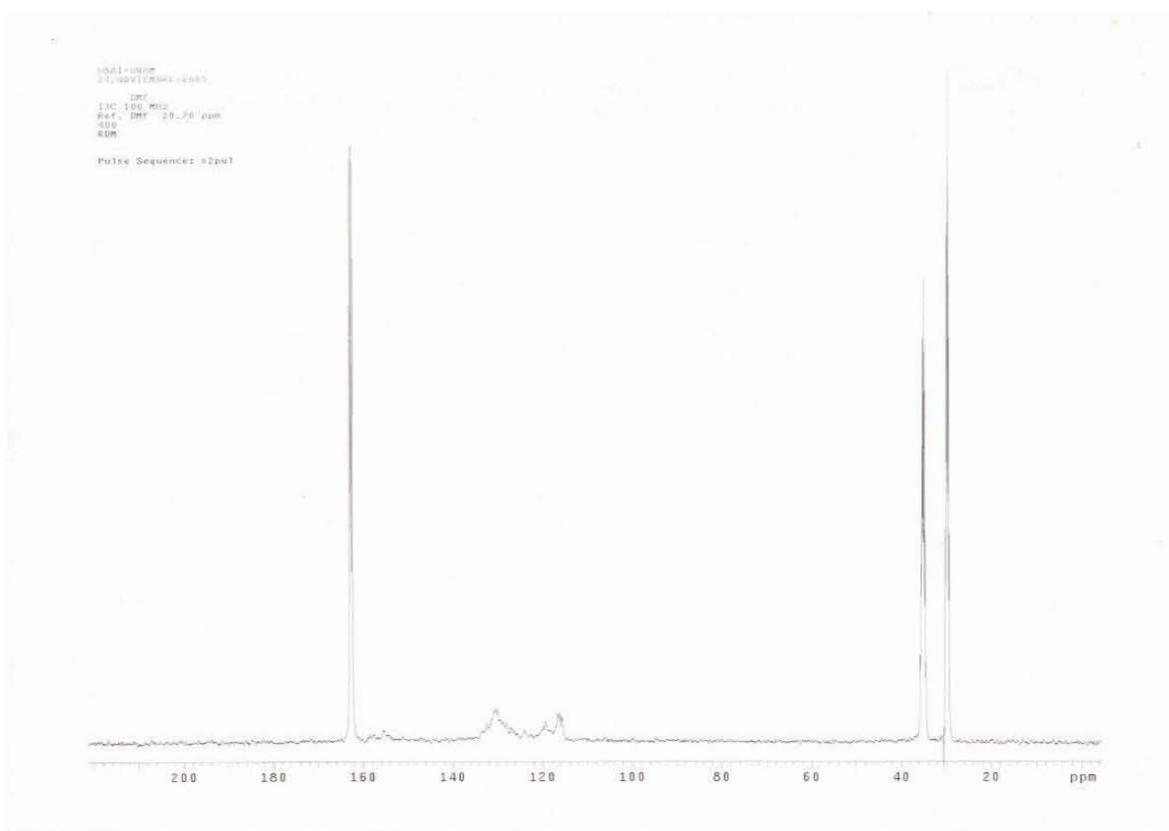


Figura 27. Espectro de ^{13}C RMN de polifenol.

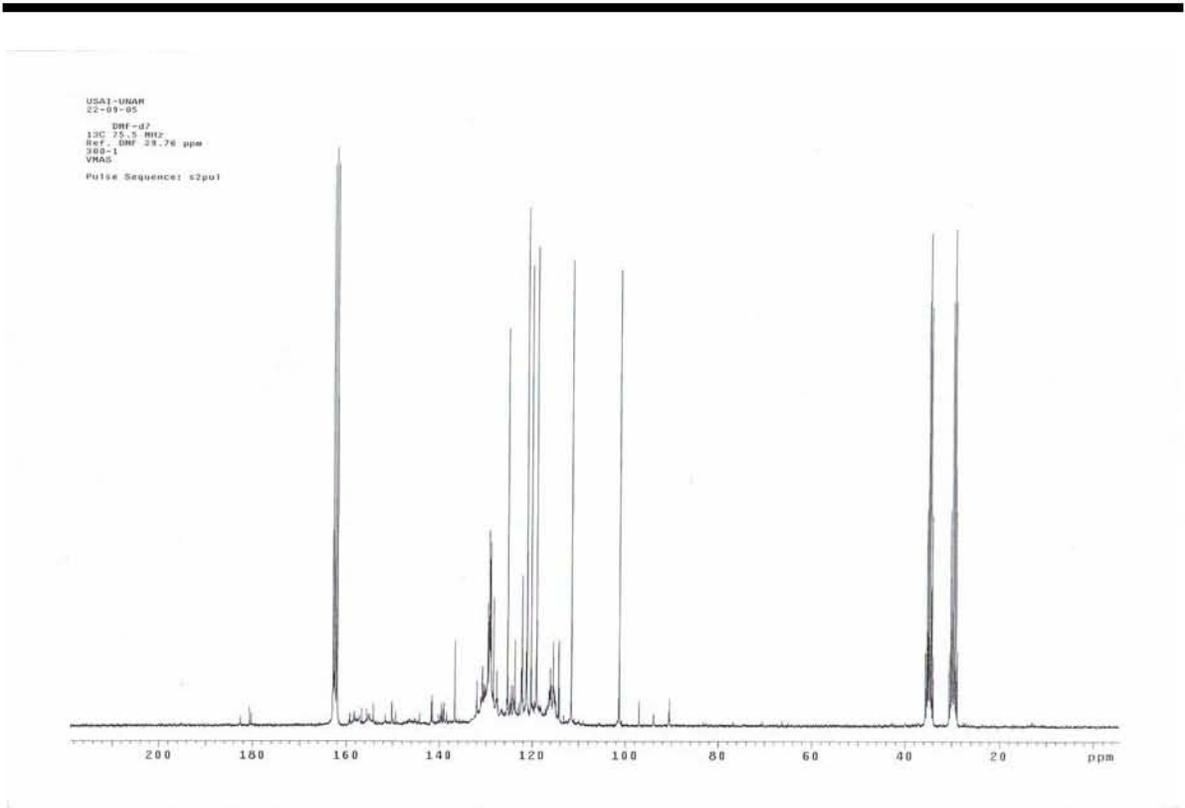


Figura 28. Espectro de ^{13}C RMN del copolímero.

PROPIEDADES TÉRMICAS

Se realizó el estudio de todos los polímeros sintetizados por calorimetría de barrido diferencial (DSC) en un rango de -30 a 300 °C bajo una atmósfera de nitrógeno, para lo cual se registraron los datos del segundo o tercer barrido

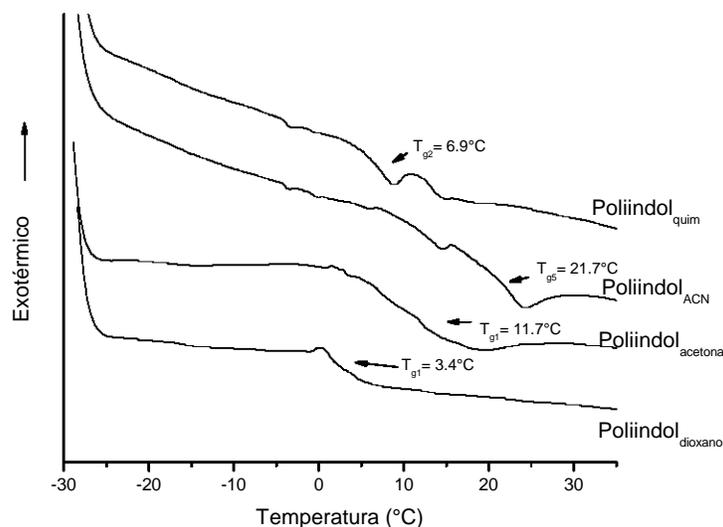


Figura 29. Termogramas de los diferentes poliindoles sintetizados.

Cada uno de los poliindoles presentó sólo una transición. La T_g del poliindol_{dioxano} se observó a 3.4 °C y la del poliindol_{acetona} se observó a 11.7 °C, las cuales son mas bajas que la presentada por el poliindol_{ACN} (21.7 °C). La diferencia en los valores de T_g 's pueden deberse a que el sistema en el que se sintetiza el polímero pudiera tener un efecto sobre el grado de polimerización y conformación del polímero. El poliindol_{ACN} presentó el valor de T_g más alto, lo cual podría indicar que este presenta el mayor peso molecular. Los tres polímeros presentaron temperaturas de transición bajas, lo cual podría permitir que su manipulación y aplicación fueran factibles.

El poliindol químico presentó una sola transición a 6.9 °C, dicho valor de Tg es menor que la del poliindol enzimático sintetizado en acetonitrilo, lo cual, indicaría que el poliindol químico presentó un menor grado de polimerización que el poliindol enzimático (Figura 29).

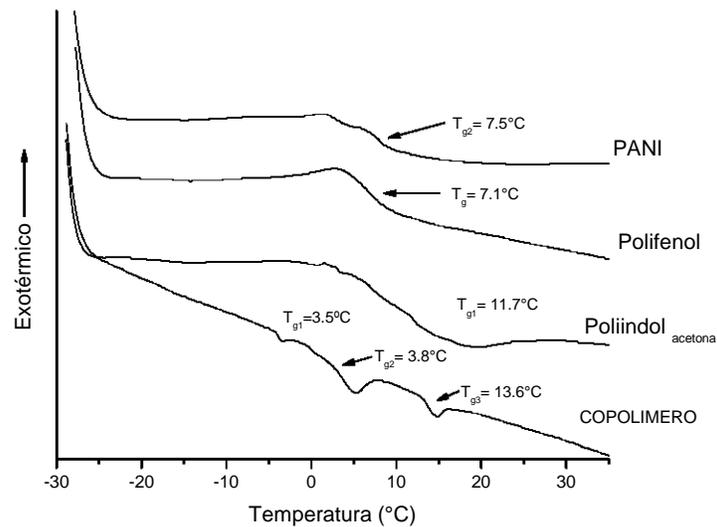


Figura 30. Termogramas de los homopolímeros y el copolímero.

El polifenol sintetizado en este estudio presentó una transición a 7.1 °C (Figura 30). Esta temperatura es menor a la reportada para el poli (2,6-dimetil-1,4-oxifenileno) de 136 °C (Ikeda *et. al.*, 1996). Por su parte, Uyama *et. al.* (1996) y Oguchi *et. al.* (2000) reportaron que polifenoles enzimáticos no presentan Tg debajo de 300 °C. Adicionalmente, se sabe que la Tg de resoles líquidos es inferior a la temperatura ambiente, lo cual nos permite inferir haber obtenido un polímero de alto peso molecular, cuyo arreglo espacial pudiera ser similar al de los resoles líquidos.

Asimismo, este resultado muestra que los polifenoles sintetizados enzimáticamente pueden presentar transiciones vítreas, y que el no observarlas no necesariamente es una propiedad característica de dichas resinas fenólicas (Uyama *et. al.*, 1996; Oguchi *et. al.*, 2000).

La polianilina obtenida presentó una transición vítrea a 7.5 °C. La polianilina sintetizada presentó un valor de Tg bajo en comparación con el valor reportado para polianilina *orto* dirigida (100-140 °C) (Lim *et. al.*, 2000). Lo anterior, hace evidente que la polianilina sintetizada en este trabajo cuenta con mayor espacio disponible entre las cadenas poliméricas. Estos datos sugieren la obtención de una polianilina procesable.

Por último, el termograma del copolímero sintetizado presentó tres transiciones vítreas a -3.5, 3.8 y a 13.6 °C, las cuales no coinciden con las observadas para los homopolímeros lo que nos indica la formación de un producto totalmente diferente a los homopolímeros. De forma similar a lo observado en los homopolímeros, las temperaturas de transición son bajas lo que indica la existencia de espacio disponible entre las cadenas poliméricas. El que este polímero presente Tg's bajas es una característica interesante que lo hace más manipulable y flexible que polímeros con Tg's altas, lo cual puede ser aplicado en múltiples campos de interés.

CONCLUSIONES

La técnica de polimerización enzimática permitió la síntesis de polímeros cuyas características cromatográficas, espectroscópicas y térmicas demuestran la obtención de polímeros novedosos y de interés en diferentes áreas de aplicación.

De las condiciones de reacción estudiadas para la polimerización de indol, el sistema con acetona permitió la obtención de un producto con mayor rendimiento, sin embargo, el estudio en cromatografía en capa fina mostró que el sistema con dioxano permite la obtención de sólo una fracción polimérica.

Las diferentes técnicas espectroscópicas mostraron que los homopolímeros sintetizados en acetona y dioxano presentan gran similitud estructural. A partir de los datos obtenidos de estas técnicas se infirió que la polimerización se da principalmente mediante uniones del anillo bencénico del indol. En lo que se refiere a sus propiedades térmicas, presentaron una diferencia de 8° en la transición vítrea, lo cual indica una diferencia en su grado de polimerización o arreglo espacial.

Por su parte, el homopolímero de indol sintetizado en acetonitrilo presentó, al igual que el poliindol sintetizado en acetona, dos fracciones poliméricas. Sin embargo, los espectros de fluorescencia e infrarrojo mostraron que, además del proceso de polimerización, se presenta la inserción de oxígeno en el carbono alfa al nitrógeno.

El estudio de calorimetría corrobora que el proceso enzimático permite un mayor grado de polimerización con respecto al proceso en ausencia de HRP. La polimerización con peróxido de hidrógeno favorece la oxidación por inserción de átomos de oxígeno.

Los homopolímeros de fenol y anilina sintetizados en este trabajo, pese a ser estructuralmente similares a los reportados por diferentes autores, presentaron una gran diferencia en la temperatura de transición vítrea, lo cual es posible se deba a que los polímeros presentan un M_n muy bajo.

Por último, en el copolímero conformado por anilina, fenol e indol, las unidades se unen principalmente mediante enlaces carbono-carbono obteniéndose un sistema altamente conjugado aparentemente aun mayor al observado en los homopolímeros. El estudio cromatográfico y espectroscópico del heteropolímero demuestran la obtención de dos fracciones poliméricas que presentan un arreglo totalmente diferente entre ellas. En el estudio térmico del mismo, fueron evidentes tres transiciones vítreas, de las cuales las más cercanas es posible correspondan a una misma fracción con diferente conformación en tanto que la transición restante correspondería a la segunda fracción polimérica.

REFERENCIAS

Aburto, J. and Le Borgne, S. *Molecular recognition and adsorption of dibenzothiophene sulphone by an imprinted and stimuli-responsive hydrogel of chitosan*. *Macromolecules* 37:8 (2004) 2938-2943.

Akkara, J., Salapu, P., Samuelson, L. and Kaplan, D. *Synthesis and characterization of polyphenols from peroxidase-catalyzed reactions*. *Enzyme and Microbial Technology* 13:6 (1991) 521.

Allard, S., Braun L., Brehmer M., Zentel, R. *Oligothiophenes for pattern formation by stamping*. *Macromolecular Chemistry and Physics* 204 (2003) 68-45.

Alvarez, S., Manolache, S., Denes, F. *Synthesis of polyaniline using horseradish peroxidase immobilized on plasma- functionalized polyethylene surfaces as initiator*. *Journal of Applied Polymer Science* 88 (2003) 369-379.

Ayyagari, M., Marx, K., Tripathy, S., Akkara, J., Kaplan, D. *Controlled free-radical polymerization of phenol derivatives by enzyme-catalyzed reactions in organic solvents*. *Macromolecules* 28 (1995) 5192-5197.

Ayyagari, M., Akkara, J., Kaplan, D. *Characterization of phenolic polymers synthesized by enzyme-mediated reactions in bulk solvents and at oil-water interfaces*. *Materials Science and Engineering C4*: 3 (1996) 169-173.

Bakhshi, A., Ladik, J., Seel, M. *Comparative study of the electronic structure and conduction properties of polypyrrole, polythiophene and polyfuran and their copolymers*. *The American Physical Society* 35:2 (1987) 704-712.

Billuad, D., Maarouf, E., Hannecart, E. *Chemical oxidation and polymerization of indole*. *Synthetic Metals* 69 (1995) 571-572.

Bruno, F., Akkara, J., Samuelson, L., Kaplan, D., Mandal, B., Marxs, K., Kumar, J., Tripathy, S., *Enzymatic mediated synthesis of conjugated polymers at the Langmuir trough air- water interface.* Langmuir 11 (1995) 889-892.

Cataldo, F., Maltese, P. *Preparation of polyaniline conductive composites with diene-rubber or polyphenylacetylene.* Polymers for Advanced Technologies 12 (2001) 293-299.

Cirpan, A., Alkan, S., Toppare, L., Hepuzer, Y., Yagci, Y. *Conducting graft copolymers of poly (3-methylthienylmethacrylate) with pyrrole and thiophene.* Journal of Polymer Science. Part. A: Polymer Chemistry 40 (2002) 4131-4140.

Colonna, S., Gaggero, N., Richelmi, C., Pasta, P. *Recent biotechnological developments in the use of peroxidases.* Trends in Biotechnology 17 (1999) 163- 168.

D'Ischia, M., Napolitano, A., Prota, G. *Peroxidase as an alternative to tyrosinase in the oxidative polymerization of 5,6-dihydroxyindoles to melanin(s).* Biochimica et Biophysica Acta 1073 (1991) 423- 430.

D'Ischia, M., Napolitano, A., Tsiakas, K., Prota, G. *New intermediates in the oxidative polymerization of 5,6-dihydroxyindole to melanin promoted by the peroxidase/H₂O₂ system.* Tetrahedron 46:16 (1990) 5789-5796.

Diamant, Y., Furmanovich, E., Landau, A., Lellouche, J-P., Zaban, A. *Electrochemical polymerization and characterization of a functional dicarbazole conducting polymer.* Electrochimica Acta 48 (2003) 507-512.

Dordick, J., Marletta, M., Klibanov, A. *Polymerization of phenols catalyzed by peroxidase in nonaqueous media.* Biotechnology and Bioengineering 30 (1987) 31-36.

Fukuoka, T., Uyama, H., Kobayashi, S. *Synthesis of ultrahigh molecular weight polyphenols by oxidative coupling.* Macromolecules 36 (2003) 8213-8215.

Genies, E., Boyle, A., Lapkowski, M., Tsintavis, C. *Polianiline: A Historical survey*. Synthetic Metals 36 (1990) 139-182.

Ghioureliotis, M., Nicell, J. *Assessment of soluble products of peroxidase –catalized polymerization of aqueous phenol*. Enzyme and Microbial Technology 25 (1999) 185-193.

Grazulevicius, J., Strohriegl, P., Pielichowski, J., Pielichowski, K. *Carbazole-containing polymers: synthesis, properties and applications*. Progress in Polymer Science 28 (2003) 1297-1353.

Grigalevicius, S., Grazulevicius, J., Gaidelis, V., Jankauskas, V. *Synthesis and properties of poly(3,9-carbazole) and low–molar–mass glass-forming carbazole compounds*. Polymer 43 (2002) 2603-2608.

Hino, S., Iwasaki, K., Matsumoto, K., *Ultraviolet photoelectron spectra of electropolymerized polymers: polyazulene, polypyrene and polycarbazole*. Synthetic Metals 64 (1994) 259-264.

Ikeda, R., Uyama, H., Kobayashi, S., *Novel synthetic pathway to a poly(phenylene oxide). Laccase-Catalized oxidative polymerization of syringic acid*. Macromolecules 29 (1996) 3053-3054.

Inganäs, O., Carlberg, C. and Yohannes, T., *Polymer electrolytes in optical devices*, Electrochimica Acta 43:10-11 (1998) 1615-1621.

Johannes, C., Majcherczyk, A. *Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccasa mediator systems*. Applied and Environmental Microbiology 66:2 (2000) 524-528.

Kim, D., Moon, H., Park, S., Hong, S. *Synthesis of photoconducting nonlinear optical side-chain polymers containing carbazole derivatives*. Reactive & Funtional Polymers 42(1999) 73-86.

Kizilyar, N., Akbulut, U., Toppare, L., Özden, M., Yagci, Y. *Immobilization of invertase in conducting polypyrrole/polytetrahydrofuran graft polymer matrices*. Synthetic Metals 104 (1999) 45-50.

Kobayashi, S. *Enzymatic polymerization: A new method of polymer synthesis*. Journal of Polymer Science. Part. A: Polymer Chemistry 37 (1999) 3041-3056.

Kobayashi S., Uyama, H., Kimura, S. *Enzymatic polymerization*. Chemical Reviews 101 (2001) 3793-3818.

Kurioka, H., Komatsu, I., Uyama, H., Kobayashi, S. *Enzymatic oxidative polymerization of alkylphenols*. Macromolecular Rapid Communications 15 (1994) 507-510.

Lim, C., Yoo, Y. *Synthesis of ortho-directed polyaniline using horseradish peroxidase*. Process Biochemistry 36 (2000) 233-241.

Liu, W., Kumar, J., Tripathy, S., Senecal, K., Samuelson, L. *Enzymatically synthesized conducting polyaniline*. Journal American Chemical Society 121 (1999) 71-78.

MacDiarmid, A. and Epstein, A. *The concept of secondary doping as applied to polyaniline*. Synthetic Metals 65: 2-3 (1994) 103-116.

Nabid, M., Entezami, A. *Enzymatic synthesis and characterization of a water-soluble, conducting poly(o toluidine)*. European Polymer Journal 39 (2003) 1169-1175.

Oguchi, T., Tawaki, S., Uyama, H., Kobayashi, S. *Enzymatic synthesis of soluble polyphenol*. Bulletin of the Chemical Society Japan 73 (2000) 1389-1396.

Pezzella, A., Napolitano, A., D'Ischia, M., Prota, G. *Oxidative polymerisation of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid to melanin: A new Insight*. Tetrahedron 52:23 (1996) 7913-7920.

Premachandran, R., Banerjee, S., Wu, X., John, V., McPherson, G. *Enzymatic synthesis of fluorescent naphthol-based polymers*. Macromolecules 29 (1996) 6452-6460.

Rao, M., John, V., Gonzalez, R., Akkara, J., Kaplan, D. *Catalytic and interfacial aspects of enzymatic polymer synthesis in reversed micellar systems*. *Biotechnology and Bioengineering* 41 (1993) 531-540.

Samuelson, L. *Biologically derived conducting and water soluble polyaniline*. *Macromolecules* 31 (1998) 4376-4378.

Saraswathi, R., Gerard, M., Malhotra, B. *Characteristics of Aqueous polycarbazole batteries*. *Journal of Applied Polymer Science* 74 (1999) 145-150.

Sayed, W., Salem, T. *Preparation of polyaniline and studying its electrical conductivity*. *Journal of Applied Polymer Science* 77 (2000) 1658-1665.

Shan, J., Cao, S. *Enzymatic Polymerization of aniline and phenol derivatives catalyzed by Horseradish Peroxidase in dioxane*. *Polymer for Advanced Technologies* 11 (2000) 288-293.

Shan, J., Han, L., Bai, F., Cao S. *Enzymatic polymerization of aniline and phenol derivatives catalyzed by Horseradish peroxidase in dioxane (II)*. *Polymer for Advanced Technologies* 14 (2003) 330-336.

Silverstein R.M., Clauyton Basler G., Morrill T., (1991) "Spectrometric identification of organic compounds". Eds. John Wiley & Sons Inc. Fifth edition.

Suematsu, S., Oura, Y., Tsujimoto, H., Kanno, H., Naoi, K. *Conducting polymer films of cross-linked structure and their QCM analysis*. *Electrochimica Acta* 45 (2000) 3813-3821.

Sun, Z., Geng, Y., Li, J., Wang, X., Jing, X., Wang, F. *Catalytic oxidization polymerization of aniline in an H_2O_2 - Fe^{2+} system*. *Journal of Applied Polymer Science* 72 (1999) 1077-1084.

Syed Abthagir, P., Dhanalakshmi, K., Saraswathi, R. *Thermal studies on polyindole and polycarbazole*. *Synthetic Metals* 93 (1998) 1-7.

Talbi, H., Monard, G., Loos, M., Billaud, D. *Theoretical investigation of the monomer reactivity in polyindole derivatives*. Synthetic Metals 101 (1999) 115-116.

Talbi, H., Monard, G., Loos, M., Billaud D. *Theoretical study of indole polymerization*. Journal of Molecular Structure (Theochem) 434 (1998) 129-134.

The practice of NMR spectroscopy with-structure correlations for hydrogen-1. Chamberlain N.E., Eds. Plenum Press, New York., 1974.

Tüken, T., Düdükçü, M., Yazici, B., Erbil, M. *The use of polyindole for mild steel protection*. Progress in Organic Coatings 50 (2004) 273-282.

Uyama, H., Kobayashi, S. *Enzyme- catalyzed polymerization to funtional polymers*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic19:20 (2002) 117-127.

Uyama, H., Kurioka, H., Kaneko, I., Kobayashi, S. *Synthesis of a new family of phenol resin by enzymatic oxidative polymerization*. Chemistry Letters (1994) 423-426.

Uyama, H., Kurioka, H., Sugihara, J., Kobayashi, S. *Enzymatic synthesis and thermal properties of a new class of polyphenol*. Bulletin of the Chemical Society Japan 69 (1996) 189-193.

Van Rantwijk, F., Sheldon, R. *Selective transfer catalysed by heme peroxidases: synthetic and mechanistic aspects*. Current Opinion in Biotechnology 6:1 (2000) 554-564.

Van de Velde, F., Van Rantwijk, F., Sheldon, R. *Selective oxidations with molecular oxygen, catalyzed by chloroperoxidase in the presence of a reductant*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 6 (1999) 453-461.

Veitch, N. *Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme*. Phytochemistry 65 (2004) 249-259.

Verghese, M., Ram, M., Vardhan, H., Malhotra, B., Ashraf, S. *Electrochromic properties of polycarbazole films*. Polymer 38 (1997) 1625-1629.

Ximenes, V., Campa, A., Catalani, L. *The oxidation of indole derivatives catalyzed by horseradish peroxidase is highly chemiluminescent*. Archives of Biochemistry and Biophysics 387:2 (2001) 173-179.

Xu, X., Kommareddi, N., McCormick, M., Baumgartner, T., John, V., McPherson, G., Akkara, J., Kaplan, D. *The microstructure of polymers enzymatically synthesized in a self-assembling environment*. Materials Science and Engineering C4 (1996) 161-168.

Yagci, Y., Toppare, L. *Electroactive macromonomers based on pyrrole and thiophene: a versatile route to conducting block and graft polymers*. Polymer International 52 (2003) 1573-1578.

Yapi Abe, S., Bernede, J., Delvalle, M., Tregouet, Y., Ragot, F., Diaz, F., Lefrant, S. *Electroluminescent polycarbazole thin films obtained by electrochemical polymerization*. Synthetic Metals 126 (2002)1-6.

Yurtsever, M., Yurtsever, E. *A DFT study of polymerization mechanisms of indole*. Polymer 43 (2002) 6019- 6025.