



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCATÁLISIS

***SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE POLÍMEROS
INTRÍNSECAMENTE CONDUCTORES***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A :

Adriana Margarita Longoria Hernández

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Rafael Vázquez Duhalt



CUERNAVACA, MORELOS 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Rafael Vázquez Duhalt.

Los estudios de maestría fueron posibles gracias a la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Para la escritura de la tesis se contó con la beca otorgada por el Programa de Fomento a la Graduación de los Alumnos de Posgrado de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A mis padres Rodolfo y Margarita por alentarme siempre a seguir adelante, por su dedicación, cariño y apoyo incondicional.

A mis hermanas Elsa, Minerva, Tania, Xóchitl, María del Carmen, Juanita y a mi hermano Eder por ser mi ejemplo para no desistir a pesar de los obstáculos encontrados.

A Raunel por estar conmigo en las buenas y en las malas, por impulsarme a ser mejor cada día y acompañarme codo a codo en la realización de este sueño.

A mis amigas Berenice y Ericka por su amistad a pesar de la distancia.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi infinita gratitud al Dr. Rafael Vázquez Duhalt por permitirme desarrollar este proyecto bajo su tutela, por todas las enseñanzas, los consejos, la paciencia y sobretodo, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo.

Quiero agradecer de manera especial al M. en B. Raunel Tinoco Valencia no sólo por el entrenamiento, apoyo técnico y académico recibido durante la realización de este proyecto, sino también por los buenos momentos compartidos.

También quiero agradecer infinitamente al Dr. Michael A. Pickard por sus sabios consejos para llevar a buen término esta etapa de mi vida y sobretodo por la donación de la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*.

Agradezco a los miembros del Comité Tutorial: Dra. Hailin Zhao Hu, por ser un ejemplo a seguir tanto profesional como personalmente y por contribuir de manera importante en mi formación académica. A los Dres. Edmundo Castillo Rosales y Rafael Vázquez Duhalt por sus atinadas aportaciones al desarrollo de este trabajo.

Quiero agradecer a los miembros del Comité de Candidatura: Dras. Laura Alicia Palomares Aguilera, María Elena Nicho Díaz y Hailin Zhao Hu; Dres. Alfredo Martínez Jiménez y Edmundo Castillo Rosales por darme el último empujón para alcanzar la meta.

Gracias a los miembros del Jurado de Grado: Dras. Laura Alicia Palomares Aguilera y María Elena Nicho Díaz; Dres. Alfredo Martínez Jiménez, Mario Soberón Chávez y Rafael Vázquez Duhalt por la revisión minuciosa de la tesis y por las sugerencias para lograr un mejor documento.

Agradezco también a la Dra. María Teresa Viana Castrillón por ayudarme a conseguir una infinidad de referencias bibliográficas y por el préstamo de equipo para el desarrollo de este proyecto.

Gracias a la Dra. Ma. Concepción Arenas Arrocena por la asistencia técnica en la realización de las mediciones referentes a la conductividad de los polímeros.

Gracias también a la Dra. Soledad Córdova Aguilar por la asesoría técnica para el análisis de imágenes.

GRACIAS

A todos los recalcitrantes con los que he convivido durante estos años. En especial a aquéllos que más que compañeros de trabajo han sido mi familia en Cuernavaca y con los que he logrado una amistad que espero sobreviva en paso del tiempo: Lorena Sánchez, Cristina Torres, Lizette Trujillo, Sergio Águila, Adriaan Jeremiasse, Alexis Rodríguez y Raunel Tinoco. También quisiera mencionar a Eduardo Torres, al cual he tenido el gusto de conocer aún cuando no coincidimos espacio-temporalmente en el laboratorio.

A los miembros de la comunidad del Instituto de Biotecnología con los que no sólo tuve la oportunidad de trabajar, compartir opiniones y aprender acerca de temas novedosos, sino que también tuve la oportunidad de gozar de su amistad. Lo más importante de todo, es que me enseñaron a valorar un buen ambiente de trabajo. Gracias por ser una comunidad tan diversa y enriquecedora.

A todos aquellos que contribuyeron de una u otra manera a la realización de este proyecto.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo la obtención de polímeros intrínsecamente conductores a partir de las anilinas sustituidas 2,6-dimetilanilina, 2,6-dicloroanilina y 2,3,5,6-tetracloroanilina empleando una peroxidasa, además de su caracterización eléctrica en ausencia y presencia de agentes dopantes.

En la primera etapa de este trabajo se realizó un estudio para elegir la enzima adecuada para la síntesis de polímeros a partir de las anilinas sustituidas. Este estudio involucró a la peroxidasa de rábano blanco, la lignino peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium*, la versátil peroxidasa de *Bjerkandera adusta* y la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*, así como las anilinas halogenadas 2,3,5,6-tetracloroanilina y pentacloroanilina y sus análogos fenólicos 2,3,5,6-tetraclorofenol y pentaclorofenol. La cloroperoxidasa fue la única de las enzimas estudiadas con la capacidad para transformar las anilinas halogenadas y por lo tanto fue elegida para la síntesis de polímeros a partir de las anilinas sustituidas.

En la segunda etapa se realizó la síntesis de polímeros empleando las anilinas sustituidas y la cloroperoxidasa. Los polímeros obtenidos fueron dopados con ácido (1*S*)-(+)-10-canforsulfónico, ácido dodecibencensulfónico y ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico en relaciones molares 1:0.25 y 1:0.5. Los polímeros dopados mostraron conductividades en la zona de semiconductores y algunos de ellos en la zona de transición entre aislantes y semiconductores. El polímero de la 2,3,5,6-tetracloroanilina dopado con ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico mostró los mayores valores de conductividad.

Finalmente se realizó un barrido con diferentes concentraciones de ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico para dopar el polímero de 2,3,5,6-tetracloroanilina y se determinó que el complejo con una relación molar 1:0.5 mostró el mayor valor de conductividad ($1.6 \times 10^{-2} \text{ S m}^{-1}$). Este valor se encuentra en la zona de semiconductores y es comparable con los valores obtenidos para otras polianilinas modificadas reportadas en la literatura.

ABSTRACT

The aim of this work was the synthesis by peroxidase catalysis of intrinsically conducting polymers from substituted anilines, such as 2,6-dimethylaniline, 2,6-dichloroaniline and 2,3,5,6-tetrachloroaniline, and their electrical characterization in the presence of doping agents.

First, a study to choose the most effective peroxidase for polymer synthesis from substituted anilines was performed. This study involved peroxidases such as horseradish peroxidase, lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*, versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta* and chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*, the halogenated anilines 2,3,5,6-tetrachloroaniline and pentachloroaniline, and their phenolic analogues 2,3,5,6-tetrachlorophenol and pentachlorophenol. Chloroperoxidase was the only enzyme able to transform the halogenated anilines and thus it was used for polymer synthesis with substituted anilines.

Secondly, polymer synthesis was carried out using the substituted anilines and chloroperoxidase. Polymers were doped with (1*S*)-(+)-10-camphorsulfonic acid, dodecylbenzenesulfonic acid and 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid at molar ratios of 1:0.25 and 1:0.5. Some doped polymers had conductivities corresponding to semiconductors, while others were in the transition zone between insulators and semiconductors. The 2,3,5,6-tetrachloroaniline polymer doped with 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid had the highest conductivity.

Finally, a wide range of 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid concentrations for doping the 2,3,5,6-tetrachloroaniline polymer was tested. A conductivity value of $1.6 \times 10^{-2} \text{ S m}^{-1}$ for the complex with molar ratio of 1:0.5 was obtained. This value corresponds to that of semiconductors and is similar to those of other modified polyanilines.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ABREVIATURAS	vii
NOMENCLATURA	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Polímeros intrínsecamente conductores	3
2.1.1 Generalidades	3
2.1.2 Tipos de polímeros intrínsecamente conductores	4
2.1.2 Mecanismos de dopado	6
2.2 Polianilina	9
2.2.1 Propiedades y aplicaciones	9
2.3 Síntesis de polianilina	11
2.3.1 Síntesis química y electroquímica	13
2.3.2 Síntesis enzimática	14
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	20
Hipótesis	20
Objetivo General	20
Objetivos Particulares	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1 Reactivos y enzimas	21
4.2 Transformación enzimática de los compuestos halogenados	22
4.3 Identificación de productos	23
4.4 Síntesis de los polímeros	24
4.5 Caracterización del polímero de TCA (PTCA)	24
4.6 Elaboración de películas de los diferentes polímeros y sus dopantes	25
4.7 Respuesta eléctrica	26
4.8 Dimensiones de los electrodos de plata	27
4.9 Medición de espesores de película	27
4.10 Determinación de los valores de conductividad	29
	iii

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
5.1 Selección de la peroxidasa	31
5.1.1 Evaluación de cuatro peroxidasas con cuatro sustratos halogenados	31
5.1.2 Identificación de productos	35
5.2 Síntesis y caracterización eléctrica de los polímeros	44
5.2.1 Síntesis de polímeros	44
5.2.2 Conductividad de los polímeros	48
5.3 PTCA dopado con diferentes concentraciones de AMPSA	52
6. CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES	57
Conclusiones generales	57
Recomendaciones	58
REFERENCIAS	59
APÉNDICES	64
Apéndice I. Artículo: Chloroperoxidase-mediated transformation of highly halogenated monoaromatic compounds	64
Apéndice II. Identificación de compuestos mediante espectrometría de masas	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividad específica de las diferentes peroxidasas con los compuestos halogenados.	34
Tabla 2. Constantes catalíticas de la CPO para la transformación de los compuestos halogenados.	34
Tabla 3. Datos de espectrometría de masas de los productos de la transformación de los compuestos halogenados empleando las diferentes peroxidasas.	36
Tabla 4. Datos de espectrometría de masas de los productos obtenidos mediante la transformación de la DCA y de la DMA por la CPO.	45
Tabla 5. Valores de conductividad de los diferentes polímeros dopados y sin dopar.	49
Tabla 6. Espesores de película determinados por análisis de imágenes.	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de los polímeros intrínsecamente conductores más estudiados.	5
Figura 2. Conductividad de los polímeros conjugados comparada con otros materiales.	6
Figura 3. Mecanismo de dopado por ácidos protónicos de la forma emeraldina base de la polianilina (PANI).	8
Figura 4. Estados de oxidación intrínsecos de la PANI.	9
Figura 5. Oxidación de la anilina y consecuente formación de un radical catiónico.	11
Figura 6. Síntesis de la PANI.	12
Figura 7. Representación de la polimerización enzimática de la PANI en presencia de poliestireno sulfonado (SPS).	17
Figura 8. Anilinas sustituidas propuestas para la síntesis de polímeros lineales.	19
Figura 9. Sistema de secado a temperatura controlada para la formación de películas.	26
Figura 10. Electrodo de plata dibujados sobre las películas.	27
Figura 11. Posicionamiento de las películas para su observación al microscopio.	28
Figura 12. Ejemplo de las imágenes adquiridas para determinar el espesor de película.	29
Figura 13. Representación de un conductor tridimensional.	30
Figura 14. Compuestos halogenados empleados en la selección de la peroxidasa para la síntesis de polímeros intrínsecamente conductores.	32
Figura 15. Productos de la transformación del pentaclorofenol (PCP) empleando peroxidasa.	37
Figura 16. Productos de la transformación del 2,3,5,6-tetraclorofenol (TCP) empleando peroxidasa.	38
Figura 17. Productos de la transformación de la pentacloroanilina (PCA) empleando la cloroperoxidasa (CPO).	39
Figura 18. Productos de la transformación de la 2,3,5,6-tetracloroanilina (TCA) empleando la cloroperoxidasa (CPO).	40
Figura 19. Espectros de infrarrojo de la TCA y el polímero de TCA (PTCA).	42
Figura 20. Estructura propuesta para el PTCA.	43
Figura 21. Cloroperoxidasa de <i>Caldariomyces fumago</i> .	44
Figura 22. Productos de la 2,6-dicloroanilina (DCA) empleando la cloroperoxidasa (CPO).	46
Figura 23. Productos de la 2,6-dimetilanilina (DMA) empleando la cloroperoxidasa (CPO).	47
Figura 24. Conductividad de los polímeros de DMA, DCA y TCA dopados y sin dopar.	51
Figura 25. Conductividad de PTCA dopado y sin dopar con AMPSA a diferentes concentraciones.	54
Figura 26. Comparación del valor de conductividad del complejo PTCA-AMPSA con valores de polianilinas modificadas.	56

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPSA	Ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico
CPO	Cloroperoxidasa de <i>Caldariomyces fumago</i>
CSA	Ácido (1S)-(+)-10-Canforsulfónico
DBSA	Ácido dodecilbencensulfónico
DCA	2,6-Dicloroanilina
DMA	2,6-Dimetilanilina
HRP	Peroxidasa de rábano blanco
LiP	Lignino peroxidasa de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>
PANI	Polianilina
PCA	Pentacloroanilina
PCP	Pentaclorofenol
PDCA	Polímero de DCA
PDMA	Polímero de DMA
PIC	Polímero intrínsecamente conductor
PTCA	Polímero de TCA
SPS	Poliestireno sulfonado
TCA	2,3,5,6-Tetracloroanilina
TCBQ	2,3,5,6-Tetracloro- <i>p</i> -benzoquinona
TCP	2,3,5,6-Tetraclorofenol
VP	Peroxidasa versátil de <i>Bjerkandera adusta</i>

NOMENCLATURA

- A Área transversal (metros cuadrados, m^2)
- d Espesor de la película (metros, m)
- I Corriente (ampers, A)
- L Longitud de los electrodos de plata (m)
- R Resistencia (ohms, Ω)
- R_s Resistencia por cuadro (Ω)
- S Separación entre los electrodos de plata (m)
- V Voltaje (volts, V)
- ρ Resistividad (ohms por metro, Ωm)
- σ Conductividad (siemens* por metro, $S m^{-1}$)

*Siemens es una medida de conductividad eléctrica equivalente a ohm^{-1} ó mho. En un principio, al ohm^{-1} por ser el inverso de la unidad de resistencia se lo denominó mho, la palabra original escrita al revés. Para simplificar, en las últimas décadas del siglo XX se propuso denominar al mho como Siemens asignándole como símbolo la letra S mayúscula.

1. INTRODUCCIÓN

El creciente avance tecnológico demanda el desarrollo de materiales con propiedades y características que permitan la fabricación de productos novedosos y disminuir los costos de producción, además de que la disposición final de los mismos tenga un menor impacto ecológico. Los polímeros intrínsecamente conductores pueden sustituir a los metales conductores y semiconductores inorgánicos en infinidad de dispositivos ópticos y electrónicos con la ventaja de que mantienen las propiedades mecánicas y facilidad de procesamiento de un polímero convencional. Además, para la fabricación de éstos polímeros conductores se pueden emplear procesos enzimáticos, reduciendo el impacto sobre el ambiente, ya que por lo general las enzimas requieren condiciones suaves de reacción tales como temperatura, pH y presión.

Entre los polímeros intrínsecamente conductores más estudiados y con mayor potencial industrial se encuentra la polianilina (PANI). El interés en la PANI se debe a que posee excelentes propiedades electroquímicas, eléctricas y ópticas, además de una buena estabilidad en el ambiente [Xu *et al.*, 2006]. La PANI se obtiene comúnmente por oxidación química o electroquímica de la anilina aunque en los últimos años se ha estudiado su síntesis vía enzimática. Se han empleado diferentes oxidorreductasas para la síntesis de PANI entre las que se encuentran la bilirrubina oxidasa, lacasas y peroxidasas tales como la peroxidasa de rábano blanco, la peroxidasa de soya y la peroxidasa de palma [Xu *et al.*, 2006].

Es importante mencionar que independientemente del método de síntesis, es la generación de radicales de anilina y el acoplamiento de los mismos lo que da lugar a la formación del polímero. Debido a la resonancia del anillo aromático, estos radicales tienden a acoplarse en posiciones *orto* y *para* de tal forma que se generan polímeros ramificados que presentan propiedades conductoras muy pobres. Para que la PANI tenga mejores propiedades conductoras se requiere que la síntesis del polímero ocurra en posición *para*, es decir, que se obtenga un polímero lineal que represente un camino directo a través del cual los electrones puedan moverse libremente.

Una de las estrategias seguidas para la síntesis enzimática de PANI lineal ha sido el empleo de la peroxidasa de rábano blanco para catalizar la oxidación de la anilina en presencia de una plantilla polianiónica (templado). La plantilla polianiónica permite alinear los radicales de anilina para que se acoplen en posición *para*, además de mantener la solubilidad en agua [Samuelson *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999a, b].

Como alternativa al uso de una plantilla polianiónica, en este trabajo se pretendió forzar el proceso de polimerización lineal empleando las anilinas sustituidas 2,6-dimetilanilina (DMA), 2,6-dicloroanilina (DCA) y 2,3,5,6-tetracloroanilina (TCA) que permitan la estabilización en posición *para* del radical formado por la acción catalítica de una peroxidasa.

2. ANTECEDENTES

2.1 Polímeros intrínsecamente conductores

2.1.1 Generalidades

La síntesis de plásticos revolucionó el campo de los materiales desde 1935, cuando se obtuvo por primera vez el nylon, y su impacto sigue hasta nuestros días. Actualmente muchos utensilios, aparatos, materiales de construcción e inclusive partes de automóviles son fabricados con plásticos, los cuales son materiales poliméricos. Este tipo de materiales se distinguen por sus características aislantes y son utilizados para cubrir cables metálicos con el fin de evitar cortocircuitos. Pero este concepto cambió luego de que ocurriera uno de los descubrimientos más importantes del siglo pasado: la capacidad de ciertos polímeros orgánicos para conducir electricidad.

Los trabajos de Alan Heeger, Alan MacDiarmid y Hideki Shirakawa demostraron que el poliacetileno dopado era capaz de conducir electricidad a niveles similares a los de un metal [Shirakawa *et al.*, 1977]. A partir de ese momento la ciencia de materiales ha tenido un amplio desarrollo y se han generado infinidad de aplicaciones para este tipo de polímeros. Los autores de este trabajo fueron galardonados con el Premio Nobel de Química en el año 2000 por el descubrimiento y desarrollo de los polímeros conductores.

No todos los polímeros orgánicos son capaces de conducir electricidad, para que esto ocurra deben contar con ciertas características que permitan imitar el fenómeno que ocurre en un metal. Los átomos metálicos tienen un electrón en su última capa que se mueve libremente al aplicar un potencial eléctrico. Para que los electrones se puedan mover a través del polímero, la primera condición es que cuente con un sistema de enlaces sencillos y dobles alternados, es decir un sistema conjugado de enlaces a lo largo de su cadena principal. Esto no es suficiente, pues en ese estado los polímeros conjugados presentan características aislantes o semiconductoras. Para alcanzar los niveles de conductividad de un metal se deben incrementar los acarreadores de carga en forma de electrones extra (por reducción) o huecos positivos (por oxidación) en la cadena principal de los polímeros. De esta manera, cuando un hueco es llenado por un electrón que salta de una posición vecina,

se crea un nuevo hueco y así sucesivamente, permitiendo la migración de cargas a través de largas distancias. El efecto macroscópico es la creación de un flujo de electrones y por lo tanto, de conducción eléctrica. Al proceso de oxidar o reducir el polímero se le conoce como dopado y en un estado dopado el polímero consta de un sistema π deslocalizado a lo largo de su estructura. Además de eso, se requiere que el fenómeno de conducción sea tridimensional, es decir, que la probabilidad de que un electrón difunda a una cadena vecina aumente con respecto al desplazamiento a través de la cadena principal. Esta probabilidad es mayor en materiales ordenados y cristalinos. De esta forma, la conductividad y las propiedades mecánicas de un polímero mejoraran en correlación directa al incremento en el grado de alineamiento de las cadenas del mismo [Heeger, 2001].

Entonces, un polímero intrínsecamente conductor (PIC) es aquel en el que la conductividad eléctrica se origina en la conjugación extendida de electrones π a lo largo de la cadena polimérica. Si además se realiza un proceso de dopado, la conductividad de un PIC puede alcanzar los valores de un conductor metálico por lo que también se conoce como metal sintético [MacDiarmid, 2001]. La importancia de un PIC radica en que combina las propiedades eléctricas, electrónicas, magnéticas y ópticas típicas de metales y/o semiconductores inorgánicos con las propiedades mecánicas y la facilidad de procesamiento de un polímero convencional. Cabe resaltar que el campo de los polímeros conductores incluye a aquellos polímeros que adquieren sus propiedades conductoras al ser mezclados con materiales conductores, tales como partículas metálicas o polvo de carbón, de forma tal que sus propiedades son extrínsecas a su estructura, lo que los diferencia claramente de los PICs.

2.1.2 Tipos de polímeros intrínsecamente conductores

Entre los PICs más estudiados se encuentran el poliacetileno, el politiofeno, el poli(*p*-fenileno), el poli(*p*-fenilvinileno), el polipirrol y la PANI. Como se observa en la Figura 1 este tipo de polímeros presentan alternancia de enlaces dobles y sencillos, que como se ha mencionado es una característica fundamental para la conducción eléctrica.

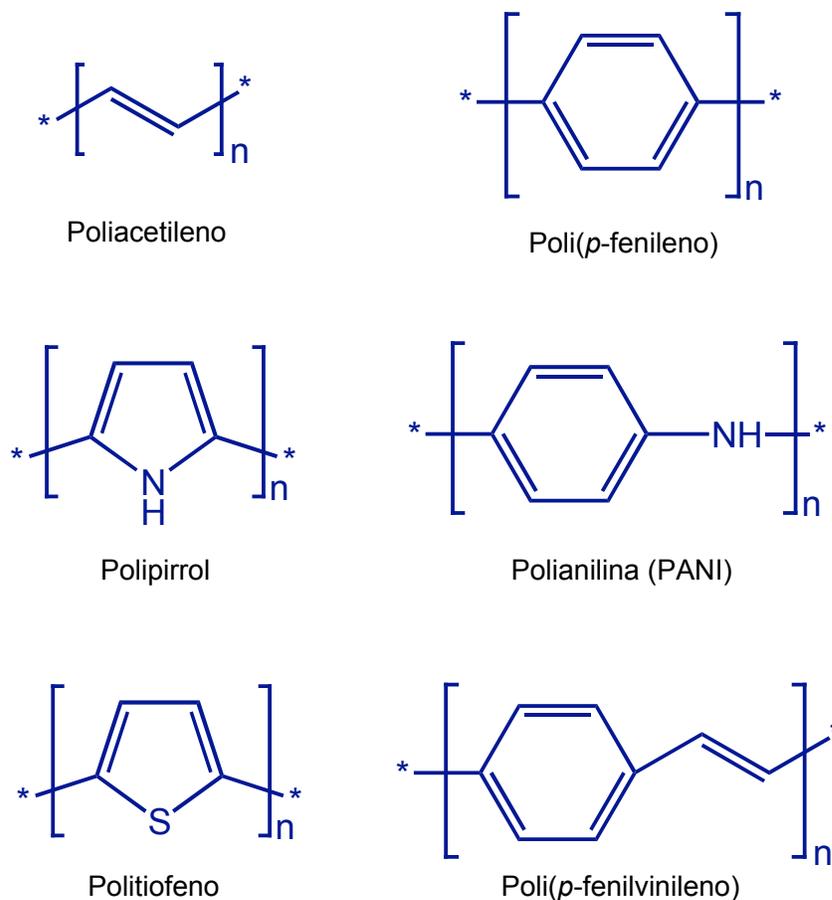


Figura 1. Estructuras de los polímeros intrínsecamente conductores más estudiados.

Algunos de los PICs ya se conocían en su forma no conductora antes de descubrirse su conductividad y otras propiedades de interés, otros más se conocían en su forma conductora pero no estaban bien caracterizados. El interés sobre estos materiales se generó sólo después del descubrimiento de la conductividad tipo metálica del poliacetileno dopado con yodo [Shirakawa *et al.*, 1977]. Inicialmente el poliacetileno fue el PIC más estudiado tanto desde el punto de vista científico como desde el punto de vista práctico, pero debido a su inestabilidad química en presencia de oxígeno, su interés se redujo al ámbito científico. El interés en la PANI aumentó de manera importante sobre otros PICs debido a características como la facilidad de síntesis, alto rendimiento de la polimerización y la estabilidad al ambiente [MacDiarmid *et al.*, 1985; Chiang y MacDiarmid, 1986].

2.1.2 Mecanismos de dopado

El dopado es un aspecto que unifica y distingue a los PICs de otros polímeros. Aunado a las características estructurales, el nivel de dopado coloca a los polímeros conjugados en un intervalo que va de aislantes a conductores tipo metálicos pasando por semiconductores (ver Figura 2). Como ejemplos se pueden mencionar el trans-poliacetileno, que antes de ser dopado tiene características semiconductoras y después de doparlo alcanza niveles de conductividad similares a los de un metal, mientras que la PANI pasa de un estado aislante a un estado metálico [MacDiarmid, 2001].

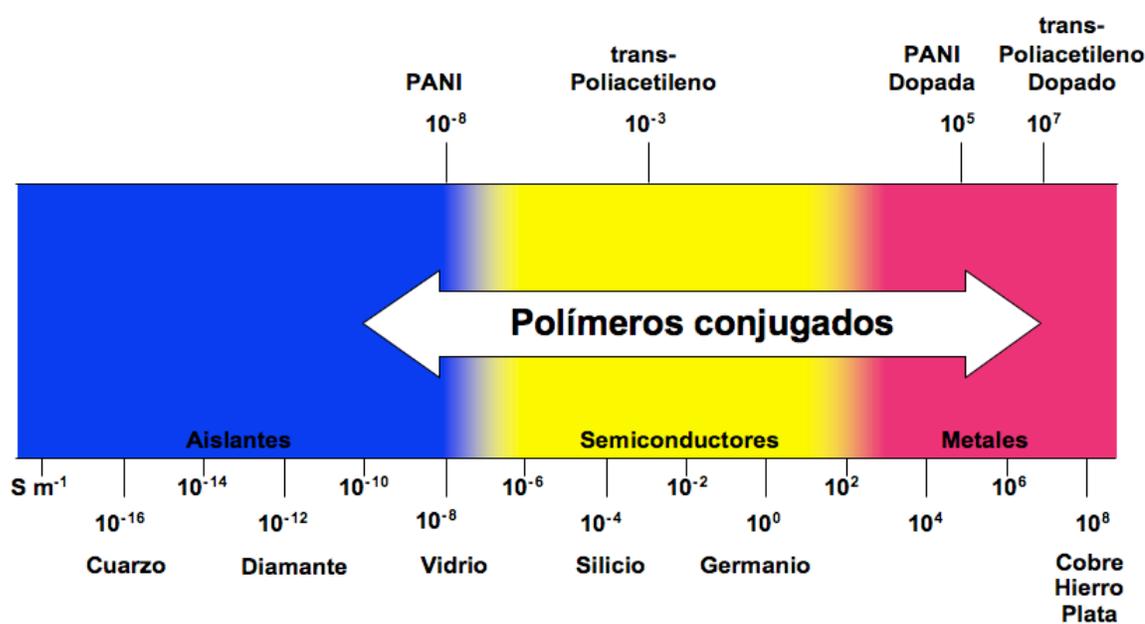


Figura 2. Conductividad de los polímeros conjugados comparada con otros materiales. Esta escala de conductividad permite apreciar el efecto que el dopado tiene sobre los polímeros conjugados (esquema adaptado de MacDiarmid, 2001).

Para semiconductores metálicos, el dopado se define como el proceso de adición de pequeñas cantidades de otros elementos que mejoran una propiedad específica [Silberberg, 2002]. Análogamente, la adición controlada de especies químicas a un polímero conjugado resulta en cambios dramáticos en sus propiedades electrónicas, eléctricas, ópticas y/o estructurales. En el caso específico de la conductividad eléctrica, su valor aumenta considerablemente debido a que la formación del complejo polímero-dopante provoca el

aumento de la movilidad de los electrones a través de la cadena polimérica [Aldissi, 1989]. Dado que el agente dopante no forma parte de la cadena polimérica es posible removerlo en condiciones inversas a las que fueron empleadas para agregarlo, y por lo tanto es un proceso que se puede modular de manera reversible.

De manera general los mecanismos de dopado se pueden clasificar como mecanismos redox y no-redox. Dentro de los mecanismos de dopado redox se incluyen el dopado tipo p y el dopado tipo n. Todos los polímeros conductores y la mayoría de sus derivados sufren dopado p- y/o n-redox por procesos químicos y/o electroquímicos durante los cuales el número de electrones asociados al polímero cambia [Kanatzidis, 1990].

El dopado tipo p es la oxidación parcial del sistema de enlaces π del polímero. Se descubrió a partir del tratamiento del trans-poliacetileno con yodo, que es un agente oxidante [Chiang *et al.*, 1977, 1978]. Este proceso generó un aumento en la conductividad de 10^{-3} S m^{-1} a 10^5 S m^{-1} . El dopado tipo n es la reducción parcial del sistema de enlaces π del polímero. Se descubrió al tratar el trans-poliacetileno con naftalina de sodio como agente reductor [Chiang *et al.*, 1977, 1978]. Este proceso incrementó la conductividad a 10^5 S m^{-1} . Existen además otros mecanismos de dopado redox como el fotodopado y el dopado por inyección de carga que no involucran iones dopantes [Heeger, 2001; MacDiarmid, 2001].

Dentro de los mecanismos no-redox se encuentra el dopado por ácidos protónicos. Este tipo de dopado difiere de los mecanismos redox en que el número de electrones asociado a la cadena principal no cambia durante el proceso [Wudl *et al.*, 1987]. La forma emeraldina base de la PANI fue el primer ejemplo del dopado de un polímero orgánico a un régimen de alta conductividad por un proceso de este tipo. Esto se logró mediante el tratamiento de la emeraldina base con ácidos protónicos acuosos, lo que provocó un aumento de 9 a 10 órdenes de magnitud en la conductividad de la PANI para producir la forma emeraldina sal [Chiang y MacDiarmid, 1986; MacDiarmid *et al.*, 1987]. Este mecanismo provoca un rearrreglo estructural del polímero mediante una reacción redox interna (Figura 3). Este tipo de dopado se extendió luego a sistemas como polivinilenos heteroaromáticos [Han y Elsenbaumer, 1989].

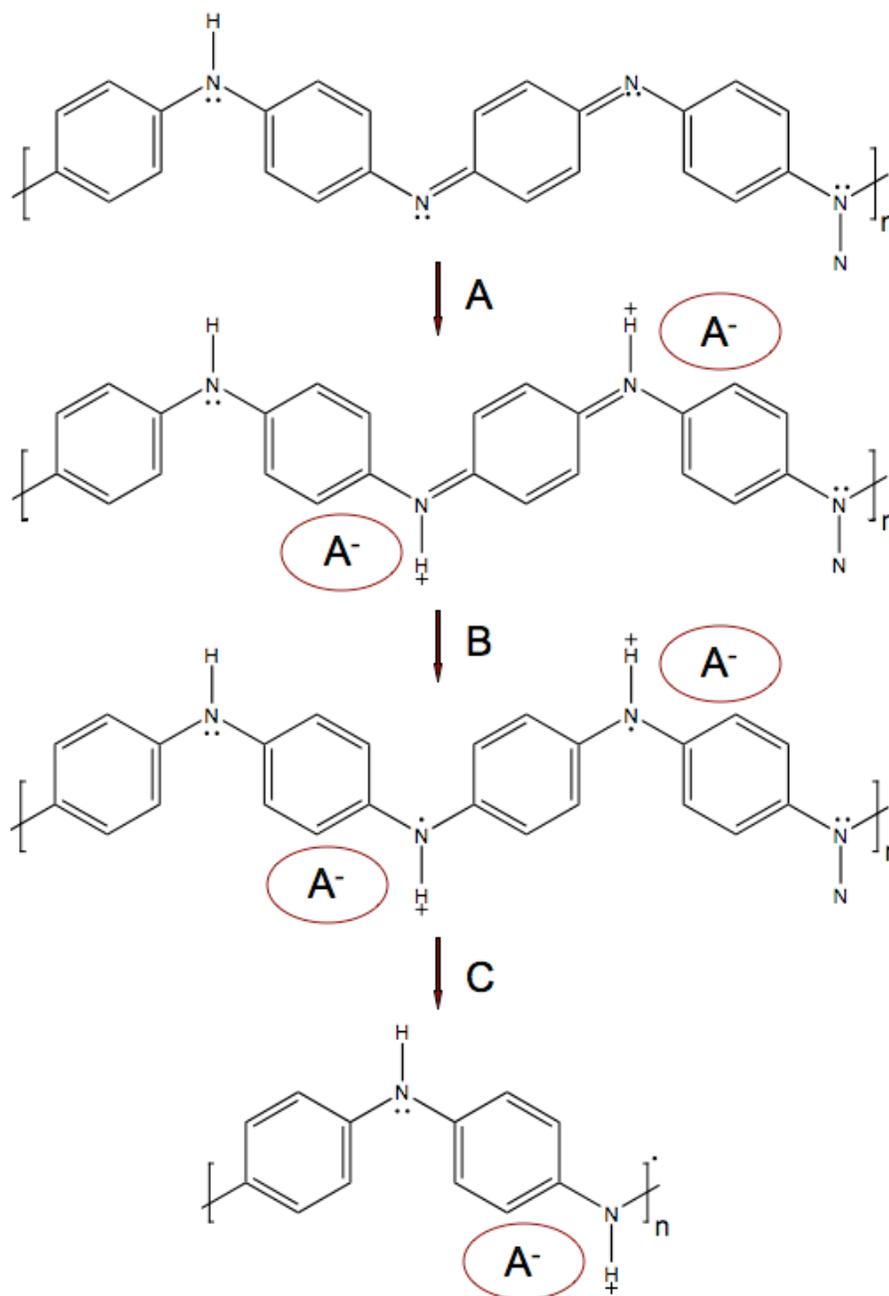


Figura 3. Mecanismo de dopado por ácidos protónicos de la forma emeraldina base de la polianilina (PANI).

A) Adición de 2 H⁺ por reacción con 2 moléculas del ácido protónico. B) Reacción redox interna (paso de la forma quinoide a la forma bencenoide). C) Redistribución de la carga y el spin. Diagrama adaptado de Heeger, 2001.

2.2 Polianilina

2.2.1 Propiedades y aplicaciones

La PANI fue probablemente el primer PIC conocido, pero como ya se ha mencionado, no hubo interés en sus características hasta el descubrimiento de la conductividad similar a un metal en el poliacetileno dopado [Shirakawa *et al.*, 1977]. La PANI es el producto polimérico de la oxidación de la anilina y ya en 1862 se le conocía como negro de anilina [Letheby, 1862]. A principios del siglo XX los químicos orgánicos comenzaron a investigar la estructura de la PANI y llegaron a la conclusión de que el polímero presenta varias formas de acuerdo a su estado de oxidación. Su fórmula general se representa como $[(-B-NH-B-NH-)_y(-B-N=Q=N-)_{1-y}]_x$, donde B y Q representan los anillos en sus formas bencenoide y quinoide respectivamente. En la Figura 4 se muestran los estados de oxidación intrínsecos de la PANI que van desde su estado totalmente reducido (leucoemeraldina, $y = 1$) pasando por el estado con 50 % de oxidación (emeraldina, $y = 0.5$) hasta su estado totalmente oxidado (pernigranilina, $y = 0$).

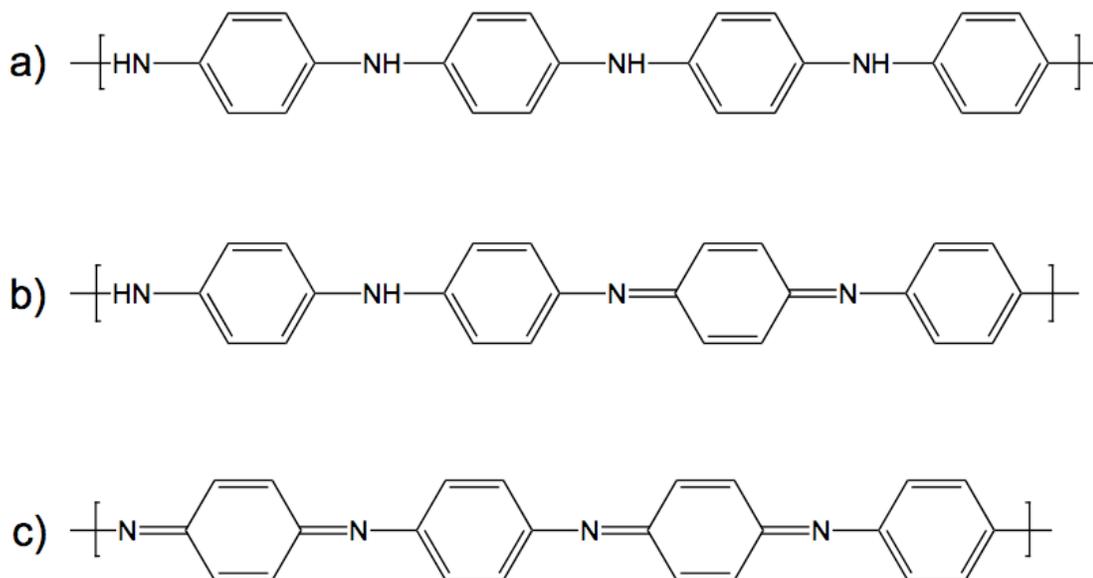


Figura 4. Estados de oxidación intrínsecos de la PANI.

- a) Leucoemeraldina: estado totalmente reducido. b) Emeraldina base: estado 50 % oxidado.
c) Pernigranilina: Estado totalmente oxidado.

La forma leucoemeraldina de la PANI tiene un color blanco transparente pero es inestable en presencia de aire en el cual se oxida y cambia de color desde amarillo hasta violeta [Yano *et al.*, 1998], mientras que la emeraldina presenta un color azul y la pernigranilina es azul-violeta. La PANI en estado conductor se puede obtener a través de la protonación de grupos imino ($=N-$) de la emeraldina (sal emeraldina, que es de color verde) o por medio de la oxidación de grupos amino ($-NH-$) de la leucoemeraldina [Chiang y MacDiarmid, 1986].

Como ya se ha mencionado, la PANI es uno de los PICs más estudiados. Esto se debe a que además de su buena estabilidad en el ambiente, posee excelentes propiedades electroquímicas, eléctricas y ópticas [Xu *et al.*, 2006]. Sus propiedades ópticas y electrónicas se pueden controlar reversiblemente variando el nivel de dopaje [Chiang y MacDiarmid, 1986; Nguyen *et al.*, 1994]. Estas características y propiedades generan una infinidad de aplicaciones para la PANI. Su capacidad para adoptar diferentes estados intrínsecos de oxidación estables y la habilidad de estos estados para sufrir protonación/desprotonación reversible e interacciones de transferencia de carga asociados a un cambio de color, permiten su aplicación como elemento de sensores de gases, químicos y de pH y como componente de mezclas electroactivas y membranas permeables selectivas. Por ejemplo, una película delgada de PANI en su estado reducido u oxidado puede ser usada para determinar la presencia de un oxidante o reductor respectivamente, en un ambiente particular a través de una simple medición del cambio de color. Estas características también permiten su empleo en la inhibición de la corrosión de metales. Particularmente, la emeraldina base se ha utilizado como componente activo en dispositivos emisores de luz. Por otro lado, la habilidad de la PANI para sufrir procesos de oxidación-reducción reversibles permite utilizarla como electrodo para baterías recargables y capacitores. También puede reemplazar conductores y semiconductores metálicos en muchas aplicaciones como transistores, conmutadores, actuadores electroquímicos, resistencias litográficas, protección contra rayos, circuitos impresos, microelectrónicos, celdas solares, electrolitos poliméricos, elementos de calor, descargas electroestáticas, y materiales para protección electromagnética [Palaniappan y John, 2008].

2.3 Síntesis de polianilina

El primer paso en la síntesis de PANI es la formación del radical catiónico que se obtiene a partir de la oxidación de un electrón de la anilina [Geniès *et al.*, 1990]. Este radical se estabiliza debido a la resonancia del anillo aromático en las posiciones *orto* y *para* de la anilina como se observa en la Figura 5.

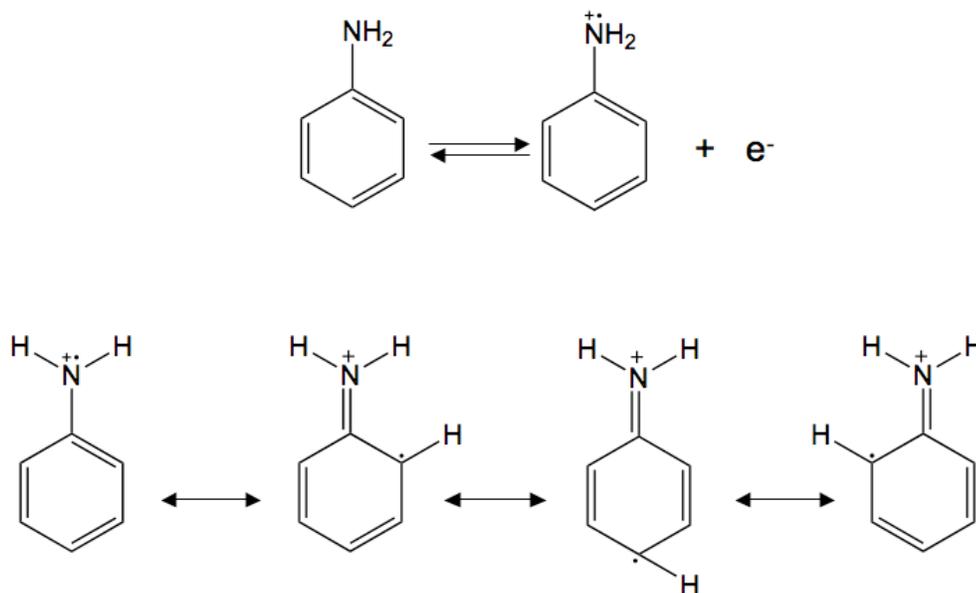


Figura 5. Oxidación de la anilina y consecuente formación de un radical catiónico.

Debido a la resonancia del anillo aromático el radical formado se deslocaliza y se estabiliza en las posiciones *orto* y *para* de la anilina [Geniès *et al.*, 1990].

El acoplamiento de los radicales formados a partir de la oxidación de la anilina genera el polímero. Cuando este acoplamiento ocurre en orientaciones *orto* y *para* se obtiene una PANI ramificada que posee características eléctricas muy pobres (ver Figura 6). Con la finalidad de obtener una PANI lineal que posea mejores características eléctricas se requiere que el acoplamiento de radicales sea *para*-dirigido (ver Figura 6).

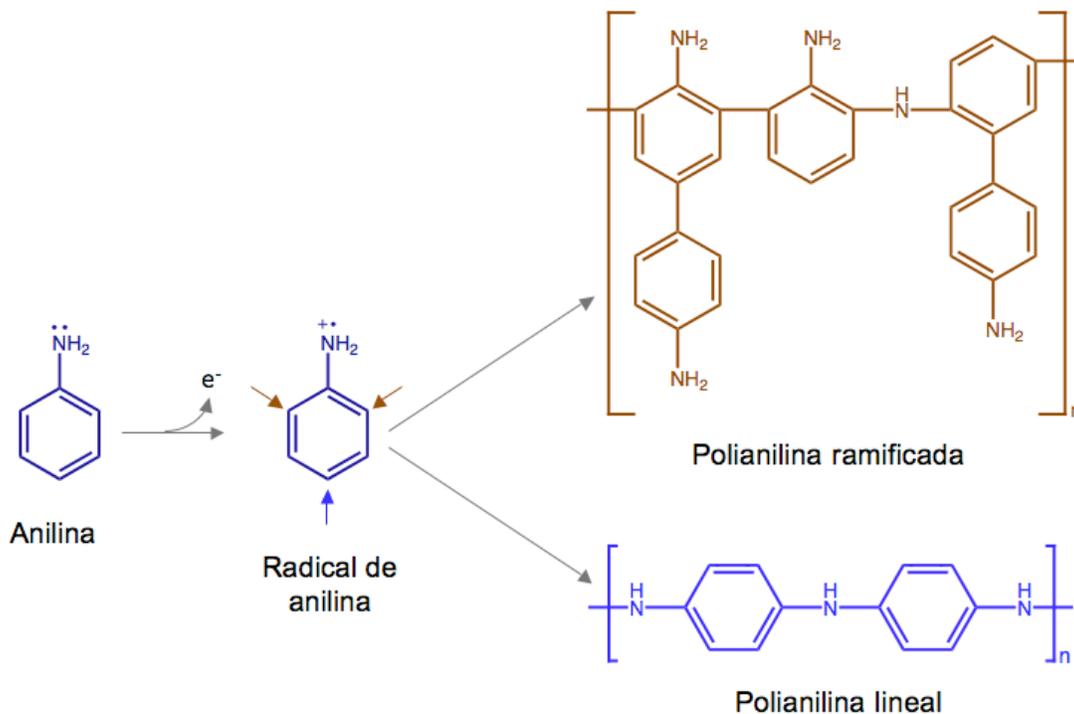


Figura 6. Síntesis de la PANI.

El primer paso es la formación del radical de anilina mediante la oxidación de la anilina. En un segundo paso el acoplamiento de radicales deriva en la obtención del polímero. Si el acoplamiento ocurre en posiciones *orto* se genera polianilina ramificada. Para obtener mejores características eléctricas se requiere que el acoplamiento ocurra en orientación *para*.

Se ha determinado que se requieren condiciones ácidas de reacción ($\text{pH} \leq 2$), preferentemente acuosas para el crecimiento *para*-dirigido de la PANI [Geniès *et al.*, 1990]. La forma emeraldina sal de la PANI es insoluble en agua y en la mayoría de los solventes, lo que dificulta su procesamiento. Se han seguido diversas estrategias que facilitan su procesamiento, aunque afectan su conductividad. Entre estas se encuentran las siguientes:

- Empleo de anilinas sustituidas con grupos funcionales que mejoran la solubilidad.
- Síntesis de copolímeros de anilina y anilinas sustituidas como las ya mencionadas.
- Síntesis en presencia de ácidos protónicos que actúan como surfactantes y dopantes al mismo tiempo.
- Síntesis en presencia de templados polianiónicos.

2.3.1 Síntesis química y electroquímica

Los métodos más comunes para la síntesis de PANI son las oxidaciones química y electroquímica de la anilina. La elección del método de síntesis se ha basado en la aplicación que se pretenda dar a la PANI. Si se desea la obtención de películas uniformes y ordenadas de PANI se utilizan métodos electroquímicos, que además permiten obtener información acerca del mecanismo de crecimiento del polímero, el comportamiento redox y el mecanismo de conducción electrónica [Trivedi, 1997]. Por otro lado, los procesos químicos permiten la obtención de grandes cantidades de polímero.

El método electroquímico más empleado es la oxidación anódica de la anilina utilizando un electrodo inerte (generalmente platino). La formación de películas de la forma emeraldina sal de la PANI en solución se realiza en condiciones ácidas con pH entre 0 y 2 y en presencia de un oxidante adecuado. Se sabe que la polimerización por oxidación de la anilina ocurre en potenciales de 0.8 V vs SCE (Saturated Calomel Electrode), por tanto existen una serie de oxidantes capaces de llevar a cabo la oxidación de la anilina, entre ellos Cl_2 , HF y persulfatos. Además de elegir el oxidante adecuado, la constante de disociación del ácido (pK_a) también es un aspecto importante en la síntesis de la PANI debido a que el equilibrio de protonación involucra exclusivamente el segmento diamina-quinona, que tiene dos nitrógenos con $\text{pK}_{a1} = 1.05$ y $\text{pK}_{a2} = 2.55$. Cualquier ácido cuyo pK_a se encuentre dentro de ese intervalo de valores puede ser utilizado como dopante [Trivedi, 1997].

En cuanto a la síntesis química de la emeraldina sal de la PANI, se han explorado diferentes condiciones de pH, temperatura, además de varios oxidantes. Las condiciones típicas son el uso de ácido clorhídrico o sulfúrico y persulfato de amonio como oxidante a temperatura de 3 - 5 °C [Trivedi, 1997]. Para obtener un rendimiento del 100% se requiere un mol de persulfato por cada mol de anilina. Regularmente se utiliza una cantidad menor de oxidante para prevenir la degradación oxidativa del polímero. La forma emeraldina sal de la PANI se obtiene como precipitado que resulta difícil de disolver y por lo tanto de procesar. Se han desarrollado estrategias para generar películas empleando síntesis química. Uno de ellas es el llamado depósito químico que consiste en sumergir en la mezcla de reacción un material sólido inerte (como vidrio) sobre el cuál se depositan las moléculas de PANI y forman una

película. En un sistema como éste las condiciones de deposición, tales como la temperatura, la velocidad de agitación, el pH y la concentración de la solución son determinantes para obtener una película de buena calidad [Mane y Lokhande, 2000].

Por otro lado se han desarrollado métodos de autodopado para mejorar la estabilidad eléctrica y la solubilidad de PANI [Nguyen *et al.*, 1994; Chan *et al.*, 1995; Chen y Hwang, 1995; Wei *et al.*, 1996]. Estas condiciones de polimerización química requieren pasos adicionales de separación y purificación antes de poder procesar la forma conductora de la PANI. Otra estrategia para mejorar la solubilidad y la facilidad de procesamiento de los productos poliméricos es mediante el tratamiento con vapores de ácido sulfúrico posterior a la polimerización de la PANI [Chen y Hwang, 1994, 1996].

2.3.2 Síntesis enzimática

La síntesis enzimática de la PANI es un método muy atractivo debido a las ventajas que presenta con respecto a los métodos químicos y electroquímicos. Entre las ventajas que presenta esta ruta sintética es que los procesos son realizados a presiones y temperaturas bajas. Las velocidades de reacción alcanzadas mediante el uso de enzimas son de dos a tres órdenes de magnitud mayor que la de los catalizadores inorgánicos, y usualmente no son necesarios catalizadores adicionales y se generan pocos subproductos. La alta selectividad de la reacción permite el control de la estructura química, además de que proporciona rendimientos tan altos como los otros métodos de síntesis.

Las enzimas que oxidan la anilina y algunos de sus derivados son las oxidorreductasas, las cuales generan radicales libres durante su ciclo catalítico y el acoplamiento no enzimático de dichos radicales da lugar a la formación de los polímeros. Para la síntesis de PANI se han utilizado diferentes oxidorreductasas entre las que se encuentran la bilirrubina oxidasa, lacasas y peroxidasas tales como la peroxidasa de rábano blanco (HRP), la peroxidasa de soya y la peroxidasa de palma [Xu *et al.*, 2006]. Mientras que la catálisis de las peroxidasas ocurre en el centro ferriprotoporfirina oxidado por el H_2O_2 a través de dos pasos secuenciales de reducción de un electrón, generando dos radicales de anilina por cada

vuelta al ciclo [Dunford, 1999], en el caso de las lacasas, la oxidación de un electrón es catalizada vía los centros de cobre en presencia de O₂ [Solomon *et al.*, 1996].

Como ya se había mencionado, existen factores que afectan la estructura del polímero formado tales como temperatura, pH y la naturaleza del medio de reacción, por lo que se deben controlar las condiciones de reacción para evitar la formación de polímeros ramificados con propiedades de conductividad eléctrica muy pobres. Se han planteado diversas estrategias para contender con este problema. Las estrategias seguidas tienen en cuenta los siguientes aspectos: solubilidad del polímero obtenido para facilitar su procesamiento, el autodopado por adición de contraiones y el control de la linealidad del polímero. Algunas de estas estrategias se basan en las soluciones que ya se han planteado para la síntesis química y electroquímica de la PANI.

Una de las estrategias seguidas fue el uso de la HRP para catalizar la polimerización de *o*-, *m*- y *p*-fenilendiaminas empleando H₂O₂ como oxidante en una mezcla de dioxano y amortiguador de fosfatos pH 7 [Kobayashi *et al.*, 1992; Ichinohe *et al.*, 1998]. Al analizar la estructura de los polímeros se determinó que mayoritariamente se presentan enlaces azo y que los polímeros de *o*- y *m*-fenilendiamina con peso molecular de 3700 y 4200 respectivamente fueron solubles en 1-metil-2-pirrolidinona [Ichinohe *et al.*, 1998]. Aunque se sugiere que estos polímeros son análogos de PANI y podrían ser electroactivos, no existen mediciones que lo justifiquen. Más adelante, se utilizó la HRP para catalizar la polimerización de fenilendiaminas y aminofenoles también en medio con dioxano y amortiguador de fosfatos pH 7 [Shan y Cao, 2000; Shan *et al.*, 2003]. Los productos obtenidos fueron solubles en dimetilformamida y en dimetilsulfóxido. Particularmente, los polímeros del 2-aminofenol y 4-aminofenol mostraron propiedades electroactivas. Mencionan también que la formación de enlaces éter y los acoplamientos en orientación *meta* en el polímero de 4-aminofenol están interrumpiendo la formación de un sistema conjugado de enlaces a lo largo de su estructura [Shan *et al.*, 2003].

Con el fin de obtener un análogo de PANI soluble en agua se utilizó una anilina sulfonada: 2,5-diaminobencensulfonato [Alva *et al.*, 1997]. La presencia de grupos sulfónicos a lo largo de la estructura de la PANI mejoró la solubilidad en agua en un amplio rango de pH. El polímero se obtuvo con un peso molecular promedio de 18 000 Da y la conductividad

fue de 10^{-3} S m^{-1} a pH 6. Los autores mencionan que la conductividad del polímero es afectada por las ramificaciones y que se podría mejorar realizando una copolimerización con anilina.

Aunque muchos de los trabajos iniciales de síntesis enzimática de la PANI se realizaron con la HRP, a la fecha se han utilizado otras enzimas y catalizadores biomiméticos. Por ejemplo se realizó la oxidación de una serie de fenoles, anilinas y becenotioles empleando diversas lacasas fungales [Xu, 1996]. La peroxidasa de soya es un biocatalizador atractivo debido a su estabilidad a la temperatura y pH. Empleando esta enzima fue posible obtener PANI conductora con peso molecular controlado [Jakowski y Kaplan, 2001]. Este método permitió la síntesis de oligómeros de PANI de bajo peso molecular. Aunque el pH se mantuvo arriba de 3.5, fue posible utilizar un pH de 1.0 debido a la estabilidad de la enzima en tales condiciones. Además de la obtención de oligómeros se logró la obtención de PANI con peso molecular de 200 000 Da. La conductividad del polímero fue de 10^{-1} a 10^1 S m^{-1} .

La bilirrubina oxidasa se utilizó para obtener películas de PANI electroactiva. La polimerización de anilina se realizó con la enzima adsorbida en superficies de materiales como vidrio, plástico o platino y se obtuvieron películas homogéneas [Aizawa *et al.*, 1990]. El pH óptimo fue de 5.5. Los compuestos *p*-aminofenol y *p*-fenilendiamina también fueron buenos sustratos para la bilirrubina oxidasa. Los análisis estructurales realizados sugieren que la PANI sintetizada contiene ramificaciones parciales. Aunque no se realizaron mediciones de conductividad, los estudios de voltamperometría cíclica demostraron que las propiedades redox de las películas de PANI fueron reversibles, pero difieren de la PANI sintetizada química o electroquímicamente. La diferencia fue atribuida a la presencia de ramificaciones en la estructura del polímero.

Con la finalidad de reducir las ramificaciones presentes en la PANI sintetizada vía enzimática se han utilizado miscelas. Las miscelas funcionan como nanoreactores ya que aíslan la anilina cargada positivamente al tiempo que generan un ambiente local de pH bajo que permite la obtención de PANI lineal. Este ambiente local fue crítico en la unión y alineamiento de los monómeros de anilina debido a que su control permite la obtención de PANI ya sea en su estado conductor o aislante. Se utilizaron diferentes surfactantes como la sal de sodio del ácido dodecilsulfónico, bromuro de hexadeciltrimetilamonio y

Tritón X-100 para la formación de las miscelas [Samuelson *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002]. Las propiedades de los polímeros obtenidos fueron dependientes del surfactante utilizado, mostrando que el uso de ácidos fuertes como el ácido dodecibencensulfónico para la formación de las miscelas favorece la síntesis de la forma sal emeraldina de la PANI.

Otra de las estrategias seguidas fue la síntesis de PANI en una solución acuosa a pH 4.3 utilizando la HRP en presencia del poliestireno sulfonado (SPS), el cual funcionó como plantilla o templado para la obtención de PANI lineal. El resultado fue un complejo PANI-SPS electroactivo. Estudios espectroscópicos indicaron que la conductividad del complejo fue dependiente del pH debido al mecanismo de autodopado durante la síntesis. El estudio del efecto del pH permitió establecer la relación óptima de SPS a anilina para lograr la solubilidad del complejo y al mismo tiempo alcanzar el máximo nivel de conductividad [Samuelson *et al.*, 1998]. Para demostrar la polimerización se determinó el peso molecular del complejo por cromatografía de permeación en gel durante el transcurso de la reacción y fue comparado con SPS puro como control [Liu *et al.*, 1999a]. El bajo pK_a del grupo bencensulfónico del SPS provee el balance de cargas positivas y negativas creando un microambiente de bajo pH para el alineamiento de la anilina y la formación de la sal emeraldina a lo largo de la estructura del SPS [Liu *et al.*, 1999b]. En resumen, el templado cumple 3 funciones: la alineación de la anilina para promover la polimerización lineal, el dopado por adición de contraiones y el mantenimiento de la solubilidad en agua para facilitar el procesamiento del polímero. En la Figura 7 se muestra una representación del complejo PANI-SPS.

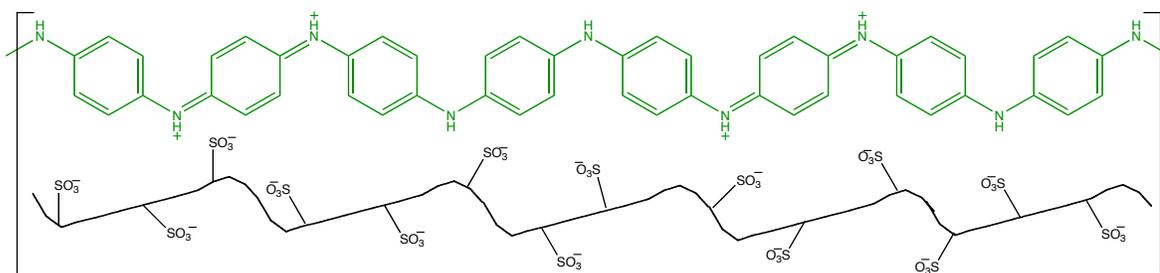


Figura 7. Representación de la polimerización enzimática de la PANI en presencia de poliestireno sulfonado (SPS).

El SPS promueve la síntesis de la PANI lineal, con una orientación *para* que resulta en la obtención de la forma conductora de la PANI (esquema adaptado de Samuelson *et al.*, 1998).

El SPS también se utilizó para la síntesis de PANI empleando la lacasa de *Coriolus hirsutus* [Karamyshev *et al.*, 2003]. Esta enzima mostró notables ventajas durante la polimerización comparado con la HRP debido a su alta estabilidad y actividad bajo condiciones ácidas. La HRP mostró baja actividad y pobre estabilidad a $\text{pH} < 4.5$ [Chattopadhyay y Mazumdar, 2000; Pina *et al.*, 2001]. La polimerización de anilina en presencia de SPS utilizando la HRP se realiza a pH de 4.3 y resulta en el consumo de grandes cantidades de la enzima debido a la inestabilidad de la enzima en condiciones ácidas [Liu *et al.*, 1999b]. En contraste, la lacasa es activa a pH 3.5 por cerca de 4 ó 5 días. La conductividad del complejo PANI-SPS obtenido con la lacasa fue de $2 \times 10^{-2} \text{ S m}^{-1}$. También la peroxidasa de palma fue un biocatalizador útil en la síntesis de PANI en la presencia de SPS [Sakharov *et al.*, 2004]. Esta peroxidasa fue aislada de las hojas de palma Africana y palma real y exhibe una estabilidad inusual a altas temperaturas y en un amplio rango de pH [Sakharov y Sakharova, 2002].

Además del SPS, se estudiaron otros polielectrolitos como plantillas para la síntesis de PANI conductora. Entre estos, se utilizó el ácido polivinilfosfónico en presencia de la HRP y H_2O_2 en amortiguador pH 4.0 para realizar la síntesis de PANI [Nagarajan *et al.*, 2000]. Una característica importante de dicho complejo es que fue posible separar la PANI y el ácido polivinilfosfónico por desdopado en una solución de NH_4OH , mientras la PANI es insoluble y precipita, el ácido polivinilfosfónico permanece soluble. La conductividad del complejo fue de 1.2 a 5.5 S m^{-1} y después de redopar la PANI precipitada con HCl fue de 7 S m^{-1} . También se han utilizado el ácido desoxirribonucleico (ADN) [Nagarajan *et al.*, 2001] y el ligninosulfonato [Roy *et al.*, 2002]. Aunque los valores de conductividad son menores al del complejo PANI-SPS, los complejos obtenidos poseen otras características. Por ejemplo la PANI fue capaz de provocar cambios reversibles en la conformación del ADN de acuerdo a su estado de oxidación y luego de dopar el complejo, la conductividad fue de $40.9 \times 10^{-5} \text{ S m}^{-1}$. El complejo PANI-ligninosulfonato aumentó su termoestabilidad y la conductividad fue de 10^{-3} S m^{-1} .

Como alternativa al uso de una plantilla, en este trabajo se pretende forzar el proceso de polimerización lineal empleando anilinas sustituidas con metilos o halógenos que permitan el acoplamiento en posición *para* de los radicales formados por la acción enzimática de una peroxidasa. Las anilinas propuestas son la 2,6-dimetilanilina (DMA), la 2,6-dicloroanilina (DCA) y la 2,3,5,6-tetracloroanilina (TCA) cuyas estructuras se muestran en la Figura 8.

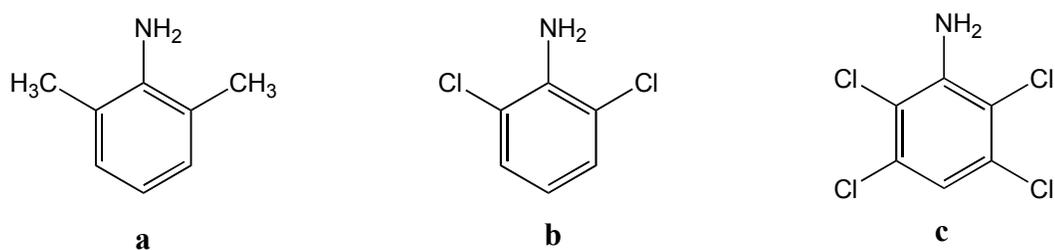


Figura 8. Anilinas sustituidas propuestas para la síntesis de polímeros lineales.

a) 2,6-dimetilanilina (DMA); b) 2,6-dicloroanilina (DCA); c) 2,3,5,6-tetracloroanilina (TCA).

Se sabe también que la conductividad de los PICs aumenta de manera importante mediante procesos de dopaje. En este trabajo se propone que será posible aumentar la conductividad de los polímeros obtenidos aplicando procesos de dopaje.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Empleando una peroxidasa será posible producir polímeros lineales a partir de anilinas sustituidas con átomos de halógenos o grupos metilo en las posiciones *orto* y/o *meta* del anillo aromático para inducir el acoplamiento de radicales en orientación *para*.

Objetivo General

Sintetizar y caracterizar los polímeros intrínsecamente conductores obtenidos vía enzimática a partir de las anilinas sustituidas.

Objetivos Particulares

1. Establecer las condiciones óptimas de reacción para la obtención de los polímeros intrínsecamente conductores (PICs) a partir de las anilinas sustituidas.
2. Estudiar el efecto de las condiciones de reacción sobre la estructura química de los polímeros obtenidos.
3. Caracterizar químicamente los PICs obtenidos y determinar sus propiedades de conducción eléctrica.
4. Estudiar el efecto de diferentes dopantes sobre las propiedades de los PICs.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivos y enzimas

La cloroperoxidasa (CPO) de *Caldariomyces fumago* fue donada por el Prof. Michael A. Pickard (Universidad de Alberta, Canadá) y presentaba un Rz de 1.4. El coeficiente de Reinheitszahl (Rz, $A_{403\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$) es un índice de pureza y para la CPO pura es de 1.44 [Hager *et al.*, 1966]. La peroxidasa de rábano blanco (HRP) fue obtenida de Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI). La lignino peroxidasa (LiP) de *Phanerochaete chrysosporium* fue obtenida de Tienzyme (Salt Lake City, UT). La peroxidasa versátil (VP) de *Bjerkandera adusta* fue obtenida y purificada como se describe en Pogni *et al.*, 2005.

Los reactivos empleados se muestran a continuación:

REACTIVO	ESPECIFICACIONES	PROVEEDOR
Ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico (AMPSA)	Pureza de 99 % P.M. 207.25	Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI)
Ácido (1S)-(+)-10-Canforsulfónico (CSA)	Pureza de 99 % P.M. 232.30	Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI)
Ácido dodecibencensulfónico, Sal de sodio (DBSA)	P.M. 348.48	Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI)
Anilina	Pureza de 99 % P.M. 93.13	Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI)
2,6-Dicloroanilina (DCA)	Pureza de 98 % P. M. 162.02	Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI)
2,6-Dimetilanilina (DMA)	Pureza de 99 % P.M. 121.18	Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI)
2,3,5,6-Tetracloroanilina (TCA)	Pureza de 97 % P.M. 230.91	Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI)
2,3,5,6-Tetraclorobenzoquinona (TCBQ)	P.M. 245.90	MP Biomedicals (Solon, OH)
2,3,5,6-Tetraclorofenol (TCP)	Pureza de 99.9 % P.M. 231.88	Supelco (Bellefonte, PA)
Pentacloroanilina (PCA)	P.M. 265.35	Alfa Aesar (Ward Hill, MA)
Pentaclorofenol (PCP)	Pureza de 99 % P.M. 230.91	Chem Service (Chester, PA)
Polianilina (PANI), emeraldina base	P.M. 5000, 20000 y 50000	Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI)
Poliestireno sulfonado (SPS)	P.M. ~70000	Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI)

Los solventes orgánicos grado HPLC fueron obtenidos de Fisher Scientific (Springfield, NJ). El resto de los reactivos empleados para la preparación de amortiguadores y otras soluciones fueron obtenidos de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ).

4.2 Transformación enzimática de los compuestos halogenados

La actividad específica de cada peroxidasa se midió en amortiguador con 20 % de isopropanol en 1 mL de volumen total. El amortiguador elegido para cada peroxidasa fue aquel en que cada una presentó la mayor actividad específica. Para la LiP y la VP se utilizó amortiguador de succinatos 40 mM pH 3, para la HRP se utilizó amortiguador de fosfatos 60 mM pH 6 mientras que para la CPO se utilizó amortiguador acetatos 60 mM pH 3 con 20 mM de KCl. La concentración de los compuestos halogenados se fijó a 100 μ M excepto para la PCA que fue de 20 μ M debido a su insolubilidad en el medio de reacción. En todos los casos las reacciones iniciaron al adicionar el H₂O₂. Las concentraciones de H₂O₂ y enzima utilizadas fueron las siguientes:

	HRP (nM)/H ₂ O ₂ (μ M)	VP (nM)/H ₂ O ₂ (μ M)	CPO (nM)/H ₂ O ₂ (μ M)
TCP	170.80/100	45.85/200	3.75/100
PCP	470.00/100	60.20/100	7.50/200
TCA	*/*	*/*	7.50/400
PCA	*/*	*/*	39.25/100

* Para las mezclas de reacción de la VP y HRP con TCA y PCA se probaron diferentes concentraciones de enzima y H₂O₂ pero en ningún caso se encontró actividad.

Nota: la LiP sufrió daño irreversible independiente al desarrollo de este trabajo y no fue posible conseguirla nuevamente debido a que ya no se produce comercialmente, aunque si fue posible determinar que dicha enzima no fue capaz de transformar la TCA ni la PCA y si los compuestos TCP y PCP.

La oxidación enzimática de los compuestos halogenados con CPO fue realizada en una mezcla de reacción de 1 mL conteniendo 20 % de isopropanol en amortiguador acetatos 60 mM pH 3, 20 mM de KCl y diferentes concentraciones del compuesto correspondiente. Se adicionaron de 3 a 40 pmoles de CPO dependiendo del compuesto y la reacción comenzó al adicionar el H₂O₂. La velocidad de transformación se determinó siguiendo la desaparición

de los compuestos por HPLC. Las constantes catalíticas se determinaron variando las concentraciones de cada uno de los compuestos halogenados manteniendo fija la concentración del H_2O_2 y viceversa hasta alcanzar la saturación catalítica. Los parámetros cinéticos se obtuvieron empleando el programa EnzFitter (Biosoft, Cambridge, UK) siguiendo el modelo de Michaelis-Menten.

Los análisis en HPLC se realizaron en un sistema de Perkin Elmer equipado con un detector de arreglo de diodos 235C y una columna Discovery® BIO Wide Pore C5 (15 cm x 4.6 mm, 5 μm) de Supelco, Bellefonte, PA. La fase móvil empleada fue acetonitrilo:agua MilliQ (40:60) con 0.1 % de ácido trifluoroacético. El TCP se monitoreó a 210 nm, el PCP a 215 nm y la TCA y PCA a 220 nm.

4.3 Identificación de productos

Con el fin de obtener suficiente material para los análisis químicos se realizaron reacciones en 100 mL con adiciones sucesivas de enzima y H_2O_2 hasta agotar el compuesto halogenado correspondiente. Las mezclas de reacción se extrajeron con diclorometano. Los polímeros se recuperaron por centrifugación, se lavaron con metanol y se secaron con flujo de N_2 . El sobrenadante metanólico y las fracciones en diclorometano se evaporaron a vacío y se redisolviaron en 50 μL de diclorometano. Se inyectó 1 μL de estas muestras en el equipo de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, Cromatógrafo de gases 6890N y Detector selectivo de masas 5973 de Agilent Technologies). Para las fracciones que fueron insolubles en metanol y diclorometano se utilizó una sonda de inserción directa (Scientific Instrument Services). Estas muestras fueron colocadas en la sonda en estado sólido.

La interpretación de los patrones de fraccionamiento obtenidos permitió determinar la estructura de los productos de las diferentes reacciones. En el Apéndice II se muestra una descripción de la técnica de espectrometría de masas empleada. También se muestra la interpretación de los productos obtenidos más representativos con el fin de ejemplificar el método de análisis empleado.

4.4 Síntesis de los polímeros

Para la obtención de los polímeros de DMA, DCA y TCA se utilizaron matraces Erlenmeyer con las siguientes mezclas de reacción: 4 mM de DMA ó DCA ó 0.14 mM de TCA; 20 mM de KCl; 75 nM de CPO en las reacciones con DMA y DCA ó 300 nM de CPO en las reacciones con TCA; 20 % v/v de isopropanol y amortiguador acetatos 60 mM pH 3 en un volumen total de 1 L. Las reacciones iniciaron con la adición de 0.5 mM de H₂O₂. Las mezclas se mantuvieron en agitación magnética moderada y se realizaron adiciones de CPO (c/2 hr) y H₂O₂ (c/20 min) hasta agotar el sustrato correspondiente. Al final de las reacciones, los polímeros se recuperaron por centrifugación, se lavaron exhaustivamente con agua Milli Q (agua desionizada libre de pirógenos, RNAsas y ultrabajo contenido de orgánicos con una resistividad no mayor a 12 MΩ cm) seguido de lavados con metanol y finalmente se secaron bajo flujo de N₂. Por otro lado, los sobrenadantes fueron sometidos a un proceso de extracción con diclorometano. Ambas fracciones se concentraron a vacío.

Para la síntesis de PANI en presencia de SPS se colocó la siguiente mezcla de reacción en un matraz Erlenmeyer: 24 mM de anilina; 6 mM de SPS basado en el monómero; 9 nM de CPO; 20 mM de KCl en acetatos 60 mM pH 3 en un volumen final de 30 mL. La reacción se inició con la adición de H₂O₂, mismo que se agregó por goteo a lo largo de 4 horas hasta una concentración de 24 mM. A las 2 horas del comienzo de la reacción se adicionó CPO (9 nmoles más). La mezcla de reacción se dializó exhaustivamente contra agua destilada. Para este fin se empleó un tubo de diálisis con corte de 12 kDa. Finalmente el complejo PANI-SPS fue recuperado por liofilización.

4.5 Caracterización del polímero de TCA (PTCA)

Ensayo de FT-IR. Se obtuvieron los espectros de infrarrojo de la TCA y el PTCA en estado sólido, empleando un equipo FT-IR System modelo Spectrum GX de Perkin Elmer en el modo de medición ATR (reflectancia total atenuada).

Permeación en gel. Se emplearon dos columnas en serie Ultrahydrogel Linear y 500 (Waters, Milford, MA). La fase móvil fue THF:amortiguador boratos pH 11 20:80. Como estándar de peso molecular se utilizó PANI emeraldina base de 5000, 20000 y 50000 Da disuelta en la misma fase. También se preparó una solución 0.4 mg mL^{-1} del PTCA en la misma fase. La detección se realizó a 295 nm para la PANI y a 220 nm para el PTCA. Se inyectaron muestras de 50 μL de la solución del PTCA y de 950 μL de los estándares de PANI.

MALDI-ToF. Se envió una muestra del PTCA en estado sólido para su análisis a la empresa alemana Anagnostec, donde fue analizada en modo lineal para detección de pesos moleculares promedio entre 100 y 5000 Da.

4.6 Elaboración de películas de los diferentes polímeros y sus dopantes

Para la elaboración de las películas se utilizaron los polímeros secos. Se pesaron muestras de los polímeros (entre 0.5 y 2.5 mg) y se prepararon soluciones a una concentración de 5 mg mL^{-1} . El PTCA se disolvió en NH_4OH 0.01 M y los polímeros de DMA y DCA (PDMA y PDCA respectivamente) se disolvieron en metanol. Se aplicó una gota de aproximadamente 100 μL de la solución de cada polímero en un portaobjetos de vidrio (PTCA y PANI-SPS) o en una placa de acrílico (PDMA y PDCA) y se permitió que se secaran a temperatura controlada de 40 °C para PTCA y PANI-SPS y de 30 °C para PDMA y PDCA utilizando el sistema que se muestra en la Figura 9. Las condiciones de temperatura fueron fijadas luego de varios ensayos para conseguir la formación de las películas de los diferentes polímeros.

Para obtener las películas de los polímeros dopados se prepararon soluciones de los dopantes CSA, DBSA y AMPSA en metanol y se agregaron a los polímeros en relaciones molares 1:0.25 y 1:0.5 respecto a los monómeros DMA, DCA y TCA respectivamente. Se mantuvo la concentración final de los polímeros en 5 mg mL^{-1} . En el caso específico del PTCA disuelto en NH_4OH 0.01 M, se obtuvo una relación final de 20 % v/v de metanol. Para el secado se siguió el procedimiento antes descrito.



Figura 9. Sistema de secado a temperatura controlada para la formación de películas.

En una segunda etapa se pesaron muestras del PTCA (entre 1 y 2 mg) y se prepararon soluciones a una concentración de 5 mg mL^{-1} . El dopante AMPSA se agregó en relaciones 1:0, 1:0.125, 1:0.25, 1:0.5 y 1:1 con respecto al monómero TCA. Se aplicó una gota de aproximadamente $200 \mu\text{L}$ de cada mezcla de PTCA-AMPSA en portaobjetos de vidrio y se permitió que se secaran a temperatura controlada de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 7 horas. El PTCA se disolvió en NH_4OH 0.005 M y se le agregaron los dopantes disueltos en agua Milli Q a una relación final de 20 % v/v. Las películas se elaboraron por triplicado para cada relación PTCA-AMPSA.

4.7 Respuesta eléctrica

Se dibujó un par de electrodos de plata en la superficie de las películas utilizando plata líquida y un pincel de cerda fina (ver Figura 10). La respuesta eléctrica se determinó aplicando voltaje (V) a intervalos regulares en un intervalo de -100 a 100 V y midiendo la corriente (I) resultante empleando una unidad de fuente y medición de corriente y voltaje, Keithley 236.

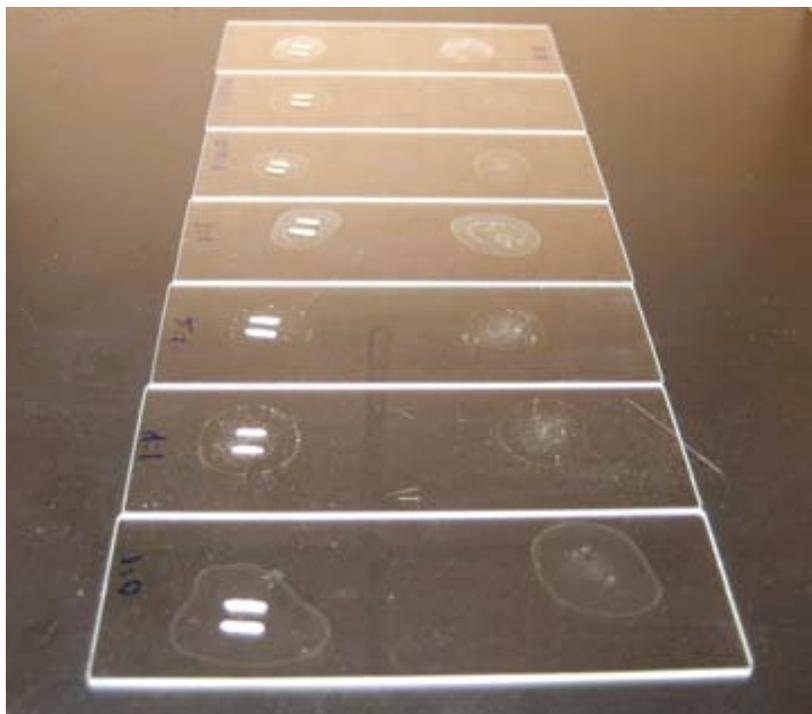


Figura 10. Electrodo de plata dibujados sobre las películas.

4.8 Dimensiones de los electrodos de plata

Las dimensiones de los electrodos se midieron utilizando un calibrador Vernier Ultra Cal Mark III (Sylvac – Fowler) con precisión de 0.02 mm.

4.9 Medición de espesores de película

Empleando un perfilómetro. Cuando se elaboraron las películas de PDMA, PDCA y PTCA considerada como primera etapa, los espesores de película se determinaron empleando un perfilómetro de Tencor Instruments Alpha-Step 100. Este equipo mide el escalón existente entre la superficie de la película y la superficie del portaobjetos/acrílico.

Por medio de análisis de imágenes. En la segunda etapa, cuando sólo se elaboraron las películas de PTCA dopado con AMPSA, no fue posible utilizar el perfilómetro para medir los espesores. Esto debido a que la consistencia de las películas era más suave conforme aumentaba la concentración de APMSA en la mezcla. Fue necesaria la búsqueda de una nueva técnica de medición y la solución fue determinar los espesores de película mediante

el análisis de imágenes. El primer paso fue cortar las películas por mitad. Se utilizó un cortador con punta de diamante ya que estaban depositadas sobre portaobjetos de vidrio. Después se colocaron en posición vertical para observar los espesores de película por medio de un microscopio (ver Figura 11).



Figura 11. Posicionamiento de las películas para su observación al microscopio.

Los valores de espesor se determinaron por análisis de imágenes obtenidas con una cámara CCD (Hitachi Color, KP-D50) acoplada a un microscopio (Nikon Optiphot-2) y conectada a una computadora. La adquisición de las imágenes y la determinación de espesores se realizó con el programa comercial Image Pro Plus 5.1 (Media Cybernetics, MD, EUA). Se hizo una curva de calibración (píxeles/ μm) capturando imágenes de un micrómetro estándar a cada una de las magnificaciones del microscopio. Con esta curva de calibración fue posible convertir los píxeles a micrómetros de acuerdo a la magnificación con la que cada imagen fue adquirida. En la Figura 12 se muestran ejemplos de las imágenes que fueron analizadas.

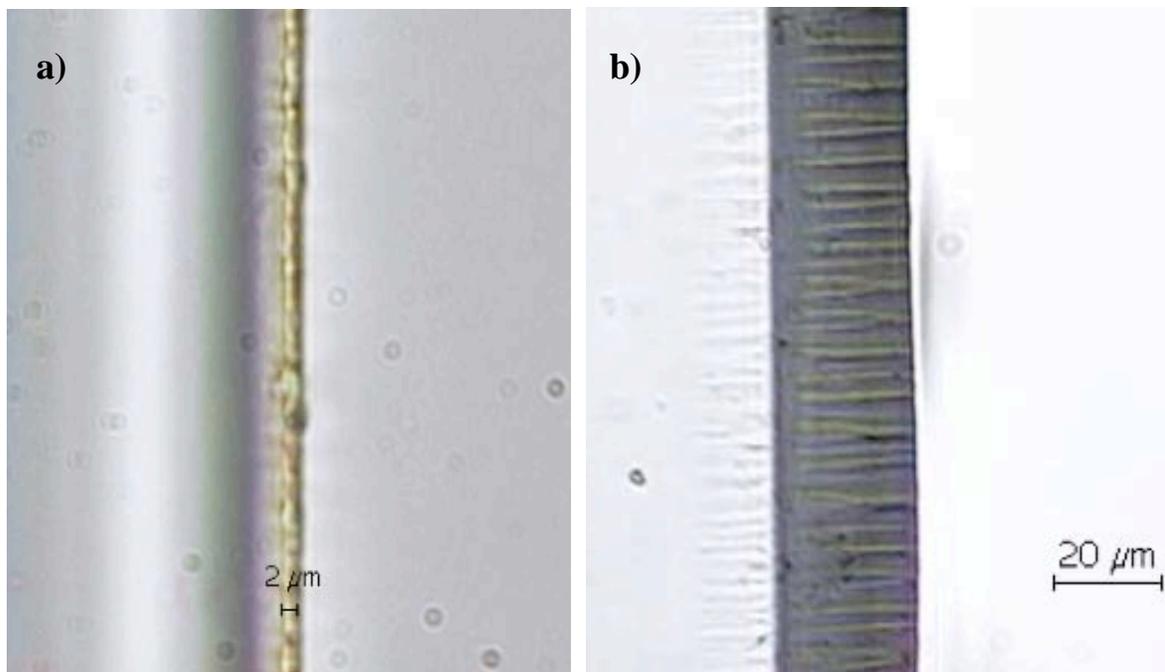


Figura 12. Ejemplo de las imágenes adquiridas para determinar el espesor de película.
 a) Perfil de la película PTCA-AMPSA 1:0.25 adquirida con magnificación 40X. b) Perfil de la película PTCA-AMPSA 1:0.5 adquirida con magnificación 20X.

4.10 Determinación de los valores de conductividad

Para determinar la conductividad de las películas se utilizó el concepto de resistencia por cuadro (sheet resistance, R_s) que se puede obtener a partir de la siguiente deducción:

La resistencia (R) de un conductor tridimensional como el que se representa en la Figura 13 se puede escribir como:

$$R = \rho \frac{S}{A}$$

Donde:

ρ = Resistividad ($\Omega \text{ m}$).

A = Área transversal (m^2).

S = Separación entre electrodos de plata (m).

Es posible separar el área como L que es la longitud de los electrodos de plata y d que es el espesor de película. Sustituyendo L y d y reagrupando la resistividad con el espesor de película se obtiene:

$$R = \frac{\rho}{d} \frac{S}{L} = R_s \frac{S}{L}$$

Reorganizando la igualdad anterior y conociendo que la conductividad es el inverso de la resistividad se obtiene:

$$R_s = R \frac{L}{S} \quad \text{y} \quad \sigma = \frac{1}{\rho} = \frac{1}{R_s d}$$

Donde:

σ = Conductividad ($S \text{ m}^{-1}$).

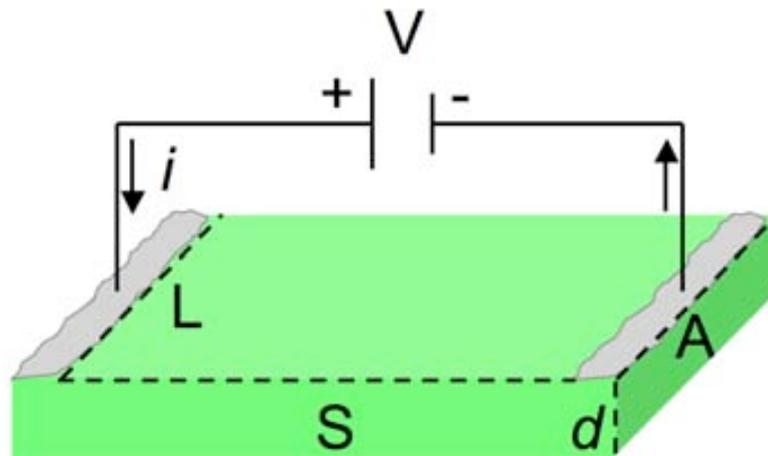


Figura 13. Representación de un conductor tridimensional.

La resistencia de las películas se obtuvo a partir de los datos de la respuesta eléctrica siguiendo la Ley de Ohm ($V = I \cdot R$). Esto fue válido para el caso donde la curva I vs V fue lineal.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Selección de la peroxidasa

5.1.1 Evaluación de cuatro peroxidasas con cuatro sustratos halogenados

La primera tarea a resolver fue la elección de la peroxidasa a utilizar y se partió de la siguiente idea: una de las anilinas sustituidas que se propuso para la síntesis de polímero fue la 2,3,5,6-tetracloroanilina (TCA) que es una molécula altamente halogenada, así que era necesario encontrar una peroxidasa que catalizara su transformación.

Se sabe que compuestos como la 4-cloroanilina y el 4-clorofenol han sido transformados por oxidorreductasas en presencia de ácidos húmicos generando productos oligoméricos, además se demostró la presencia del acoplamiento de radicales formados con los ácidos húmicos [Park *et al.*, 2000]. Por otro lado la cloroperoxidasa (CPO) del hongo *Caldariomyces fumago* se ha empleado para transformar la 4-cloroanilina [Corbett *et al.*, 1978, 1980] y N-metil-4-cloroanilina [Corbett y Chipko, 1979]. Se han estudiado mono, di y tricloroanilinas, pero no existe información acerca de anilinas altamente halogenadas. También existen innumerables estudios relacionados con la transformación de fenoles halogenados empleando peroxidasas. En particular, existe información acerca de la transformación de pentaclorofenol (PCP) mediada por peroxidasas como la lignino peroxidasa (LiP) de *Phanerochaete chrysosporium* [Hammel y Tardone, 1988; Chung y Aust, 1995; Rüttimann-Johnson y Lamar, 1996], la peroxidasa de rábano blanco (HRP) [Samokyszyn *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 1999; Kazunga *et al.*, 1999], y la versátil peroxidasa (VP) de *Bjerkandera adusta* [Davila-Vazquez *et al.*, 2005].

Con esto en mente se decidió emplear las peroxidasas arriba mencionadas para evaluar su capacidad para transformar la TCA. Además de la TCA se decidió ensayar la pentacloroanilina (PCA) que contiene un átomo adicional de cloro con respecto a la TCA y sus análogos fenólicos 2,3,5,6-tetraclorofenol (TCP) y PCP cuyas estructuras se muestran en la Figura 14.

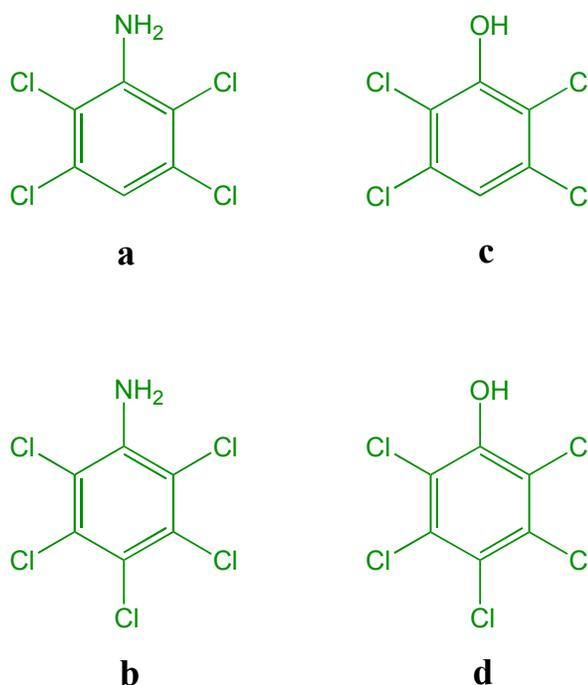


Figura 14. Compuestos halogenados empleados en la selección de la peroxidasa para la síntesis de polímeros intrínsecamente conductores.

a) 2,3,5,6-Tetrachloroanilina (TCA), b) Pentachloroanilina (PCA), c) 2,3,5,6-Tetrachlorofenol (TCP), d) Pentachlorofenol (PCP).

Este tipo de compuestos tienen diversos usos, tanto domésticos como industriales. En particular, el PCP es el principal compuesto en uso como conservador para madera. El PCP es un compuesto estable y persistente que puede ser absorbido por ingestión, inhalación y en menor proporción, por medio de la piel. Es metabolizado y eliminado lentamente. Exposiciones severas a este compuesto pueden reflejarse en un cuadro agudo provocado por el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. En casos extremos puede provocar la muerte luego de síntomas como vómito, taquicardia, sudoración intensa y convulsiones [Proudfoot, 2003]. El PCP ha sido clasificado como un mutagénico débil, sin embargo, es capaz de formar aductos con el ADN [Dai *et al.*, 2003, 2005] y debe, entonces, ser considerado como potencial carcinógeno.

Por otro lado, las cloroanilinas son empleadas como precursores en la síntesis de compuestos agroindustriales, tintas y plaguicidas y pueden ser liberadas al ambiente a través de la actividad industrial. También pueden ser liberadas al ambiente como productos

de la degradación de plaguicidas derivados de anilinas. La PCA es el principal metabolito de la degradación en suelo del quintoceno (pentacloronitrobenceno) [Renner, 1980; Fushiwaki *et al.*, 1990]. El quintoceno es convertido en PCA en suelos húmedos y sedimentos estuarinos [Tas y Pavlostathis, 2005]. Se encontró una alta mortalidad por cáncer pancreático entre residentes de largo tiempo en áreas con tasas de aplicación elevadas de quintoceno [Clary y Ritz, 2003]. Las anilinas altamente halogenadas pueden ser letales para muchos organismos [de Wolf *et al.*, 1991]. En general, la toxicidad de las cloroanilinas aumenta con el número de átomos de cloro en su estructura, aunque esta tendencia es menos marcada para compuestos altamente sustituidos. La TCA muestra toxicidad ligeramente mayor con respecto a las tricloroanilinas, mientras que la PCA revierte este comportamiento al encontrarse que su toxicidad es menor a la mostrada por las tetracloroanilinas [Argese *et al.*, 2001]. Las anilinas cloradas se clasifican como narcóticos polares en estudios QSAR (Quantitative structure-activity relationship) enfocados en su toxicidad hacia organismos acuáticos [Sixt *et al.*, 1995].

Los resultados obtenidos en esta etapa fueron publicados con un enfoque ambientalista [Longoria *et al.*, 2008, Apéndice I]. Una peculiaridad de las peroxidasas es que transforman una gran variedad de sustratos. Algunos compuestos no son sustratos de estas enzimas porque simplemente no son solubles en el medio de reacción y esto los hace inaccesibles para la enzima. El uso de medios no convencionales de reacción permite que la catálisis sea posible. Los cuatro compuestos halogenados presentan una solubilidad limitada en medio acuoso, y por lo anterior, se decidió emplear un solvente orgánico en la mezcla de reacción. En el caso particular de este trabajo, el solvente empleado es el isopropanol al 20 % v/v porque estudios preliminares mostraron que es uno de los disolventes que menos afectaban la actividad de la CPO. Esto se mantuvo para las cuatro peroxidasas con fines comparativos.

Como se observa en la Tabla 1, todas las peroxidasas ensayadas transforman los compuestos fenólicos, pero sólo la CPO fue capaz de transformar las anilinas. Además de esto, la actividad específica de la CPO sobre los fenoles es un orden de magnitud mayor que la de la VP, y dos órdenes de magnitud mayor que la de la LiP y la HRP, confirmando que la CPO es una enzima interesante para propósitos ambientales [Vazquez-Duhalt, 1998].

Tabla 1. Actividad específica de las diferentes peroxidasas con los compuestos halogenados.

Sustrato	Actividad específica (nmol sustrato min ⁻¹ nmol enzima ⁻¹)			
	CPO	LiP	VP	HRP
TCP	3020 ± 170	R	220 ± 7	37 ± 2
PCP	1200 ± 90	15*	90 ± 5	9 ± 0.3
TCA	1660 ± 70	NR	NR	NR
PCA	54 ± 1	NR	NR	NR

R Reacción.

NR No hay reacción.

* Valor obtenido de Wang *et al.*, 1999.

En la Tabla 2 se muestran los parámetros cinéticos de la CPO para la transformación de los compuestos halogenados. Los valores de k_{cat} varían de 2157 a 3650 min⁻¹ y los valores más altos se obtuvieron con los fenoles. Se observa una mayor diferencia en la constante de afinidad (K_M) pues los valores van de 6 µM para el TCP a 120 µM para el PCP. La presencia de un átomo adicional de cloro en el anillo aromático incrementa significativamente la hidrofobicidad del compuesto. El TCP tiene un coeficiente de partición en octanol-agua (K_{ow}) de 3.88 - 4.92 mientras que el PCP tiene un K_{ow} de 5.01 - 5.86 [Czaplicka, 2004]. El incremento en la hidrofobicidad se refleja en un decremento en la solubilidad en agua de 183 mg L⁻¹ del TCP a sólo 14 mg L⁻¹ del PCP [Czaplicka, 2004]. Este incremento en la hidrofobicidad podría tener un efecto en la afinidad de la enzima por estos sustratos.

Tabla 2. Constantes catalíticas de la CPO para la transformación de los compuestos halogenados.

Sustrato	k_{cat} (min ⁻¹)	K_M H ₂ O ₂ (µM)	K_M Sustrato (µM)
TCP	3650	30	6
PCP	2818	100	120
TCA	2157	269	38

La determinación de las constantes cinéticas se realizó en presencia de cada uno de los compuestos halogenados manteniendo fija la concentración de H_2O_2 y viceversa hasta alcanzar la saturación catalítica. De esta manera, la diferencia en los valores de K_M de la CPO por H_2O_2 se debe a que los valores de velocidad máxima alcanzados con cada compuesto halogenado son diferentes. El valor de K_M está definido como el valor de concentración de sustrato cuando se alcanza la mitad de la velocidad máxima.

No fue posible determinar las constantes cinéticas para la PCA debido a inconsistencias en su comportamiento cinético. No se observó transformación de la PCA cuando se adicionó CPO ó H_2O_2 de forma separada, con lo que se demuestra que la transformación de la PCA fue un proceso enzimático.

5.1.2 Identificación de productos

El principal producto de la transformación de los compuestos halogenados es un material polimérico insoluble en el medio de reacción. Como ya se mencionó, los compuestos altamente halogenados son contaminantes de difícil tratamiento. Considerando esto, la obtención de polímeros a partir de estos compuestos podría emplearse como un proceso de detoxificación ya que disminuye la biodisponibilidad de los mismos. Por otro lado, el que estos compuestos se encuentren en forma polimérica facilitaría su remoción de ambientes acuosos por procesos de filtración o precipitación.

Los productos solubles en el medio de reacción fueron extraídos con diclorometano. Los productos solubles en diclorometano y la fracción soluble en metanol resultante de los lavados de polímero precipitado fueron identificados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. En la Tabla 3 se muestra un resumen de los fragmentos masa/carga (m/z) más relevantes en la identificación de cada producto. Los espectros de masas y la interpretación de los mismos se puede observar en el Apéndice II.

Tabla 3. Datos de espectrometría de masas de los productos de la transformación de los compuestos halogenados empleando las diferentes peroxidasas.

Sustrato	Producto	Relación masa/carga (m/z)*
TCP	Trímero	692 (98) [M ⁺], 620 (31), 550 (31), 462 (77), 424 (37), 345 (56), 275 (34), 247 (100), 203 (61), 167 (45), 130 (37).
PCP	TCBQ	246 (77) [M ⁺], 209 (53), 190 (36), 153 (17), 118 (20), 87 (100), 71 (8), 59 (14), 47 (11).
TCA	PCA	265 (100) [M ⁺], 230 (12), 203 (12), 194 (18), 158 (19), 132 (7), 123 (11), 115 (5), 96 (13), 79 (5), 61 (11).
	PCP	266 (100) [M ⁺], 230 (24), 202 (21), 165 (47), 130 (24), 107 (24), 95 (47), 87 (26), 60 (33).
	TCBQ	246 (77) [M ⁺], 209 (53), 190 (36), 153 (17), 118 (20), 87 (100), 71 (8), 59 (14), 47 (11).
	Dímero TCA-TCA	460 (62) [M ⁺], 424 (11), 388 (100), 354 (24), 317 (16), 281 (10), 245 (18), 209 (45), 194 (25), 158 (11).
	Dímero TCA-PCA	494 (41) [M ⁺], 458 (32), 424 (23), 388 (34), 356 (7), 285 (10), 257 (24), 194 (31).
	Dímero PCA-PCA	526 (10) [M ⁺], 492 (6), 277 (66), 249 (100), 214 (41), 179 (18), 142 (22).
PCA	PCP	266 (100) [M ⁺], 230 (24), 202 (21), 165 (47), 130 (24), 107 (24), 95 (47), 87 (26), 60 (33).
	TCBQ	246 (77) [M ⁺], 209 (53), 190 (36), 153 (17), 118 (20), 87 (100), 71 (8), 59 (14), 47 (11).

*M⁺ denota el ion molecular y los números entre paréntesis corresponden a la abundancia relativa de cada fragmento m/z.

En la transformación del PCP se identificaron dos productos además del polímero: 2,3,5,6-tetraclorobenzoquinona (TCBQ) y un dímero (ver Figura 15). La transformación del PCP ya se ha reportado previamente usando la HRP [Samokyszyn *et al.*, 1995; Kazunga *et al.*, 1999], la LiP [Hammel y Tardone, 1988; Rüttimann-Johnson y Lamar, 1996; Reddy y Gold, 2000] y la VP [Davila-Vazquez *et al.*, 2005].

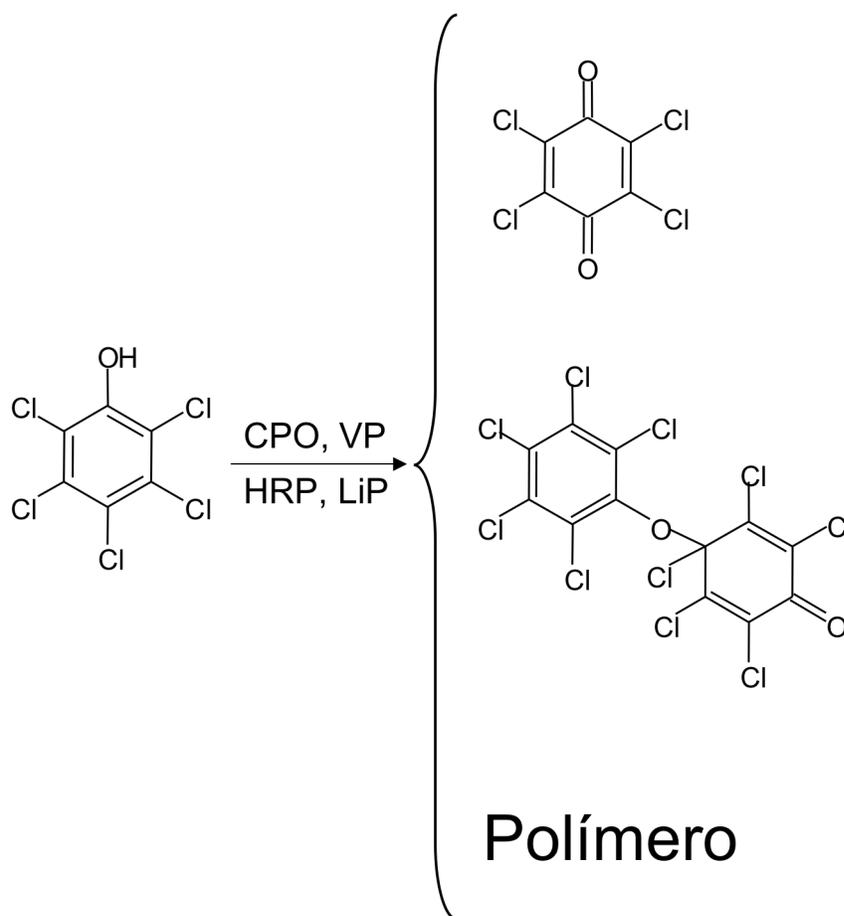


Figura 15. Productos de la transformación del pentaclorofenol (PCP) empleando peroxidases. CPO, Cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*; VP, peroxidasa versátil; HRP, peroxidasa de rábano blanco, LiP, lignino peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium*.

Se sugiere que el mecanismo de síntesis de la TCBQ a partir del PCP incluye la formación de un radical basado en el oxígeno, seguido por la deslocalización del radical en el anillo aromático provocando la liberación del átomo de cloro en la posición *para* [Samokyszyn *et al.*, 1995]. Se ha sugerido un mecanismo diferente en el cual el primer paso es la formación de un dímero por condensación de radicales fenoxilo y su posterior descomposición liberando PCP y TCBQ [Kazunga *et al.*, 1999]. Este último mecanismo es sustentado por los resultados obtenidos en este trabajo, ya que sólo el 2.5 % del PCP transformado se encuentra como TCBQ y al final de la reacción siempre se encuentran cantidades significativas de PCP. Se dice que la TCBQ es un posible precursor en la formación de polímero [Rüttimann-Johnson y Lamar, 1996].

El TCP es fácilmente transformado por la CPO al igual que las otras peroxidadas. Se identificó un trímero con acoplamientos en posición *para*, lo que sugiere fuertemente la formación de un polímero lineal (ver Figura 16). La formación de oligómeros también se ha observado a partir de di- y triclorofenoles mediante el uso de la HRP y la lacasa de *Trametes versicolor* [Simmons *et al.*, 1987]. Por otro lado se ha reportado la halogenación de fenoles clorados usando la CPO [Corbett *et al.*, 1980; Wannstedt *et al.*, 1990].

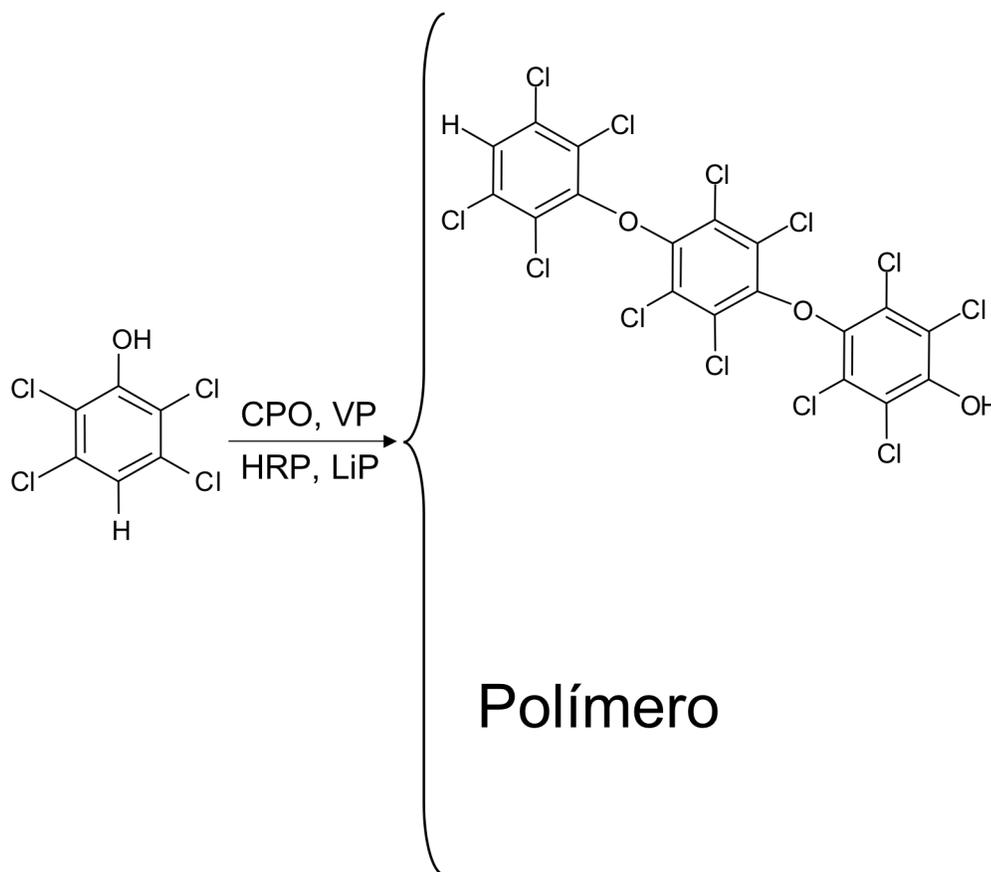


Figura 16. Productos de la transformación del 2,3,5,6-tetraclorofenol (TCP) empleando peroxidadas.

CPO, Cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*; VP, peroxidasa versátil; HRP, peroxidasa de rábano blanco, LiP, lignino peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium*.

Como se observa en la Tabla 1, de las cuatro peroxidadas ensayadas, sólo la CPO fue capaz de transformar las anilinas halogenadas. Entre los productos de la transformación de la PCA se encuentran el PCP y la TCBQ, además del polímero (ver Figura 17).

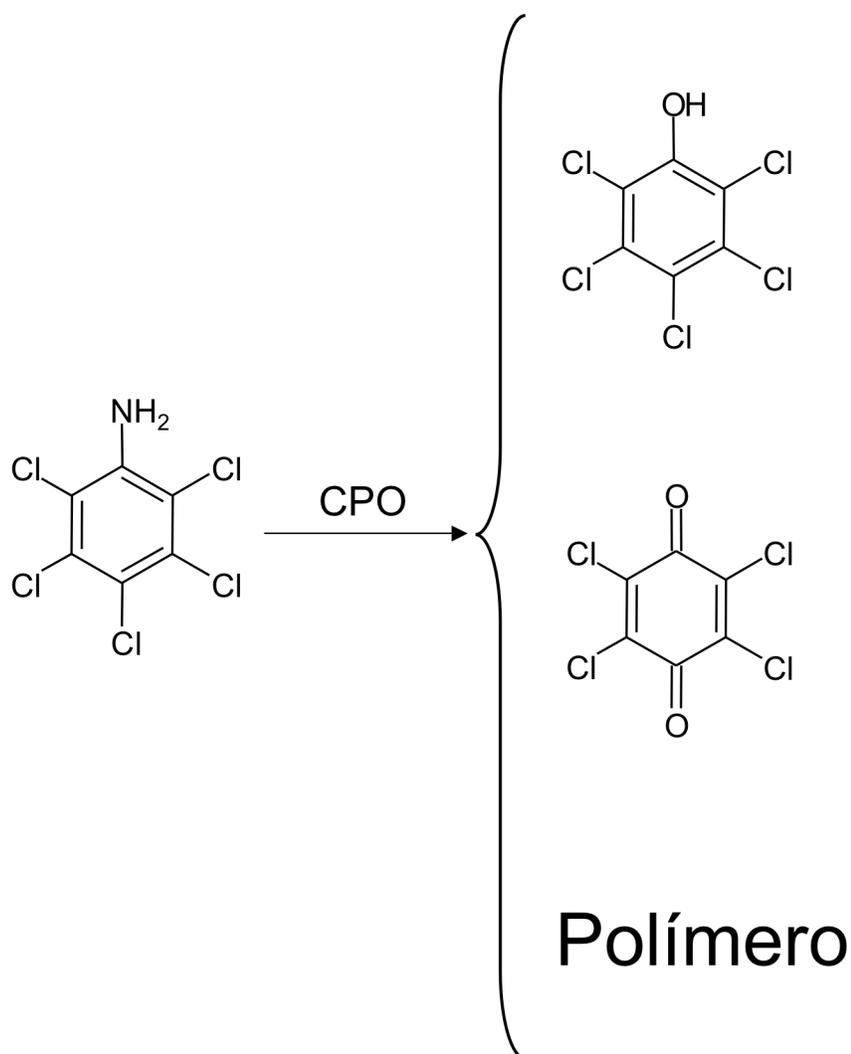


Figura 17. Productos de la transformación de la pentacloroanilina (PCA) empleando la cloroperoxidasa (CPO).

Esta es la primera vez que se reporta la transformación de PCA empleando peroxidasa. Dicha transformación sólo ocurre en presencia de cloruro. No se conoce el mecanismo por el cuál se obtiene el PCP a partir de la PCA por lo que se requieren estudios más profundos para elucidarlo. Se sabe que utilizando la CPO se obtiene 4-cloronitrosobenceno a partir de la 4-cloroanilina [Corbett *et al.*, 1978, 1980]. Este producto se ha identificado cuando no hay cloruro en la mezcla de reacción y en condiciones de $\text{pH} \geq 6$. En condiciones de $\text{pH} \leq 3$ y en presencia de cloruro se obtienen productos halogenados. En este trabajo no se identificaron compuestos con el grupo $-\text{NO}$ al transformar las anilinas halogenadas

empleando la CPO. Se sabe que la CPO realiza actividad halogenasa alrededor de pH 3 y actividad peroxidasa a pH entre 4.5 y 6 [Pickard y Hashimoto, 1982]. También se sabe que la presencia de cloruro mejora la actividad peroxidasa de la CPO aunque el mecanismo por medio del cual esto ocurre no es claro.

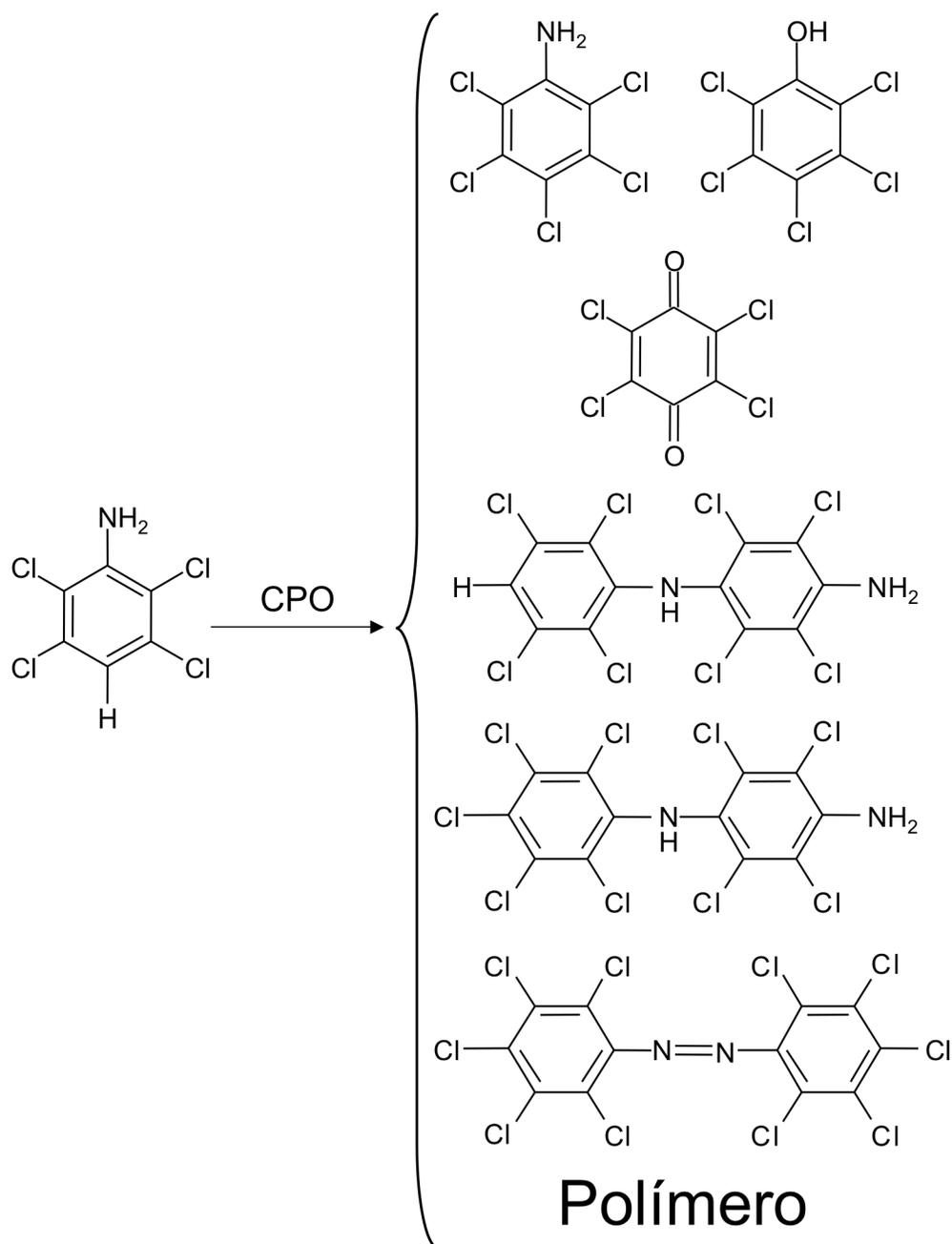


Figura 18. Productos de la transformación de la 2,3,5,6-tetracloroanilina (TCA) empleando la cloroperoxidasa (CPO).

Entre los productos de la TCA (Figura 18) se encuentra la PCA que es producto de la actividad halogenasa de la enzima. También se encontraron 3 dímeros con acoplamiento en posición *para*, más el PCP y la TCBQ que deben ser productos de la PCA, que a la vez es sustrato de la CPO. Los dímeros obtenidos se deben al acoplamiento de dos radicales de TCA, un radical de TCA y otro de PCA, ambos en orientación cabeza-cola definiendo como cabeza el grupo amino, un dímero de dos radicales de PCA acoplados cabeza-cabeza formando un enlace azo. Como se observa, los tres dímeros identificados en la transformación de la TCA por la CPO presentan acoplamiento en posiciones *para*, lo que indica que la estrategia de utilizar anilinas sustituidas es adecuada para la obtención de polímeros lineales. El crecimiento del polímero se ve limitado hacia uno de los extremos por el dímero TCA-PCA, mientras que el dímero PCA-PCA es inútil en el crecimiento del mismo. Sin embargo, estos productos representan del 3 al 11 % de la masa total de la TCA transformada mientras que el polímero representa del 87 al 95 %. El 2 % de la masa total de TCA no es transformada luego de varias adiciones de CPO y H₂O₂.

Estructura de los polímeros. Se sabe que la transformación de compuestos aromáticos mediada por peroxidasas genera polímeros o al menos oligómeros debido al acoplamiento de los radicales libres producidos. De acuerdo a la estructura de los monómeros, dímeros y trímeros identificados como productos de la transformación de los compuestos halogenados, se propone que las estructuras de los polímeros son lineales. Es decir, los monómeros que forman parte de la estructura de los polímeros están unidas en posiciones *para*. Este argumento se apoya en el hecho de que no hay salida de los átomos de cloro de las posiciones *orto* y *meta*, lo cual dirige el acoplamiento de los radicales producidos en posición *para*. Por otro lado, la transformación del PCP por la HRP genera un polímero cuyo análisis por cromatografía de gases pirolítica acoplada a espectrometría de masas mostró que el principal producto de pirólisis es el TCP [Morimoto *et al.*, 2000].

Se realizaron algunos estudios para determinar la estructura y peso molecular del polímero de TCA (PTCA). Como se puede observar en la Figura 19, las bandas características de aminas primarias a 3500 y 3400 cm⁻¹ presentes en el espectro de TCA, se encuentran atenuadas en el espectro del PTCA. Esto puede deberse a la desaparición de las aminas primarias debido al proceso de polimerización, sin embargo, en esa zona también aparecen

las señales debidas a la presencia de agua en la muestra. El ensanchamiento de las bandas cercanas a los 1600 cm^{-1} , que corresponden a dobles enlaces de moléculas aromáticas, y las bandas cercanas a los 1100 cm^{-1} que corresponden a enlaces carbono-cloro de moléculas aromáticas, indican la acumulación de estos grupos debido al proceso de polimerización.

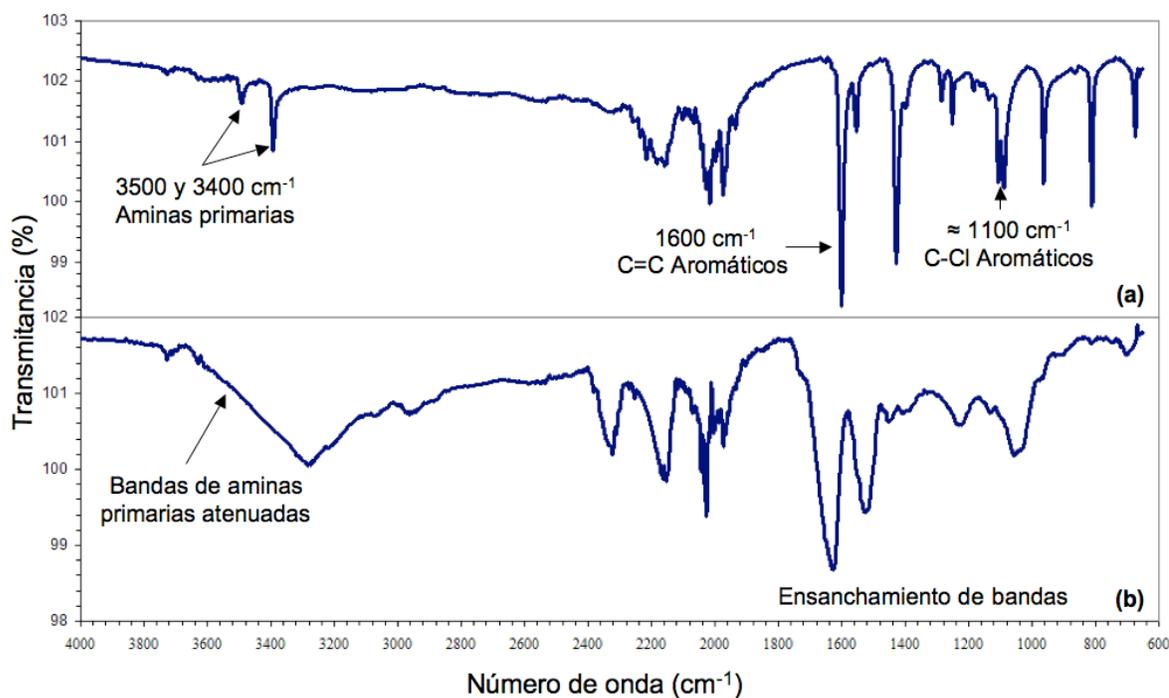


Figura 19. Espectros de infrarrojo de la TCA y el polímero de TCA (PTCA).

(a) Espectro de infrarrojo de la TCA; (b) Espectro de infrarrojo del PTCA. Los espectros fueron obtenidos a partir de muestras sólidas.

Las evidencias con que se cuenta acerca del peso molecular del PTCA provienen de los análisis por cromatografía de permeación en gel y espectrometría de masas empleando la técnica de MALDI-ToF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight). El análisis de espectrometría de masas fue realizado por la empresa AgnosTec (Alemania), en una ventana de análisis de 100 a 5000 Da y se observó un pico máximo alrededor de 4500 Da. En el análisis de permeación en gel, el PTCA eluyó antes que la PANI de 50000 Da empleada como estándar. Esto indica que el peso molecular del PTCA es mayor a 50000 Da. Debido a que el PTCA eluyó en la fracción no retenida (volumen muerto) no fue posible establecer el peso molecular por medio de extrapolación con respecto a la elución de los estándares de PANI utilizados (5000, 20000 y 50000 Da). Los esfuerzos por

determinar el peso molecular del PTCA estuvieron fuertemente limitados por sus características de solubilidad en condiciones alcalinas. La PANI no es soluble en tales condiciones, lo que dificultó en gran medida el análisis por permeación en gel. Por otro lado, el análisis por MALDI-ToF fue realizado en estado sólido. El análisis de muestras en estado sólido sigue presentando retos para los expertos en el tema.

La polimerización de compuestos aromáticos mediada por peroxidasas está dividida en pasos de formación, acoplamiento y transferencia de radicales [Ryu *et al.*, 1993]. Esto implica que un radical recién formado puede acoplarse con otro radical para formar dímeros o puede transferirse a un dímero ya formado. El dímero radical puede acoplarse con otro dímero radical o monómero radical. La repetición de estos procesos genera el polímero. Con base en esto y a los productos identificados por espectrometría de masas, la estructura del PTCA sería lineal y estaría conformada por segmentos con acoplamientos cabeza-cabeza y cabeza-cola como se muestra en la Figura 20.

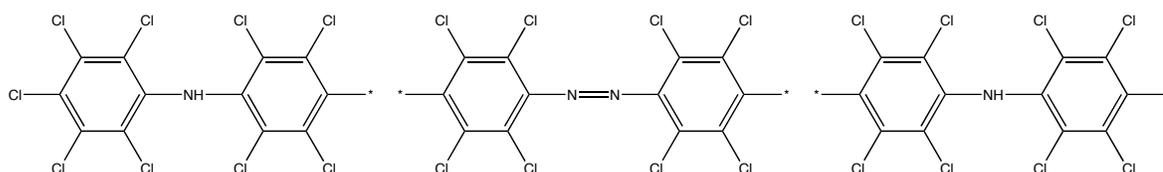


Figura 20. Estructura propuesta para el PTCA.

De acuerdo con los productos identificados por espectrometría de masas, esta estructura estaría compuesta por segmentos con acoplamientos cabeza-cabeza y cabeza-cola. Además, podría contener terminaciones halogenadas.

Para determinar con certeza el tamaño y estructura del polímero se requiere la utilización de diferentes técnicas de espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear, análisis elemental, entre otras, que puedan contender con muestras en estado sólido ó solubles en condiciones alcalinas.

Los resultados obtenidos en esta etapa muestran que la CPO es la única peroxidasa de las cuatro evaluadas con la capacidad para sintetizar polímero a partir de la TCA, por lo tanto se decidió utilizar ésta enzima en la síntesis de polímeros a partir de las anilinas sustituidas.

5.2 Síntesis y caracterización eléctrica de los polímeros

5.2.1 Síntesis de polímeros

Con base en los resultados se decidió utilizar la CPO (Figura 21) para la síntesis de polímeros a partir de las anilinas sustituidas al ser la única de las peroxidas estudiadas con la capacidad para transformar la TCA. La CPO (E. C. 1.11.1.10, cloruro:hidrógeno-peróxido oxidorreductasa) es una proteína monomérica extracelular producida por el hongo filamentoso *Caldariomyces fumago*. Tiene un peso molecular de 42 kDa, contiene una ferriprotoporfirina IX como grupo prostético y está glicosilada. Los azúcares representan del 25 al 30 % del peso molecular de la proteína [Morrison y Hager, 1966]. Además de la actividad peroxidasa, la CPO presenta actividad halogenasa, catalasa y de tipo monooxigenasa [Hager *et al.*, 1966; Thomas *et al.*, 1970].

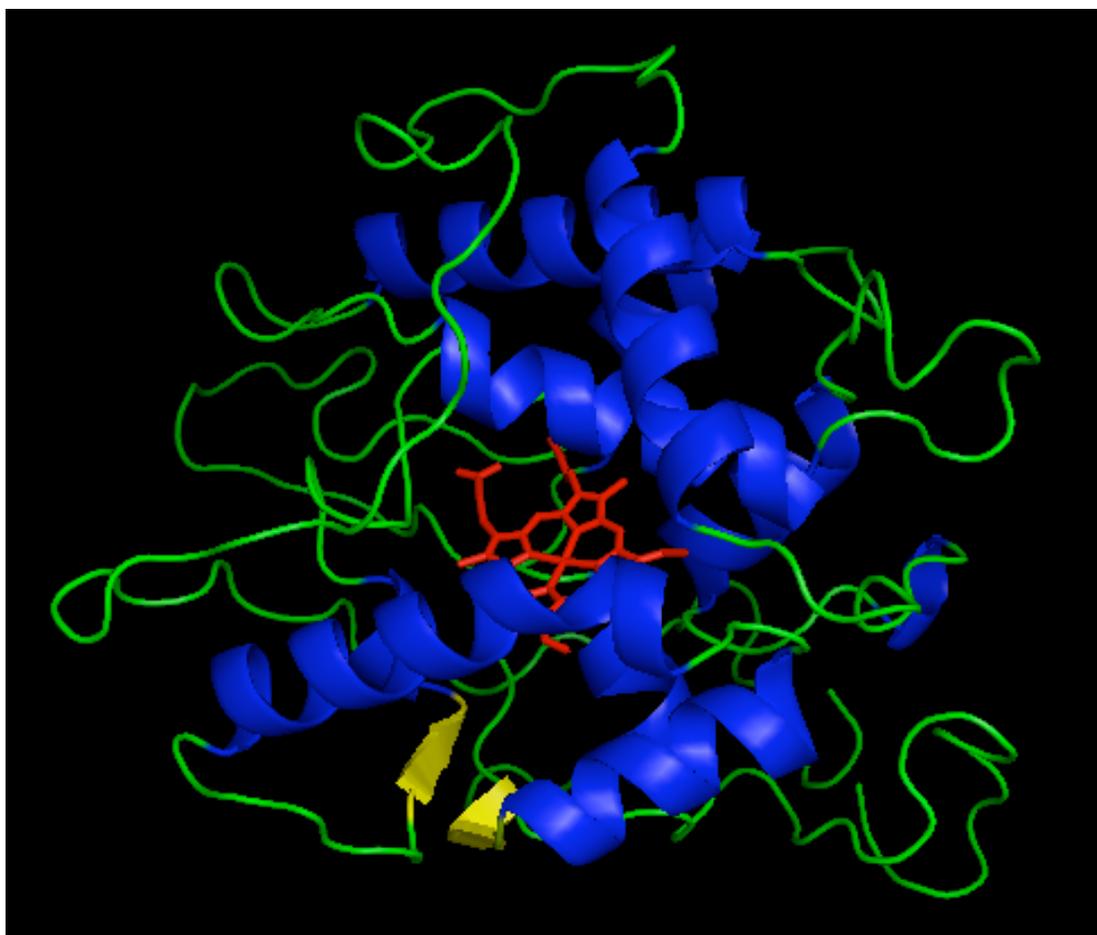


Figura 21. Cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*.

En la fase previa ya se había comprobado la síntesis de polímero a partir de la TCA empleando la CPO, además de que se identificaron los productos solubles en la mezcla de reacción. Era necesario sintetizar una mayor cantidad de polímero para realizar la caracterización eléctrica, por lo que la reacción de síntesis se realizó en 1 L de volumen total.

Síntesis de polímeros e identificación de los productos solubles empleando DMA y DCA como sustratos. Se realizaron reacciones separadas con la CPO y cada una de las anilinas sustituidas. Al final de las reacciones se obtuvieron 2 fracciones: una soluble en el medio de reacción y el polímero precipitado. Los productos presentes en la fracción soluble fueron identificados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. En la Tabla 4 se muestran los fragmentos m/z más relevantes en la identificación de cada producto (en el Apéndice II se describe la técnica de espectrometría de masas empleada).

Tabla 4. Datos de espectrometría de masas de los productos obtenidos mediante la transformación de la DCA y de la DMA por la CPO.

Sustrato	Producto	Relación masa/carga (m/z)*
DCA	2,4,6-Tricloroanilina	195 (100) [M^+], 159 (10), 124 (25), 97 (12), 73 (5), 62 (7), 52 (5).
	2,6-Diclorobenzoquinona	176 (100) [M^+], 148 (20), 141 (19), 120 (45), 113 (40), 88 (56), 85 (18), 60 (55), 53 (51), 50 (15).
	Dímero DCA-DCA, enlace azo	320 (21) [M^+], 173 (72), 145 (100), 109 (48), 74 (19).
	Dímero DCA-DCA	322 (87) [M^+], 286 (6), 250 (100), 215 (14), 179 (8), 152 (4).
	Dímero DCA-Tricloroanilina, enlace azo	354 (39) [M^+], 207 (66), 179 (72), 145 (100), 109 (57), 74 (29).
	Dímero DCA-Tricloroanilina	356 (100) [M^+], 321 (12), 284 (76), 251 (31), 213 (20), 187 (10), 166 (12), 142 (16), 109 (11).
	Dímero Tricloroanilina-Tricloroanilina, enlace azo	388 (22) [M^+], 207 (96), 179 (100), 143 (41), 109 (25), 74 (18).
DMA	2,6-Dimetil- <i>p</i> -cloroanilina	155 (100) [M^+], 140 (12), 120 (82), 103 (9), 91 (17), 77 (13).
	2,6-Dimetilbenzoquinona	136 (91) [M^+], 108 (79), 96 (26), 79 (74), 68 (100), 53 (12), 39 (69).
	Dímero DMA-Dimetil- <i>p</i> -cloroanilina	275 (100) [M^+], 258 (30), 244 (54), 230 (16), 195 (17), 91 (18), 77 (28).
	Dímero DMA-Dimetil- <i>p</i> -cloroanilina, enlace azo	274 (44) [M^+], 231 (50), 189 (100), 185 (52), 161 (96), 143 (86), 131 (32), 128 (41), 115 (56), 91 (66).
	Dímero Dimetil- <i>p</i> -coloranilina-Dimetil- <i>p</i> -cloroanilina	308 (56) [M^+], 173 (84), 143 (100), 138 (37), 115 (40), 91 (38), 77 (33).

* M^+ denota el ion molecular y los números entre paréntesis corresponden a la abundancia relativa de cada fragmento m/z .

Al igual que con la TCA, con la DMA y la DCA se encuentran productos de la actividad halogenasa y peroxidasa de la CPO (ver Figuras 22 y 23).

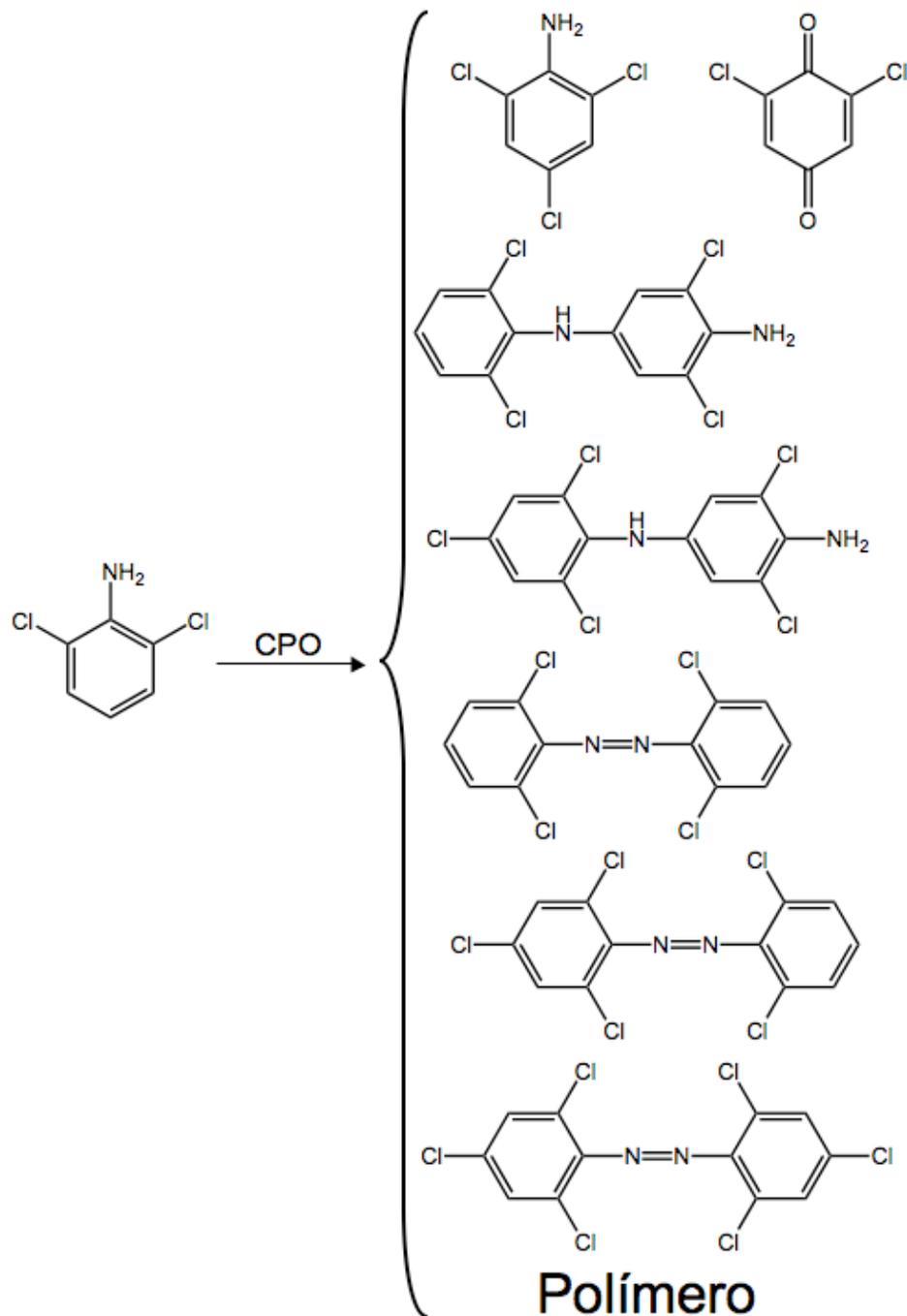


Figura 22. Productos de la 2,6-dicloroanilina (DCA) empleando la cloroperoxidasa (CPO).

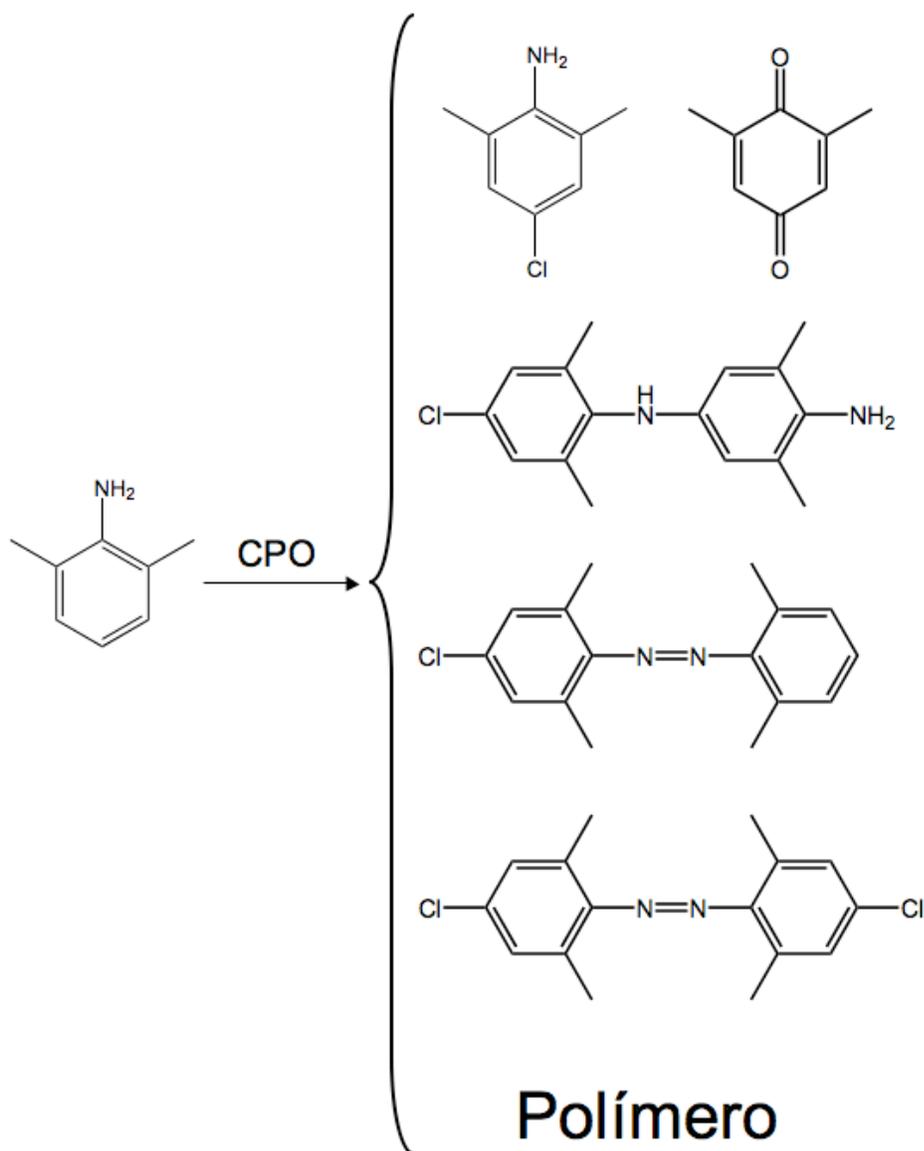


Figura 23. Productos de la 2,6-dimetilanilina (DMA) empleando la cloroperoxidasa (CPO).

También se observó la producción de quinonas, las cuales podrían derivarse a través del mecanismo antes descrito para la obtención de la TCBQ a partir del PCP. Entre los dímeros observados, se encuentran acoplamientos formando enlaces azo. Este tipo de acoplamiento también se ha observado mediante la transformación de 3,4-DCA por la LiP [Pieper, *et al.*, 1992] y de la 3,5-DCA empleando tetrasulfonatoftalocianina de Fe (III) como catalizador y monopersulfato de potasio ó H_2O_2 como agente oxidante [Hadasch y Meunier, 1999]. Otros

de los dímeros están acoplados en orientación cabeza-cola, la cual se prefiere en la formación de los polímeros. No se identificó ningún producto derivado de la salida de los grupos en las posiciones *orto*. Esto es importante porque la propuesta de este trabajo es que dichos grupos permanecerían en las moléculas y forzarían el acoplamiento de radicales en orientación *para*. Se observó una disminución en el rendimiento de polímero de DCA y DMA con respecto al PTCA que pudiera deberse a que la diversidad compuestos monoméricos y diméricos obtenidos aumenta. Es necesario realizar análisis que permitan determinar la estructura y peso molecular de los polímeros de DCA y DMA. Con base en los productos identificados se propone que sus estructuras son lineales y análogas a la estructura propuesta para el PTCA (ver Figura 20).

Síntesis de PANI-SPS. La alternativa de utilizar anilinas sustituidas en lugar de una plantilla química para obtener polímeros lineales asume que la CPO sintetiza PANI en presencia de SPS al igual que la HRP. Para comprobar si esto sucedía, se realizó una reacción con CPO y anilina en presencia de SPS. El resultado fue un polímero de color verde que coincide con las características descritas para el complejo PANI-SPS obtenido mediante la catálisis con HRP [Samuelson, 1998; Liu *et al.*, 1999a, b].

5.2.2 Conductividad de los polímeros

Se determinó la conductividad de los polímeros en forma de películas delgadas antes y después de doparlos. Para el dopaje se eligieron 3 ácidos que se han empleado como dopantes para la PANI con buenos resultados [Beyer y Steckenbiegler, 1993; Cao *et al.*, 1992]. Estos fueron el ácido (1*S*)-(+)-10-Canforsulfónico (CSA), el ácido dodecibencensulfónico (DBSA) y ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico (AMPSA). En la Tabla 5 se observan los valores de conductividad obtenidos, además de los diferentes parámetros necesarios para la determinación de dichos valores. El empleo del concepto de resistencia por cuadro (R_s) incluye un factor de corrección geométrico, de tal forma que los valores de conductividad son comparables independientemente de las dimensiones de las películas de los diferentes polímeros. Sin embargo, se puede observar que salvo algunas excepciones, los valores de espesor de película (d) se mantienen en el mismo orden de magnitud. Recordando que la conductividad (σ) de las películas está

definida como el inverso del producto $R_s \cdot d$, es claro que el valor de R_s tiene un mayor impacto en los valores de σ (ver Tabla 5). Esto significa que para obtener mayores valores de σ es necesario disminuir los valores de R_s manteniendo valores similares de d .

Tabla 5. Valores de conductividad de los diferentes polímeros dopados y sin dopar.

Película *	Resistencia (R), Ω	Separación electrodos (S), m	Longitud electrodos (L), m	Espesor de película (d), m	Resistencia por cuadro (R_s), Ω	Conductividad (σ), $S\ m^{-1}$
PDMA	3.92×10^{12}	1.9×10^{-3}	5.1×10^{-3}	1.40×10^{-6}	1.05×10^{13}	6.79×10^{-8}
PDMA-CSA 1:0.25	8.77×10^9	2.9×10^{-3}	6.2×10^{-3}	3.07×10^{-6}	1.87×10^{10}	1.74×10^{-5}
PDMA-CSA 1:0.5	8.03×10^{12}	2.4×10^{-3}	5.5×10^{-3}	2.43×10^{-6}	1.88×10^{13}	2.20×10^{-8}
PDMA-DBSA 1:0.25	1.27×10^{10}	1.9×10^{-3}	5.0×10^{-3}	3.77×10^{-6}	3.29×10^{10}	8.06×10^{-6}
PDMA-DBSA 1:0.5	1.80×10^{10}	1.9×10^{-3}	5.3×10^{-3}	5.00×10^{-6}	5.02×10^{10}	3.99×10^{-6}
PDMA-AMPSA 1:0.25	2.42×10^{11}	1.4×10^{-3}	5.5×10^{-3}	2.06×10^{-6}	8.92×10^{11}	5.44×10^{-7}
PDMA-AMPSA 1:0.5	3.54×10^{12}	1.6×10^{-3}	5.5×10^{-3}	4.74×10^{-6}	1.09×10^{13}	1.93×10^{-8}
PDCA	3.25×10^{11}	2.0×10^{-3}	4.5×10^{-3}	1.13×10^{-6}	7.35×10^{11}	1.21×10^{-6}
PDCA-CSA 1:0.25	1.24×10^{13}	3.0×10^{-3}	5.1×10^{-3}	2.42×10^{-6}	2.08×10^{13}	1.99×10^{-8}
PDCA-CSA 1:0.5	3.08×10^{12}	3.9×10^{-3}	5.0×10^{-3}	2.36×10^{-6}	3.95×10^{12}	1.07×10^{-7}
PDCA-DBSA 1:0.25	2.46×10^{10}	3.7×10^{-3}	5.7×10^{-3}	1.82×10^{-6}	3.76×10^{10}	1.46×10^{-5}
PDCA-DBSA 1:0.5	2.98×10^9	4.2×10^{-3}	5.9×10^{-3}	0.63×10^{-6}	4.15×10^9	3.82×10^{-4}
PDCA-AMPSA 1:0.25	9.71×10^{12}	3.4×10^{-3}	5.2×10^{-3}	1.05×10^{-6}	1.46×10^{13}	6.56×10^{-8}
PDCA-AMPSA 1:0.5	1.18×10^{12}	3.3×10^{-3}	5.8×10^{-3}	0.42×10^{-6}	2.06×10^{12}	1.15×10^{-6}
PTCA	2.67×10^{12}	2.1×10^{-3}	6.5×10^{-3}	0.02×10^{-6}	8.14×10^{12}	4.69×10^{-6}
PTCA-CSA 1:0.25	8.73×10^9	2.5×10^{-3}	6.5×10^{-3}	4.89×10^{-6}	2.31×10^{10}	8.86×10^{-6}
PTCA-CSA 1:0.5	3.50×10^{10}	2.8×10^{-3}	5.6×10^{-3}	6.15×10^{-6}	6.99×10^{10}	2.32×10^{-6}
PTCA-DBSA 1:0.25	5.90×10^{12}	2.4×10^{-3}	6.7×10^{-3}	1.08×10^{-6}	1.62×10^{13}	5.72×10^{-7}
PTCA-DBSA 1:0.5	1.66×10^{12}	2.2×10^{-3}	6.0×10^{-3}	1.41×10^{-6}	4.49×10^{12}	1.58×10^{-7}
PTCA-AMPSA 1:0.25	8.58×10^8	2.6×10^{-3}	5.6×10^{-3}	3.43×10^{-6}	1.84×10^9	1.58×10^{-4}
PTCA-AMPSA 1:0.5	6.49×10^7	2.7×10^{-3}	6.5×10^{-3}	5.68×10^{-6}	1.58×10^8	1.11×10^{-3}
PANI-SPS	3.85×10^7	1.9×10^{-3}	4.2×10^{-3}	4.70×10^{-6}	8.67×10^7	2.45×10^{-3}

Para las muestras dopadas se utilizaron las abreviaturas ya definidas para los polímeros y dopantes separadas por un guión, seguidas de la relación molar de polímero-dopante empleada en cada caso.

La conductividad del complejo PANI-SPS ($2.45 \times 10^{-3}\ S\ m^{-1}$) obtenido con la CPO es menor al sintetizado con HRP ($5 \times 10^{-1}\ S\ m^{-1}$) [Liu *et al.*, 1999b]. La diferencia podría deberse a que la CPO esté ejerciendo su actividad halogenasa, lo que implicaría la presencia de átomos de cloro en la estructura del polímero que afecten la conductividad.

Otras posibilidades son que las condiciones de síntesis no sean óptimas ya que se realizó en las condiciones descritas para la HRP [Liu *et al.*, 1999b] con el fin de comprobar que la CPO era capaz de sintetizar PANI en presencia del SPS ó la diferencia en las condiciones de medición de la conductividad.

Con el polímero de DMA (PDMA) y los tres dopantes empleados, una relación molar 1:0.25 polímero:dopante parece ser suficiente para aumentar la conductividad del PDMA pues un aumento en la concentración de dopante disminuye dicho valor (Figura 24, inciso a). En el caso del polímero de DCA (PDCA) y los tres dopantes pareciera que es necesario aumentar todavía más la concentración de los mismos para alcanzar un valor máximo de conductividad, aunque en los casos de dopado con CSA y AMPSA (Figura 24, inciso b), al adicionar el dopante en una relación molar 1:0.25 la conductividad cae con respecto al valor del PDCA sin dopar y se recupera ligeramente a una relación molar de 1:0.5. No se tiene una respuesta a dicho comportamiento, aunque es necesario mencionar que la superficie de las películas obtenidas con el PDMA y el PDCA fue muy irregular. Esta característica superficial se refleja en una mala calidad de las películas. Se realizó una exploración de condiciones con el fin de mejorar esta característica pero esto no fue posible. Se sabe que no todos los polímeros son buenos formadores de películas delgadas. La elaboración de películas delgadas de los polímeros se empleó para medir la conductividad debido a que no se requerían grandes cantidades de muestra. Dados los resultados obtenidos, se deben buscar otras alternativas para determinar los valores de conductividad de PDMA y PDCA como la elaboración de pastillas o comprimidos de los mismos. En contraste con PDMA y PDCA, con el PTCA se obtuvieron películas de mejor calidad, es decir, superficies parejas. En el caso del PTCA dopando con CSA y DBSA no se observa un aumento en la conductividad, más bien, éste valor disminuye al aumentar la concentración de dopantes comparado con el polímero sin dopar (Figura 24, inciso c). Como se observa en la Tabla 5 y la Figura 24 inciso c, el PTCA dopado con AMPSA presentó las mayores conductividades.

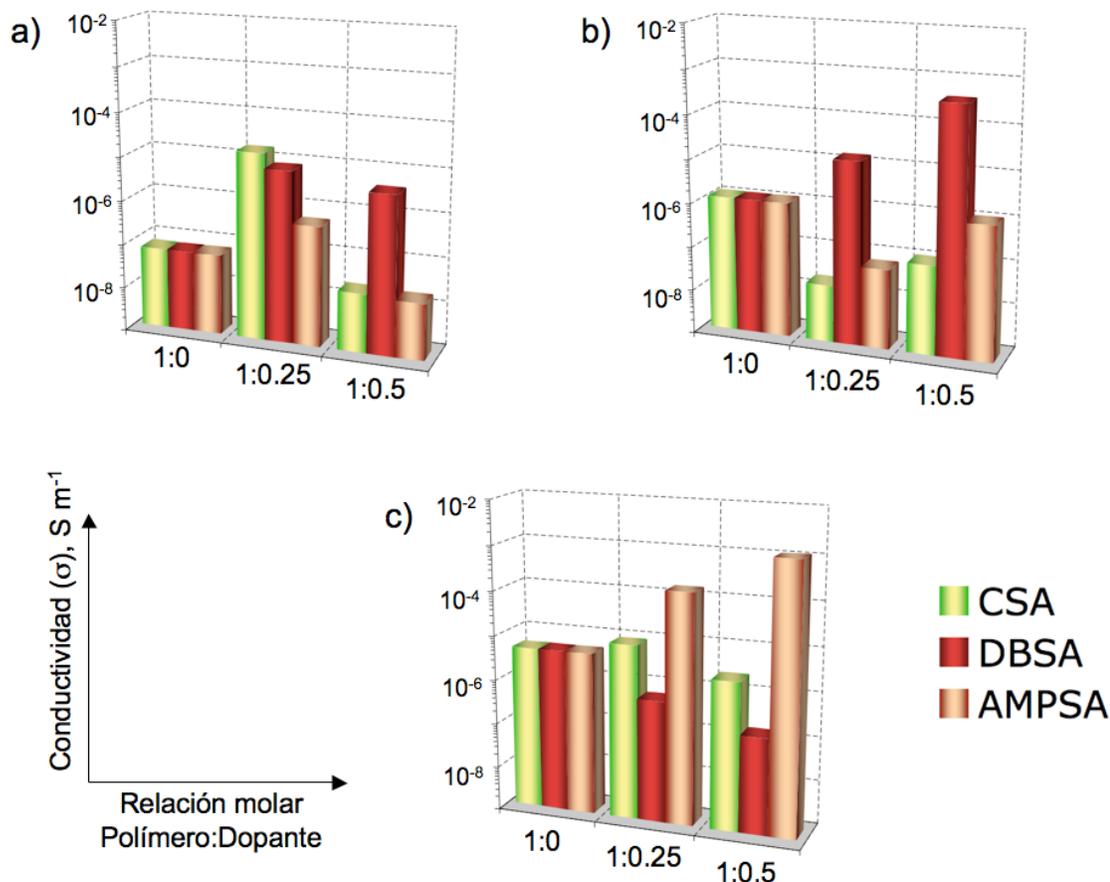


Figura 24. Conductividad de los polímeros de DMA, DCA y TCA dopados y sin dopar. a) Polímero de DMA (PDMA); b) Polímero de DCA (PDCA); c) Polímero de TCA (PTCA). Se elaboró una película de cada polímero sin dopar y su conductividad se muestra en 3 barras correspondientes a cada dopante con fines comparativos. La escala de las gráficas aquí presentadas se encuentra en la esquina inferior izquierda.

Los materiales aislantes son aquellos con conductividades entre 10^{-16} y 10^{-7} S m^{-1} y los semiconductores van de 10^{-7} a 10^2 S m^{-1} . Las conductividades de los polímeros y sus especies dopadas oscilan entre 10^{-8} y 10^{-3} S m^{-1} , lo que indica que se encuentran en la zona de semiconductores y algunos en la zona de transición entre aislantes y semiconductores. El estudio de conductividades de los polímeros se realizó empleando dos relaciones molares polímero:dopante y las respuestas obtenidas no son muy claras, por lo que se propuso aumentar el intervalo de concentraciones de dopante empleadas. Como ya se mencionó, el PDMA y el PDCA no son muy buenos materiales para la formación de películas delgadas, por lo que se eligió al PTCA y el dopante AMPSA, que además muestran los mayores valores de conductividad, para realizar dicho estudio.

5.3 PTCA dopado con diferentes concentraciones de AMPSA

Luego de ensayar diferentes solventes y condiciones acuosas a diferentes valores de pH, se determinó que el PTCA era soluble en condiciones alcalinas con $\text{pH} \geq 9.5$. Esta característica de solubilidad se vuelve muy importante al compararla con la forma conductora de la PANI. Como ya se ha mencionado, la forma conductora de la PANI no es soluble en los solventes comúnmente utilizados y por lo tanto, su procesamiento se vuelve complejo. Con el fin de obtener películas delgadas del material sin sales depositadas en las mismas, se empleó una solución de NH_4OH . Cabe mencionar que mientras mayor sea el pH de la solución mayor es la solubilidad del PTCA, razón por la cual las primeras películas elaboradas partieron de una solución del PTCA en NH_4OH 0.01 M. Al momento de decidir que éste polímero se emplearía para estudiar un intervalo más amplio de concentraciones de dopante, se decidió explorar la concentración de la solución de NH_4OH que permitiera solubilizar al PTCA y mejorar el contacto con el dopante AMPSA. Esto pensando en que podría existir un compromiso entre la solubilidad del polímero en condiciones alcalinas y la naturaleza ácida del dopante. Se determinó que para mantener soluble al polímero se requería una solución 0.005 M de NH_4OH . De esta manera, en la segunda etapa se utilizó la solución a 0.005 M de NH_4OH para disolver el polímero y mezclarlo luego con el AMPSA disuelto en Agua MilliQ. Las películas resultantes eran visiblemente más espesas y tenían una consistencia más suave que no permitió el uso de la técnica de medición de espesor de película que se venía utilizando. Por esta razón fue necesario encontrar una técnica alternativa para determinar estos valores. La solución a este problema fue el empleo de análisis de imágenes. Se adquirieron imágenes de los perfiles de las películas en la zona activa para la determinación de las propiedades eléctricas, es decir, la zona comprendida entre el par de electrodos de plata. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Espesores de película determinados por análisis de imágenes.

Relación molar PTCA:AMPSA	Espesor de película (<i>d</i>), m	Coefficiente de variación (%)
1:0 – a*	1.72 x 10 ⁻⁶	13.8
1:0 – b	1.41 x 10 ⁻⁶	9.3
1:0 – c	1.40 x 10 ⁻⁶	8.7
1:0.125 – a	2.98 x 10 ⁻⁶	11.0
1:0.125 – b	1.78 x 10 ⁻⁶	11.9
1:0.125 – c	5.27 x 10 ⁻⁶	19.3
1:0.25 – a	2.66 x 10 ⁻⁶	4.4
1:0.25 – b	2.15 x 10 ⁻⁶	6.7
1:0.25 – c	2.20 x 10 ⁻⁶	6.6
1:0.5 – a	23.01 x 10 ⁻⁶	2.4
1:0.5 – b	26.73 x 10 ⁻⁶	4.1
1:0.5 – c	20.68 x 10 ⁻⁶	2.8
1:1 – a	28.47 x 10 ⁻⁶	4.0
1:1 – b	27.55 x 10 ⁻⁶	4.8
1:1 – c	39.63 x 10 ⁻⁶	2.7
1:2 – a	18.50 x 10 ⁻⁶	3.9
1:2 – b	45.36 x 10 ⁻⁶	5.4
1:2 – c	12.44 x 10 ⁻⁶	12.4

* Las etiquetas a, b y c representan tres diferentes películas elaboradas para cada relación de concentraciones polímero:dopante.

El espesor de las películas aumentó conforme aumentó la concentración de AMPSA y hubo un incremento de un orden de magnitud en los espesores comparados con los que se obtenían con una solución de NH₄OH 0.01 M (comparar Tablas 5 y 6). El AMPSA es un compuesto higroscópico, de tal manera que el aumento en el espesor de las películas podría deberse a un mayor contenido de agua en las mismas. La técnica de análisis de imágenes permitió la determinación de espesores de película con coeficientes de variación entre 2.7 y 19.3 %. Los coeficientes de variación más altos se observaron en el caso de películas con espesores menores a 12.44 x 10⁻⁶ m. Por arriba de ese valor, la precisión de la técnica aumentó considerablemente. Para películas de PTCA:AMPSA con relaciones molares de 1:0, 1:0.125 y 1:0.025 se puede utilizar el perfilómetro debido a que sus espesores de película correlacionan con una mayor firmeza superficial.

La adición de diferentes concentraciones de AMPSA para el dopado de PTCA disuelto en una solución de NH_4OH 0.005 M resultó en el aumento de un orden de magnitud en la conductividad del complejo PTCA-AMPSA (ver Figura 25) comparado con los valores obtenidos anteriormente (ver Tabla 5 y Figura 24). Este aumento en la conductividad podría ser explicado por la mayor presencia de agua en las películas y a la vez, sugiere que el efecto de conducción podría deberse a una mezcla de efectos iónicos y electrónicos. Para determinar el impacto que ambos efectos pueden tener en las propiedades conductoras del PTCA sería importante evaluar el efecto que tiene la pérdida de agua en la película sobre la conductividad.

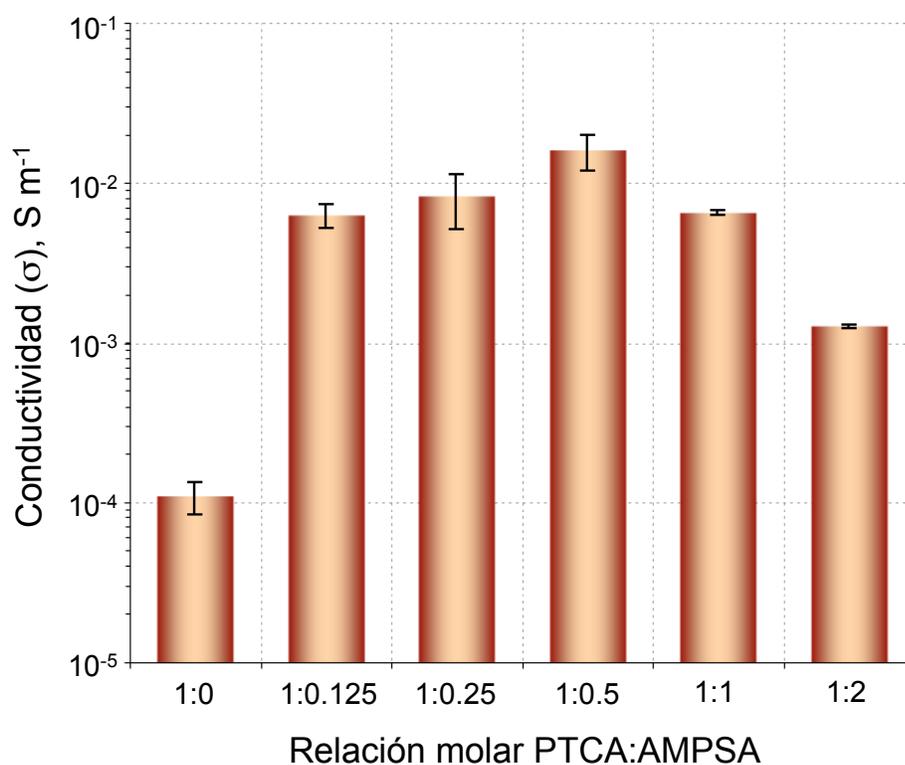


Figura 25. Conductividad de PTCA dopado y sin dopar con AMPSA a diferentes concentraciones.

Los valores presentados corresponden al promedio de tres réplicas.

Como se muestra en la Figura 25 la variación en la concentración de AMPSA utilizada para dopar el PTCA resulta en que la relación molar 1:0.5 es la que presenta mayor conductividad ($1.6 \times 10^{-2} \text{ S m}^{-1}$). El aumentar la concentración de AMPSA más allá de dicha relación no incrementa la conductividad, más bien tiene un efecto nocivo sobre la

misma. Esto podría deberse a que la presencia de una mayor cantidad de moléculas de AMPSA en el complejo PTCA-AMPSA impida la interacción entre las moléculas de PTCA, dificultando a su vez la transferencia de electrones a través de las mismas y por lo tanto provocando una disminución en el valor de conductividad. Por otro lado, el aumento en la concentración de AMPSA también afecta el pH de la disolución PTCA-AMPSA empleada para la elaboración de la película, lo que a su vez podría afectar la solubilidad del PTCA. Esto podría impedir el contacto entre las moléculas del polímero y el dopante, interfiriendo de esta manera en la eficiencia del proceso de dopaje. Independientemente de las razones que expliquen este fenómeno, la optimización de la conductividad de las películas de PTCA:AMPSA está limitada debido a la naturaleza ácida del dopante y la solubilidad en medio alcalino del PTCA. Sin embargo, la conductividad del complejo PTCA-AMPSA con relación molar 1:0.5 es similar a los valores de conductividad de otros polímeros obtenidos mediante la copolimerización de anilina y difenilamino-4-sulfonato de sodio [Nguyen *et al.*, 1994], la polimerización del ácido *o*-aminobencenosulfónico [Chan *et al.*, 1995], la modificación de PANI con 1,3-propanosulfona [Chen y Hwang, 1995] o la polimerización enzimática del 2,5-diamino-bencenosulfonato [Alva *et al.*, 1997] cuyos valores se encuentran entre 10^{-3} y 1 S m^{-1} . Este valor es comparable también con la conductividad de 10^{-2} S m^{-1} del composito de PANI-Polimetilmetacrilato [Nicho *et al.*, 2001] y la conductividad de 10 S m^{-1} del complejo PANI-SPS sintetizado por la HRP [Samuelson *et al.*, 1998]. Esto demuestra que la conductividad del complejo PTCA-AMPSA no está muy alejado de los valores obtenidos con otras polianilinas modificadas. Estos valores se pueden apreciar mejor en la escala de conductividad mostrada en la Figura 26 en la que se incluye también el valor de conductividad del complejo PANI-SPS obtenido mediante el empleo la CPO.

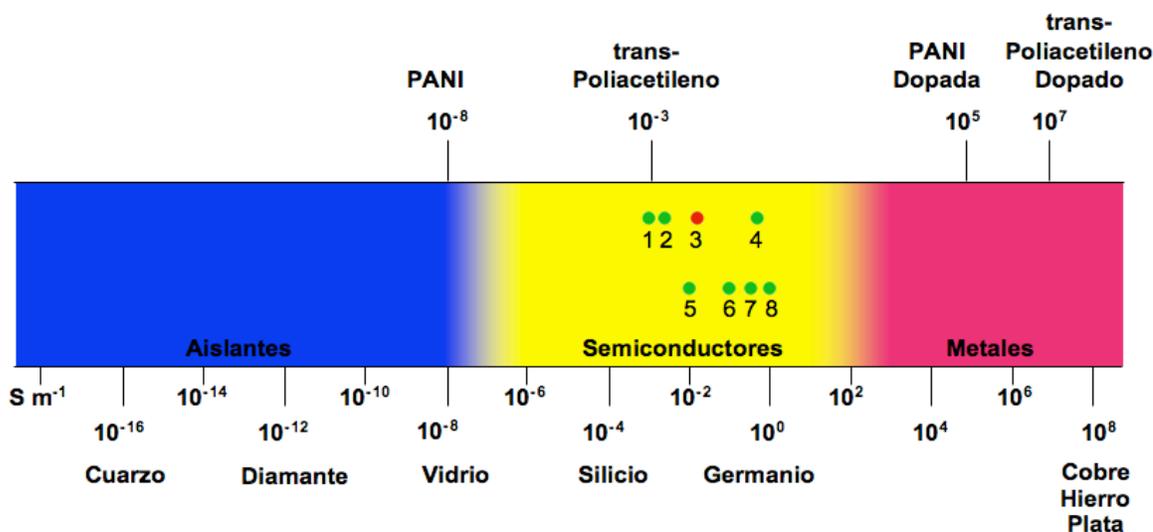


Figura 26. Comparación del valor de conductividad del complejo PTCA-AMPSA con valores de polianilinas modificadas.

1. Poli(2,5-diaminobencensulfonato) sintetizado enzimáticamente [Alva *et al.*, 1997]; 2. PANI-SPS sintetizada con CPO; 3. PTCA-AMPSA 1:0.5; 4. PANI-SPS sintetizada con HRP [Samuelson *et al.*, 1998]; 5. Composito PANI-Polimetilmetacrilato [Nicho *et al.*, 2001]; 6. Poli(ácido *o*-aminobencenfósónico) [Chan *et al.*, 1995]; 7. Copolímero de anilina y difenilamina-4-sulfonato de sodio [Nguyen *et al.*, 1995]; 8. PANI modificada con 1,3-propanosulfona [Chen y Hwang, 1995].

Nota: en la primera línea de valores se encuentra aquellos que provienen de procesos enzimáticos. En la segunda línea se muestran valores obtenidos mediante procesos químicos.

Se requieren estudios más profundos que permitan elucidar los mecanismos de conducción presentes en el complejo PTCA-AMPSA en forma de películas delgadas. Por otro lado, la caracterización morfológica y estructural del polímero permitiría proponer aplicaciones específicas para el mismo. La película PTCA-AMPSA con una relación molar 1:0.5 tiene propiedades semiconductoras y su apariencia es casi transparente. Un polímero con estas características podría ser empleado en recubrimientos para protección antiestática y contra la corrosión, en recubrimientos de equipos que requieran disipación rápida de calor o de electricidad, en pantallas planas y otros dispositivos en los que se requiere de una capa semiconductoras e incolora o transparente.

6. CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones generales

La CPO es la única peroxidasa de las cuatro peroxidases evaluadas con la capacidad para transformar la TCA y la PCA. La transformación se realiza en presencia de cloruro, mostrando que la actividad halogenasa de la CPO le confiere una ventaja adicional respecto al resto de las peroxidases.

La CPO cataliza la transformación de las anilinas halogenadas DMA, DCA y TCA y no elimina los grupos en posiciones *orto* y *meta* que forzan a que el acoplamiento de los radicales obtenidos ocurra en posición *para*, promoviendo de esta manera la formación de un polímero lineal.

La CPO sintetiza PANI en presencia de SPS al igual que la HRP. Este comportamiento coincide con el de otras oxidorreductasas como la lacasa, peroxidasa de palma, bilirrubina oxidasa entre otras.

Los polímeros sintetizados tienen características semiconductoras. Algunos de ellos presentan valores cercanos a la zona de transición entre aislantes y semiconductores, después del proceso de dopaje, estos cruzan la barrera hacia compuestos semiconductores.

Del conjunto de tres polímeros sintetizados y tres dopantes empleados, el PTCA dopado con AMPSA fue el que presentó los valores más altos de conductividad. El complejo PTCA-AMPSA con una relación molar de 1:0.5, mostró un valor de conductividad igual a $1.6 \times 10^{-2} \text{ S m}^{-1}$. Este valor corresponde a un buen semiconductor. Al aumentar la concentración de AMPSA más allá de una relación molar de 1:0.5, el valor de conductividad disminuye.

El aumento en la conductividad de PTCA al disminuir la alcalinidad de la solución empleada para disolverlo y por lo tanto, la presencia de una mayor cantidad de agua en las películas, indica la presencia de efectos iónicos en el mecanismo de conducción.

Recomendaciones

La conductividad alcanzada por el complejo PTCA-AMPSA está en la zona de buenos semiconductores, de manera que es importante realizar una caracterización profunda con el fin de proponer aplicaciones específicas para el mismo. Estudios de difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido, análisis termogravimétricos y de estabilidad química del complejo a diferentes valores de pH serían útiles en la caracterización morfológica y de estabilidad química y térmica del complejo PTCA-AMPSA. Los análisis termogravimétricos podrían correlacionarse con mediciones de conductividad para determinar el efecto que tiene la presencia de agua en las películas. Estudios de resonancia magnética nuclear permitirían conocer la estructura y nivel de dopado del complejo.

También sería interesante el estudio de otros ácidos protónicos que han sido empleados como agentes dopantes para la PANI, con la finalidad de encontrar alguno que mejore aún más las propiedades conductoras del PTCA. Entre estos se encuentran el ácido benzoico, el ácido *p*-tolunesulfónico, ácidos aril-diésterfosfóricos, el ácido cardanol-azo-sulfónico, entre otros.

REFERENCIAS

- Aizawa, M., Wang, L., Shinohara, H., Ikariyama, Y., 1990. Enzymatic synthesis of polyaniline film using a copper-containing oxidoreductase: Bilirubin oxidase. *J. Biotechnol.* 14, 301-309.
- Aldissi, M., 1989. Inherently conducting polymers. Processing, fabrication, applications, limitations. Noyes Data Corporation.
- Alva, K. S., Kumar, J., Marx, K. A., Tripathy, S. K., 1997. Enzymatic synthesis and characterization of a novel water-soluble polyaniline: poly(2,5-diaminobenzenesulfonate). *Macromolecules.* 30, 4024-4029.
- Argese, E., Bettiol, C., Agnoli, F., Zambon, A., Mazzola, M., Ghirardini, A. V., 2001. Assessment of chloroaniline toxicity by the submitochondrial particle assay. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 826-832.
- Beyer, G., Steckenbiegler, B., 1993. Improved conductivity of polyaniline by counter-ion-induced processability. *Synth. Met.* 60, 169-170.
- Cao, Y., Smith, P., Heeger, A. J., 1992. Counter-ion induced processability of conducting polyaniline and of conducting polyblends of polyaniline in bulk polymers. *Synth. Met.* 48, 91-97.
- Chan, H. S. O., Ho, P. K. H., Ng, S. C., Tan, B. T. G., Tan, K. L., 1995. A new water-soluble, self-doping conducting polyaniline from poly(o-aminobenzylphosphonic acid) and its sodium salts: synthesis and characterization. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 8517-8523.
- Chattopadhyay, K., Mazumdar, S., 2000. Structural and conformational stability of horseradish peroxidase: effect of temperature and pH. *Biochemistry.* 39, 263-270.
- Chen, S-A., Hwang, G-W., 1994. Synthesis of water-soluble self-acid-doped polyaniline. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 7939-7940.
- Chen, S-A., Hwang, G-W., 1995. Water-soluble self-acid-doped conducting polyaniline: structure and properties. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 10055-10062.
- Chen, S-A., Hwang, G-W., 1996. Structure characterization of self-acid-doped sulfonic acid ring-substituted polyaniline in its aqueous solutions and as solid film. *Macromolecules.* 29, 3950-3955.
- Chiang, C. K., Fincher, C. R., Park, Y. W., Heeger, A. J., Shirakawa, H., Louis, E. J., Gau, S. C., MacDiarmid, A. G., 1977. Electrical conductivity in doped polyacetylene. *Phys. Rev. Lett.* 39, 1098-1100.
- Chiang, C. K., Druy, M. A., Gau, S. C., Heeger, A. J., Louis, E. J., MacDiarmid, A. G., Park, Y. W., Shirakawa, H., 1978. Synthesis of highly conducting films of derivatives of polyacetylene, (CH)_x. *J. Am. Chem. Soc.* 100, 1013-1015.
- Chiang, J-C., MacDiarmid, A. G., 1986. "Polyaniline": Protonic acid doping of the emeraldine form to the metallic regime. *Synth. Met.* 13, 193-205.
- Choi, Y.-J., Chae, H. J., Kim, E. Y., 1999. Steady-state oxidation model by horseradish peroxidase for the estimation of the non-inactivation zone in the enzymatic removal of pentachlorophenol. *J. Biosci. Bioeng.* 88, 368-373.
- Chung, N., Aust, S.D., 1995. Veratryl alcohol-mediated indirect oxidation of pentachlorophenol by lignin peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 322, 143-148.
- Clary, T., Ritz, B., 2003. Pancreatic cancer mortality and organochlorine pesticide exposure in California, 1989-1996. *Am. J. Ind. Med.* 43, 306-313.
- Corbett, M. D., Chipko, B. R., Baden, D. G., 1978. Chloroperoxidase-catalysed oxidation of 4-chloroaniline to 4-chloronitrosobenzene. *Biochem. J.* 175, 353-360.

- Corbett, M. D., Chipko, B. R., 1979. Chloroperoxidase-catalyzed oxidation of N-methyl-4-chloroaniline. *Experientia*. 35, 1150-1151.
- Corbett, M. D., Chipko, Batchelor, A. O., 1980. The action of chloride peroxidase on 4-chloroaniline. N-oxidation and ring halogenation. *Biochem. J.* 187, 893-903.
- Czaplicka, M., 2004. Sources and transformations of chlorophenols in the natural environment. *Sci. Total Environ.* 322, 21-39.
- Dai, J., Wright, M. W., Manderville, R. A., 2003. An oxygen-bonded c8-deoxyguanosine nucleoside adduct of pentachlorophenol by peroxidase activation: evidence for ambident c8 reactivity by phenoxy radicals. *Chem. Res. Toxicol.* 16, 817-821.
- Dai, J., Sloat, A. L., Wright, M. W., Manderville, R. A., 2005. Role of phenoxy radicals in DNA adduction by chlorophenol xenobiotics following peroxidase activation. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 771-779.
- Davila-Vazquez, G., Tinoco, R., Pickard, M. A., Vazquez-Duhalt, R., 2005. Transformation of halogenated pesticides by versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *Enzyme Microb. Tech.* 36, 223-231.
- de Wolf, W., Opperhuizen, A., Seinen, W., Hermens, J. L. M., 1991. Influence of survival time on the lethal body burden of 2,3,4,5-tetrachloroaniline in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Sci. Total Environ.* 109-110, 457-459.
- Dunford, H. B., 1999. Heme Peroxidases. John Wiley, New York.
- Fushiwaki, Y., Tase, N., Saeki, A., Urano, K., 1990. Pollution by the fungicide pentachloronitrobenzene in an intensive farming area in Japan. *Sci. Total Environ.* 92, 55-67.
- Geniès, E. M., Boyle, A., Lapkowski, M., Tsintavis, C., 1990. Polyaniline: a historical survey. *Synth. Met.* 36, 139-182.
- Hadasch, A., Meunier, B., 1999. Oxidation of dichloroanilines and related anilides catalyzed by Iron(III) tetrasulfonatophthalocyanine. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2319-2325.
- Hager, L. P., Morris, D. R., Brow, F. S., Eberwein, H., 1966. Chloroperoxidase. II. Utilization of halogen anions. *J. Biol. Chem.* 241, 1769-1777.
- Hammel, K. E., Tardone, P. J., 1988. The oxidative 4-dechlorination of polychlorinated phenols is catalyzed by extracellular fungal lignin peroxidases. *Biochemistry.* 27, 6563-6568.
- Han, C. C., Elsenbaumer, R. L., 1989. Protonic acids: Generally applicable dopants for conducting polymers. *Synth. Met.* 30, 123-131.
- Heeger, A. J., 2001. Semiconducting and metallic polymers: the fourth generation of polymeric materials (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 2591-2611.
- Ichinohe, D., Muranaka, T., Sasaki, T., Kobayashi, M., Kise, H., 1998. Oxidative polymerization of phenylenediamines catalyzed by horseradish peroxidase. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* 36, 2593-2600.
- Jakowski, J. D., Kaplan, G. M., 2001. Methods of production of polyaniline. *Int. App. PCT*, WO01/49733A1.
- Kanatidis, M. G., 1990. Conductive polymers. *Chem. Eng. News.* 68, 36-50+54.
- Karamyshev, A. V., Shleev, S. V., Koroleva, O. V., Yaropolov, A. I., Sakharov, I. Y., 2003. Laccase-catalyzed synthesis of conducting polyaniline. *Enzyme Microb. Tech.* 33, 556-564.
- Kazunga, C., Aitken, M. D., Gold, A., 1999. Primary product of the horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of pentachlorophenol. *Environ. Sci. Technol.* 33, 1408-1412.
- Kobayashi, S., Kaneko, I., Uyama, H., 1992. Enzymatic oxidation polymerization of o-phenylenediamine. *Chem. Lett.* 393-394.

- Letheby, H., 1862. On the production of a blue substance by the electrolysis of sulphate of aniline. *J. Chem. Soc.* 15, 161-163.
- Liu, W., Anagnostopoulos, A., Bruno, F. F., Senecal, K., Kumar, J., Tripathy, S., Samuelson, L., 1999a. Biologically derived water soluble conducting polyaniline. *Synth. Met.* 101, 738-741.
- Liu, W., Kumar, J., Tripathy, S., Senecal, K.J., Samuelson, L., 1999b. Enzymatically synthesized conducting polyaniline. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 71-78.
- Liu, W., Kumar, J., Tripathy, S., Samuelson, L. A., 2002. Enzymatic synthesis of conducting polyaniline in micelle solutions. *Langmuir.* 18, 9696-9704.
- Longoria, A., Tinoco, R., Vázquez-Duhalt, R., 2008. Chloroperoxidase-mediated transformation of highly halogenated monoaromatic compounds. *Chemosphere.* 72, 485-490.
- MacDiarmid, A. G., Chiang, J. C., Halpern, M., Huang, W. S., Mu, S. L., Nanaxakkara, L. D., Wu, S. W., Yaniger, S. I., 1985. Polyaniline: Interconversion of metallic and insulating forms. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 121, 173-180.
- Macdiarmid, A. G., Chiang, J. C., Richter, A. F., Epstein, A. J., 1987. Polyaniline: a new concept in conducting polymers. *Synth. Met.* 18, 285-290.
- MacDiarmid, A. G., 2001. "Synthetic metals": A novel role for organic polymers (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 2581-2590.
- Mane R. S., Lockhande, C. D., 2000. Chemical deposition method for chalcogenide thin films. *Mater. Chem. Phys.* 65, 1-31.
- Morimoto, K., Tatsumi, K., Kuroda, K.-I., 2000. Peroxidase catalyzed co-polymerization of pentachlorophenol and a potential humic precursor. *Soil. Biol. Biochem.* 32, 1071-1077.
- Morrison, D. R., Hager, L. P., 1966. Chloroperoxidase. I. Isolation and properties of the crystalline glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 241, 1763-1768.
- Nagarajan, R., Tripathy, S., Kumar, J., Bruno, F. F., Samuelson, L., 2000. An enzymatically synthesized conducting molecular complex of polyaniline and poly(vinylphosphonic acid). *Macromolecules.* 33, 9542-9547.
- Nagarajan, R., Roy, S., Kumar, J., Tripathy, S. K., Dolukhanyan, T., Sung, C., Bruno, F., Samuelson, L. A., 2001. Enzymatic synthesis of molecular complexes of polyaniline with DNA and synthetic oligonucleotides: thermal and morphological characterization. *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.*, A38, 1519-1537.
- Nguyen, M. T., Kasai, P., Miller, J. L., Diaz, A. F., 1994. Synthesis and properties of novel water-soluble conducting polyaniline copolymers. *Macromolecules.* 27, 3625-3631.
- Nicho, M. E., Trejo, M., García-Valenzuela, A., Saniger, J. M., Palacios, J., Hu, H., 2001. Polyaniline composite coatings interrogated by a nulling optical-transmittance bridge for sensing low concentrations of ammonia gas. *Sensor Actuat. B.* 76, 18-24.
- Palaniappan, S., John, A., 2008. Polyaniline materials by emulsion polymerization pathway. *Prog. Polym. Sci.* 33, 732-758.
- Park, J.-W., Dec, J., Kim, J.-E., Bollag, J.-M., 2000. Transformation of chlorinated phenols and anilines in the presence of humic acid. *J. Environ. Qual.* 29, 214-220.
- Pickard, M. A., Hashimoto, A., 1982. Isoenzymes of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. *Can. J. Microbiol.* 28, 1382-1388.
- Pieper, D. H., Winkler, R., Sandermann, H., 1992. Formation of a toxic dimerization product of 3,4-dichloroaniline by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 31, 68-70.

- Pina, D. G., Shnyrova, A. V., Gavilanes, F., Rodríguez, A., Leal, F., Roig, M. G., Sakharov, I. Y., Zhadan, G. G., Villar, E., Shnyrov, V. L., 2001. Thermally induced conformational changes in horseradish peroxidase. *Eur. J. Biochem.* 268, 120-126.
- Pogni, R., Baratto, M.C., Giansanti, S., Teutloff, C., Verdin, J., Valderrama, B., Lenzian, F., Lubitz, W., Vazquez-Duhalt, R., Basosi, R., 2005. Tryptophan-based radical in the catalytic mechanism of versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *Biochemistry.* 44, 4267-4274.
- Proudfoot, A.T., 2003. Pentachlorophenol poisoning. *Toxicol. Rev.* 22, 3-11.
- Reddy, G. V. B., Gold, M. H., 2000. Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved. *Microbiology.* 146, 405-413.
- Renner, G., 1980. Metabolic studies on pentachloronitrobenzene (PCNB) in rats. *Xenobiotica.* 10, 537-550.
- Roy, S., Fortier, J. M., Nagarajan, R., Tripathy, S., Kumar, J., Samuelson, L. A., Bruno, F. F., 2002. Biomimetic synthesis of a water soluble conducting molecular complex of polyaniline and lignosulfonate. *Biomacromolecules.* 3, 937-941.
- Rüttimann-Johnson, C., Lamar, R.T., 1996. Polymerization of pentachlorophenol and ferulic acid by fungal extracellular lignin-degrading enzymes. *Appl. Environ. Microb.* 62, 3890-3893.
- Ryu, K., McEldoon, J. P., Pokora, A. R., Cyrus, W., Dordick, J. S., 1993. Numerical and Monte Carlo stimulations of phenolic polymerizations catalyzed by peroxidase. *Biotechnol. Bioeng.* 42, 807-814.
- Sakharov, I. Y., Sakharova, I. V., 2002. Extremely high stability of African oil palm tree peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1598, 108-114.
- Sakharov, I. Y., Ouporov, I. V., Vorobiev, A. K., Roig, M. G., Pletjushkina, O. Y., 2004. Modeling and characterization of polyelectrolyte complex of polyaniline and sulfonated polystyrene produced by palm tree peroxidase. *Synth. Met.* 142, 127-135.
- Samokyszyn, V. M., Freeman, J. P., Maddipati, K. R., Lloyd, R. V., 1995. Peroxidase-catalyzed oxidation of pentachlorophenol. *Chem. Res. Toxicol.* 8, 349-355.
- Samuelson, L. A., Anagnostopoulos, A., Alva, K. S., Kumar, J., Tripathy, S. K., 1998. Biologically derived conducting and water soluble polyaniline. *Macromolecules.* 31, 4376-4378.
- Samuelson, L., Liu, W., Nagarajan, R., Kumar, J., Bruno, F. F., Cholli, A., Tripathy, S., 2001. Nanoreactors for the enzymatic synthesis of conducting polyaniline. *Synth. Met.* 119, 271-272.
- Shan, J., Cao, S., 2000. Enzymatic polymerization of aniline and phenol derivatives catalyzed by horseradish peroxidase in dioxane. *Polym. Adv. Technol.* 11, 288-293.
- Shan, J., Han, L., Bai, F., Cao, S., 2003. Enzymatic polymerization of aniline and phenol derivatives catalyzed by horseradish peroxidase in dioxane(II). *Polym. Adv. Technol.* 14, 330-336.
- Shirakawa, H., Louis, E. J., MacDiarmid, A. G., Chiang, C. K., Heeger, A. J., 1977. Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH)_x. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 16, 578-580.
- Silberberg, M. S., 2002. *Chemistry, the molecular nature of matter and change.* McGraw Hill. Boston.
- Simmons, K. E., Minard, R. D., Bollag, J.-M., 1987. Oligomerization of 4-chloroaniline by oxidoreductases. *Environ. Sci. Technol.* 21, 999-1003.
- Sixt, S., Altschuh, J., Brüggemann, R., 1995. Quantitative structure-toxicity relationships for 80 chlorinated compounds using quantum chemical descriptors. *Chemosphere.* 30, 2397-2414.
- Solomon, E. I., Sundaram, U. M., Machonkin, T. E., 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 96, 2563-2605.

- Tas, D. O., Pavlostathis, S. G., 2005. Microbial reductive transformation of pentachloronitrobenzene under methanogenic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 39, 8264-8272.
- Thomas, J. A., Morris, D. R., Hager, L. P., 1970. Chloroperoxidase VII: classical peroxidatic, catalytic, and halogenating forms of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 245, 3129-3134.
- Trivedi, D. C., 1997. Chapter 12. Polyanilines. In: Nalga, H. S. (Ed.). *Handbook of organic conductive molecules and polymers: Vol. 2. Conductive Polymers: Synthesis and electrical properties.* John Wiley, New York.
- Vazquez-Duhalt, R., 1998. Hemoproteins as biocatalyst for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Galindo, E., Ramírez, O. T. (Eds.). *Advances in Bioprocess Engineering II.* Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 183-207.
- Wang, P., Woodward, C. A., Kaufman, E. N., 1999. Poly(ethylene glycol)-modified ligninase enhances pentachlorophenol biodegradation in water-solvent mixtures. *Biotechnol. Bioeng.* 64, 290-297.
- Wannstedt, C., Rotella, D., Siuda, J. F., 1990. Chloroperoxidase mediated halogenation of phenols. *B. Environ. Contam. Tox.* 44, 282-287.
- Wei, X.-L.; Wang, Y. Z.; Long, S. M.; Bobeczko, C.; Epstein, A. J., 1996. Synthesis and physical properties of highly sulfonated polyaniline. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 2545-2555.
- Wudl, F., Angus, R. O., Lu, F. L., Allemand, P. M., Vachon, D. J., Nowak, M., Liu, Z. X., Heeger, A. J., 1987. Poly(p-phenyleneamineimine): Synthesis and comparison to polyaniline. *J. Am. Chem. Soc.* 109, 3677-3684.
- Xu, F., 1996. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry.* 35, 7608-7614.
- Xu, P., Singh, A., Kaplan, D. L., 2006. Enzymatic catalysis in the synthesis of polyanilines and derivatives of polyanilines. *Adv. Polym. Sci.* 194, 69-94.
- Yano, J., Terayama, K., Yamasaki, S., Aoki, K., 1998. Logarithmic time dependence of the oxidative coloration of polyaniline film. *Electrochim. Acta.* 44, 337-343.

APÉNDICES

Apéndice I. Artículo: Chloroperoxidase-mediated transformation of highly halogenated monoaromatic compounds

Chemosphere 72 (2008) 485–490



Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere



Chloroperoxidase-mediated transformation of highly halogenated monoaromatic compounds

Adriana Longoria, Raunel Tinoco, Rafael Vázquez-Duhalt *

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

Chloroperoxidase-mediated transformation of highly halogenated monoaromatic compounds

Adriana Longoria, Raunel Tinoco, Rafael Vázquez-Duhalt*

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 October 2007

Received in revised form 2 March 2008

Accepted 3 March 2008

Available online 24 April 2008

Keywords:

Chloroperoxidase
Halogenated compounds
Pentachlorophenol
Tetrachloroaniline
Tetrachlorophenol
Tetrachloroaniline

ABSTRACT

Peroxidase transformations of widely distributed pollutants, tetra- and penta-chlorinated phenols and anilines, were studied using different peroxidases. Chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* was able to transform tetra- and penta-chlorinated phenols and anilines, while horseradish peroxidase, lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* and versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta* were able only to transform the halogenated phenols. Chloroperoxidase showed a specific activity on pentachlorophenol two orders of magnitude higher than lignin peroxidase and horseradish peroxidase, and one order of magnitude higher than versatile peroxidase. The main product from peroxidase oxidation in all cases was a polymeric and insoluble material. The insolubilization of halogenated phenols and anilines permits their removal, reduces their bioavailability, and thus reduces their environmental impact. The other minor products from the enzymatic transformation of highly chlorinated compounds were determined by mass spectrometry. Tetrachloroquinone, dimers and trimers of halogenated compounds were also identified. Chloroperoxidase was able to halogenate tetrachloroaniline to form pentachloroaniline.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Highly halogenated monoaromatic compounds, including tetra- and penta-halogenated phenols and anilines, are currently used for a wide range of domestic, agricultural and industrial purposes. Chlorophenols are among the most widely distributed pollutants. Their toxicity increases as the degree of chlorine substitution increases (Zhao et al., 1995). Pentachlorophenol (PCP) and the lower chlorinated phenol, tetrachlorophenol (TCP), are intensively used as fungicides, herbicides, insecticides, and precursors in the synthesis of other pesticides. The ban on PCP production in USA since 1992 and in Europe since 2000, and the current production in countries such as China and Mexico, makes it difficult to find data about total world production of chlorophenols. However, the world production of these compounds was estimated to be over 200 000 tons per year in 1980 (Ahlborg et al., 1980). Specifically, the PCP worldwide production has been estimated between 25 000 and 90 000 tons per year (Ullmanns Encyklopadie der technischen Chemie, 1983), and no data is available thereafter. PCP is the major synthetic wood preservative currently used and it is used in a variety of applications for its biocidal properties, as an additive for shoe leather, drilling mud, paper products, and certain food packaging. Despite its uses PCP has been banned in many countries and its use has been severely restricted in others, however it is still

widely used and remains an important pollutant from a toxicological perspective. The toxicology and environmental impact of PCP has been reviewed (Ahlborg et al., 1980; Jensen, 1996; Proudfoot, 2003). PCP is a stable and persistent compound, that can be adsorbed by ingestion, inhalation and, to a lesser extent, by the skin. It is metabolized and eliminated slowly. Severe exposure results in acute effects mediated by uncoupling oxidative phosphorylation. Occasionally, fatal illness occurs with tachycardia, tachypnoea, hyperthermia, sweating, and convulsions (Proudfoot, 2003). PCP has been classified as a weak mutagen; however, it is able to form a DNA adduct (Dai et al., 2003, 2005), and thus should be considered as a potential carcinogen.

Chloroanilines are used as intermediates in the synthesis of dyestuffs, agricultural chemicals, pharmaceuticals, and others, and they can be released into the environment through industrial activity. They can also occur in the environment as biodegradation products of aniline-based pesticides. Pentachloroaniline (PCA) is a major metabolite of the widely used fungicide quintozone (pentachloronitrobenzene, PCNB) (Renner, 1980; Fushiwaki et al., 1990). This pesticide is converted to PCA in moist soil, estuarine sediments (Tas and Pavlostathis, 2005), and by animal metabolism (Renner, 1980; Larsen et al., 1998). Clary and Ritz (2003) found increased pancreatic cancer mortality among long-term residents in areas with high application rates of PCNB. Highly chlorinated anilines can be lethal for many organisms (De Wolf et al., 1991). In general, chloroaniline toxicity increases with the number of chlorine atoms, although this trend is less marked for highly

* Corresponding author. Tel.: +52 555 6227619; fax: +52 777 3172388.
E-mail address: vazquduh@ibt.unam.mx (R. Vázquez-Duhalt).



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

Chloroperoxidase-mediated transformation of highly halogenated monoaromatic compounds

Adriana Longoria, Raunel Tinoco, Rafael Vázquez-Duhalt *

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 October 2007
 Received in revised form 2 March 2008
 Accepted 3 March 2008
 Available online 24 April 2008

Keywords:

Chloroperoxidase
 Halogenated compounds
 Pentachlorophenol
 Pentachloroaniline
 Tetrachlorophenol
 Tetrachloroaniline

ABSTRACT

Peroxidase transformations of widely distributed pollutants, tetra- and penta-chlorinated phenols and anilines, were studied using different peroxidases. Chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* was able to transform tetra- and penta-chlorinated phenols and anilines, while horseradish peroxidase, lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* and versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta* were able only to transform the halogenated phenols. Chloroperoxidase showed a specific activity on pentachlorophenol two orders of magnitude higher than lignin peroxidase and horseradish peroxidase, and one order of magnitude higher than versatile peroxidase. The main product from peroxidase oxidation in all cases was a polymeric and insoluble material. The insolubilization of halogenated phenols and anilines permits their removal, reduces their bioavailability, and thus reduces their environmental impact. The other minor products from the enzymatic transformation of highly chlorinated compounds were determined by mass spectrometry. Tetrachloroquinone, dimers and trimers of halogenated compounds were also identified. Chloroperoxidase was able to halogenate tetrachloroaniline to form pentachloroaniline.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Highly halogenated monoaromatic compounds, including tetra- and penta-halogenated phenols and anilines, are currently used for a wide range of domestic, agricultural and industrial purposes. Chlorophenols are among the most widely distributed pollutants. Their toxicity increases as the degree of chlorine substitution increases (Zhao et al., 1995). Pentachlorophenol (PCP) and the lower chlorinated phenol, tetrachlorophenol (TCP), are intensively used as fungicides, herbicides, insecticides, and precursors in the synthesis of other pesticides. The ban on PCP production in USA since 1992 and in Europe since 2000, and the current production in countries such as China and Mexico, makes it difficult to find data about total world production of chlorophenols. However, the world production of these compounds was estimated to be over 200000 tons per year in 1980 (Ahlborg et al., 1980). Specifically, the PCP worldwide production has been estimated between 25000 and 90000 tons per year (Ullmanns Encyklopadie der technischen Chemie, 1983), and no data is available thereafter. PCP is the major synthetic wood preservative currently used and it is used in a variety of applications for its biocidal properties, as an additive for shoe leather, drilling mud, paper products, and certain food packaging. Despite its uses PCP has been banned in many countries and its use has been severely restricted in others, however it is still

widely used and remains an important pollutant from a toxicological perspective. The toxicology and environmental impact of PCP has been reviewed (Ahlborg et al., 1980; Jensen, 1996; Proudfoot, 2003). PCP is a stable and persistent compound, that can be adsorbed by ingestion, inhalation and, to a lesser extent, by the skin. It is metabolized and eliminated slowly. Severe exposure results in acute effects mediated by uncoupling oxidative phosphorylation. Occasionally, fatal illness occurs with tachycardia, tachypnoea, hyperthermia, sweating, and convulsions (Proudfoot, 2003). PCP has been classified as a weak mutagen: however, it is able to form a DNA adduct (Dai et al., 2003, 2005), and thus should be considered as a potential carcinogen.

Chloroanilines are used as intermediates in the synthesis of dyestuffs, agricultural chemicals, pharmaceuticals, and others, and they can be released into the environment through industrial activity. They can also occur in the environment as biodegradation products of aniline-based pesticides. Pentachloroaniline (PCA) is a major metabolite of the widely used fungicide quinterozone (pentachloronitrobenzene, PCNB) (Renner, 1980; Fushiwaki et al., 1990). This pesticide is converted to PCA in moist soil, estuarine sediments (Tas and Pavlostathis, 2005), and by animal metabolism (Renner, 1980; Larsen et al., 1998). Clary and Ritz (2003) found increased pancreatic cancer mortality among long-term residents in areas with high application rates of PCNB. Highly chlorinated anilines can be lethal for many organisms (De Wolf et al., 1991). In general, chloroaniline toxicity increases with the number of chlorine atoms, although this trend is less marked for highly

* Corresponding author. Tel.: +52 555 6227619; fax: +52 777 3172388.
 E-mail address: vazqduh@ibt.unam.mx (R. Vázquez-Duhalt).

substituted compounds. Tetrachloroaniline (TCA) shows only slightly increased toxic effects with respect to trichloroanilines, while for pentachloroaniline (PCA), the trend of increasing toxicity is reversed since this compound was found to be less toxic than tetra-substituted anilines (Argese et al., 2001). Its toxicity potential was also estimated with the Microtox test and with other bacterial toxicological assays (Ribo and Kaiser, 1984). Chlorinated anilines are commonly classified as polar narcotic chemicals in most Quantitative structure–activity relationship (QSAR) studies focused on acute toxicity to aquatic organisms (Sixt et al., 1995).

Ligninolytic fungi are able to degrade PCP. *Phanerochaete chrysosporium* (Reddy and Gold, 2000; Shim and Kawamoto, 2002), *Gloeophyllum striatum* (Fahr et al., 1999), *Panus tigrinus* (Leontievsky et al., 2002), and *Trametes versicolor* (Walter et al., 2004) are able to mineralize PCP to CO₂. The proposed fungal PCP metabolism is a multi-step pathway starting with an oxidative dehalogenation mediated by extracellular peroxidases to form tetrachloro-1,4-benzoquinone (TCBQ). TCBQ is further degraded by reductive dehalogenations, and then hydroxylated. *In vitro* ligninolytic peroxidases and other peroxidases are able to transform PCP. Lignin peroxidase from *P. chrysosporium* (Hammel and Tardone, 1988; Chung and Aust, 1995; Rüttimann-Johnson and Lamar, 1996), horseradish peroxidase (Samokyszyn et al., 1995; Choi et al., 1999), myeloperoxidase (Wittsiepe et al., 2000), lactoperoxidase (Oberg and Paul, 1985), and the peroxidase model microperoxidase-8 (Osman et al., 1998) transform PCP to TCBQ by an oxidative dehalogenation in the presence of hydrogen peroxide. However, significant amounts of the highly toxic polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans have been reported after peroxidase-catalyzed oxidation (Wittsiepe et al., 1999).

P. chrysosporium has also been shown to mineralize lignin conjugates of chloroanilines and free chloroanilines (Arjmand and Sanderdmann, 1985), but no products were identified. This ability is important in order to remove these conjugates from the environment. 4-Chloroaniline and 4-chlorophenol have been transformed by oxidoreductases in presence of humic acids and oligomerization of the substrates or their binding to organic matter was found (Park et al., 2000). Mono- and di-chlorinated anilines have been studied but there is no information about highly halogenated anilines.

In this work, the enzymatic transformation of highly chlorinated monoaromatic phenols and amines by chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* is studied. Chloroperoxidase from *C. fumago* is a versatile and unusual heme-peroxidase. *In vitro*, chloroperoxidase shows halogenase-, peroxidase-, catalase- and cytochrome P450-like activities (Colonna et al., 1999), and has been shown to be the most active peroxidase in the transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons (Vazquez-Duhalt, 1998).

2. Materials and methods

2.1. Enzyme and chemicals

Purified chloroperoxidase (CPO) from *C. fumago* was a gift from Prof. Michael A. Pickard (University of Alberta, Canada). Lignin peroxidase from *P. chrysosporium* was purchased from Tienzyme (Salt Lake City, UT), versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta* was obtained and purified as previously described (Pogni et al., 2005), and horseradish peroxidase was obtained from Sigma–Aldrich (Milwaukee, WI). Pentachlorophenol (PCP), 2,3,5,6-tetrachlorophenol (TCP), and 2,3,5,6-tetrachloroaniline (TCA) were purchased from Sigma–Aldrich (Milwaukee, WI). Pentachloroaniline (PCA) was obtained from Alfa-Aesar (Ward Hill, MA). HPLC-grade organic solvents were from Fisher Scientific (Springfield, NJ). All the other chemicals were obtained from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ) as reagent grade.

2.2. Enzymatic transformation of halogenated compounds

The enzymatic oxidation of highly halogenated monoaromatic compounds with CPO was carried out in a 1 ml reaction mixture containing 20% isopropanol in 60 mM acetate buffer (pH 3.0), 20 mM KCl, and with different concentrations of the corresponding halogenated compound. The reaction mixture contained between 31.4 and 314 pmol of CPO and the reaction was started by adding hydrogen peroxide. The transformation rate was determined as substrate depletion monitored by HPLC. The catalytic constants were determined varying the concentrations of halogenated substrate and hydrogen peroxide until catalytic saturation. Values were obtained using the EnzFitter software (Biosoft, Cambridge, UK) following a Michaelis–Menten model.

Activity was also measured with other peroxidases in a buffer containing 20% isopropanol. Lignin peroxidase from *P. chrysosporium* and versatile peroxidase from *B. adusta* were assayed in a 40 mM succinate buffer pH 3.0, while horseradish peroxidase was assayed in a reaction mixture containing 60 mM phosphate buffer pH 6.0. The concentration of halogenated compounds was set at 100 μM except for PCA which was at 20 μM because of its insolubility in 20% isopropanol buffer.

HPLC analysis was performed with a Perkin Elmer system equipped with a 235C diode array detector, using a C₅ column (15 cm × 4.6 mm, 5 μm particle size; Supelco, Inc., Bellefonte, PA). The mobile phase was 40% acetonitrile:60% H₂O containing 0.1% trifluoroacetic acid. TCP was detected at 210 nm, PCP at 215 nm and TCA and PCA at 220 nm.

2.3. Identification of reaction products

To have enough material for chemical analysis, 100 ml CPO-enzymatic reactions were carried out. Successive additions of enzyme and hydrogen peroxide were made until the substrate was exhausted. Reaction mixtures were extracted with dichloromethane and the extract evaporated under vacuum. When polymer was formed, the reaction mixture was centrifuged, the pellet washed with methanol, and the methanolic solution evaporated under vacuum. The volume of samples was reduced under N₂ flow and then redissolved in 50 μl of dichloromethane. The chemical nature of the products was determined by gas chromatography coupled to a mass detector (GC–MS). One microliter was injected on a GC–MS (Agilent 6890N gas chromatograph with 5973 mass selective detector). For insoluble samples, electron impact spectra were obtained using a direct insertion probe (Scientific Instrument Services). Samples were added to the probe as solids.

3. Results and discussion

Four highly halogenated monoaromatic compounds: tetra- and penta-chlorophenol and tetra- and penta-chloroaniline, were assayed for enzymatic transformation with four different peroxidases. The catalytic activity of CPO from *C. fumago*, lignin peroxidase from *P. chrysosporium*, versatile peroxidase from *B. adusta*, and horseradish peroxidase was determined on these halogenated compounds (Table 1). All the peroxidases tested were able to transform the halogenated phenols, however only CPO was able to transform the halogenated anilines. In addition, the specific activity of CPO was one order of magnitude higher than that of versatile peroxidase, and two orders of magnitude higher than those of lignin peroxidase and horseradish peroxidase, confirming that CPO is an interesting enzyme for environmental purposes (Vazquez-Duhalt, 1998).

The kinetic constants for CPO and the four halogenated substrates were determined (Table 2). The k_{cat} values vary from

Table 1
Specific activity of different peroxidases on highly halogenated aromatic substrates

Substrate		Specific activity (mol substrate min ⁻¹ mol ⁻¹ CPO) ^a			
		Chloroperoxidase	Lignin peroxidase	Versatile peroxidase	Horseradish peroxidase
2,3,5,6-Tetrachlorophenol	TCP	3020 ± 170	R ^b	220 ± 7	37 ± 2
Pentachlorophenol	PCP	1200 ± 90	15 ^c	90 ± 5	9 ± 0.3
2,3,5,6-Tetrachloroaniline	TCA	1660 ± 70	NR ^d	NR	NR
Pentachloroaniline	PCA	54 ± 1	NR	NR	NR

^a Values showed are the average of three replicas.^b R = Reaction. This work.^c Activity values obtained from Wang et al. (1999).^d NR = No reaction. Results obtained in this work.**Table 2**
Catalytic constants of CPO for the transformation of highly halogenated monoaromatic compounds

Substrate		<i>k</i> _{cat} (min ⁻¹)	<i>K</i> _M H ₂ O ₂ (μM)	<i>K</i> _M Halogenated substrate (μM)
2,3,5,6-Tetrachlorophenol	TCP	3650	30	6
Pentachlorophenol	PCP	2818	100	120
2,3,5,6-Tetrachloroaniline	TCA	2157	269	38

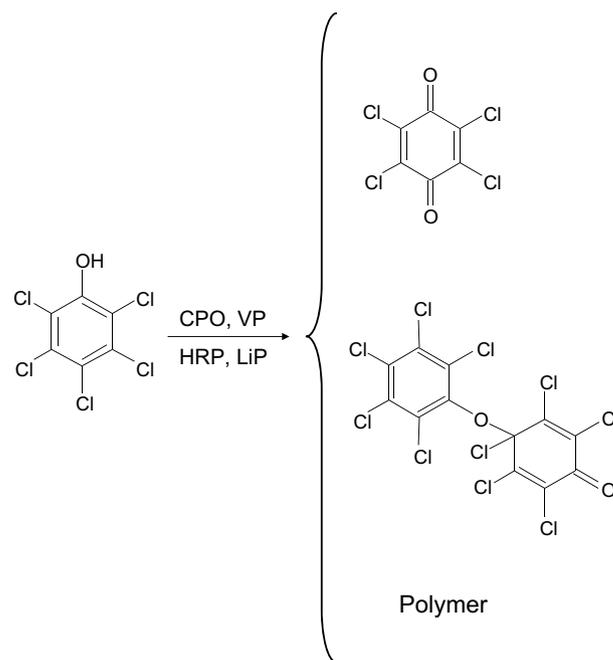
2157 to 3650 min⁻¹, and the higher values were exhibited with the phenols. The apparent affinity constant (*K*_M) showed bigger differences, and the presence of one additional chlorine increased the *K*_M value from 6 μM for TCP to 120 μM for PCP. The presence of the additional chlorine atom from four to five in the aromatic ring significantly increases the hydrophobicity of the compound. TCP has a partition coefficient in octanol–water (*K*_{ow}) of 3.88–4.92 while PCP has a *K*_{ow} value of 5.01–5.86 (Czaplicka, 2004). The increased hydrophobicity means a decrease in water solubility from 183 mg l⁻¹ for TCP to only 14 mg l⁻¹ for PCP (Czaplicka, 2004), this hydrophobicity increase could affect the substrate affinity (*K*_M). Determination of the kinetic constant for PCA was difficult because of inconsistencies in the kinetic behaviour, nevertheless PCA was enzymatically transformed, and no reaction was found when hydrogen peroxide or CPO were added alone.

Polymeric insoluble material is the main product from the peroxidase transformation of the highly halogenated aromatic compounds. This insoluble polymer represents the 87–95% of the total mass of TCA transformation. Enzymatic transformation of the toxic chlorinated phenols to an insoluble polymeric material can be considered a detoxification process. The low bioavailability of polymer and the possibility of removing it from contaminated waters makes the enzymatic reaction interesting from the environmental point of view, and CPO was, by far, the most efficient enzyme for phenol transformation among the peroxidases tested (Table 1).

Table 3
Mass spectral data of the products formed from highly halogenated aromatic compounds by chloroperoxidase

Substrate	Product	Mass spectral ions (<i>m/z</i>)
Tetrachlorophenol	Trimer	692 (98) [M ⁺], 620 (31), 550 (31), 462 (77), 424 (37), 345 (56), 275 (34), 247 (100), 203 (61), 167 (45), 130 (37)
Pentachlorophenol	Tetrachlorobenzoquinone	246 (77) [M ⁺], 209 (53), 190 (36), 153 (17), 118 (20), 87 (100), 71 (8), 59 (14), 47 (11)
Tetracloroaniline	Pentachloroaniline	265 (100) [M ⁺], 230 (12), 203 (12), 194 (18), 158 (19), 132 (7), 123 (11), 115 (5), 96 (13), 79 (5), 61 (11)
	Pentachlorophenol	266 (100) [M ⁺], 230 (24), 202 (21), 165 (47), 130 (24), 107 (24), 95 (47), 87 (26), 60 (33)
	Tetrachlorobenzoquinone	246 (77) [M ⁺], 209 (53), 190 (36), 153 (17), 118 (20), 87 (100), 71 (8), 59 (14), 47 (11)
	TCA–TCA dimer	460 (62) [M ⁺], 424 (11), 388 (100), 354 (24), 317 (16), 281 (10), 245 (18), 209 (45), 194 (25), 158 (11)
	TCA–PCA dimer	494 (41) [M ⁺], 458 (32), 424 (23), 388 (34), 356 (7), 285 (10), 257 (24), 194 (31)
Pentachloroaniline	PCA–PCA dimer	526 (10) [M ⁺], 492 (6), 277 (66), 249 (100), 214 (41), 179 (18), 142 (22)
	Pentachlorophenol	266 (100) [M ⁺], 230 (24), 202 (21), 165 (47), 130 (24), 107 (24), 95 (47), 87 (26), 60 (33)
	Tetrachlorobenzoquinone	246 (77) [M ⁺], 209 (53), 190 (36), 153 (17), 118 (20), 87 (100), 71 (8), 59 (14), 47 (11)

The chemical nature of the minor products was determined by mass spectrometry (Table 3). In addition to the polymer, two other products were detected from CPO transformation of PCP: TCBQ and a dimer (Fig. 1). PCP transformation has been previously reported using horseradish peroxidase (Samokyszyn et al., 1995; Kazunga et al., 1999), lignin peroxidase (Hammel and Tardone, 1988; Rüttimann-Johnson and Lamar, 1996; Reddy and Gold, 2000) and versatile peroxidase (Davila-Vazquez et al., 2005). TCBQ has been also

**Fig. 1.** Products from the peroxidase transformation of pentachlorophenol. CPO, chloroperoxidase; HRP, horseradish peroxidase; LiP, lignin peroxidase; VP, versatile peroxidase.

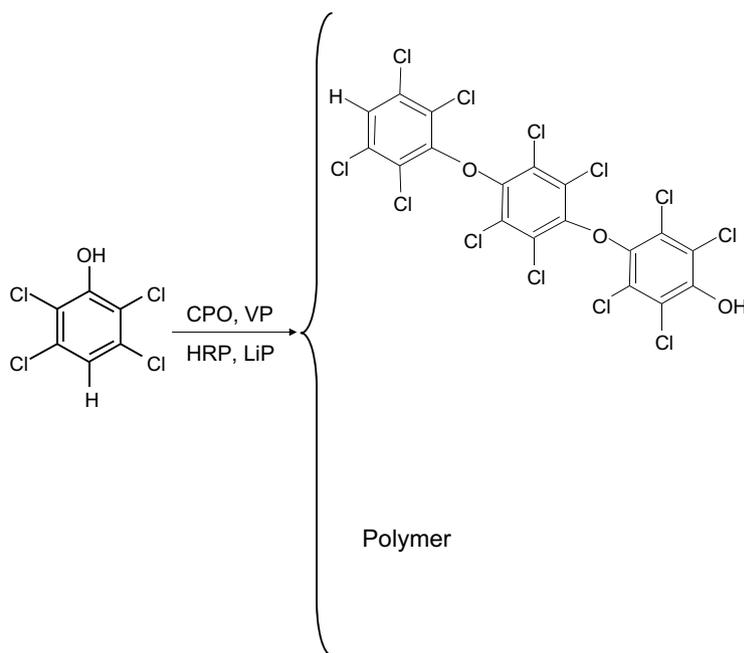


Fig. 2. Products from the peroxidase transformation of 2,3,5,6-tetrachlorophenol. Abbreviations as in Fig. 1.

detected as a product from PCP transformation by horseradish peroxidase and lignin peroxidase, and the suggested mechanism includes the oxygen-based radical formation, followed by a radical delocalization and *p*-chlorine release (Samokyszyn et al., 1995). The TCBQ formed has been suggested as a possible precursor for polymer formation (Rüttimann-Johnson and Lamar, 1996). However, a different mechanism for TCBQ formation has been proposed in which the first step is the dimer formation by phenoxyl radical condensation and then dimer decomposition forming TCBQ (Kazunga et al., 1999). This last mechanism is supported by our results; only 2.5% of PCP is transformed to TCBQ, the dimer reported by Kazunga et al. (1999), and a significant amount of PCP remained after the enzymatic reaction.

TCP is easily transformed by CPO as well as by the other peroxidases. A trimer was identified from peroxidase transformation of TCP (Fig. 2). The trimer is polymerized in the *para* position, suggesting the production of a linear polymer. Di- and trichlorophenols are oligomerized using horseradish peroxidase and laccase from *T. versicolor* (Simmons et al., 1987), while halogenation of low chlorinated phenols has been reported using CPO (Corbett et al., 1980; Wannstedt et al., 1990).

Only CPO was able to transform highly chlorinated anilines (Table 1). Using PCA, PCP and TCBQ were identified as reaction products (Fig. 3) in addition to the polymeric material. This is the first report of PCA transformation by peroxidases. The mechanism of PCP production from PCA is still unknown. However, the TCBQ seems to be a product of the PCP intermediate and not produced directly from the PCA as found in PCP transformation. 4-Chloro-nitrosobenzene has been identified as product of the CPO transformation of 4-chloroaniline (Corbett et al., 1978, 1980). This product was the only one identified when no chloride was present in the reaction media at pH 6 or above. When chloride is present at pH 3 or minor, halogenated products were observed. We were unable to detect any nitroso compound after the CPO transformation of highly halogenated anilines. It is known that CPO carries out halogenase activity at pH around 3 and peroxidase activity at pH 4.5 to 6 (Pickard and Hashimoto, 1982).

In addition to polymer, several minor products from the CPO transformation of TCA were identified (Fig. 4). PCA was detected

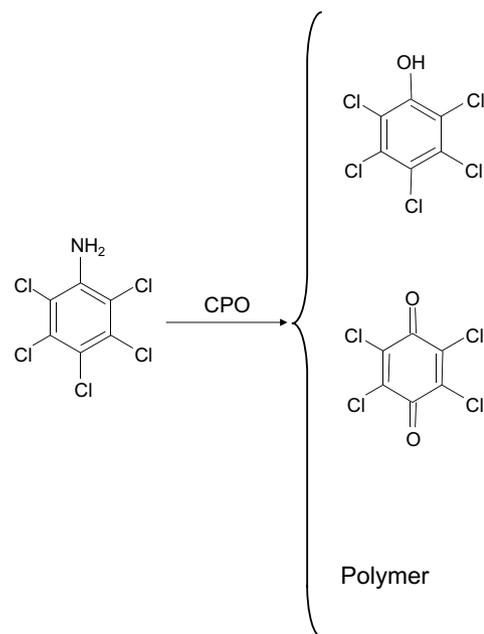


Fig. 3. Products from the transformation of pentachloroaniline by chloroperoxidase.

as halogenation product. Three different dimers were identified; TCA–TCA dimer, TCA–PCA dimer, and a head–head azo dimer also could be identified. Finally, by far the polymeric material is the most important reaction product of this enzymatic reaction representing 87–95% of the total mass.

4. Conclusions

From these results, we can conclude that CPO is able to transform tetra- and penta-chlorinated phenols and anilines, while horseradish, lignin and versatile peroxidases are only able to transform the halogenated phenols. The main product from peroxidase

- Ullmanns Encyklopadie der technischen Chemie, 1983. Chlorphenole, vol. 9. Verlag Chemie, Weinheim (Germany). pp. 573–577.
- Vazquez-Duhalt, R., 1998. Hemoproteins as biocatalyst for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Galindo, E., Ramirez, O.T. (Eds.), *Advances in Bioprocess Engineering II*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 183–207.
- Walter, M., Boul, L., Chong, R., Ford, C., 2004. Growth substrate selection and biodegradation of PCP by New Zealand white-rot fungi. *J. Environ. Manage.* 71, 361–369.
- Wang, P., Woodward, C.A., Kaufman, E.N., 1999. Poly(ethylene glycol)-modified ligninase enhances pentachlorophenol biodegradation in water–solvent mixtures. *Biotechnol. Bioeng.* 64, 290–297.
- Wannstedt, C., Rotella, D., Siuda, J.F., 1990. Chloroperoxidase mediated halogenation of phenols. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 44, 282–287.
- Wittsiepe, J., Kullmann, Y., Schrey, P., Selenka, F., Wilhelm, M., 1999. Peroxidase-catalyzed *in vitro* formation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans from chlorophenols. *Toxicol. Lett.* 106, 191–200.
- Wittsiepe, J., Kullmann, Y., Schrey, P., Selenka, F., Wilhelm, M., 2000. Myeloperoxidase-catalyzed formation of PCDD/F from chlorophenols. *Chemosphere* 40, 963–968.
- Zhao, F., Mayura, K., Hutchinson, R.W., Lewis, R.P., Burghard, R.C., Phillips, T.D., 1995. Developmental toxicity and structure–activity relationship of chlorophenols using human embryonic palatal mesenchymal cells. *Toxicol. Lett.* 78, 35–42.

Apéndice II. Identificación de compuestos mediante espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica de análisis que acoplada a técnicas de separación como la cromatografía de gases o HPLC se convierte en una herramienta indispensable en laboratorios analíticos. Diversas agencias privadas y gubernamentales emplean dicha técnica de manera rutinaria con el fin de explorar, cuantificar e identificar de manera certera compuestos orgánicos de interés. La espectrometría de masas difiere de otras técnicas de análisis en que la muestra no absorbe radiación de un espectro electromagnético (infrarrojo, ultravioleta, etc.). Esta técnica de análisis es destructiva, es decir, no es posible recuperar la muestra, por fortuna es altamente sensible (se requieren algunos picomoles) por lo que sólo se requerirá la totalidad de la muestra cuando ésta sea extremadamente limitada. Por otro lado, si se cuenta con compuestos puros es posible realizar la inserción directa de los mismos al espectrómetro de masas.

Existen diferentes técnicas de espectrometría de masas aunque en todos los casos es necesario transferir alguna forma de energía a las moléculas blanco para lograr la ionización. En la técnica clásica de impacto electrónico (electron ionization EI), algunas de las moléculas ionizadas generan una variedad de fragmentos ionizados, el patrón de fragmentación resultante así como los iones moleculares constituyen el espectro de masas. En principio, el espectro de masas de cada compuesto es único y puede ser usado como la “huella química” de una molécula. El avance de la tecnología ha permitido el desarrollo de programas computacionales cada vez más poderosos que facilitan la interpretación de los espectros de masas obtenidos.

En la Figura AII.1 se muestra un esquema general del sistema de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) como el empleado en el presente trabajo. El espectrómetro de masas tiene un límite máximo de detección de 700 Da.

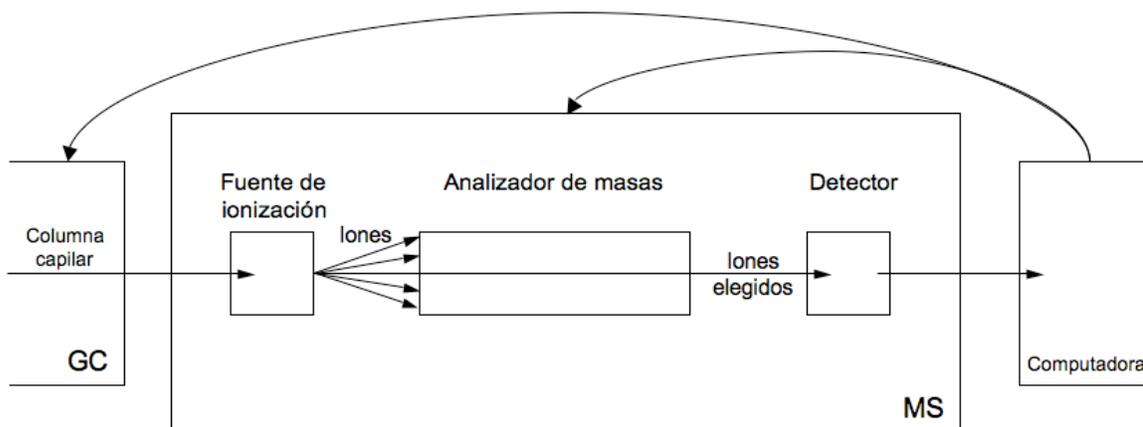


Figura AII.1. Diagrama de bloques de una sistema de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

De manera general, lo que sucede en un sistema GC-MS es lo siguiente:

- Los compuestos presentes en una mezcla son separados mediante cromatografía de gases.
- Las moléculas de los compuestos que salen de la columna capilar empleada en la separación, entran a la fuente de ionización donde son bombardeados con un haz de electrones de alta energía (generalmente 70 eV). Para lograr la ionización de moléculas orgánicas se requiere superar el potencial de ionización de las mismas. El potencial de ionización se refiere a la cantidad de energía para remover un electrón de los orbitales de enlace o antienlace. El primer potencial de ionización de las moléculas orgánicas se encuentra entre 8 y 15 eV. El empleo de 70 eV no sólo permite la generación de iones moleculares si no la fragmentación característica de los mismos. Generalmente se generan iones con carga. Durante este proceso se generan diversas especies ionizadas de tal manera que la fuente de ionización está diseñada para permitir que sólo los iones positivos continúen su camino hacia el analizador de masas.

- En el analizador de masas los iones generados en la fuente de ionización son acelerados y sometidos a un campo magnético cuya variación permite la llegada al detector de iones con una determinada relación masa/carga (m/z) en cada momento.
- Debido a que la eficiencia en la generación de iones positivos es muy baja, la señal generada por cada ion que impacta en la superficie del detector es amplificada.
- Finalmente dichas señales se registran en la computadora y permiten generar el patrón de fragmentación que es característico de cada molécula. En dicho patrón se observa las relaciones m/z de los iones en el eje x y la abundancia de los mismos en el eje y. Al ión más abundante se le asigna el 100 % y por convención se reporta como abundancia relativa. Generalmente se obtienen iones con carga +1 por lo que la relación m/z corresponde a la masa del ion. En algunos casos es posible obtener iones con cargas de +2, +3 o hasta +4 aunque sus abundancias no suelen ser significativas.

Para realizar la interpretación de los espectros de masas se deben tener en cuenta los siguientes aspectos: el primer ion formado es el que resulta de la eliminación de un electrón de la molécula blanco y es llamado ion molecular (M^+). Las abundancias observadas pueden ser asignadas a fragmentos de la molécula blanco que provengan de eventos de disociación del ion molecular ya sea por el rompimiento de un enlace o la pérdida de un grupo neutro (corte sencillo) o a fragmentos que provengan de la disociación del ión molecular y el rearrreglo intramolecular (en cuyo caso existe la formación de nuevos enlaces. En algunos casos, las abundancias pueden ser asignadas al ion molecular con cargas de +2, +3 o hasta +4, en cuyo caso la relación m/z corresponderá al valor $M^+/2$, $M^+/3$, etc.

Cabe mencionar que los componentes del espectrómetro de masas se encuentran en condiciones de alto vacío (10^{-5} a 10^{-6} torr) debido a diferentes razones. Primero, se asegura que las moléculas que entran a la fuente de ionización se encuentran en estado gaseoso y que por lo tanto no se condensan en las superficies internas del espectrómetro. Segundo, la ruta que siguen los iones en alto vacío son relativamente largas, de manera que las

colisiones entre ellos son extremadamente raras, asegurando que los iones que llegan al detector provienen de rearrreglos internos y no de rearrreglos con otros iones o moléculas. Finalmente, el alto vacío también protege las superficies internas del espectro de la corrosión por aire y vapor de agua que podrían dañar seriamente el desempeño del espectrómetro.

La información aquí presentada puede ser consultada en las siguientes referencias:

Davis, R., Fearson, M., 1987. Mass spectrometry. Analytical chemistry by open learning. John Wiley, New York.

Smith, R. M., Busch, K. L., 1999. Understanding mass spectra. A basic approach. John Wiley, New York.

En seguida se muestran los espectros de masas de los productos obtenidos por la acción de las peroxidasas sobre los sustratos halogenados TCA, PCA, TCP y PCP reportados en Tabla 3 de la sección de 5.1 Elección de la peroxidasa. Sobre los espectros de masas se muestran las estructuras correspondientes a los fragmentos más representativos que determinan la identidad de cada compuesto.

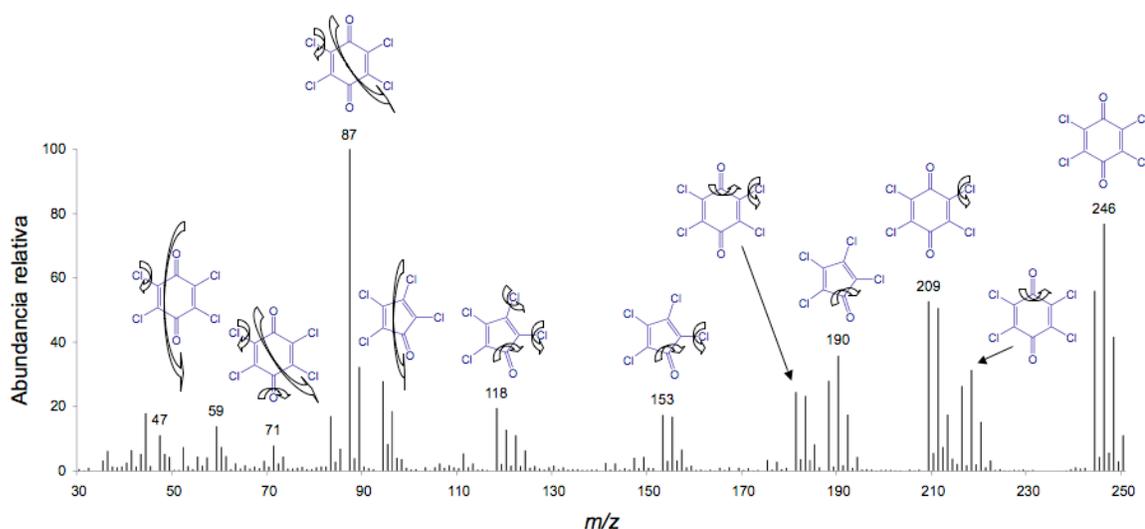


Figura AII.2. Espectro de masas de la TCBQ.

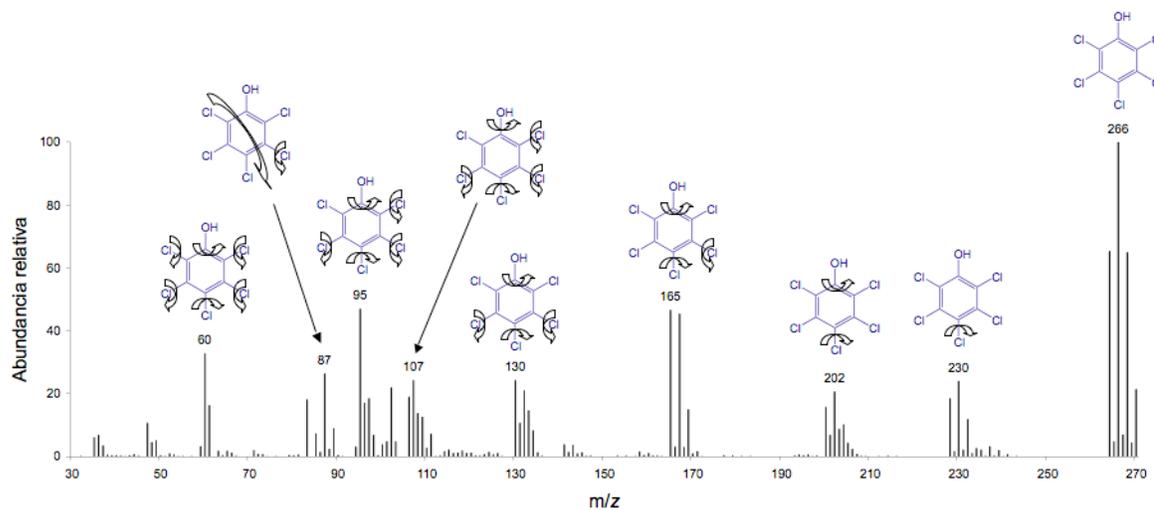


Figura AII.3. Espectro de masas del PCP.

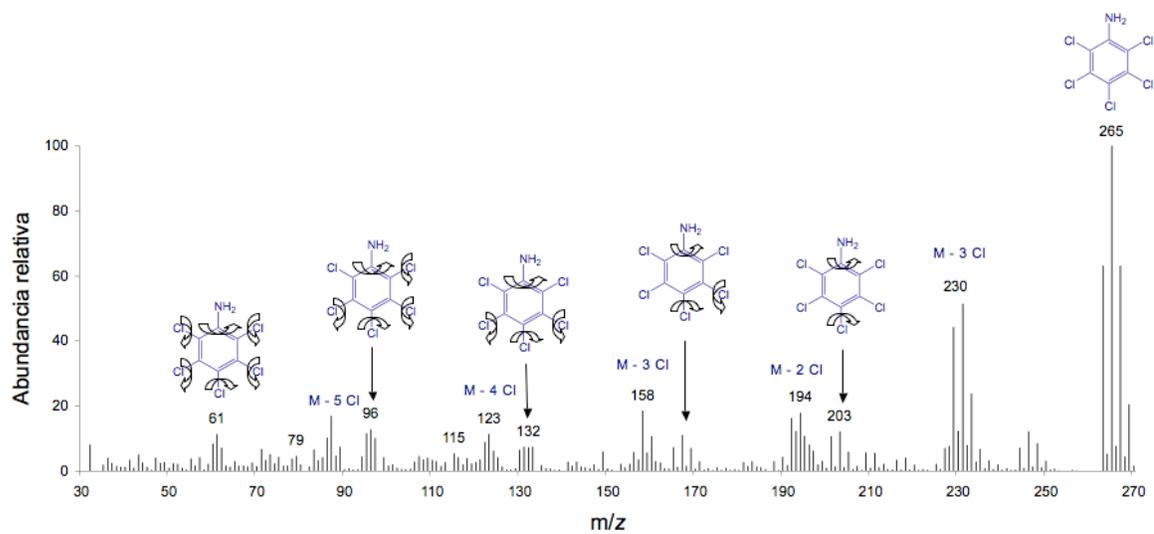


Figura AII.4. Espectro de masas de la PCA.

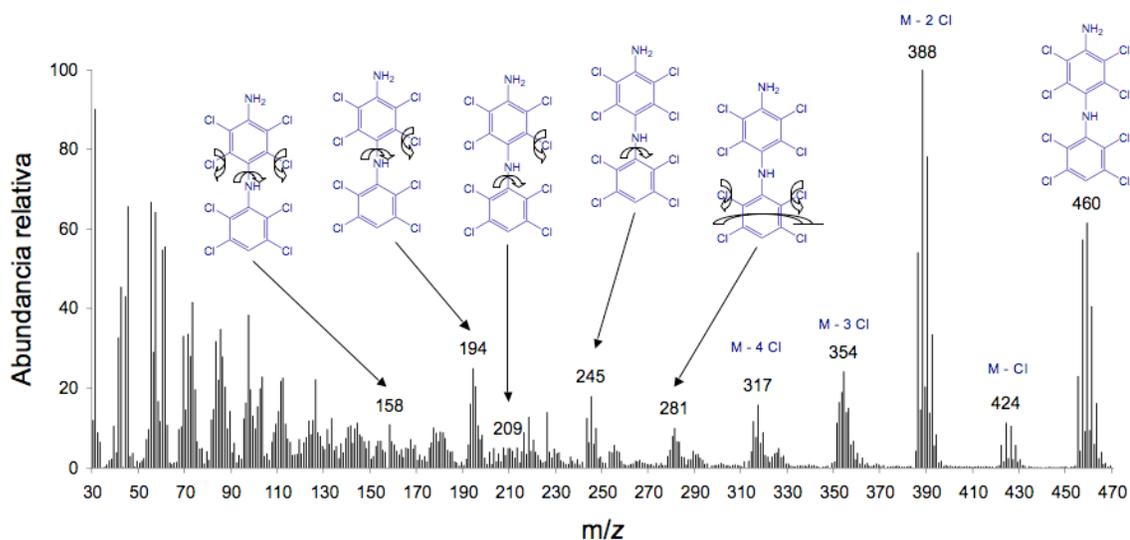


Figura AII.5. Espectro de masas del dímero TCA-TCA.

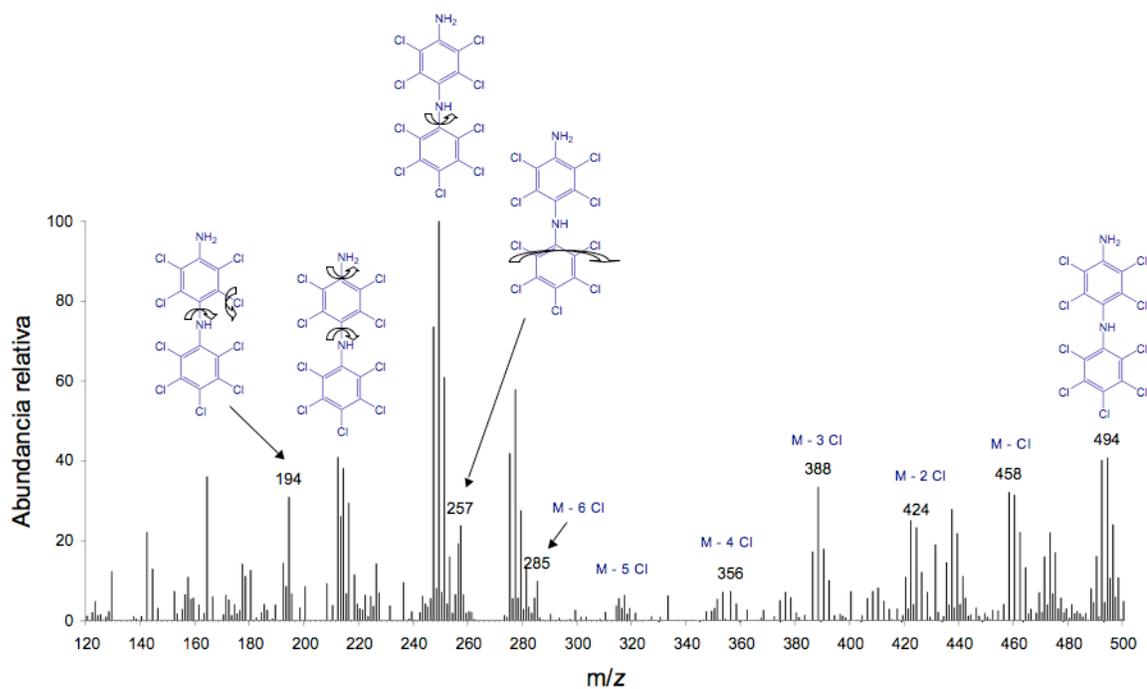


Figura AII.6. Espectro de masas del dímero TCA-PCA.

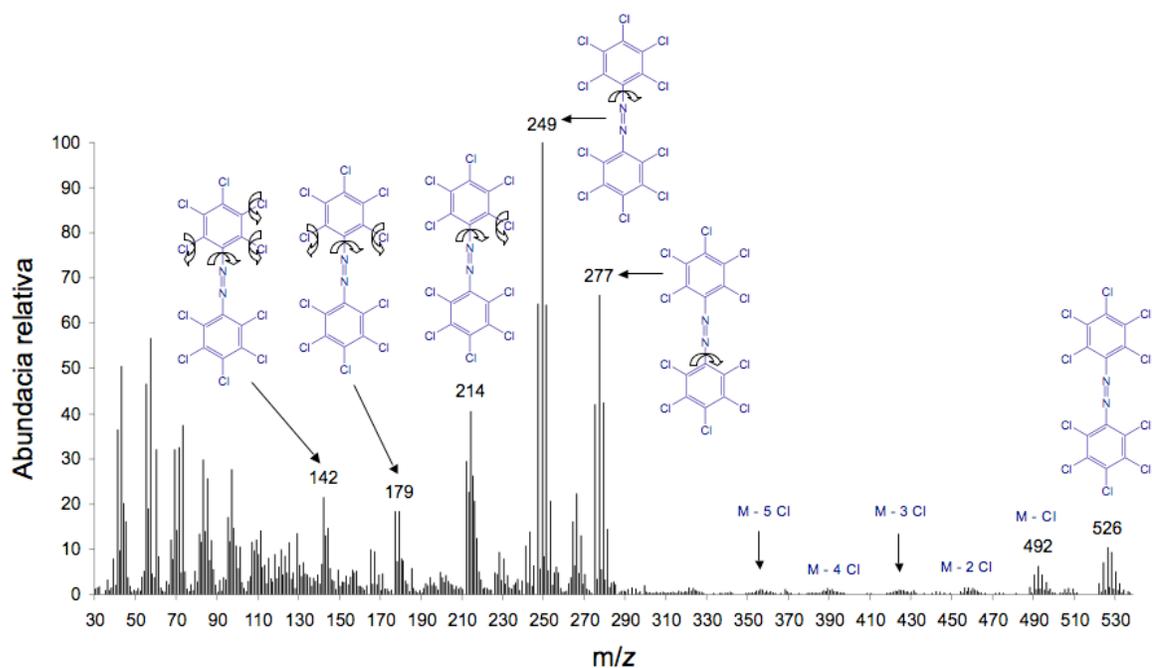


Figura AII.7. Espectro de masas del dímero PCA-PCA.

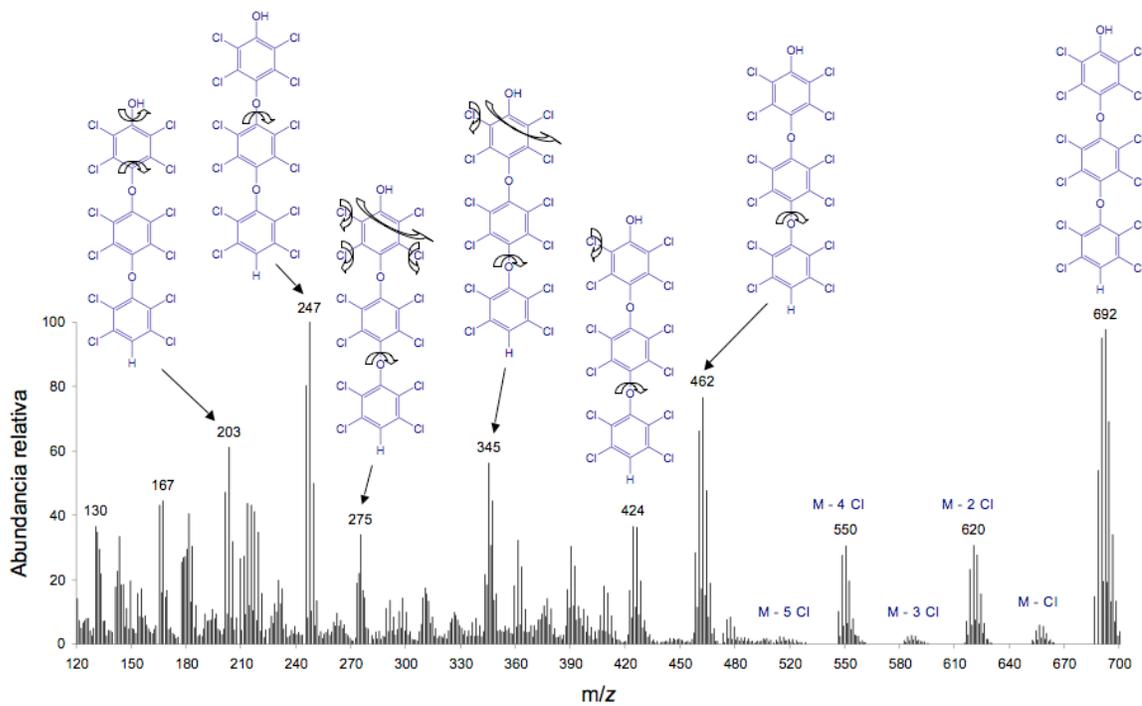


Figura AII.8. Espectro de masas del trímero de TCP.