



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA QUÍMICA – BIOCATÁLISIS

SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE MATERIALES POLIFENÓLICOS SEMICONDUCTORES

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN INGENIERÍA

PRESENTA:
M.I. CARLOS JUVENCIO LÓPEZ JIMÉNEZ

TUTOR PRINCIPAL
DR. MIQUEL GIMENO SECO, FACULTAD DE QUÍMICA
COMITÉ TUTOR
DR. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA, FACULTAD DE QUÍMICA
DR. JOSÉ MANUEL HERNÁNDEZ ALCÁNTARA, INSTITUTO DE FÍSICA

MÉXICO, D. F. AGOSTO DEL 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: DR. JOSÉ NORBERTO FARFÁN GARCÍA

Secretario: DRA. CARMINA MONTIEL PACHECO

Vocal: DRA. LIOUDMILA FOMINA

1^{er}. Suplente: DRA. MARCELA AYALA ACEVES

2^{do}. Suplente: DR. MIQUEL GIMENO SECO

Lugar o lugares donde se realizó la tesis:

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA.
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.
LABORATORIO 314 CONJUNTO E

TUTOR DE TESIS:

DR. MIQUEL GIMENO SECO

FIRMA



A MARÍA.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento más amplio a todos aquellos quienes con su apoyo han contribuido a que alcance esta meta.

*A **María**, ¿cómo podría agradecer de forma tal que equipare lo que hemos vivido juntos? Solo espero que sigamos juntos, lado a lado, alcanzando nuevos destinos.*

*A **Irma y Carlos**, no imagino mejores guías de vida, mi amor más sincero para ustedes.*

*A **Lupita, Leni, Cati, Ivonne y Astry**, con quienes he compartido grandes enseñanzas de vida.*

*A **Montserrat, Carla, Daniela, Derek, Romi, Pepe, Dino, Yaz, Leo, Dayani, Rashid, Edi y Abraham**, quienes me han contagiado de su alegría por la vida y me hacen seguir riendo. Siempre estaré para ustedes, nunca lo olviden.*

*A **Filo, Oswaldo, Roque y Trini**, porque la amistad, el apoyo y cariño es lo que nos hace familia.*

*A **Miquel**, por ofrecerme ser parte de este proyecto, por sus enseñanzas y orientación y aún más por su amistad.*

*Al **Sr. Alfredo Buenfil**, su esposa **Doña Socorro** y su familia por su apoyo incondicional siempre.*

*A **Rosy, Marce y Rafa**, por cuyo ejemplo y ánimos decidí iniciar y concluir este sendero.*

A los **Profesores Investigadores miembros del jurado**, por sus amables sugerencias y correcciones que han enriquecido este trabajo.

A **Adriana, Alberto, Ameyalli, Andrés, Axel, Brenda, Carmina, Diego, Geovanny, Jesús, Lidia, Miguel Ángel, Monse, Ricardo, Santiago y Sergio** (en estricto orden alfabético) quienes con su amistad han enriquecido mi vida.

"Se agradece a CONACyT por la beca de doctorado"

“Se agradece a CONACyT por el financiamiento a esta investigación a través del proyecto SEP-BÁSICA 2011 Modalidad J3 # 165757”

“Se agradece a DGAPA PAPIIT por la financiación de esta investigación a través del proyecto IA201813”

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
1. ANTECEDENTES	4
1.1. Compuestos orgánicos electro-ópticos	4
1.2. Derivados fenólicos	7
1.2.1. Ácido gálico	7
1.2.2. 4-fluoroguayacol.	9
1.3. Síntesis enzimática de compuestos orgánicos	10
1.3.1. Lacasa de <i>Trametes versicolor</i>	11
1.4. Polimerizaciones oxidativas enzimáticas de derivados fenólicos	15
1.4.1. Polimerización oxidativa enzimática de derivados fenólicos con propiedades electro-ópticas	16
1.4.2. Dopaje de derivados polifenólicos sintetizados enzimáticamente con propiedades electro-ópticas	17
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	19
2.1. Hipótesis	19
2.2. Objetivo general	19
2.3. Objetivos específicos	19
3. METODOLOGÍA	20
3.1. Materiales	20
3.2. Lugares donde se realizaron los análisis	20
3.3. Determinación de la actividad enzimática	21
3.4. Caracterización química de los productos	21
3.5. Polimerizaciones oxidativas enzimáticas	24

3.5.1. Polimerización oxidativa del AG	24
3.5.2. Polimerización oxidativa de 4FG	25
3.6. Caracterización electro-óptica	26
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
4.1. Polimerización oxidativa enzimática del AG	30
4.1.1. Pruebas preliminares con la enzima HRP	30
4.1.1. Efecto de la concentración del AG sobre la actividad de LTV	31
4.1.2. Polimerizaciones oxidativas con LTV	33
4.1.3. Propiedades físicas de los materiales derivados de AG	43
4.2. Polimerización oxidativa enzimática del 4FG	48
4.2.1. Actividad enzimática de LTV en presencia de co-solventes metanol y acetona	48
4.2.2. Polimerización oxidativa de 4FG con LTV	49
4.2.3. Propiedades físicas de los materiales derivados de 4FG	64
5. CONCLUSIONES	70
6. PERSPECTIVAS	71
7. REFERENCIAS	72
8. ANEXOS	77

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Aumento en la conductividad de poliacetileno mediante dopaje con halógeno.</i>	<i>4</i>
<i>Figura 2. Estados π y π^* de un polímero conjugado.</i>	<i>5</i>
<i>Figura 3. Esquema de ocurrencia de la luminiscencia en compuestos orgánicos.</i>	<i>6</i>
<i>Figura 4. Materiales moleculares electrónicos usados actualmente.</i>	<i>7</i>
<i>Figura 5. Homopolimerización química del AG.⁴³</i>	<i>8</i>
<i>Figura 6. Estructura del 4-fluoroguayacol.</i>	<i>10</i>
<i>Figura 7. Diagrama de cintas de LTV.</i>	<i>12</i>
<i>Figura 8. Mecanismo de formación de radicales libres de derivados fenólicos con LTV.</i>	<i>13</i>
<i>Figura 9. Mecanismo de polimerización de derivados fenólicos con LTV.</i>	<i>14</i>
<i>Figura 10. Polimerizaciones oxidativas de derivados fenólicos empleando oxidoreductasas.</i>	<i>16</i>
<i>Figura 11. Estructuras de derivados polifenólicos sintetizados enzimáticamente con propiedades electro-ópticas.</i>	<i>17</i>
<i>Figura 12. Estructuras de materiales dopados con propiedades electro-ópticas sintetizados mediante polimerizaciones oxidativas enzimáticas.</i>	<i>18</i>
<i>Figura 13. Estructura del derivado de AG sintetizado en este proyecto.</i>	<i>25</i>
<i>Figura 14. Estructura del derivado de 4FG sintetizado en este proyecto.</i>	<i>26</i>
<i>Figura 15. Diagrama del sistema de medición de la conductividad en estado sólido.</i>	<i>27</i>
<i>Figura 16. Circuito eléctrico equivalente al dispositivo utilizado para determinar la conductividad de los productos de polimerización oxidativa.</i>	<i>28</i>
<i>Figura 17. Esquema de reacción propuesto para la polimerización oxidativa enzimática de AG con HRP.</i>	<i>31</i>
<i>Figura 18. Espectro de RMN ¹H de un derivado de AG obtenido con HRP.</i>	<i>31</i>

Figura 20. Velocidad inicial de reacción enzimática de LTV a diferentes concentraciones de AG	32
Figura 19. Rendimiento de las reacciones de polimerización oxidativa de AG a diferentes tiempos de reacción.	33
Figura 21. Peso molecular promedio alcanzado bajo las diferentes condiciones de reacción.	36
Figura 22. Espectro de RMN ¹H de un derivado de AG obtenido con LTV.	37
Figura 23. Comparación de los espectros de RMN ¹³C del monómero (A), RMN ¹³C (B) y RMN ¹³C CP-MAS (C) de un derivado de AG.	39
Figura 24. Espectro FT-IR del AG (A) y de un derivado (B).	40
Figura 25. Esquema de reacción propuesto para la polimerización oxidativa enzimática de AG con LTV.	41
Figura 26. Mecanismo de reacción propuesto para la polimerización con LTV del AG.	42
Figura 27. Espectros UV-Vis del AG y de los derivados sintetizados.	43
Figura 28. Conductividad de los derivados de AG.	45
Figura 29. Voltamperometría cíclica del AG (-) y su derivado (-•) a una velocidad de barrido de 0.2 Vs⁻¹.	46
Figura 30. Voltamperometría cíclica de los derivados de AG a diferentes velocidades de barrido.	47
Figura 31. Actividad residual de la LTV a diferentes concentraciones de co-solvente.	49
Figura 32. Espectros FT-IR de los derivados de 4FG a las 48 h.	52
Figura 33. Espectro MALDI-TOF del derivado FGA302.	53
Figura 34. Espectro de RMN ¹H-¹H COSY del derivado FGM402.	56
Figura 35. Espectro de RMN ¹H-¹³C HSQC del derivado FGM402.	57
Figura 36. Espectro de RMN ¹H-¹³C HMBC del derivado FGM402.	58

<i>Figura 37. Esquema de reacción propuesto para la polimerización oxidativa enzimática de 4FG con LTV.</i>	<i>60</i>
<i>Figura 38. Mecanismo de reacción propuesto para la polimerización con LTV del 4FG.</i>	<i>62</i>
<i>Figura 39. Termograma de TGA de los derivados de 4FG a las 48 h.</i>	<i>63</i>
<i>Figura 40. Termograma de DSC de los derivados de 4FG a las 48 h.</i>	<i>63</i>
<i>Figura 41. Espectros de PXRD de los derivados de 4FG a las 48 h.</i>	<i>64</i>
<i>Figura 42. Espectros de absorción UV-Vis de los derivados de 4FG a las 48 h.</i>	<i>65</i>
<i>Figura 43. Espectros de fotoluminiscencia de la muestra FGA302.</i>	<i>66</i>
<i>Figura 44. Imágenes de LSCM de la muestra FGA402 bajo diferentes campos de excitación.</i>	<i>68</i>
<i>Figura 45. Intensidad de fluorescencia cuantificada por LSCM.</i>	<i>68</i>

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones experimentales de las reacciones con aireación a pH 5. _____ 34

Tabla 2. Reacciones de polimerización oxidativa de 4FG mediadas por LTV. _____ 50

Tabla 3. Señales de acoplamiento observadas en el espectro de RMN ^1H - ^{13}C HMBC del derivado FGM402. _____ 59

Tabla 4. Integración de los picos de los espectros de RMN ^1H . _____ 59

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

4FG	4-fluoroguayacol
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
AG	Ácido gálico
ATR FT-IR	Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier por reflectancia total atenuada (por sus siglas en inglés)
[BMIM][BF ₄]	Tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio
cm	Centímetros
CV	Voltamperometría cíclica (por sus siglas en inglés)
Da	Daltones
DO	Oxígeno disuelto (por sus siglas en inglés)
DSC	Calorimetría diferencial de barrido (por sus siglas en inglés)
E	Potencial de campo eléctrico
E_g	Banda de energía prohibida
g	Gramos
h	Hora
HOMO	Orbital molecular más alto ocupado (por sus siglas en inglés)
HRP	Peroxidasa de rábano (por sus siglas en inglés)
Hz	Hertz
I	Intensidad de corriente
k_{desac}	Velocidad de desactivación enzimática
K_m	Constante de Michaelis-Menten
L	Litros
LSCM	Microscopía confocal de barrido por láser
LTV	Lacasa de <i>Trametes versicolor</i>
LUMO	Orbital molecular más bajo desocupado (por sus siglas en inglés)
M	Concentración molar
m	Metros
m/z	Relación masa/carga
MALDI-TOF	Espectrometría de masas por ionización-desorción láser asistida por matriz acoplada a detector de tiempo de vuelo (por sus siglas en inglés)
min	Minutos
M_n	Peso molecular promedio en número
M_w	Peso molecular promedio en peso
nm	Nanómetros
°C	Grados centígrados

OLED	Diodo orgánico emisor de luz (por sus siglas en inglés)
p/p	Peso/peso
PDI	Índice de polidispersidad (por sus siglas en inglés)
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
PS	Espectrofotometría de fotoluminiscencia (por sus siglas en inglés)
PXRD	Difracción de Rayos X en polvo (por sus siglas en inglés)
R	Resistencia
RID	Detector de índice de refracción (por sus siglas en inglés)
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono
RMN ¹³ C CP-MAS	Resonancia magnética nuclear de carbono en sólido por polarización cruzada y giro al ángulo mágico (por sus siglas en inglés)
RMN ¹⁹ F	Resonancia magnética nuclear de flúor
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN ¹ H- ¹³ C HMBC	Resonancia magnética heteronuclear protón-carbono por correlación de enlaces múltiples (por sus siglas en inglés)
RMN ¹ H- ¹³ C HSQC	Resonancia magnética heteronuclear protón-carbono por correlación cuántica simple (por sus siglas en inglés)
RMN ¹ H- ¹ H COSY	Resonancia magnética nuclear protón-protón por espectroscopia de correlación (por sus siglas en inglés)
S	Siemens
SBP	Peroxidasa de soya (por sus siglas en inglés)
SEC	Cromatografía de exclusión molecular (por sus siglas en inglés)
t	Tiempo
<i>t</i> _{1/2}	Tiempo de vida media
TGA	Termogravimetría (por sus siglas en inglés)
U	Unidades de actividad enzimática
UV-Vis	Ultravioleta-visible
V	Voltios
v/v	Volumen/volumen
λ	Longitud de onda
λ _{em}	Longitud de onda de emisión
λ _{ex}	Longitud de onda de excitación
λ _{on}	Longitud de onda inicial
μm	Micrómetros
ρ	Resistividad
σ	Conductividad

RESUMEN

Este estudio presenta la síntesis enzimática de dos derivados polifenólicos a partir de ácido gálico y 4-fluoroguayacol. En el primer caso, se sintetizó un material semiconductor con altos rendimientos (82%) a partir del abundante ácido gálico natural polimerizado oxidativamente con lacasa de *Trametes versicolor*. La K_m determinada de 0.418 mM indicó una buena afinidad de esta enzima hacia al ácido gálico. Este material novedoso fue soluble en agua (hasta 150 mgmL⁻¹) mientras que fue poco soluble en solventes orgánicos. El material presentó una estructura molecular con propagación tipo fenil-fenil, lo cual permitió que la conductividad en estado sólido alcanzará un máximo de 10⁻⁴ Sm⁻¹ con una banda de energía prohibida óptica de 2.41 eV. Adicionalmente, en el espectro UV-Vis se observó un pico que aumentó conforme avanzó la reacción y los análisis de voltamperometría cíclica en solución acuosa evidenciaron dos ondas anódicas entre 0.40 y 0.80 V y una catódica en 0.35 V vs Ag/Ag⁺ a cualquier velocidad de barrido; interesantemente, el pico de corriente de las ondas se incrementó al aumentar la velocidad de barrido.

Por otro lado, la polimerización oxidativa enzimática de 4-fluoroguayacol se llevó a cabo con lacasa de *Trametes versicolor* en mezclas acuosas de solventes orgánicos a pH 5. Este material versátil emitió fluorescencia en las regiones azul, verde y rojo después de ser excitadas con radiación UV-Vis de acuerdo a los resultados de la microscopía confocal de barrido por láser y la espectrofotometría de fotoluminiscencia de películas. Los rendimientos alcanzaron hasta un 52% con un M_n determinado por cromatografía de exclusión molecular de 1,100 g mol⁻¹, usando acetona (30%). Los productos fueron caracterizados por análisis de RMN, FT-IR y MALDI-TOF, evidenciando que la reacción de polimerización oxidativa se realizó a través de propagación fenil-oxi y deshalogenación. Se determinó una cristalinidad de 50% de acuerdo a los espectros de difracción de rayos X en polvo, mientras que los análisis térmicos demostraron una buena estabilidad térmica por arriba del punto de fusión, lo que permitió la producción de películas por fundición.

ABSTRACT

This study is concerned with the enzymatic syntheses of two polyphenolic derivatives of gallic acid and 4-fluroguaiacol. In the first case, a semiconducting material was attained in high yield (82%) from *Trametes versicolor* laccase-mediated oxidative polymerization of naturally abundant gallic acid. The determined K_m was 0.418 mM, thus showing a good affinity of this enzyme for the substrate. This novel polyphenolic can be solubilized in water up to 150 mgmL⁻¹, whereas it presents poor solubility in organic solvents. The molecular structure presented phenylene propagation which allowed for a maximum conductivity in solid state of 10⁻⁴ Sm⁻¹ with an optic bandgap of 2.41 eV. Additionally, a growing absorption peak at 450 nm in UV-Vis spectra was observed during polymerization and cyclic voltammetry studies in aqueous solution of the polymers displayed a cathodic wave around 0.35 V vs Ag/Ag⁺ and two anodic waves between 0.40 and 0.80 V vs Ag/Ag⁺ at any scan rate for all samples; interestingly, the peak current of the waves increased with the increase of the scan rate.

On the other hand, the enzymatic oxidative polymerization of 4-fluroguaiacol was successfully achieved using *Trametes versicolor* laccase in organic solvent/buffer (pH 5) reaction media. The novel material was insulator but displayed photoluminescence with emissions in blue, green and red upon applied UV-light frequencies as determined by laser scanning confocal microscopy and photoluminescence on sample films. The highest product yield was up to 52% of a polymer with a M_n determined by size exclusion chromatography of 1,100 gmol⁻¹ using acetone (30 vol%). The products were fully characterized by NMR, FT-IR and MALDI-TOF analyses showing that the polyoxidation reaction underwent throughout defluorination and phenyl-oxy propagation. Powder X-ray diffraction spectra showed ca. 50% crystallinity for all samples and thermal analyses demonstrated high thermal resistance of the polymer well above its melting point which allowed for the production of films by melting.

INTRODUCCIÓN

La polimerización de fenoles catalizada por enzimas ha sido estudiada durante la última década¹ debido a sus ventajas sobre las rutas químicas tradicionales, tales como condiciones de reacción no drásticas en ausencia de reactivos tóxicos, así como su estabilidad, versatilidad y actividad.²⁻⁴ Su síntesis se ha hecho importante porque la consecución de derivados polifenólicos con estructuras altamente conjugadas ha encontrado aplicaciones en los campos de la microelectrónica, la óptica no lineal y de sensores debido a su buena estabilidad térmica y propiedades mecánicas.⁵⁻⁷ Recientemente, se ha propuesto para su síntesis el uso de enzimas⁸⁻¹¹ tales como oxidoreductasas, principalmente peroxidasa de rábano (HRP), peroxidasa de soya (SBP), cloroperoxidasa y en menor medida, lacasas. Las publicaciones sobre el uso de estas últimas han sido limitados comparados con HRP o la SBP,¹²⁻¹⁵ debido principalmente a la alta actividad enzimática de éstas últimas comparando con las lacasas, no obstante las ventajas que conlleva el uso de la primera. Entre ellas, destaca que se evita el uso de H₂O₂ asociado a las peroxidasas, el cual tiene, a altas concentraciones, un efecto desactivante sobre las enzimas de las cuales es sustrato y es difícil de manejar a grandes volúmenes a escala industrial, mientras que las lacasas, al activarse con oxígeno molecular, son enzimas mucho más versátiles. En general, en estas reacciones es difícil tener control sobre la estructura del producto, debido a que el mecanismo de polimerización consiste en la formación de radicales libres y en el medio de reacción es donde éstos se acoplan al azar mediante enlaces fenil-oxi o fenil-fenil;¹⁶⁻²⁰ no obstante, se han realizado esfuerzos para controlar la estructura molecular y características de los derivados, ya sea tanto modificando las condiciones de reacción como por la presencia de sustituyentes.^{6,21-25}

En este trabajo se ha estudiado la polimerización oxidativa enzimática mediada por lacasa de *Trametes versicolor* (LTV) de sustancias y derivados naturales –ácido gálico (AG) y 4-fluoroguaiacol (4FG)-, buscando productos que exhibieran propiedades electro-ópticas tales como conductividad o luminiscencia.

1. ANTECEDENTES

1.1. Compuestos orgánicos electro-ópticos

A mediados del siglo pasado, las propiedades eléctricas de los materiales moleculares llamaron la atención con un considerable interés en los procesos electrónicos en sistemas bioquímicos y polímeros conjugados. Eley (Reino Unido) y Vartanyan (URSS) en los años 40 consiguieron cristales de ftalocianina y de ftalocianina de cobre con propiedades semiconductoras; mientras que alrededor de 1950 el grupo de trabajo de Akamatu en la Universidad de Tokio empezó a investigar las propiedades eléctricas de los materiales orgánicos, por ejemplo la fotoconductividad de la violantrona.²⁶⁻²⁸ Más tarde, en 1977, Shirakawa, MacDiarmid y Heeger (Premio Nobel de Química, 2000) publicaron su célebre trabajo sobre el aumento de la conductividad de poliacetilenos cuando se exponían a vapores de halógenos (I_2 , Br_2 y Cl_2 , figura 1), dicho aumento en la conductividad fue mayor cuando se usó I_2 y menor con Cl_2 como dopante.⁵ Este trabajo reforzó el concepto entonces emergente de materiales orgánicos no como aislantes, sino con comportamiento metálico o semiconductor.²⁹

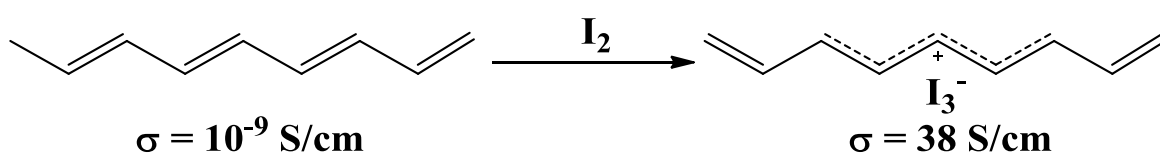


Figura 1. Aumento en la conductividad de poliacetileno mediante dopaje con halógeno.

Los polímeros conjugados se componen de enlaces covalentes alternantes simples y dobles entre átomos de carbono. Los orbitales del carbono en los dobles enlaces se encuentran en configuración sp^2p_z , en donde la hibridación sp^2 da lugar a enlaces tipo sigma entre carbonos, y/o hidrógeno principalmente, aunque también puede darse con heteroátomos. Los orbitales p_z forman enlaces moleculares entre carbonos tipo π . Los dobles enlaces conjugados, o en otras

palabras, los electrones que forman estos dobles enlaces se encuentran deslocalizados a lo largo de los enlaces 1,3-conjugados de la cadena, teniendo así una densidad electrónica deslocalizada. Esta deslocalización electrónica provee la vía para el transporte de carga a lo largo de la cadena principal del polímero, dando como resultado que tales materiales puedan exhibir propiedades semiconductoras e incluso conductoras.³⁰⁻³² La unión π puede existir en dos estados: un estado enlazante π (conocido como HOMO) y un estado antienlazante π^* (conocido como LUMO) donde la energía necesaria para el paso de un estado a otro se conoce como banda de energía prohibida (E_g) (figura 2).^{31,33,34}

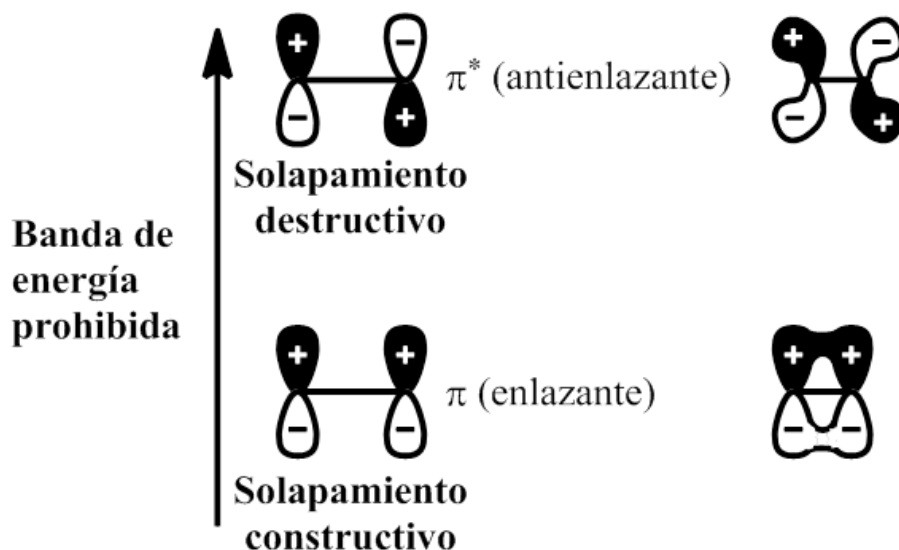


Figura 2. Estados π y π^* de un polímero conjugado.

En física del estado sólido, un semiconductor usualmente se define como un material con resistividad en un intervalo de entre 10^{-2} y $10^9 \Omega\text{cm}$, o alternativamente, con una E_g para la excitación electrónica entre 0 y 4 eV. Un semiconductor orgánico tiene como ventajas sobre uno inorgánico (como el Si) que son flexibles y que pueden adaptarse fácilmente a distintas aplicaciones; por ejemplo, sus E_g pueden modificarse más fácilmente variando su estructura química.³⁵ Los semiconductores orgánicos pueden dividirse en dos categorías: moléculas relativamente pequeñas (típicamente, grupos fenil o naftil acoplados

juntos) y polímeros conjugados de peso molecular relativamente bajo.³⁶ También pueden clasificarse como transportadores de huecos o de electrones, de acuerdo a sí la transferencia ordenada de los transportadores de carga, bajo ciertas condiciones, se deriva de la remoción de electrones de los orbitales moleculares llenos o de su adición a orbitales vacíos, respectivamente; e incluso es posible la existencia de un polímero ambipolar.^{28,30} Algunos polímeros conjugados semiconductores pueden también emitir luz cuando regresan al estado basal después de su excitación, ya sea por acción de fotones (fotoluminiscencia), un campo eléctrico (electroluminiscencia) e incluso calentamiento (termoluminiscencia) (figura 3); estos materiales han despertado un creciente interés por sus propiedades, procesabilidad y posibles aplicaciones en el campo de la optoelectrónica.^{30,34,35,37} Entre los materiales moleculares electrónicos más usados actualmente sobresalen los mostrados en la figura 4 y entre sus aplicaciones sobresalen los diodos orgánicos emisores de luz (OLEDs) y los transistores.³⁶

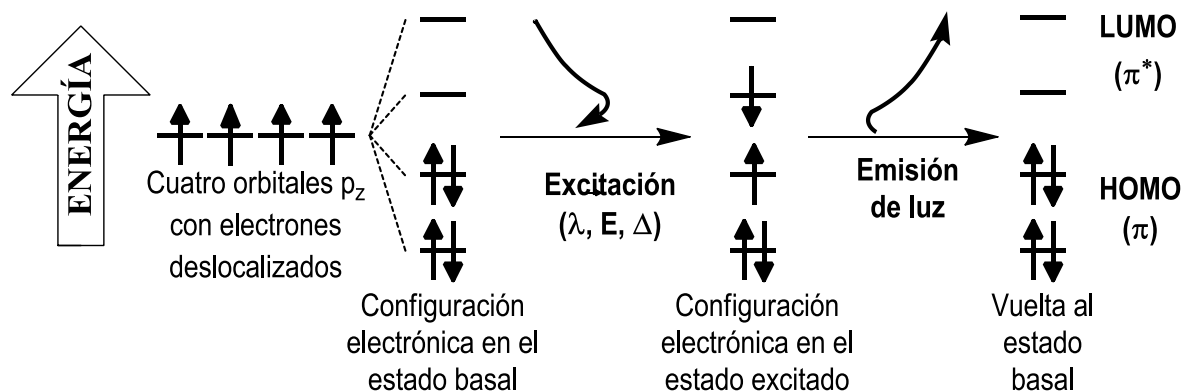


Figura 3. Esquema de ocurrencia de la luminiscencia en compuestos orgánicos.

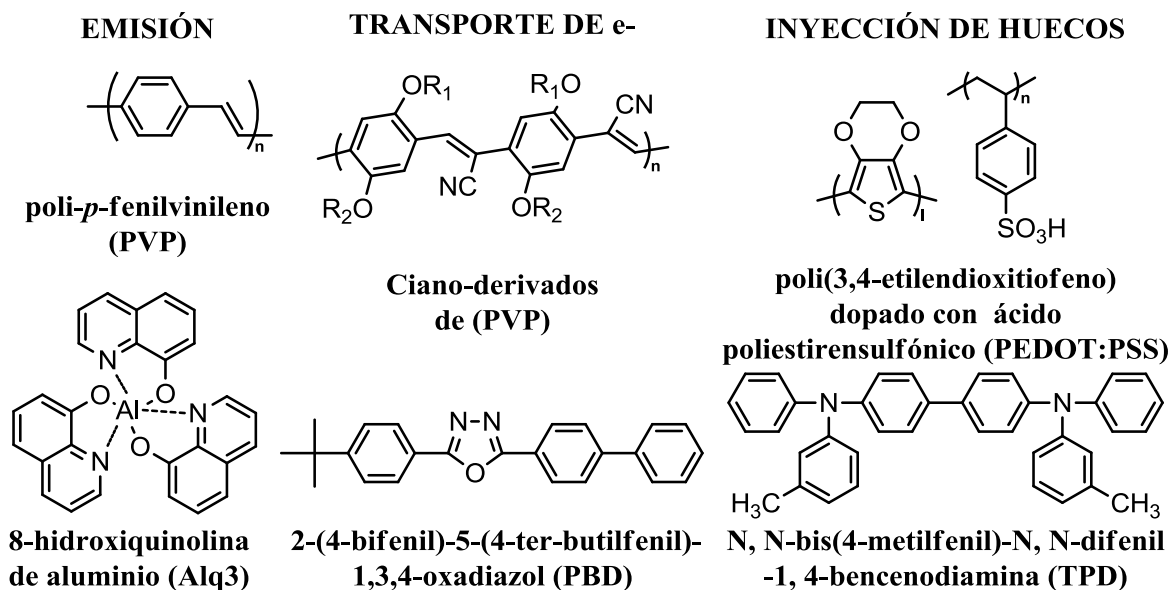


Figura 4. Materiales moleculares electrónicos usados actualmente.

1.2. Derivados fenólicos

Los materiales polifenólicos han atraído un especial interés debido a sus estructuras conjugadas y a sus propiedades de estabilización de la oxidación térmica. Esto les confiere aplicaciones potenciales en los campos de la microelectrónica, la óptica no lineal y los sensores.⁶ Estos materiales son, en muchos casos, de ocurrencia natural en los organismos vivos y exhiben un amplio intervalo de propiedades fisiológicas (anticancerígeno, antimicrobiano, antiinflamatorio, etc.), siendo sus propiedades antioxidantes muy importantes, por lo que las investigaciones en torno a ellos se dan principalmente en el sector de la salud y en química de alimentos.^{13,38}

1.2.1. Ácido gálico

El AG (nombre IUPAC: ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico, en la figura 5 puede observarse su estructura) es un derivado fenólico natural, que se encuentra en el metabolismo de muchas plantas por lo que puede considerarse no tóxico, además de ser relativamente barato.³⁹ Su demanda mundial anual se estima en 8,000

toneladas (en el 2010) y se produce industrialmente por la hidrólisis ácida de galotaninos (presentes en el aceite de la nuez de agalla) y en menor grado a través de la hidrólisis enzimática de éstos usando caldos agotados de *Aspergillus niger* o *Penicillium glaucum* que contengan tanasas.^{40,41} Los usos principales del AG se dan en fotografía, en tintas de impresión, en la producción de antimicrobianos, antivirales, analgésicos e incluso exhibe actividad citotóxica contra células cancerosas;⁴⁰ también se utiliza en la determinación de fenoles totales de extractos expresados como equivalentes de AG mediante el procedimiento de Folin–Ciocalteu⁴² y para la manufactura de alquil galatos, los cuales son usados como antioxidantes en aceites y productos grasos.⁴⁰

La primera homopolimerización química publicada del AG la realizaron Kricheldorf y Stukenbrock en 1998 (figura 5).⁴³ Dicha polimerización se realizó en dos pasos: primero, el AG se acetiló con anhídrido acético usando piridina como catalizador en tolueno en reflujo; después, el ácido 3,4,5-triacetoxi-benzoico obtenido se polimerizó en masa a 230 °C. El rendimiento global fue de 75%, con un peso molecular promedio del material (M_n) de hasta 23,000 g/mol, un índice de polidispersidad (PDI) de 2.1 y una temperatura de transición vítrea de 167 °C.

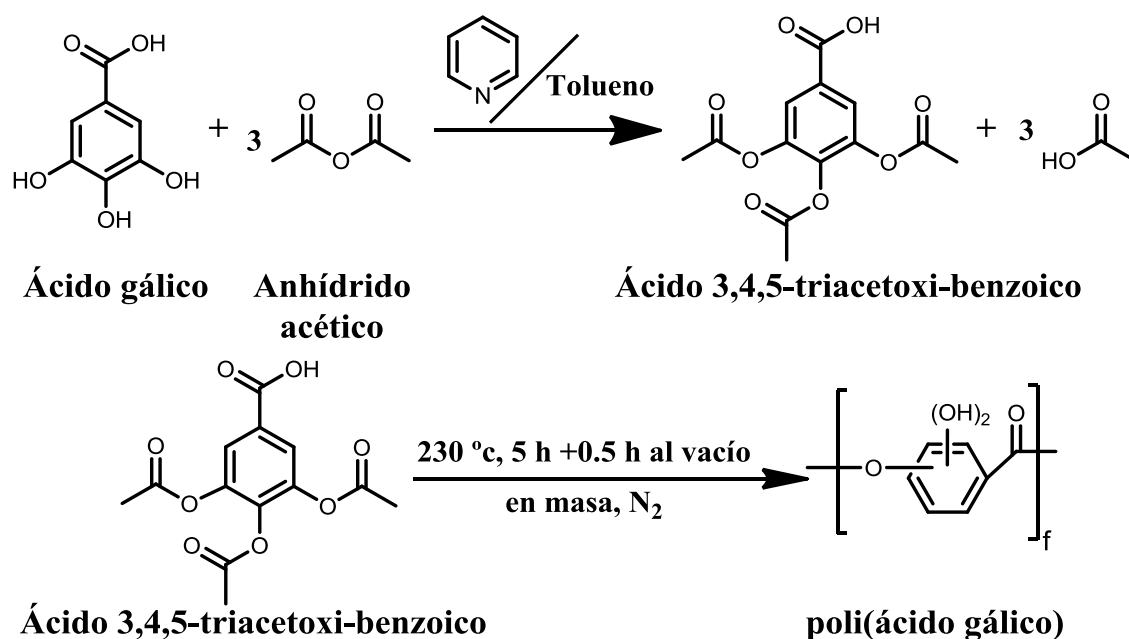


Figura 5. Homopolimerización química del AG.⁴³

Aunque el objetivo de su estudio fue sintetizar materiales hiperramificados, debido al impedimento estérico, durante la homopolimerización no reaccionaron los tres grupos acetoxi de cada unidad monomérica, sino un máximo de dos, por lo que continuaron su estudio evaluando la copolimerización del AG.

Por otro lado, Jeon *et al.* (2010)⁴⁴ lograron la homo y copolimerización enzimática de AG y otros monómeros usando LTV en una mezcla acuosa de etanol como medio de reacción. El objetivo de su estudio fue obtener colorantes que pudieran ser útiles como tintes para cabello. Dado que el homopolímero de AG no mostró los parámetros de color adecuados, continuaron su estudio utilizando copolímeros de AG y ácido siríngico, descubriendo que a pesar de agregarse al inicio de la reacción en cantidades estequiométricas, el producto final era una mezcla de homopolímeros; esta mezcla fue adecuada como tinte castaño. Se describió también que, en la mezcla, el diámetro promedio de las partículas fue de entre 130 y 400 nm y que la absorción UV-Vis fue mayor al disminuir la longitud de onda; no se publicaron los rendimientos.

1.2.2. 4-fluoroguayacol.

A su vez, el 4FG (nombre IUPAC: 4-fluoro-2-metoxifenol, figura 6) es un compuesto derivado del guayacol natural, que ha sido estudiado recientemente por sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes.^{45,46} Estas propiedades se las confiere su similitud con la apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona), un compuesto natural extraído de las raíces de *Picrorhiza kurroa* de los Himalayas y cuya capacidad antiinflamatoria ha sido demostrada.⁴⁷ Sin embargo, no existen trabajos acerca de su polimerización química, y la única publicación existente sobre su polimerización enzimática proviene del grupo de trabajo del Laboratorio 314 de la Facultad de Química de la UNAM.⁷

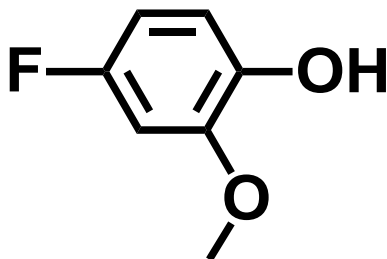


Figura 6. Estructura del 4-fluoroguaiacol.

1.3. Síntesis enzimática de compuestos orgánicos

Actualmente, los polímeros derivados de compuestos fenólicos se producen industrialmente por síntesis química, lo que involucra el uso de compuestos tóxicos (p.e.: formaldehído y piridina), incluidos metales pesados (p.e.: complejos de Cu), además de que se tiene un bajo control sobre la estructura del producto.^{6,7,13}

El estudio de la polimerización enzimática provee una alternativa prometedora para sintetizar polifenoles, ya que es ventajosa al ofrecer condiciones de reacción suaves y benignas ambientalmente.^{6,48} Adicionalmente, se espera que los catalizadores enzimáticos puedan proveer nuevos materiales poliméricos en términos de estructura molecular difíciles de obtener por otras rutas más convencionales.¹⁰

La naturaleza provee un claro ejemplo del poder de las enzimas en la preparación de polímeros fenólicos a través de la síntesis de lignina, uno de los polímeros más abundante sobre la tierra. Las condiciones suaves de reacción aunadas a la alta reactividad y estabilidad de la familia de las oxidoreductasas las hacen ideales para las aplicaciones de síntesis. En particular, la peroxidasa de soya (SBP), la peroxidasa de rábano (HRP) y lacasas, especialmente la obtenida de *Trametes versicolor* (LTV), han sido usadas para sintetizar polímeros y copolímeros fenólicos a partir de un amplio número de monómeros, incluyendo *p*-cresol, *p*-fenilfenol, varios naftalenos y el mismo fenol. Tanto SBP como HRP

producen productos poliméricos similares, lo cual parece ser representativo de la mayoría de las peroxidasas de plantas. Desafortunadamente, en soluciones acuosas, la pobre solubilidad de los monómeros fenólicos aunado a la aún más baja solubilidad de sus derivados polimerizados oxidativamente resulta en terminación temprana por precipitación en el seno de la reacción.⁴⁸ Una forma de mejorar las condiciones de reacción es aprovechar la relativa estabilidad y actividad de las peroxidasas en soluciones microacuosas de disolventes orgánicos.^{6,10,48-51}

1.3.1. Lacasa de *Trametes versicolor*

El uso de lacasas [bencenodiol: oxidoreductasa de oxígeno, EC 1.10.3.2] para biorremediación, biosensores, decoloración de pigmentos, blanqueado y deslignificación de pulpa de papel, tratamiento de aguas residuales, modificación de biopolímeros y síntesis orgánica ha sido ampliamente estudiado en las últimas décadas.^{52,53} Particularmente, la LTV (figura 7), producida principalmente por cultivo del hongo en líquido aunque su fermentación en estado sólido también ha sido estudiada;^{52,54} es una de las enzimas conocidas como oxidasas “azules”; contiene 4 átomos de cobre en el sitio activo como cofactores para reducir el oxígeno molecular a agua.^{16,53} Consta de aproximadamente 500 residuos de aminoácidos,⁵⁵ organizados en tres dominios secuenciales y con los átomos de cobre organizados en dos regiones: una conteniendo un átomo de cobre (sitio T1) y otra agrupando tres átomos de cobre (sitio T2/T3), un átomo T2 y dos átomos T3.¹⁶ La LTV efectúa la catálisis por un mecanismo de óxido-reducción, que se esquematiza en la figura 8.

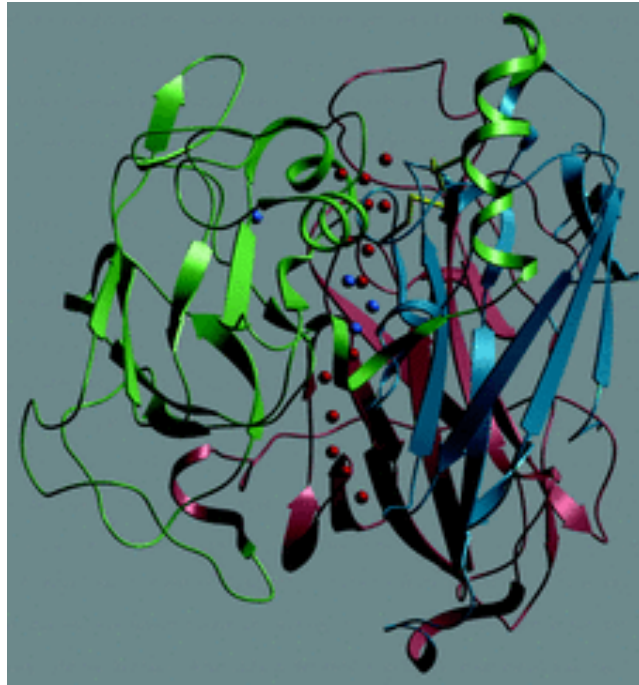


Figura 7. Diagrama de cintas de LTV. Los átomos de cobre se muestran como esferas azules.⁵⁵

En presencia de oxígeno molecular, los cuatro átomos de cobre se oxidan, y el sitio T2/T3 interacciona con ambos átomos de oxígeno. Acto seguido, en presencia de un sustrato (agente reductor), ambos átomos se reducen a 2 moléculas de agua, que son liberadas junto con los radicales libres formados por la oxidación del sustrato;¹⁶ por cada ciclo de regeneración enzimática se forman cuatro radicales libres y esta generación de radicales bajo condiciones suaves es la única función de la enzima. Posteriormente, los radicales libres formados, pueden reaccionar entre sí (acoplamiento), dar paso a otras especies radicales por resonancia o bien sustraer un hidrógeno fenólico de otra unidad monomérica e incluso oligomérica, en una reacción de transferencia. La ocurrencia de radicales libres da lugar a la formación de enlaces estables por acoplamiento entre ellos y por consiguiente, conduce al crecimiento de la cadena por alternancia de esos pasos;⁵⁶ sin embargo, cabe recalcar que esta fase de crecimiento no ocurre en el sitio activo de la enzima sino en el medio de reacción (figura 8).⁵⁷ En el sitio activo, como se ha mencionado anteriormente, se producen radicales libres en el átomo oxígeno del compuesto fenólico que posteriormente se difunden hacia el medio.

En la figura 9 se esquematiza un mecanismo de reacción general para una polimerización enzimática *in vitro* empleando en este caso la LTV, el cual puede ampliarse a otro tipo de oxidoreductasas.

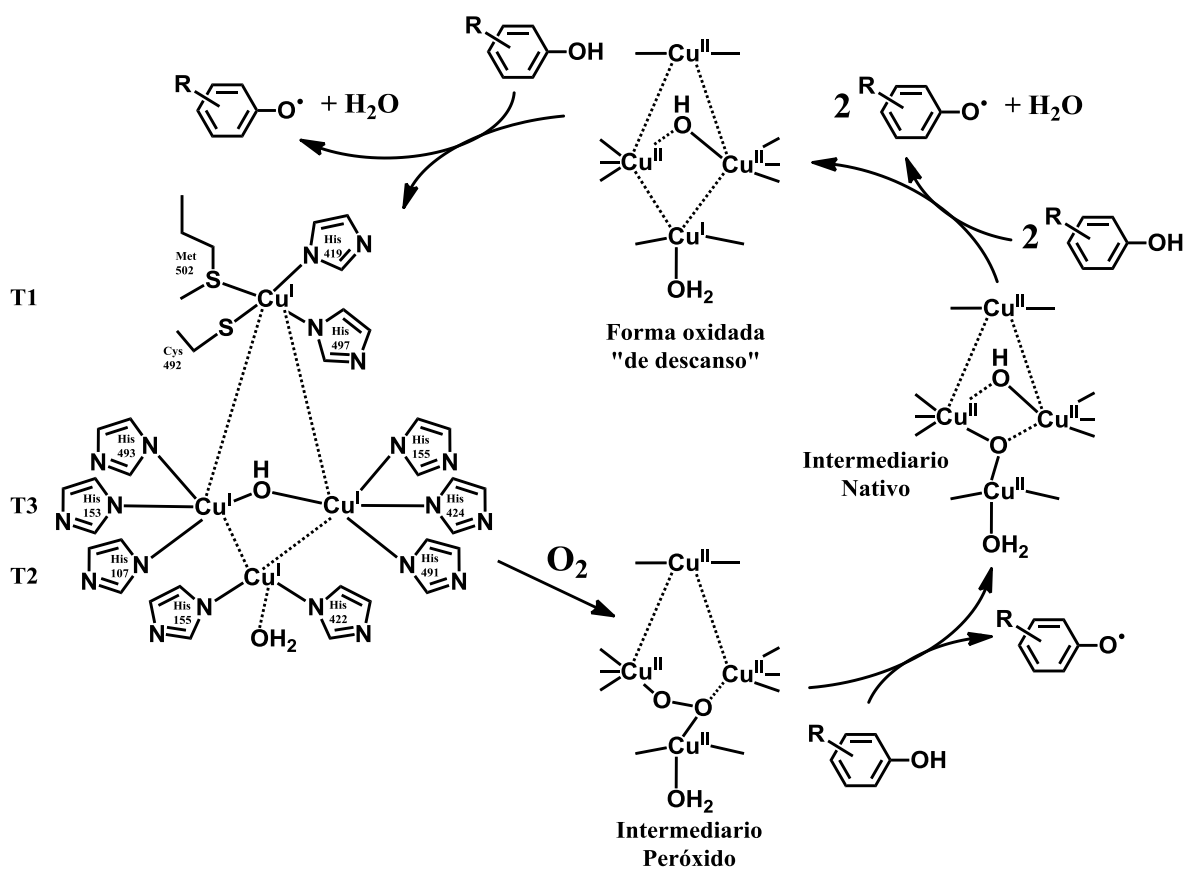
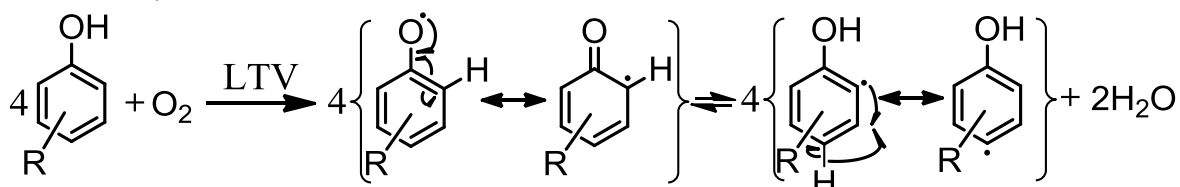
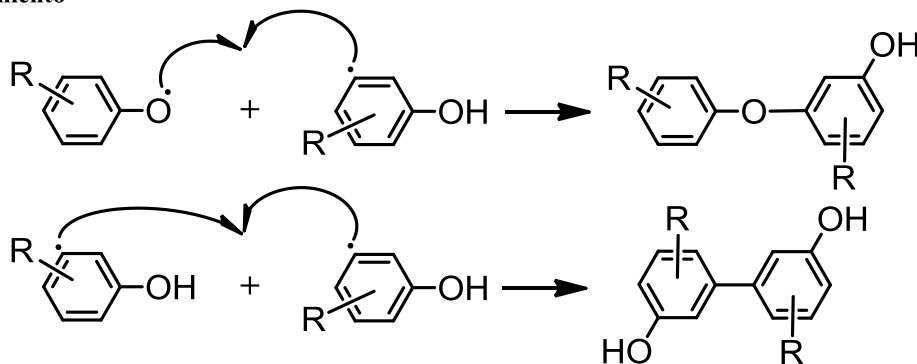


Figura 8. Mecanismo de formación de radicales libres de derivados fenólicos con LTV.¹⁶

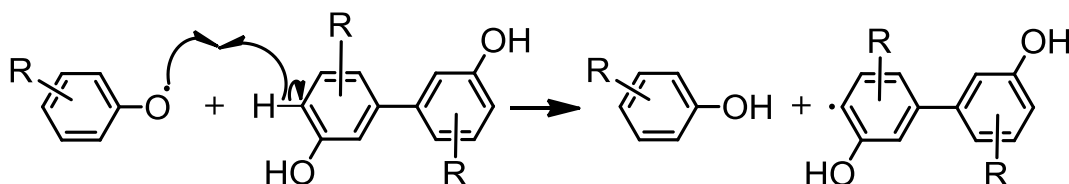
a) Iniciación y resonancia



b) Acoplamiento



c) Transferencia



d) Propagación

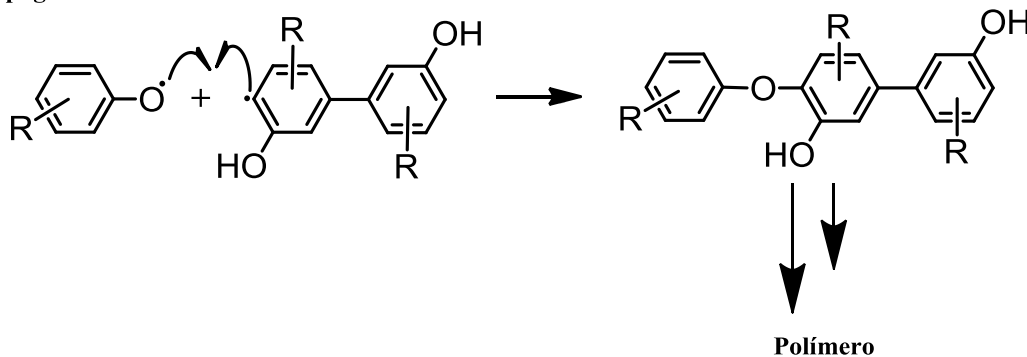


Figura 9. Mecanismo de polimerización de derivados fenólicos con LTV. a) Formación de radicales y resonancia; b) acoplamiento de radicales para formar enlaces fenil-oxi o fenil-fenil; c) transferencia de radical; d) propagación por alternancia entre los pasos de transferencia y acoplamiento que conduce al crecimiento polimérico.⁵⁶

1.4. Polimerizaciones oxidativas enzimáticas de derivados fenólicos

Hay muchos trabajos publicados sobre polimerizaciones oxidativas de fenol y derivados fenólicos empleando oxidoreductasas en sistemas microacuados, las primeras publicaciones datan del grupo de Klibanov en el MIT (EUA).^{2,58} Como ejemplos de polimerizaciones utilizando enzimas, destacan el trabajo de Kobayashi *et al.* (2001)⁵⁹ quienes llevaron a cabo la producción de “urushi artificial” (UA, el urushi es un polímero de origen natural usado de manera tradicional en Japón como recubrimiento) mediante la polimerización enzimática de cardanol (derivado fenólico que es el principal componente obtenido por tratamiento térmico de aceite de castaña de cajú) usando SBP (figura 10 inciso a), el UA obtenido presentó buenas propiedades elásticas; asimismo, Chelikani *et al.* (2009)⁶⁰ describieron la polimerización enzimática de ácido anacárdico natural (extraído del aceite de castaña de cajú) con SBP (figura 10 inciso b) con rendimientos de hasta 60% con un peso molecular promedio en peso (M_w) de 3900 g/mol cuando se usó metanol acuoso como medio de reacción, mientras que con propanol acuoso el M_w aumentó a 5000 g/mol con un menor rendimiento de 41%; el poli(ácido anacárdico) obtenido se entrecruzó posteriormente en una superficie sólida y entonces se probaron sus efectos antibióticos. Un ejemplo reciente de polimerización oxidativa enzimática, realizado en el laboratorio, es el de Zaragoza-Gasca *et al.* (2010),⁵¹ quienes llevaron a cabo la polimerización de fenol usando mezclas de tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio ([BMIM][BF₄]) y agua (uno de los primeros trabajos sobre la polimerización enzimática de fenol usando líquido iónico como solvente) con el biocatalizador HRP obteniendo pesos moleculares de hasta 7,000 kDa con rendimientos de hasta 100% y con estructuras tanto fenil-oxi como fenil-fenil (figura 10 inciso c).

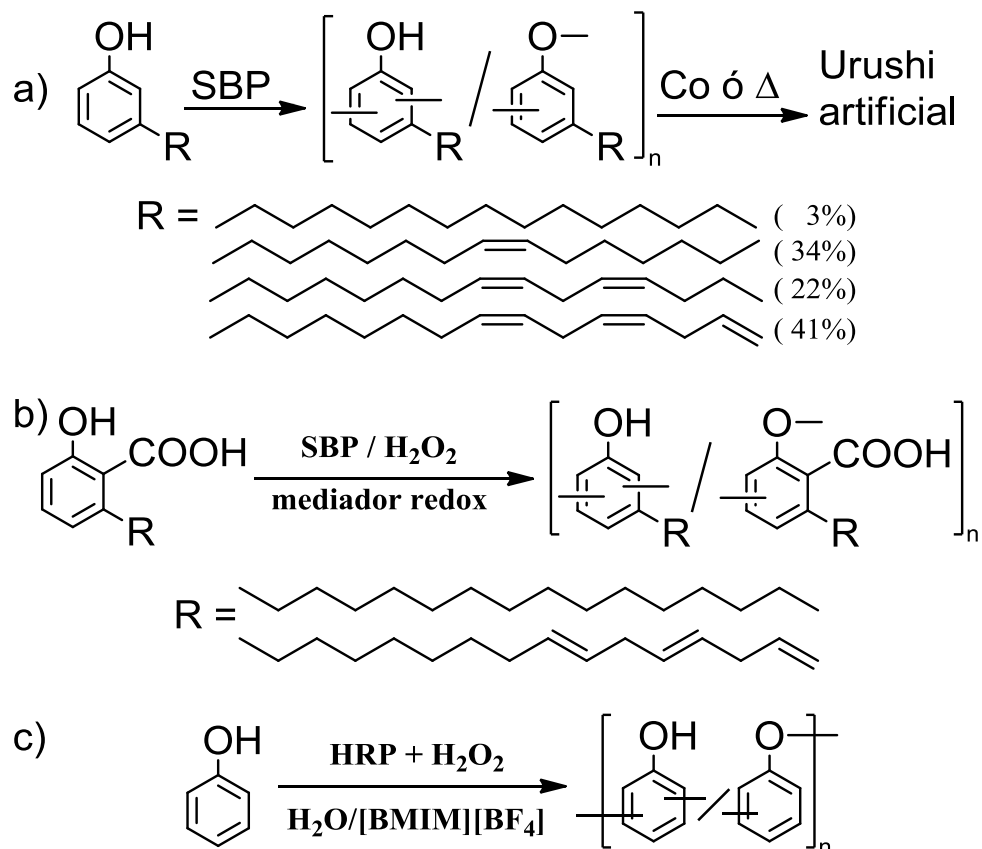


Figura 10. Polimerizaciones oxidativas de derivados fenólicos empleando oxidoreductasas.

1.4.1. Polimerización oxidativa enzimática de derivados fenólicos con propiedades electro-ópticas

La mayoría de los trabajos publicados en el campo de la síntesis enzimática de derivados polifenólicos con propiedades electro-ópticas es sin duda muy reciente. Liu *et al.* (2000)⁶¹ llevaron a cabo la síntesis de poli(4-fenilazofenol) (figura 11 inciso a) usando HRP en mezclas solvente:agua; el polímero sintetizado exhibió una buena calidad óptica, con un pico de absorción a 350 nm. Por otro lado, Cui *et al.* (2010)⁶ realizaron la polimerización enzimática oxidativa con HRP de poli-(4-[benzilideno-amino]-fenol) (PBP) y poli-(4-[(antracén-9-ilmetileno)-amino]-fenol) (PAP) (figura 11 incisos b y c) en una mezcla de dioxano y solución amortiguadora de fosfatos, obteniendo pesos moleculares entre 2,400 y 2,900 g/mol de PBP y PAP, respectivamente, con rendimientos de hasta 93%; estos materiales mostraron menores energías de transición $\pi - \pi^*$ que la

correspondiente al fenol (hasta 86 nm). Asimismo, Turac *et al.* (2010)¹⁰ sintetizaron enzimáticamente, con el uso de HRP, el poli-(4-[(4-fenilazo-fenilimino)-metil]-fenol) (P(4-PPMP)), (figura 11 inciso d) en soluciones acuosas de varios disolventes (acetona, metanol, etanol, dimetilformamida y 1,4-dioxano), con pesos moleculares de cerca de 8,000 g/mol. Dicho polímero tenía una banda de energía prohibida de 3.36 eV, lo cual lo hace interesante para aplicaciones en el campo de la electro-óptica. También, Zaragoza-Gasca *et al.* (2011)⁷ en el laboratorio describieron recientemente la polimerización enzimática de 4-fluoroguaiacol con HRP en medio [BMIM][BF₄] acuoso (figura 11 inciso e) con un rendimiento de 33%, un peso molecular de 2,300 g/mol y un PDI de 1.3. La estructura fue de casi un 90% tipo fenil-oxi y el polímero sintetizado mostró una fotoconductividad de hasta 6 órdenes de magnitud mayores a la conductividad en oscuridad.

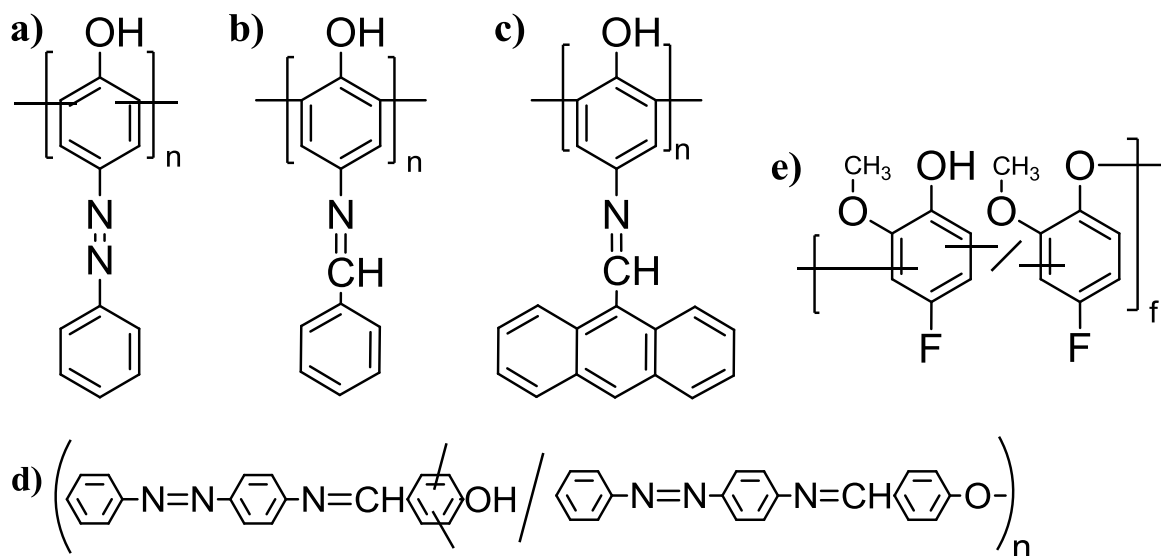


Figura 11. Estructuras de derivados polifenólicos sintetizados enzimáticamente con propiedades electro-ópticas.

1.4.2. Dopaje de derivados polifenólicos sintetizados enzimáticamente con propiedades electro-ópticas

Existen trabajos recientes sobre el dopaje de materiales obtenidos mediante polimerizaciones oxidativas enzimáticas con peroxidasas de estructuras tipo

polifenol, poliluminol y polipirrol, lo que indica lo novedoso de este campo y los potenciales avances hasta el momento en la producción de éstos. Bilici *et al.* (2010)⁹ realizaron la polimerización de poli-(2-hidroxicarbazol) (PHC) (figura 12 inciso a) en dioxano acuoso con HRP; posteriormente el polímero se dopó exponiéndolo a vapor de iodo, incrementando su conductividad cerca de 5 órdenes de magnitud después de 120 h de exposición. Por su parte, Nabid *et al.* (2011)¹¹ publicaron la síntesis de complejos poliluminol-poliestirensulfonato (PLUM-PSS). Dicha polimerización se llevó a cabo usando HRP en solución amortiguadora de fosfatos a pH 8. Estos complejos poliméricos (figura 12 inciso b) exhibieron quimioluminiscencia con rendimientos cuánticos moderados. De igual manera, Bouldin *et al.* (2011)⁶² describieron la síntesis de polipirrol (PPy) mediante la polimerización oxidativa de pirrol a bajas temperaturas usando SBP como biocatalizador en medios acuosos no tóxicos, y dopantes como poli 4-estirensulfonato de sodio (PSS), ácido 10-canforsulfónico (CSA), poli-(ácido vinilfosfónico) y ácido cítrico. La conductividad de los complejos poliméricos (p.e.: PPy-PSS, figura 12 inciso c) se relacionó con el tamaño de la molécula dopante y con su constante de disociación, siendo mayor cuando se dopó con CSA y menor cuando se usó ácido cítrico.

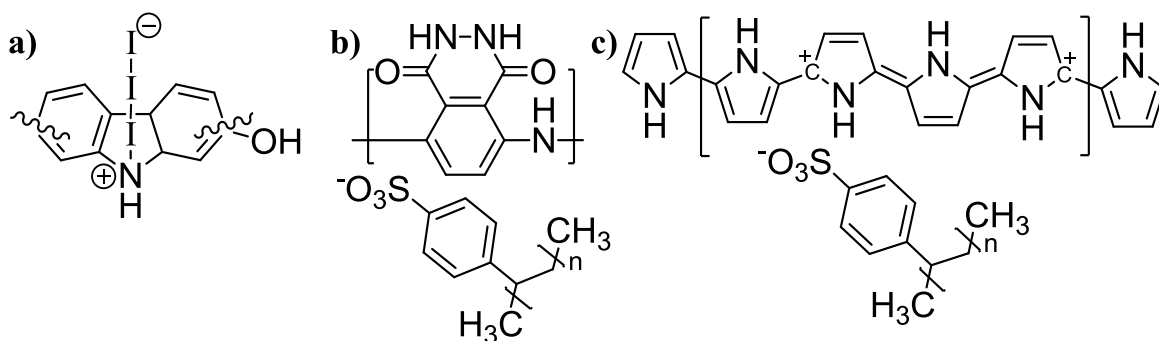


Figura 12. Estructuras de materiales dopados con propiedades electro-ópticas sintetizados mediante polimerizaciones oxidativas enzimáticas.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Si se usan enzimas oxidoreductasas para catalizar la polimerización oxidativa de AG y 4FG, entonces se obtendrán nuevos materiales orgánicos con propiedades electro-ópticas.

2.2. Objetivo general

- Evaluar variables clave en la síntesis enzimática de derivados polifenólicos con propiedades electro-ópticas a partir de AG y 4FG.

2.3. Objetivos específicos

- Realizar la polimerización oxidativa enzimática el AG y el 4FG en medio acuoso, estudiando variables clave en la reacción, tales como pH, medio de reacción, oxigenación y relación enzima/sustrato.
- Caracterizar químicamente los materiales obtenidos.
- Determinar las propiedades electro-ópticas de los materiales.

3. METODOLOGÍA

3.1. Materiales

La LTV (proteína liofilizada libre almacenada a -20 °C, Fluka, EUA) con una actividad de 5 Umg⁻¹. La HRP fue adquirida a Aldrich (EUA), actividad de 493 Umg⁻¹. Las sustancias químicas utilizadas 2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS, Fluka, EUA), AG (Sigma Aldrich, EUA), 4FG (Sigma Aldrich, EUA), metanol (Química Suastes S.A. de C.V., México) y acetona (Química Barsa S. de R.L., México) fueron grado reactivo. Todos los otros compuestos químicos utilizados fueron analíticamente puros y se usaron tal como se recibieron.

3.2. Lugares donde se realizaron los análisis

Los análisis de resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopia infrarroja (FT-IR), difracción de rayos X en polvo (PXRD), calorimetría diferencial de barrido (DSC), termogravimetría (TGA) y microscopía confocal de barrido por láser (LSCM) se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química (FQ). Por su parte, las determinaciones de conductividad y espectrofotometría de fotoluminiscencia (PS) se llevaron a cabo en el Laboratorio de Propiedades Ópticas del Instituto de Física (LPO-IF). Por otro lado, la voltamperometría cíclica (CV) se efectuó en el laboratorio 222 E de la FQ. Mientras que los espectros de masas por ionización-desorción láser asistida por matriz acoplada a detector de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) se adquirieron en el Instituto de Química de la UNAM. Finalmente, los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono en estado sólido (RMN ¹³C CP-MAS) y en líquido del AG se obtuvieron en el laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa (UAM-I).

3.3. Determinación de la actividad enzimática

La actividad de la LTV se midió espectrofotométricamente, a 420 nm (coeficiente de extinción $E_{420} = 36,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y 25 °C. La reacción se inició agregando 25 μL de una solución enzimática (1 mgmL^{-1}) a 2.9 mL de ABTS (9.1 mM) disuelto en amortiguador monofosfato (pH 5, 100 mM) y midiendo la variación de la absorbancia utilizando un espectrofotómetro Lambda 2S UV-Vis (Perkin Elmer, EUA).⁶³ La actividad se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1.0 μmol de ABTS por minuto a pH 5 y 25 °C. El efecto desactivante de los co-solventes orgánicos sobre la enzima se estudió usando el mismo procedimiento, diluyendo una solución concentrada de la enzima (2 mgmL^{-1}) en el co-solvente orgánico hasta la concentración deseada (1 mgmL^{-1} de proteína en 30, 40 y 50% de solvente orgánico). Estas soluciones se mantuvieron en agitación (a 200 rpm y 25 °C). La actividad residual se determinó cada 12 h entre las cero y las 48 h bajo tratamiento de la proteína en la solución de co-solvente orgánico.

3.4. Caracterización química de los productos

Los espectros de RMN de protón (^1H), de carbono (^{13}C), protón-protón por espectroscopia de correlación (^1H - ^1H COSY), heteronuclear protón-carbono por correlación cuántica simple (^1H - ^{13}C HSQC), heteronuclear protón-carbono por correlación de enlaces múltiples (^1H - ^{13}C HMBC) se recolectaron en un espectrómetro modelo Unity Innova 400 (Varian, EUA) mientras que los de flúor (^{19}F) en un espectrómetro modelo Unity Innova 300 (Varian, EUA). Los productos de AG (20 mg) se disolvieron en agua deuterada (D_2O) y dimetilsulfóxido deuterado ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), mientras que los derivados de 4FG (20 mg) en cloroformo deuterado (CDCl_3), debido a sus diferentes solubilidades. Los espectros RMN ^{13}C CP-MAS se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance II 300 (Alemania) a 75 MHz, equipado con un detector CP-MAS BB (BroadBand, diámetro de 4 mm, MAS de 8 kHz).

Por su parte, los M_n y PDI de los derivados fenólicos se midieron mediante Cromatografía de Exclusión Molecular (SEC) en un cromatógrafo Agilent 1210 series (EUA). Para los productos de polimerización oxidativa de AG se utilizó una columna Ultrahydrogel 500 (7.8 x 300 mm, Waters, EUA) y una solución 0.1 M de LiCl en agua desionizada como fase de elución (para evitar la formación de agregados) a un flujo de 0.8 mL/min y 30 °C, así como un detector de índice de refracción (RID). Estándares de polietilenglicol fueron usados para la calibración; tanto los estándares como las muestras de producto fueron disueltas en la fase móvil (entre 1.5 y 2.5 mgmL⁻¹) y filtradas (0.45 µm) antes de inyectarse al cromatógrafo. Por otro lado, las muestras derivadas de 4FG se analizaron en el mismo equipo pero usando cloroformo (grado espectrofotométrico) como fase móvil en dos columnas PLgel 10 µm MIXED-B LS (300 x 7.5 mm, Varian, EUA) conectadas en serie a 0.8 mL/min y 30 °C usando un detector UV-Vis a 270 nm; en este caso, estándares de poliestireno (Varian, EUA) se utilizaron para la calibración disueltos en cloroformo (2.5 mgmL⁻¹) al igual que las muestras (entre 0.5 y 1 mgmL⁻¹) y filtradas previo a su inyección.

Por otro lado, la espectroscopia FT-IR se realizó utilizando un espectrofotómetro ATR FT-IR Spectrum 400 (Perkin Elmer, EUA) mientras que los espectros de PXRD se adquirieron en un difractómetro de rayos X, modelo D8 Advance Davinci (Bruker, Alemania). Las muestras fueron perfectamente pulverizadas antes de su análisis. El porcentaje de cristalinidad se determinó mediante la integración de las respectivas áreas cristalinas y amorfas del espectro.

A su vez, los espectros de MALDI-TOF se adquirieron en un espectrómetro de masas MicroFlex (Bruker, Alemania) en modo lineal positivo (150 disparos); como matriz se utilizó ácido *trans*-3-indoleacrílico disuelto en una mezcla dioxano/dicloroetano 1:1 (10 mgmL⁻¹). Se disolvieron 2 mg de la muestra en 0.5 mL de la mezcla dioxano/dicloroetano para posteriormente mezclar 5 µL tanto de la solución de la matriz como de la muestra disuelta; una alícuota de 1 µL se tomó de esta mezcla y se colocó en el muestreador, dejando evaporarse los solventes a

temperatura ambiente antes del análisis; por su parte, los análisis de DSC y TGA se realizaron en un termoanalizador Mettler-Toledo (Suiza) con módulos DSC-1 y TGA/SDTA 851^o. La rapidez de calentamiento fue de 10 °C/min bajo una atmósfera de nitrógeno. Antes de cada corrida se realizó una rampa inicial hasta 100 °C para eliminar volátiles.

Finalmente, la titulación de hidroxilos se realizó solamente a los derivados de 4FG. De cada muestra, así como del monómero, se pesaron entre 3.0 y 4.5 mg por duplicado en tubos de ensayo roscados: al primero se le agregó 1 mL de piridina y al otro 1 mL de una solución al 0.5% de anhídrido acético en piridina. Estos tubos se taparon y se colocaron en un baño de glicerina a 100 °C durante una hora, utilizando un portatubo de ensayos y colocando un baño de hielo por encima para condensar lo volatilizado. Transcurrido este tiempo, se retiraron del baño de glicerina y se dejaron enfriar, para enseguida agregarles 20 µL de agua destilada, recolocándolos en el baño a 100 °C durante 10 minutos. Después de enfriarse hasta temperatura ambiente nuevamente, se tituló cada tubo de ensayo con una solución de KOH en etanol (0.015 N valorada con una solución estándar 0.405 N de HCl) utilizando fenoltaleína disuelta en etanol (10 gL⁻¹) como indicador. Este mismo procedimiento se utilizó en un blanco de la solución de anhídrido acético en piridina. El número de hidroxilos (#OH) fue calculado utilizando la siguiente ecuación:⁶⁴

$$\#OH = \frac{B + \left(\frac{SA}{C}\right) - V}{S} N \cdot (56.1)$$

donde :

B (mL) = cantidad de la solución de KOH requerida para la titulación del blanco de la solución de anhídrido acético en piridina.

S (g) = cantidad de muestra disuelta en la solución de anhídrido acético en piridina.

A (mL) = cantidad de la solución de KOH requerida para la titulación de la muestra disuelta en piridina.

C (g) = cantidad de la muestra disuelta en piridina.

V (mL) = cantidad de la solución de KOH requerida para la titulación de la muestra disuelta la solución de anhídrido acético en piridina.

N = normalidad de la solución de KOH.

3.5. Polimerizaciones oxidativas enzimáticas

3.5.1. Polimerización oxidativa del AG

Para llevar a cabo la polimerización oxidativa del AG se utilizaron 850.6 mg (5 mmol) de AG en una mezcla de 25 mL de solución amortiguadora de acetatos (250 mM a pH 5) y 2 mL de NaOH (2 M) en un matraz de bola de 50 mL equipado con un agitador magnético. Esta mezcla de reacción se acondicionó a 25 ± 1 °C y 500 rpm en un agitador con control de temperatura (RCT basic safety control IKAMAG®, EUA) mientras se burbujeaba aire usando una bomba Elite 800 (Hagen Inc, Canadá) hasta alcanzar una concentración inicial de oxígeno disuelto (DO) de 6 mg mL^{-1} , medida con un sensor de oxígeno Aplisens conectado a un controlador ez-OD (Applikon, Holanda). Posteriormente, se agregó la enzima (tabla 1) y la mezcla de reacción se mantuvo a 25 °C y 500 rpm manteniendo el burbujeo de aire durante el tiempo de reacción; finalizado este tiempo, la mezcla de reacción se precipitó gota a gota en metanol (grado técnico) frío (5 °C) bajo agitación (300 rpm). Esta mezcla se dejó sedimentar durante 12 h a temperatura ambiente, para posteriormente filtrarla (filtros de membrana Durapore® 0.45 μm); después, los sólidos recuperados se congelaron a -80 °C y se secaron al vacío durante dos horas. El polvo de color negro brillante recuperado se pesó y se calculó el rendimiento con base en el porcentaje peso del material purificado entre el peso de sustrato inicial. En el análisis elemental se encontró C 49.75%, H 2.53%; $(\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_5)_n$ requiere C 50%, H 2.43%. ^{13}C RMN (δ , ppm, D_2O): 177 (1C, COOH), 146 (1C, =C-OH), 133 (s, b, 2C, =C-OH), 108 (s, b traslapado, 3C, C=C-C y C-

COOH). FT-IR (λ , cm^{-1}): 3,000–3,400 (banda ancha, tensión O-H); 1,350 y 1,060 (torsión O-H fenólico tensión de C-O fenólico); 1,570 (tensión C=C aromático).

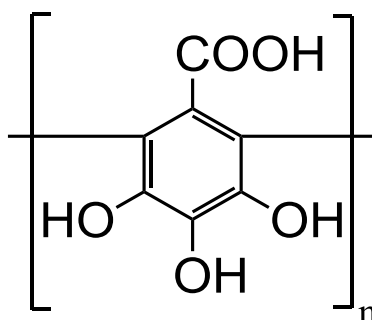


Figura 13. Estructura del derivado de AG sintetizado en este proyecto.

3.5.2. Polimerización oxidativa de 4FG

Para sintetizar los derivados de 4FG, se mezcló la solución amortiguadora de acetatos (250 mM a pH 5) con el co-solvente orgánico (acetona o metanol, a las proporciones indicadas en la tabla 2) en un matraz de bola de 50 mL equipado con un agitador magnético y se agregaron 711 mg de 4FG (5 mmol). Posteriormente, se agregaron 25 U de biocatalizador y la mezcla de reacción se agitó a 400 rpm y 25 ± 1 °C usando un agitador con control de temperatura por 24 y 48 h, monitoreando el DO durante este tiempo. Ya que el producto precipitó durante la reacción, al finalizar el tiempo de reacción la mezcla se hizo pasar por un filtro de membrana y los sólidos recuperados se congelaron a -80 °C y se secaron al vacío, recuperándose los productos como polvos de color *beige*. El rendimiento se calculó de la forma previamente descrita. Se encontró en el análisis elemental C 66.72%, H 4.58%; $(\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2)_n$ requiere C 68.85%, H 4.92%. ^1H RMN (δ , ppm, CDCl_3) 7.03 – 6.83 (bs, 1H, =C-C=CH-C-OR), 6.82 – 6.58 (bs, 1H, CH=C-OCH₃), 6.46 – 6.30 (bs, 1H, (=C-CH=C-C-OR), 3.86 – 3.73 (bs, 3H, =C-O-CH₃). ^{13}C RMN (δ , ppm, CDCl_3), señales principales: 155.93 (=C-O-C=), 152.25 (=C-O-CH₃), 139.13 (=C(COCH₃)-OR), 121.74 (=C-C=C-C-OR), 107.66 (=C-C=C-C-OR), 102.55 (C=C-OCH₃), 55.98 (CH₃-O-). ^{19}F RMN (δ , ppm, CDCl_3) -115.11 (bs, 1F). FT-IR (λ , cm^{-1}): 3,580 – 3,330 (tensión O-H); 3,082, 3,004 (tensión C-H aromático),

2,836 (tensión -O-CH₃), 1,608, 1,493 (tensión C=C aromático), 1,255 (vibración C-O-C), 1,185 (vibración C-O), 1,145, 1,115, 1,025 (torsión en el plano C-H aromático, reforzada por el sustituto halógeno).

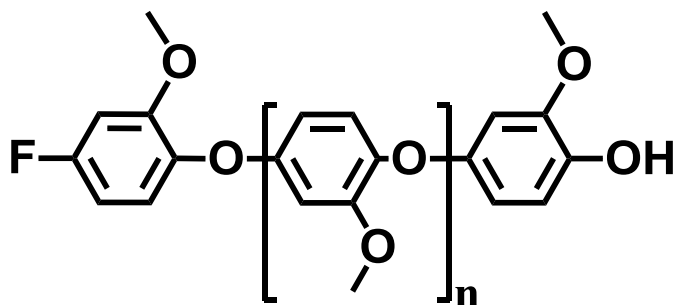


Figura 14. Estructura del derivado de 4FG sintetizado en este proyecto.

3.6. Caracterización electro-óptica

Como parte de la caracterización electro-óptica se realizó espectrofotometría UV-Vis de los derivados polifenólicos en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2S UV-Vis (EUA); la absorbancia se midió entre 200 y 700 nm. Para este análisis, los derivados se disolvieron previamente en agua destilada (de AG, 0.1 mgmL⁻¹) o cloroformo (de 4FG, 1 mgmL⁻¹).

Por su parte, la conductividad en estado sólido de los distintos productos obtenidos se determinó utilizando un dispositivo fabricado en el LPO-IF, que consta de un portamuestras con terminales de cobre conectado a un electrómetro digital de precisión programable 6512 (Keithley, EUA) y a una fuente de voltaje de laboratorio MPS-3005D (Matrix Electrónica, España), de acuerdo al diagrama mostrado en la figura 15.

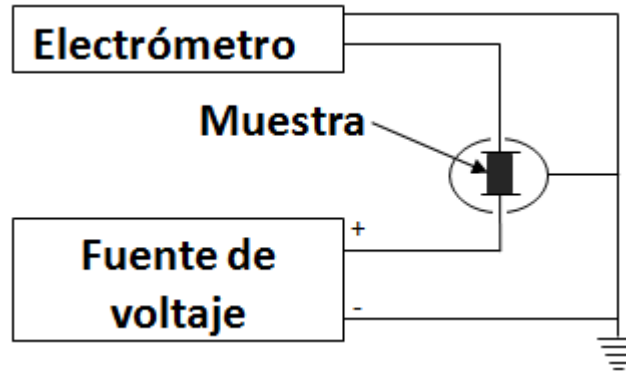


Figura 15. Diagrama del sistema de medición de la conductividad en estado sólido.

Con la ayuda de un pastillador de acero inoxidable, se hicieron pastillas de aproximadamente 5 x 4 x 1 mm de las muestras (cada pastilla hecha se midió con un calibrador vernier para determinar sus dimensiones hasta una precisión de ± 0.1 mm); estas pastillas se colocaron entre las terminales de cobre y se hizo pasar una corriente eléctrica directa con voltajes de entre 5 y 30 V cada 5 V, midiendo la corriente que se conducía a través de la muestra con ayuda del electrómetro. Debido a que la resistividad es dependiente de la geometría del material (de acuerdo a la fórmula $\rho = R \cdot S / l$, donde R es la resistencia medida en ohms, S es la superficie en contacto con los electrodos medida en m^2 y l es la longitud de la distancia entre los electrodos en metros) y que R es igual al voltaje aplicado entre la intensidad de corriente que pasa por la muestra (de acuerdo al circuito equivalente mostrado en la figura 16), al conocer éstas y la geometría de cada muestra fue posible determinar su conductividad en estado sólido con la Ley de Ohm: $\sigma = \rho^{-1}$, calculando el promedio de las conductividades bajo los diferentes campos eléctricos aplicados.

Por otro lado, la fluorescencia de la muestras se determinó utilizando un microscopio confocal de barrido por láser Olympus Fluoview FV 1000 (Japón) usando películas por fundición de las muestras sobre cubreobjetos de vidrio (2.2 x 2.2 cm); dichas películas se fabricaron colocando una pequeña cantidad de muestra en forma de polvo sobre un cubreobjetos, para enseguida colocarlo sobre una placa de calentamiento a 200 °C; cuando se fundió la muestra se cubrió con

otro cubreobjetos (área mínima de la película: 50 mm²). Se obtuvieron imágenes en 4 canales: CH1: λ_{ex} 405 nm, λ_{em} 425-460 nm; CH2: λ_{ex} 473 nm, λ_{em} 485-545 nm; CH3: λ_{ex} 559 nm, λ_{em} 575-620 nm; CH4: λ_{ex} 635 nm, λ_{em} 655-755 nm. Una vez obtenidas las imágenes, se procesaron con el software incluido en el equipo para obtener una integración de la intensidad de fluorescencia por el área de la imagen, lo que permitió cuantificar dicha fluorescencia expresada como la intensidad de fluorescencia por área (unidades arbitrarias por μm^2).

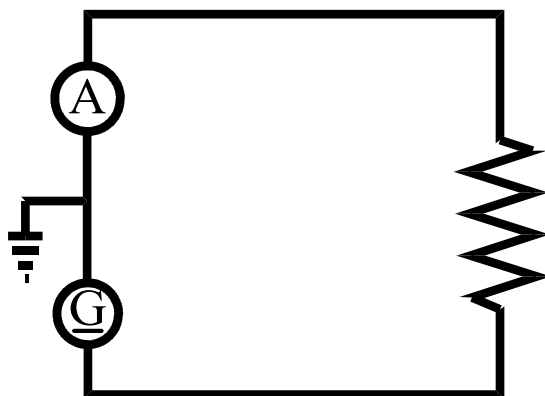


Figura 16. Circuito eléctrico equivalente al dispositivo utilizado para determinar la conductividad de los productos de polimerización oxidativa.

A su vez, la PS se realizó utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia LS-55 (Perkin Elmer, EUA). La fotoluminiscencia de los productos de AG se determinó colocándolas en el portamuestras en forma de pastillas, mientras que en el caso de los derivados de 4FG, se utilizaron las mismas películas utilizadas en el análisis de LSCM. En este análisis, se hizo incidir sobre la muestra un rayo de luz de longitud de onda conocida, mientras que se medía la intensidad y la longitud de onda de la luz emitida por la muestra.

Finalmente, la CV se realizó a los derivados de AG. Ésta se realizó a temperatura ambiente y sin agitación en un Potenciostato-Galvanostato 263 A (Princeton Applied Research, EUA) en una celda convencional de tres electrodos compuesta de un disco de platino con una superficie de 0.008 cm² como electrodo de trabajo, alambre de plata como electrodo de referencia y alambre de platino

como electrodo auxiliar; como electrolito de soporte se empleó una solución 0.1 N de NaOH. El potencial de circuito abierto (OCP) se midió durante 10 min, mientras que los barridos se iniciaron en el OCP hacia un valor positivo de hasta 1.35 V vs Ag/Ag⁺, seguido de una inversión hacia potenciales negativos hasta -0.2 V vs Ag/Ag⁺. De la gráfica de la corriente como función del potencial, se determinó el valor de corriente del pico de reducción; el valor de este pico se graficó posteriormente como función de la velocidad de barrido para realizar un ajuste lineal por el método de mínimos cuadrados.

4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Polimerización oxidativa enzimática del AG

4.1.1. Pruebas preliminares con la enzima HRP

En un principio, se realizó la polimerización oxidativa del AG mediante acción enzimática usando el biocatalizador HRP. Se obtuvieron rendimientos de entre 5 y 10%, probando diferentes relaciones enzima/sustrato, tiempos de reacción (máximo dos horas de agregado del H₂O₂ por goteo) y pH inicial, obteniendo un producto con un M_n , determinado por SEC, de entre 4,000 y 5,000 g/mol. Sin embargo, la conductividad de todos los productos obtenidos mediante la actividad de esta enzima, se encontraron entre 10^{-10} y 10^{-8} Sm⁻¹; es decir, se comportaron como aislantes, al igual que el AG ($\sigma = 10^{-10}$ Sm⁻¹); tampoco se encontraron otras propiedades electro-ópticas en el material, como luminiscencia o fotoconductividad. La ausencia de conductividad eléctrica podría deberse a que la propagación pareció ser del tipo fenil-oxi (figura 17) mayoritariamente, ya que la caracterización de los productos por RMN ¹H (figura 18) dio como resultado la aparición de señales de protón en la zona aromática.

Este tipo de propagación desfavorece enormemente la conductividad debido a que se pierde la deslocalización electrónica con la presencia del heteroátomo. Ante la falta de exhibición de propiedades electro-ópticas, no se consideró de interés proseguir con la caracterización y se decidió probar otro biocatalizador, en este caso la LTV.

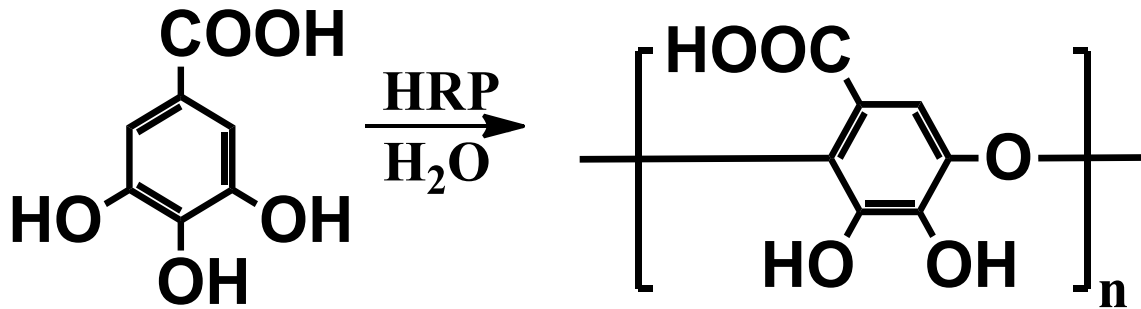


Figura 17. Esquema de reacción propuesto para la polimerización oxidativa enzimática de AG con HRP.

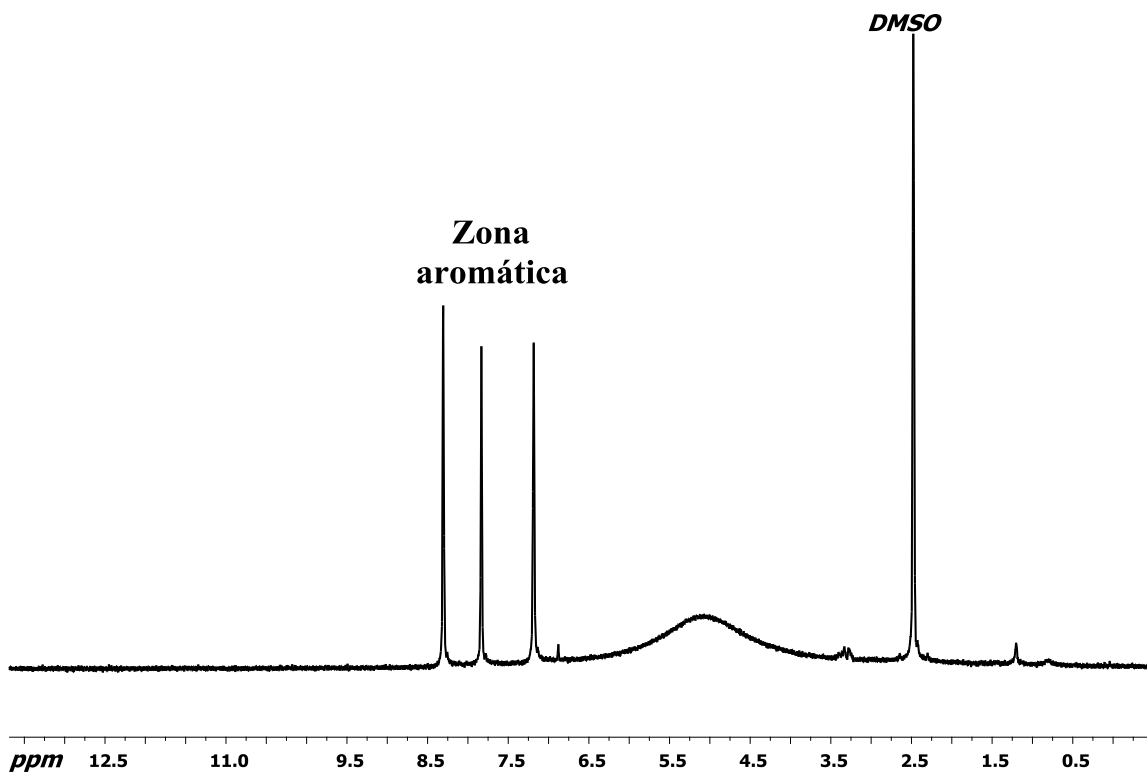


Figura 18. Espectro de RMN ^1H de un derivado de AG obtenido con HRP.

4.1.1. Efecto de la concentración del AG sobre la actividad de LTV

En la figura 19 se muestra la variación de la velocidad inicial (expresada como la variación de oxígeno disuelto en $\text{gm}^{-3}\text{s}^{-1}$) contra la concentración inicial de AG. Es posible observar que dicha velocidad exhibió un comportamiento tipo Michaelis-Menten, alcanzando un máximo de velocidad a bajas concentraciones

de AG (10 mM). Esto indica una mayor afinidad de esta enzima por el AG como sustrato, como se determinó por medio de la K_m (calculada por medio de la gráfica de Lineweaver-Burk, $r^2=0.93$) de 0.418 mM, comparada con la lacasa de *Rhus vernicifera*, ya que la K_m para el AG dada a conocer por Tianzhi *et al.* (1997)⁶⁵ fue de 6.92 mM.

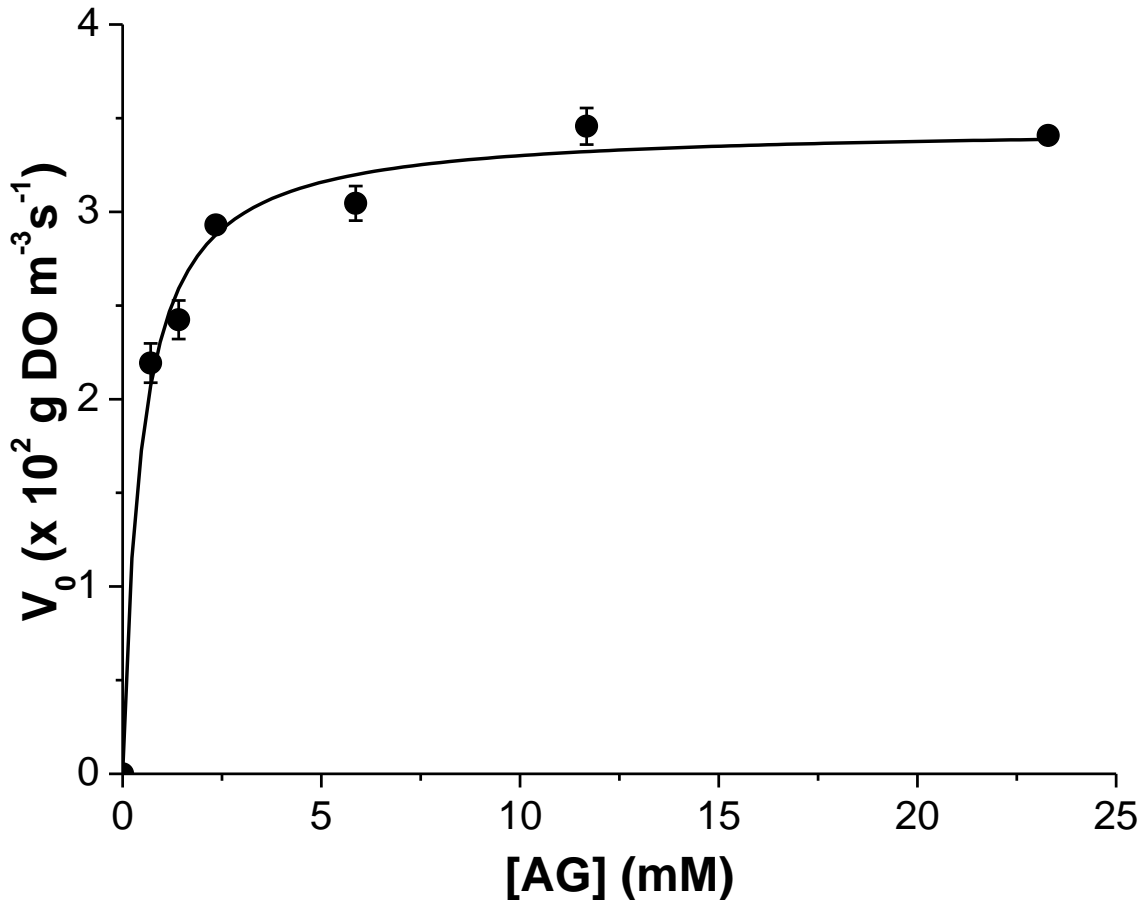


Figura 19. Velocidad inicial de reacción enzimática de LTV a diferentes concentraciones de AG

Estos resultados indican que al no airear, el oxígeno disuelto disponible para la reacción enzimática se agota al no existir una adecuada difusión del oxígeno molecular de la atmósfera hacia el medio de reacción, lo que limita notablemente la capacidad enzimática para llevar a cabo la reacción por ausencia de sustrato.

4.1.2. Polimerizaciones oxidativas con LTV

Como se ha mencionado, debido a los resultados adversos obtenidos con la HRP, se decidió cambiar esta enzima por LTV. Las reacciones enzimáticas de polimerización del AG con LTV se realizaron como se ha descrito en la sección experimental respectiva, con la diferencia de que se probaron diferentes pH iniciales (5, 6 y 7) sin aireación. Los rendimientos de dichas reacciones se muestran en la figura 20 (símbolos vacíos), al igual que los de las reacciones llevadas a cabo a pH 5 con aireación (símbolos llenos), de acuerdo a las condiciones establecidas en la tabla 1.

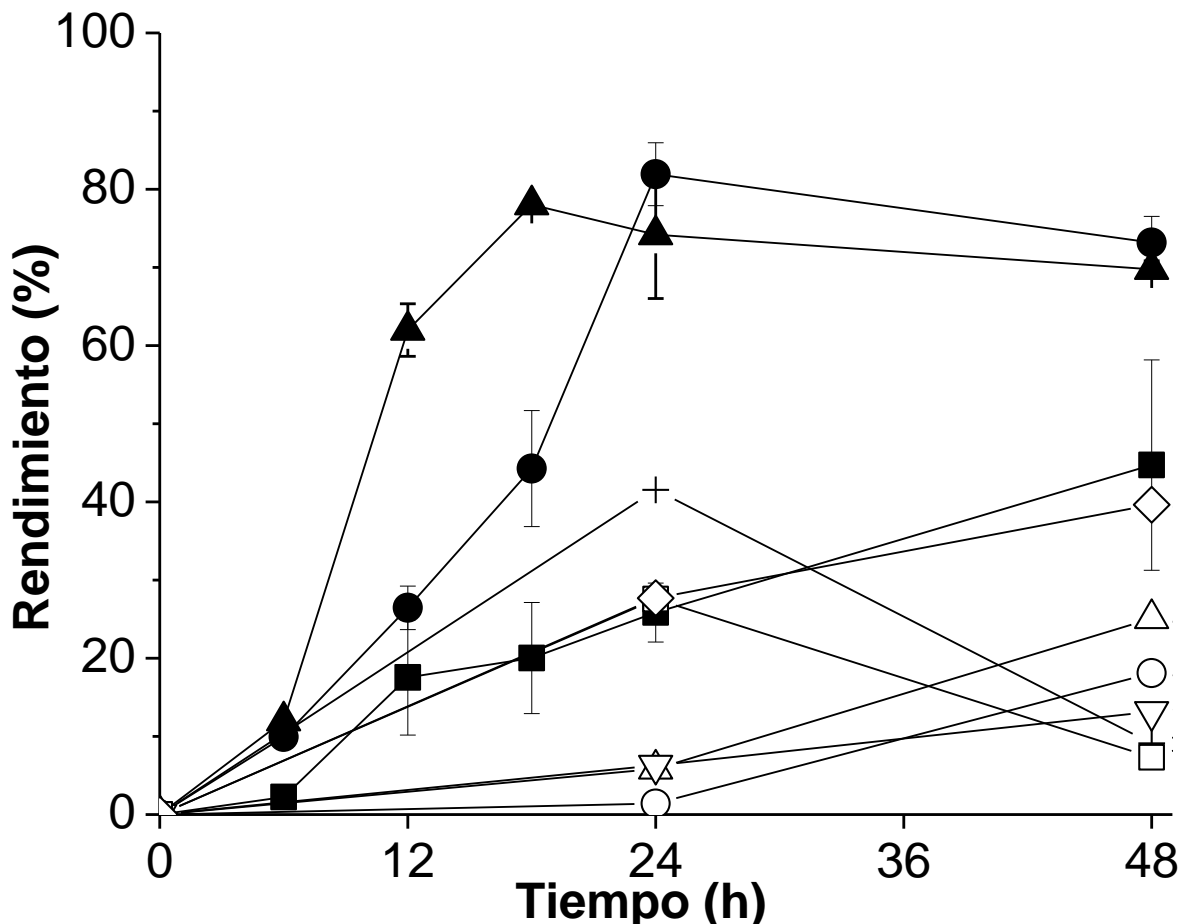


Figura 20. Rendimiento de las reacciones de polimerización oxidativa de AG a diferentes tiempos de reacción. A pH 5 y aireado con 12.5 (■), 25.0 (●) y 50.0 (▲) U de enzima; a pH 5 y sin aireado con 25.0 (○) y 50.0 (△) U de enzima; a pH 6 y sin aireado con 25.0 (+) y 50.0 (▽) U de enzima; a pH 7 y sin aireado con 25.0 (□) y 50.0 (◇) U de enzima.

Tabla 1. Condiciones experimentales de las reacciones con aireación a pH 5.

Derivado de AG	U de enzima	Tiempo (h)	PDI ^a	m ^b	r ^{2b}
1	12.5	6	1.04	0.784	0.991
2	12.5	12	1.05	0.640	0.975
3	12.5	18	1.05	0.713	0.963
4	12.5	24	1.05	0.765	0.992
5	12.5	48	1.07	0.758	0.996
6	25.0	6	1.04	0.889	0.995
7	25.0	12	1.05	0.895	0.993
8	25.0	18	1.05	0.807	0.999
9	25.0	24	1.07	0.868	0.993
10	25.0	48	1.10	0.864	0.999
11	50.0	6	1.05	1.019	0.985
12	50.0	12	1.05	0.953	0.990
13	50.0	18	1.06	0.836	0.999
14	50.0	24	1.10	0.865	0.999
15	50.0	48	1.12	0.864	0.999

^aDeterminado por SEC *software*. ^bCalculado por ajuste lineal a partir de resultados de CV.

Se observó que los rendimientos fueron menores al no airear la reacción, ya que incluso al utilizar dos veces (25.0 U) y hasta cuatro veces (50.0 U) de enzima, comparado con 12.5 U y aireación a pH 5, los rendimientos alcanzados a 24 h fueron similares. Con respecto a los rendimientos alcanzados con aireación, además se logró observar que se alcanzó un rendimiento máximo de cerca del 80% a las 18 y 24 h cuando se agregaron 50.0 y 25.0 U de biocatalizador, respectivamente, mientras que con 12.5 U de enzima los rendimientos alcanzados fueron siempre menores hasta las 48 h de reacción. Cabe mencionar que el rendimiento máximo alcanzado al agregar 25.0 y 50.0 U de biocatalizador es

superior al reportado en la síntesis química del poli-(ácido gálico) publicado por Kricheldorf y Stukenbrock (1998)⁴³ que fue de 75% global, con las ventajas adicionales, como se había mencionado anteriormente, del uso de un catalizador no tóxico, biodegradable y natural (LTV en lugar de piridina), ahorro energético al llevarse a cabo la reacción a temperaturas menores (25 °C en lugar de 230 °C) y a presión atmosférica en atmósfera de aire en lugar de vacío bajo atmósfera de nitrógeno.

Por su parte, los M_n determinados por SEC (figura 21) alcanzaron valores de entre 2,200 y 3,500 g/mol para las condiciones de síntesis aireadas, mientras que sin aireación los pesos moleculares fueron siempre menores. Esto pudo deberse, nuevamente, a la limitación enzimática por no transferirse adecuadamente el oxígeno de la atmósfera al medio de reacción. Además, los M_n se incrementaron ligeramente conforme se incrementó tanto la cantidad de enzima como el tiempo de reacción. Interesantemente, los PDI de estos derivados fueron bajos (cerca de 1, tabla 1) lo que indica que la propagación de la cadena polimérica se da de manera controlada, como se ha descrito para la polimerización de poli-catecol, poli-resorcinol y poli-hidroquinona por Sun *et al.* (2013).⁶⁶

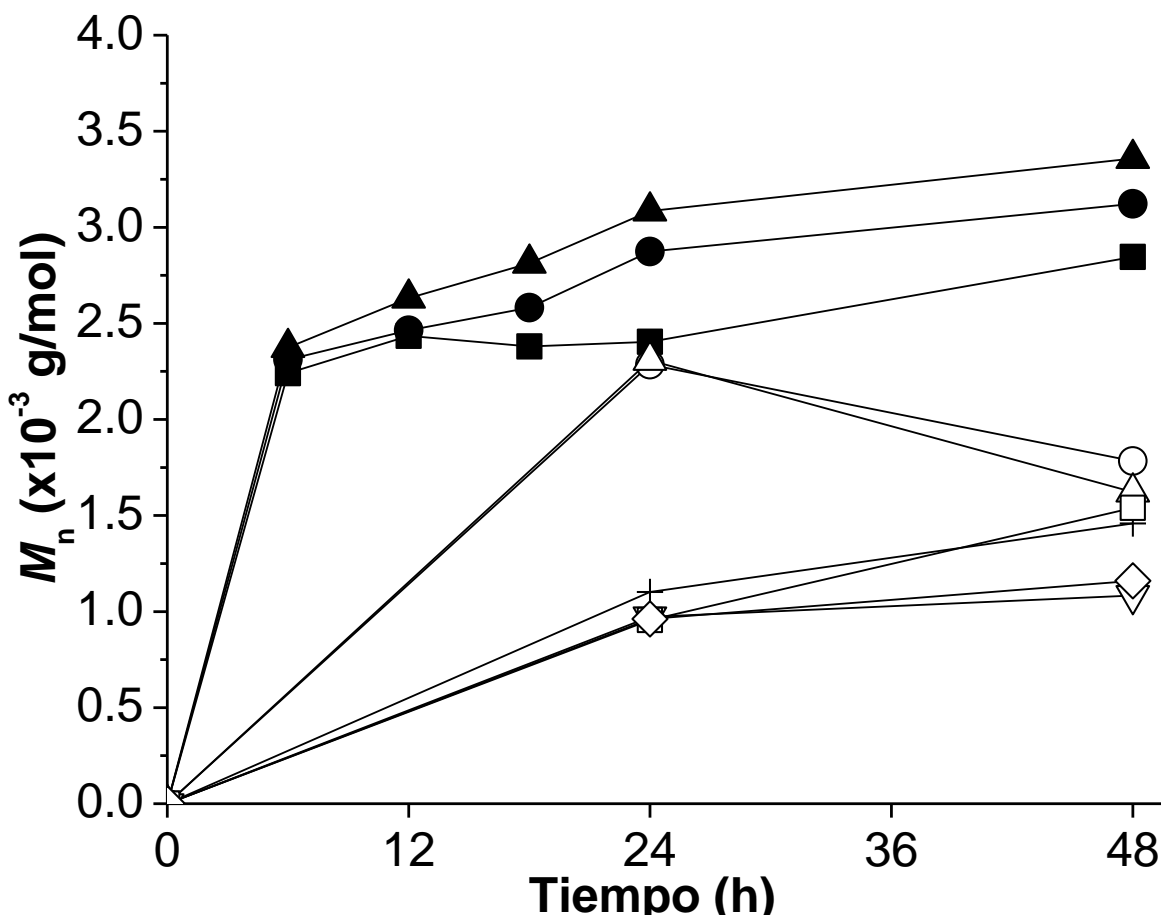


Figura 21. Peso molecular promedio alcanzado bajo las diferentes condiciones de reacción. A pH 5 y aireado con 12.5 (■), 25.0 (●) y 50.0 (▲) U de enzima; a pH 5 y sin aireado con 25.0 (○) y 50.0 (△) U de enzima; a pH 6 y sin aireado con 25.0 (+) y 50.0 (▽) U de enzima; a pH 7 y sin aireado con 25.0 (□) y 50.0 (◇) U de enzima.

Por otro lado, los espectros de RMN ^1H de los derivados sintetizados no mostraron señales en la región aromática (figura 22), en contraste con la del monómero (anexo) y, aún más, si los comparamos con los productos obtenidos usando la HRP. La desaparición de esta señal indicó que el crecimiento polimérico se dio vía enlaces fenil-fenil, a diferencia de los espectros de RMN ^1H de los derivados obtenidos mediante HRP (figura 18) en los que, como se mencionó anteriormente, se observaron señales en la región aromática.

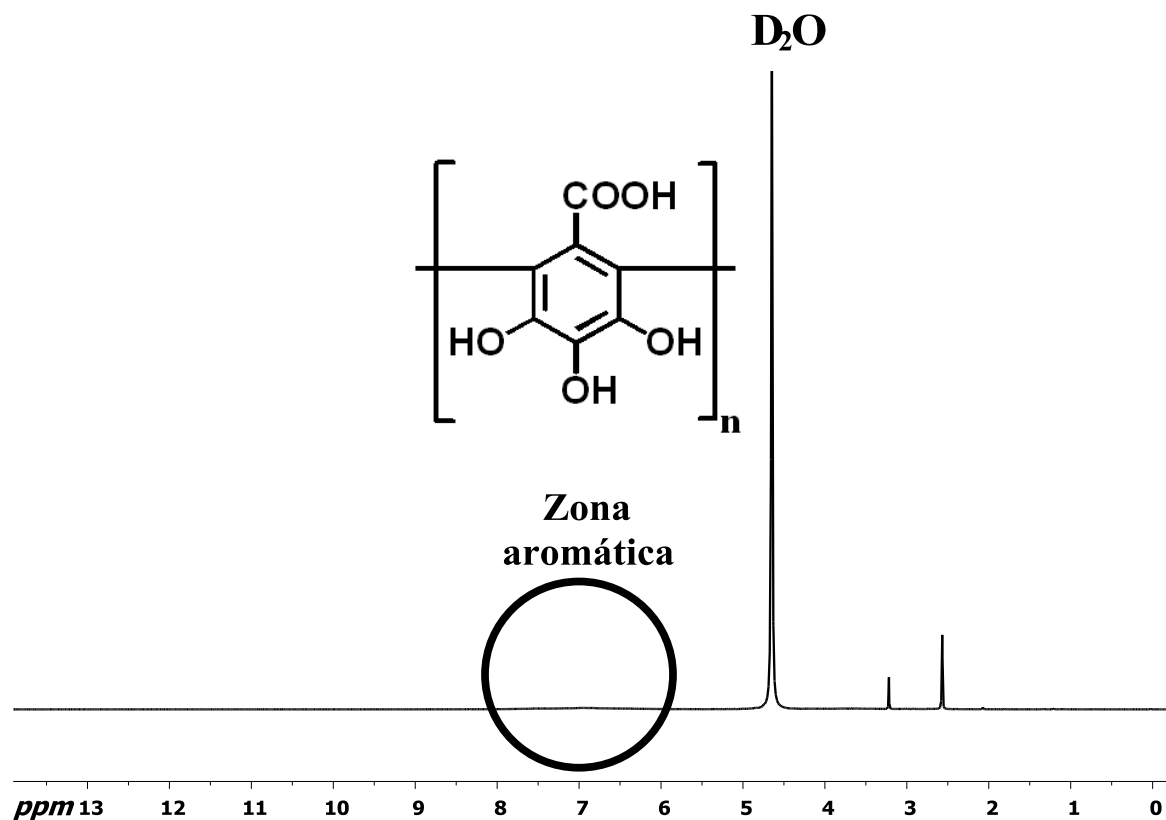


Figura 22. Espectro de RMN ^1H de un derivado de AG obtenido con LTV.

Lo anterior indica que cuando se utilizó la HRP para generar los radicales libres, estos reaccionaron mediante acoplamiento vía fenil-oxi, a diferencia de cuando se utilizó LTV; esto podría ser la razón por la que la conductividad de los derivados obtenidos con HRP fue tan baja como la del monómero. A pesar de que no se puede decir que las dos enzimas probadas puedan tener un control específico sobre la estructura del producto, ya que después de formar los radicales libres en el sitio activo estos se difunden al medio reaccionando al azar (figura 9), la razón por la que exista la diferencia entre las estructuras finales de los productos podría ser la velocidad de generación de los radicales, ya que con HRP la reacción se lleva a cabo en un fracción de tiempo al comparar con la LTV (2 h contra 48 h), lo que indica que desde el principio de la reacción existe una gran población de radicales libres que se acoplan de manera rápida (tanto fenil como fenil-oxi), mientras que con LTV al existir un menor número de radicales comparado con la reacción con HRP, éstos podrían estabilizarse en el anillo, ya

sea por resonancia o transferencia de radical, para posteriormente acoplarse y formar enlaces estables.

Por su parte, la RMN ^{13}C de los derivados de AG mostró señales muy anchas comparadas con las de monómero (inciso A de la figura 23) tanto en líquido como en sólido (RMN ^{13}C CP-MAS), como se muestra en los incisos B y C de la figura 23, respectivamente. En ambos espectros pudieron verse bajas relaciones señal-ruido, especialmente en líquido, a pesar de los largos tiempos de adquisición del espectro (21 h), lo cual podría ser atribuido a que los tiempos de relajación fueron muy cortos debido a la rigidez⁶⁷ del producto por los enlaces fenil-fenil. A pesar de esto, fue posible observar en los espectros de ^{13}C cuatro picos característicos de los derivados, que pueden ser asignados a los carbonos tal como se esquematiza en la figura 23; la señal característica de los carbonos 2 y 6 podría traslaparse con la señal de $\delta = 108$ ppm correspondiente al C1. Cabe señalar que las señales de la RMN ^{13}C CP-MAS tienden a ser muy anchas debido a que en el espectro se observan todas las interacciones anisotrópicas o dependientes de la orientación a diferencia de la RMN en solución. Existen varias técnicas para mejorar esta relación señal-ruido, tal como la rotación a ángulo mágico (MAS) o la polarización cruzada (CP) que incluso pueden ser usadas simultáneamente. No obstante su uso, la relación señal-ruido se mantuvo baja debido probablemente a la razón ya descrita.

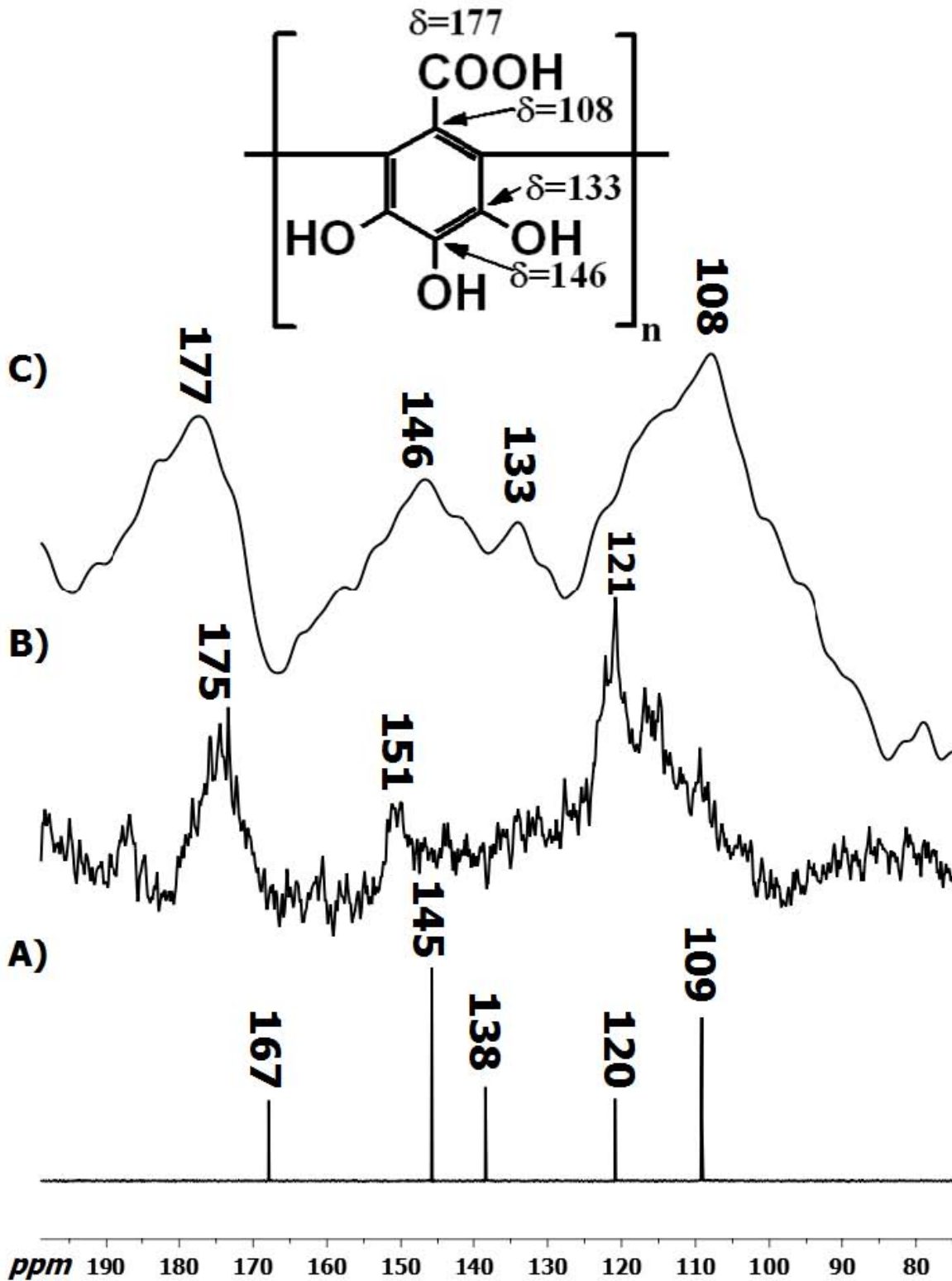


Figura 23. Comparación de los espectros de RMN ^{13}C del monómero (A), RMN ^{13}C (B) y RMN ^{13}C CP-MAS (C) de un derivado de AG.

En los espectros de FT-IR (figura 24) de los derivados, se observaron bandas anchas (indicativos de polimerización); tanto la banda intensa y ancha de entre 3,000 y 3,400 cm^{-1} , indicativo de la presencia de una gran proporción de grupos hidroxilos en los derivados, como la ausencia de una banda entre 1,230 y 1,270 cm^{-1} (característica de enlaces éter C-O-C aromáticos)⁶⁸ son indicativos de una elongación polimérica vía enlaces fenil-fenil entre los carbonos 2 y 6 de la unidad de repetición, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por RMN. Cabe decir que se intentaron obtener espectros de MALDI-TOF, sin embargo nunca se obtuvieron espectros de calidad.

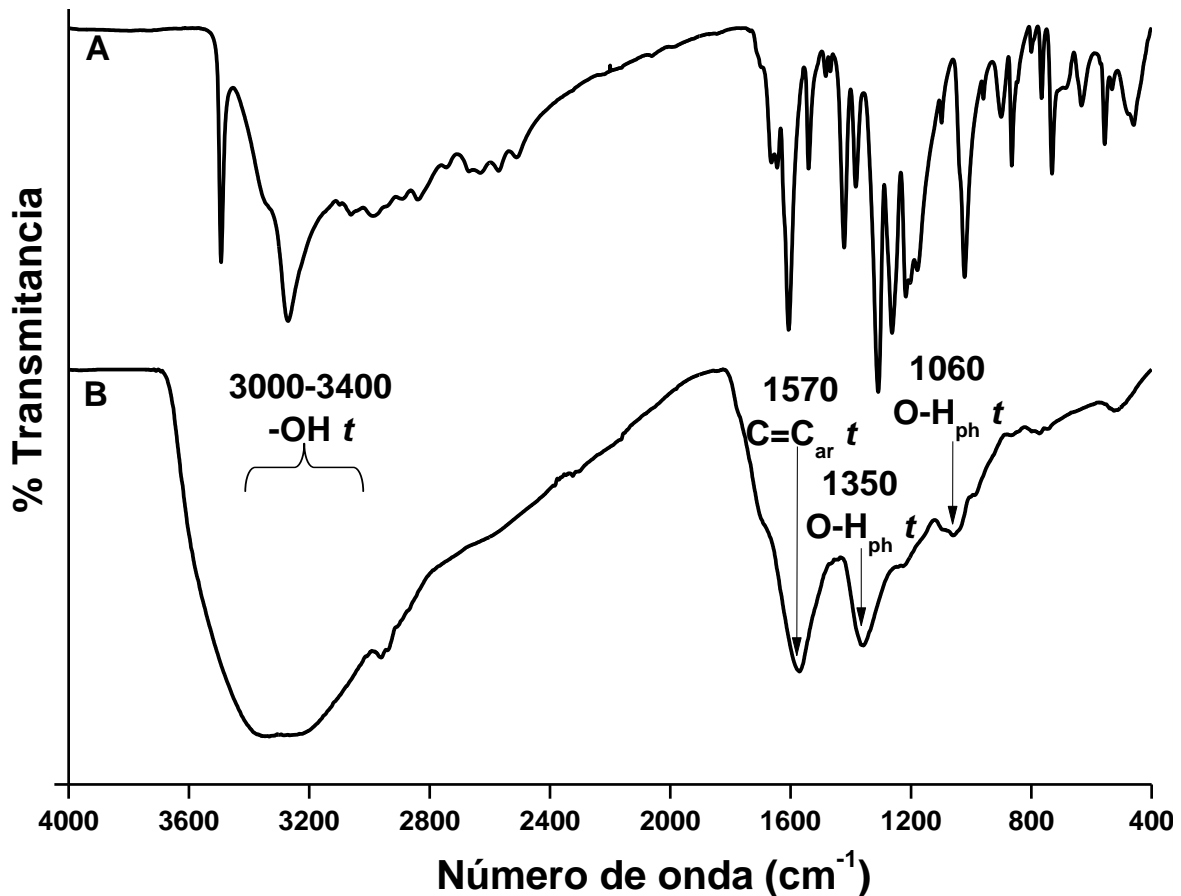


Figura 24. Espectro FT-IR del AG (A) y de un derivado (B). *t*: tensión, *ar*: aromático, *ph*: fenólico.

Con base en la evidencia experimental, se propone un esquema de reacción para la polimerización oxidativa enzimática de AG con LTV de acuerdo a

la figura 25 siguiendo el mecanismo propuesto en la figura 26, en el que radicales fenilos estables se generan ya sea por resonancia o por transferencia y luego se acoplan entre ellos, conduciendo al crecimiento polimérico vía enlaces fenil-fenil. Cabe mencionar que debido tanto al carácter donador de los grupos hidroxilos como al aceptor del grupo carbonilo, la densidad electrónica puede estar favorecida en los carbonos 2 y 6, lo que podría conducir a una estabilización del radical libre en estas posiciones y por lo tanto, favorecer el mecanismo propuesto (figura 26).

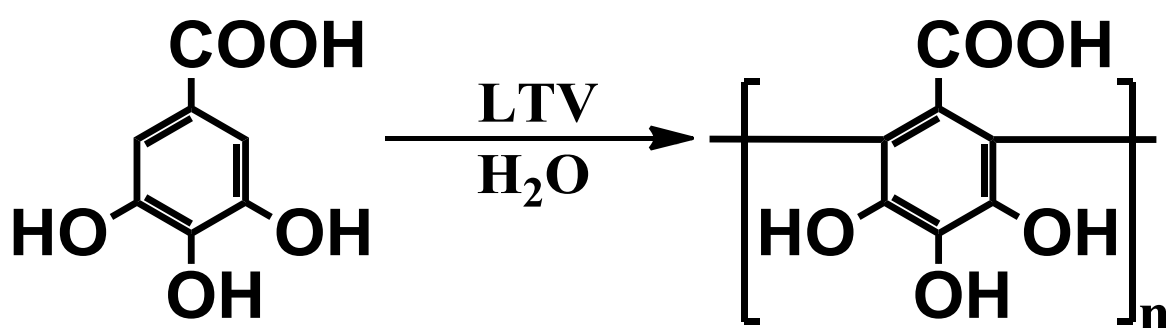
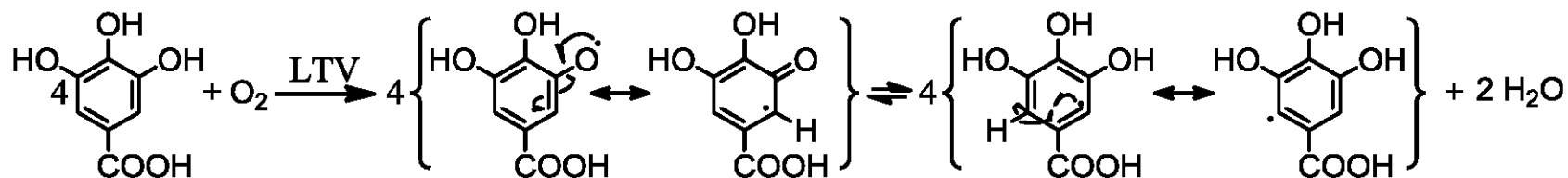


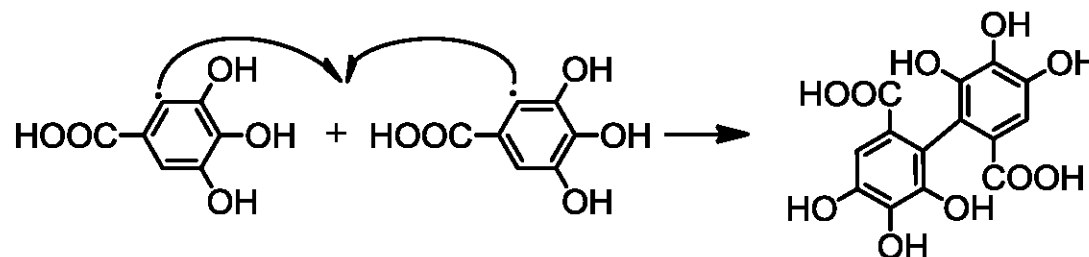
Figura 25. Esquema de reacción propuesto para la polimerización oxidativa enzimática de AG con LTV.

De acuerdo al análisis de TGA, todos los derivados sintetizados exhibieron temperaturas de degradación del 5% en peso alrededor de los 178 °C, lo cual es indicativo de una relativa estabilidad térmica, mientras que de los datos de DSC los derivados no exhibieron temperaturas ni de fusión ni de transición vítrea. A partir de los espectros de PXRD, se determinó que los derivados tuvieron estructura amorfa, a diferencia del monómero cristalino, lo cual es también indicativo de la polimerización (en la sección Anexos se muestran las gráficas de los análisis térmicos y de PXRD).

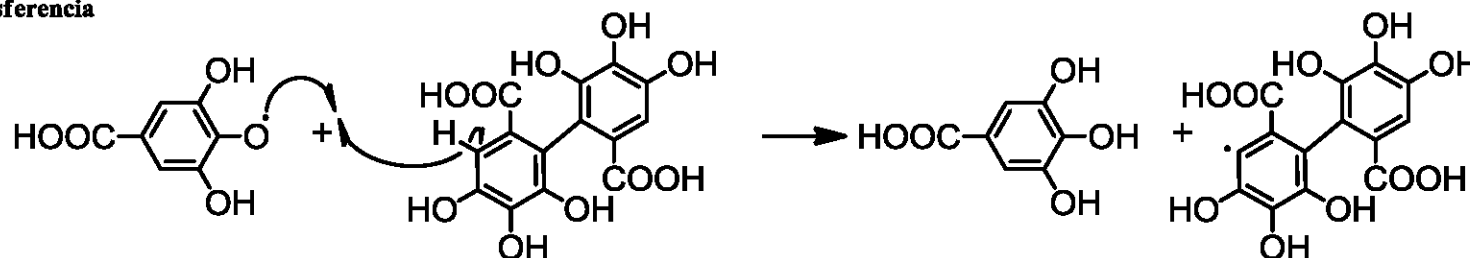
a) Iniciación y resonancia



b) Acoplamiento



c) Transferencia



d) Propagación

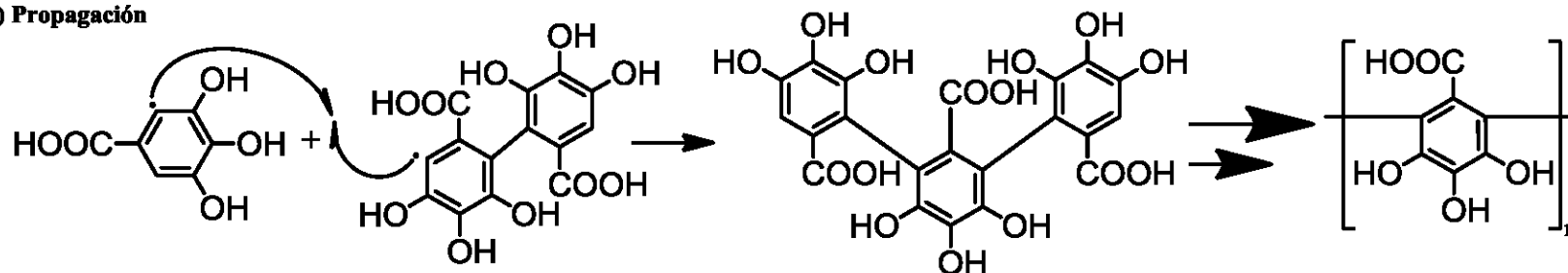


Figura 26. Mecanismo de reacción propuesto para la polimerización con LTV del AG.

4.1.3. Propiedades físicas de los materiales derivados de AG

Como parte de la caracterización electro-óptica, los espectros de espectrofotometría UV-Vis de los derivados y del monómero se muestran en la figura 27.

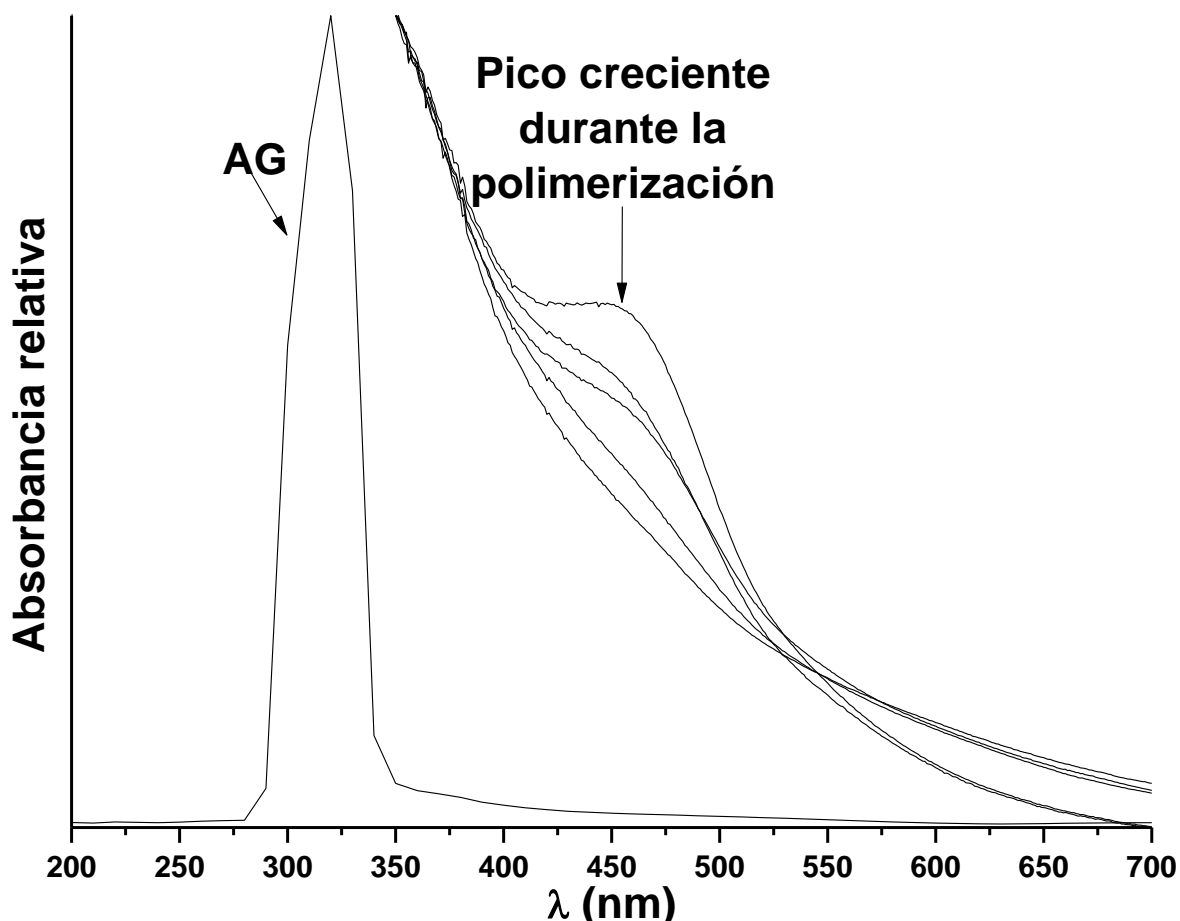


Figura 27. Espectros UV-Vis del AG y de los derivados sintetizados.

El AG exhibió un pico de absorción máxima en 320 nm, mientras que los derivados mostraron absorbancia en toda la región UV y gran parte de la región visible indicativo de un desplazamiento hacia el rojo del estado de transición $\pi-\pi^*$,⁶ con un pico alrededor de 455 nm que aumentó su intensidad conforme la reacción avanzó. Este comportamiento es indicativo del aumento en la conjugación de los dobles enlaces debido a que la elongación de la cadena polimérica se llevó a cabo

por medio de enlaces fenil-fenil, concordando con los análisis de FT-IR y RMN. A partir de los ejes de absorción y utilizando la fórmula $E_g = 1240\lambda_{on}^{-1}$ (nm),⁹ se calcularon las E_g para el monómero y el derivado con la mejor conductividad, resultando éstas iguales a 3.88 y 2.41 eV, respectivamente; esta disminución en la E_g es indicativo del aumento en la longitud de conjugación de la cadena polimérica.

En la figura 28 se presentan los resultados de la conductividad determinada en estado sólido de los derivados de AG. Se observó que los derivados obtenidos con aireación exhibieron conductividades mayores que los de los sintetizados sin aireación y a diferentes pH. Entre los aireados, se lograron conductividades de hasta 10^{-4} Sm^{-1} . Esta conductividad es también un fuerte indicativo de que el acoplamiento entre radicales se llevó a cabo mediante enlaces fenil-fenil, conforme a la evidencia experimental obtenida por RMN, FT-IR y espectrofotometría UV-Vis, ya que así se aumenta la conjugación de dobles enlaces y se permite el transporte de electrones a lo largo de la cadena polimérica.

Comparando con otros materiales orgánicos sintetizados enzimáticamente, los derivados de AG obtenidos en este trabajo mostraron conductividades de hasta 4 órdenes de magnitud mayores que el polycarbazol sin dopar (10^{-8} Sm^{-1}) descrito por Bilici *et al.* (2010)⁹ y un orden de magnitud superior al poliluminol (10^{-5} Sm^{-1}) sintetizado por Nabid *et al.* (2011);¹¹ por otro lado, al comparar con polifenoles obtenidos químicamente, la conductividad resultó mayor en hasta 3 órdenes de magnitud que los derivados de *o*-dianisidina (10^{-7} Sm^{-1}) producidos por Kaya *et al.* (2009)⁶⁹ y en hasta 4 órdenes con respecto a los productos sintetizados a partir de 4-fluorobenzaldehído (10^{-8} Sm^{-1}) por Kaya *et al.* (2012).⁷⁰ Cabe mencionar que los derivados de AG no emitieron fotoluminiscencia de acuerdo a los análisis de PS practicados.

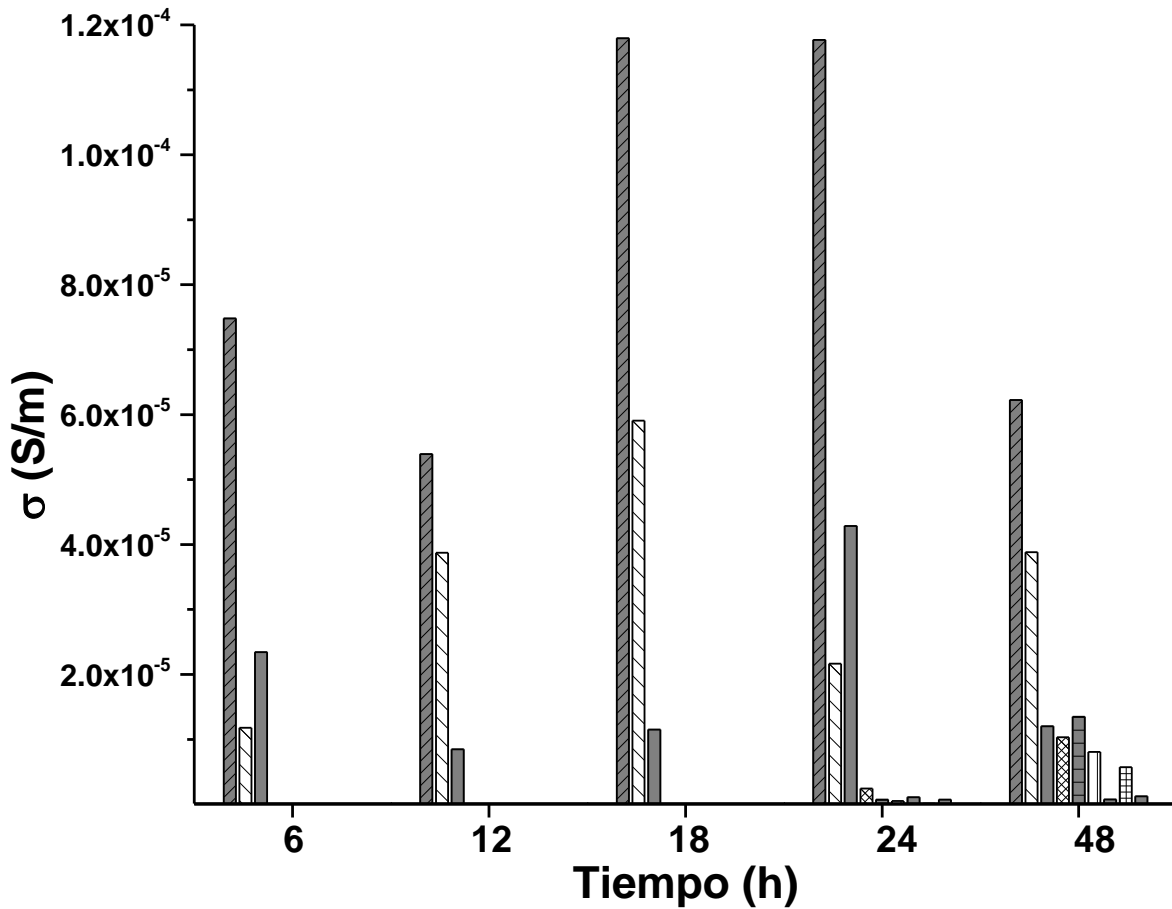


Figura 28. Conductividad de los derivados de AG. A pH 5 y aireado con 12.5 (▨), 25.0 (▩) y 50.0 (■) U de enzima; a pH 5 y sin aireación con 25.0 (□) y 50.0 (▤) U de enzima; a pH 6 y sin aireación con 25.0 (□) y 50.0 (▥) U de enzima; a pH 7 y sin aireación con 25.0 (▧) y 50.0 (▨) U de enzima.

Para finalizar la caracterización electro-óptica, se realizó un estudio de CV. En la figura 29 se muestran las respuestas voltamperométricas del AG y su derivado a una velocidad de barrido de 0.2 Vs⁻¹. En el caso del monómero se observaron tres cambios de pendiente correspondientes a ondas de oxidación (anódicas) a potenciales de entre 0.60 y 1.25 V vs Ag/Ag⁺, mientras que las de los derivados (todos mostraron comportamientos similares) exhibieron dos ondas entre 0.37 y 0.80 V vs Ag/Ag⁺ con corrientes menores. Por otro lado, el AG exhibió una onda catódica (de reducción) a 0.58 V vs Ag/Ag⁺ mientras que la de los derivados se desplazó más de 0.2 V hasta los 0.35 V vs Ag/Ag⁺.

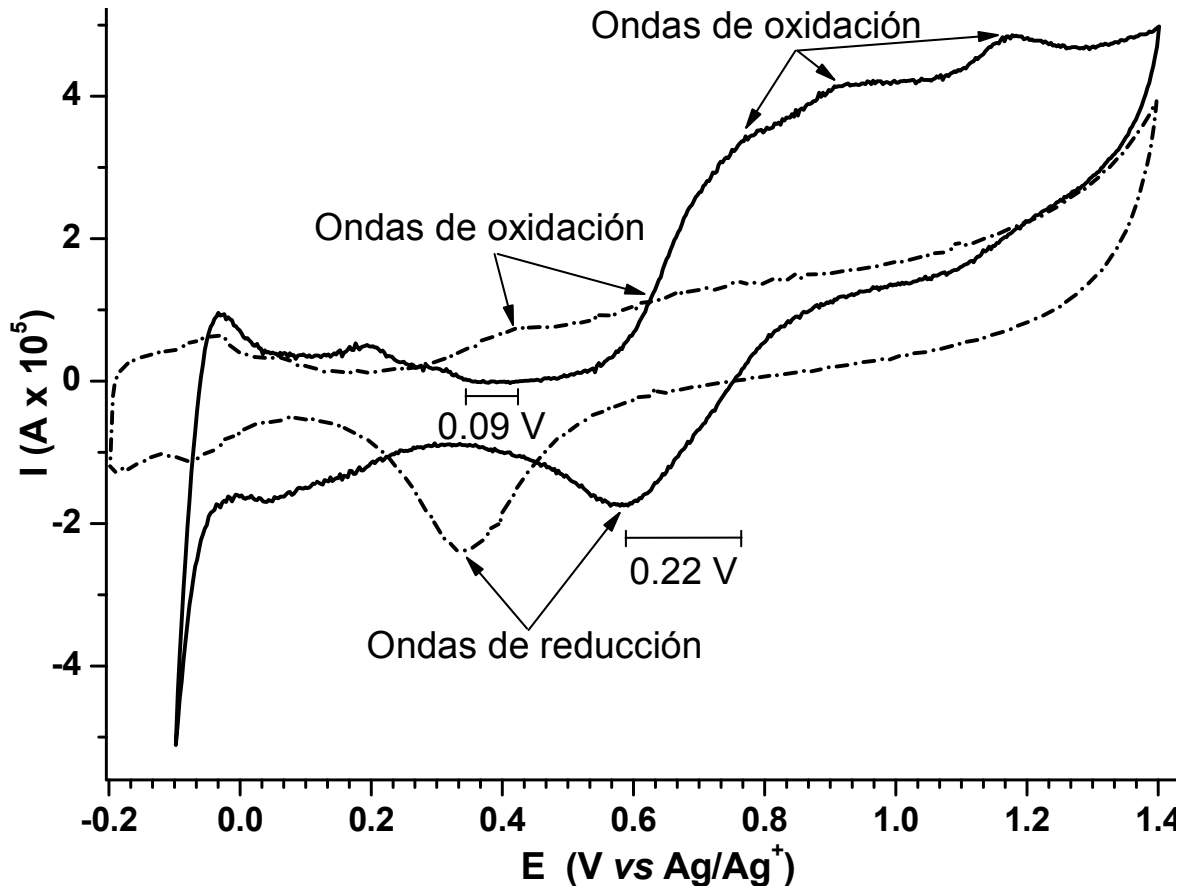


Figura 29. Voltamperometría cíclica del AG (—) y su derivado (---) a una velocidad de barrido de 0.2 Vs^{-1} .

Además, se redujo la diferencia entre los picos de reducción y el primer pico de oxidación al llevar a cabo la polimerización oxidativa (0.09 V y $0.22 \text{ V vs Ag/Ag}^+$ para los derivados y el AG, respectivamente), lo que indica una disminución en la banda de energía prohibida que conlleva un aumento en la conductividad. Cabe mencionar que los picos observados entre -0.20 y $0.15 \text{ V vs Ag/Ag}^+$ son característicos del electrodo de platino y corresponden a fenómenos de adsorción-desorción de protón a diferentes planos del cristal de Pt y a la descarga de hidrógeno molecular. El pico de adsorción-desorción de protón disminuyó e incluso se suprimió el de la descarga de hidrógeno molecular en presencia del derivado, indicando que el polifenol se adsorbe fuertemente sobre el Pt y modifica la actividad superficial del electrodo hacia esta reacción.

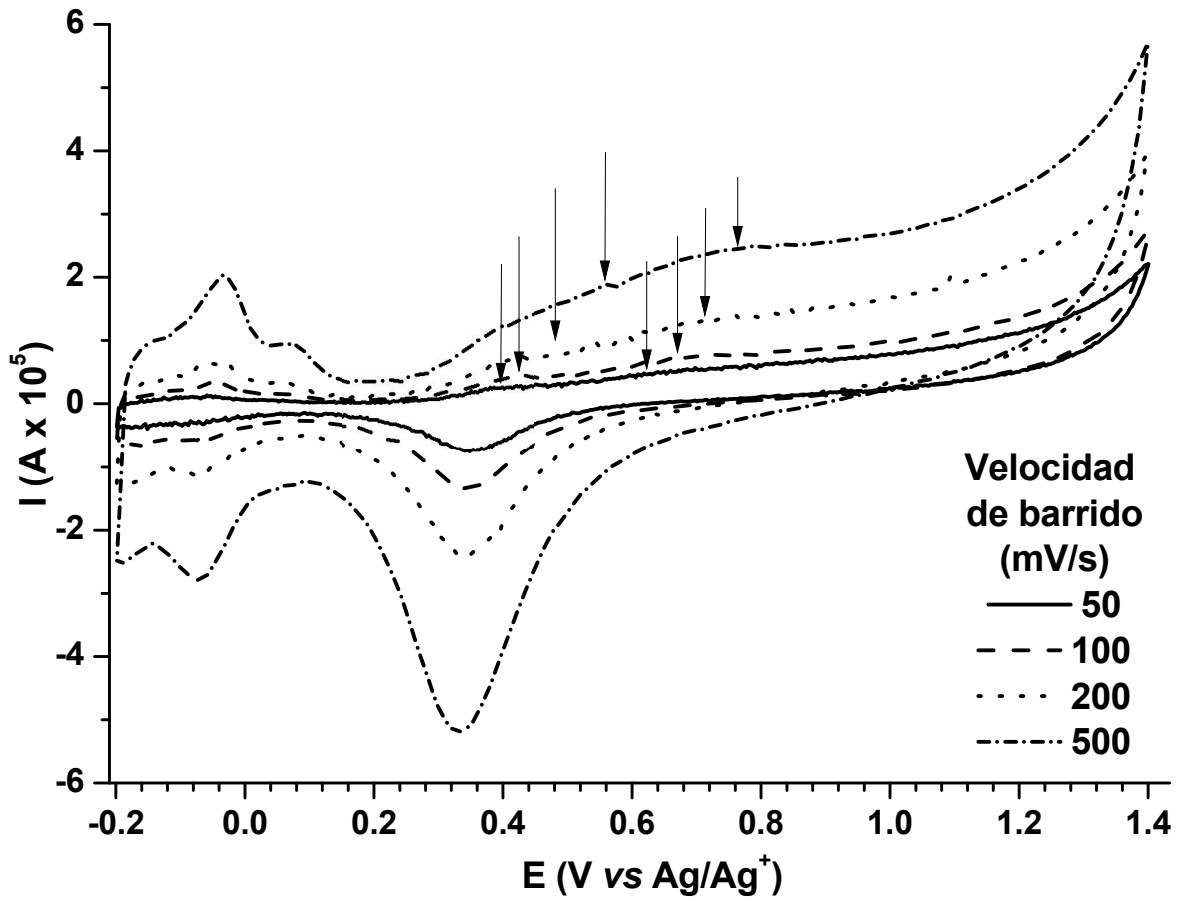


Figura 30. Voltamperometría cíclica de los derivados de AG a diferentes velocidades de barrido. Las flechas indican el corrimiento de las bandas de oxidación.

Por otro lado, al aumentarse la velocidad de barrido (figura 30), los picos de oxidación se fueron desplazando ligeramente hacia potenciales mayores mientras que el pico catódico se mantuvo al mismo potencial. De forma interesante, al graficarse la corriente del pico como función de la velocidad de barrido, se observó que la corriente se incrementó al aumentar el peso molecular promedio (ver una gráfica representativa en la sección Anexos). Adicionalmente, la corriente del pico fue mayor conforme aumentó la velocidad de barrido, encontrándose una correlación lineal entre estos dos parámetros ($r^2 > 0.96$, tabla 1); el valor de las pendientes sugieren que la reducción de los derivados se dio por medio de una mezcla de procesos de difusión-adsorción.

4.2. Polimerización oxidativa enzimática del 4FG

Con base en el trabajo de Zaragoza *et al.* (2011)⁷ cuya actividad experimental se realizó en el laboratorio 314-E, se decidió modificar las condiciones experimentales para conocer el comportamiento del monómero ante la presencia de otro biocatalizador, como la LTV (debido a los satisfactorios resultados de la reacción de polimerización de AG), y de co-solventes. Una ventaja interesante del biocatalizador LTV, como se ha mencionado anteriormente, es que se evita el uso del peróxido de hidrógeno, el cual tiene un gran potencial oxidante y tiene un efecto desactivante a altas concentraciones sobre las peroxidasas de las cuales es sustrato y que hace más complejo el control de la reacción. Asimismo, se probaron como co-solventes, el metanol y la acetona, los cuales son solventes orgánicos comunes, en los que la LTV ha mostrado actividad,^{71,72} y en cuyas mezclas acuosas superiores al 25% de solvente orgánico, el 4FG resultó soluble. Cabe mencionar que el 4FG no es soluble en agua.

4.2.1. Actividad enzimática de LTV en presencia de co-solventes metanol y acetona

En un principio, se evaluó la actividad enzimática de la LTV a diferentes concentraciones de co-solvente (expresadas como porcentaje volumen/volumen). Los resultados se muestran en la figura 31. Se observó que a mayor concentración de co-solvente, mayor fue la pérdida de actividad, descendiendo dramáticamente a una concentración de 50% v/v en la que se perdió más del 90% de la actividad en tan sólo las primeras 12 h a diferencia de 30 y 40% v/v, en las que al mismo tiempo la pérdida se encontró entre 40 y 70% y que no rebasó el 80% a las 48 h, excepto en el caso de haber usado 40% v/v de metanol. Los tiempos de vida media ($t_{1/2}$) se calcularon mediante la ecuación $t_{1/2} = \ln(2)/k_{desac}$, donde k_{desac} fue la velocidad de desactivación de la enzima bajo los diferentes tratamientos. El $t_{1/2}$ de la enzima en ausencia de co-solvente orgánico fue de 88.1

h, mientras que en presencia de acetona disminuyó a 23.8, 24.0 y 8.1 h a 30, 40 y 50% v/v, respectivamente; por su parte, la presencia de 30, 40 y 50% v/v de metanol redujo el $t_{1/2}$ a 25.5, 11.7 y 6.7 h, respectivamente. Estos resultados indican que la disminución de la actividad fue más pronunciada al usar metanol, ya que la presencia de 40 y 50% v/v redujo el $t_{1/2}$ a poco menos de la octava parte, mientras que fue necesario un 50% v/v de acetona para reducirlo a niveles similares.

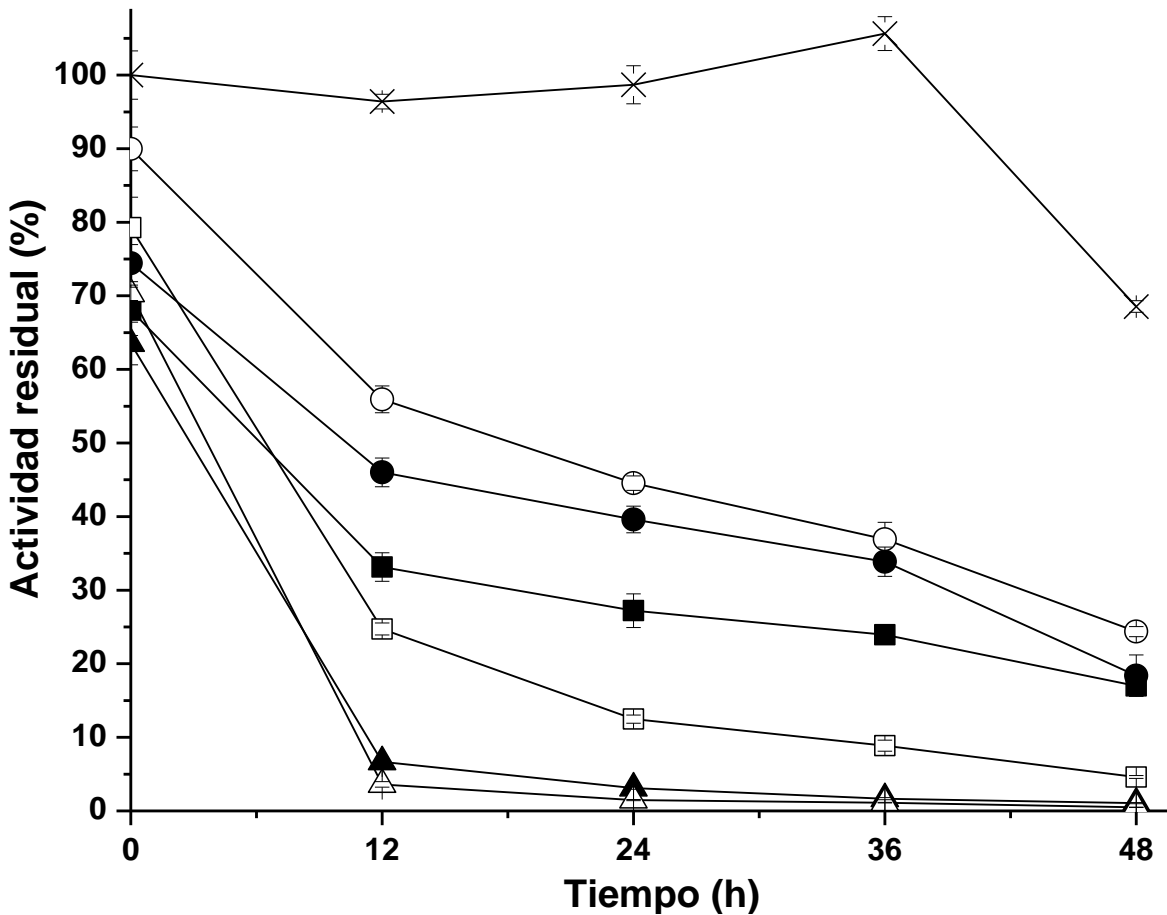


Figura 31. Actividad residual de la LTV a diferentes concentraciones de co-solvente. Control (x); acetona (% v/v): 30 (•), 40 (■), 50 (▲); metanol (% v/v): 30 (○), 40 (□) y 50 (△).

4.2.2. Polimerización oxidativa de 4FG con LTV

A partir de estos resultados, como diseño experimental se decidió llevar a cabo la reacción en ambos co-solventes, a concentraciones de 30 y 40% v/v,

evaluando 24 y 48 h de reacción. Los resultados de rendimiento, M_n , PDI y porcentaje de enlaces fenil-oxi y fenil-fenil se muestran en la tabla 2. De acuerdo a los resultados, se logró observar que la mejor condición, de entre las probadas, para mejorar tanto el rendimiento como el peso molecular, fue a 30% v/v de acetona y 48 h, ya que el rendimiento fue más del doble que a cualquier otra condición; asimismo, el peso molecular determinado fue el mayor (casi 1,200 g mol^{-1}), además de que, en general, el peso molecular mejoró en las mezclas acuosas de acetona comparadas con las de metanol; esto puede indicar que los productos oligoméricos de la reacción son ligeramente más solubles en las mezclas acuosas de acetona, lo que conlleva que al avanzar la reacción, éstos se encontraban disponibles para convertirse a radicales libres y, por tanto, para aumentar el crecimiento de la cadena. Los PDI se mantuvieron relativamente constantes a cualquier condición de síntesis, entre 1.6 y 2.2.

Tabla 2. Reacciones de polimerización oxidativa de 4FG mediadas por LTV.

Clave	Solvente (% v/v)	Tiempo de reacción (h)	Rendimiento (%)	M_n^a (g/mol)	PDI ^a	Ph/Ox ^b
FGA301	Acetona (30)	24	26.0 ± 1.3	1150	1.8	51/49
FGA302	Acetona (30)	48	52.3 ± 0.1	1,190	1.8	24/76
FGA401	Acetona (40)	24	10.6 ± 0.5	1099	2.2	53/47
FGA402	Acetona (40)	48	13.7 ± 4.3	1,038	1.6	22/78
FGM301	Metanol (30)	24	21.3 ± 1.1	972	2.2	44/56
FGM302	Metanol (30)	48	22.4 ± 7.1	1,104	2.1	26/74
FGM401	Metanol (40)	24	13.0 ± 3.7	863	2.0	37/63
FGM402	Metanol (40)	48	15.4 ± 5.7	977	1.9	29/71

^aDeterminado por SEC *software*. ^bDeterminado por titulación.

El porcentaje de enlaces fenil-fenil disminuyó a mayores tiempos de reacción; esto podría deberse a que, al realizar la titulación, los grupos hidroxilos terminales se consideraron como enlaces fenil-fenil, y en las primeras horas de

reacción los productos fueron de menor peso molecular (probablemente dímeros o trímeros), lo que condujo a una sobreestimación de enlaces fenil-fenil a estos tiempos de reacción.

Como parte de la caracterización química de los productos, se realizaron análisis de FT-IR, MALDI-TOF y RMN. En los espectros de infrarrojo (figura 32) se observó que la intensidad de la banda característica de tensión del grupo hidroxilo terminal disminuyó en los derivados sintetizados, comparada con la del monómero ($3,580\text{-}3,330\text{ cm}^{-1}$). Por su parte, las bandas características de tensión de C-H aromático ($3,082$ y $3,004\text{ cm}^{-1}$) y del grupo metoxilo -O-CH_3 ($2,836\text{ cm}^{-1}$) se mantuvieron, así como las bandas de tensión del anillo aromático C=C ($1,608$ y $1,493\text{ cm}^{-1}$). También fue visible en los espectros de todas las muestras un ligero ensanchamiento en la banda del enlace éter ($1,255\text{ cm}^{-1}$) y un aumento en la intensidad de la banda del enlace C-O ($1,185\text{ cm}^{-1}$). Finalmente, se lograron observar tres bandas de torsión de grupos C-H aromáticos realizados por la presencia del halógeno ($1,145$, $1,115$ y $1,025\text{ cm}^{-1}$), ligeramente menos intensas comparadas con las del monómero. Estos resultados indican que el acoplamiento durante la polimerización se llevó a cabo principalmente vía fenil-oxi (disminución de la banda entre $3,580$ y $3,330\text{ cm}^{-1}$ y aumento de las bandas en $1,255$ y $1,185\text{ cm}^{-1}$).

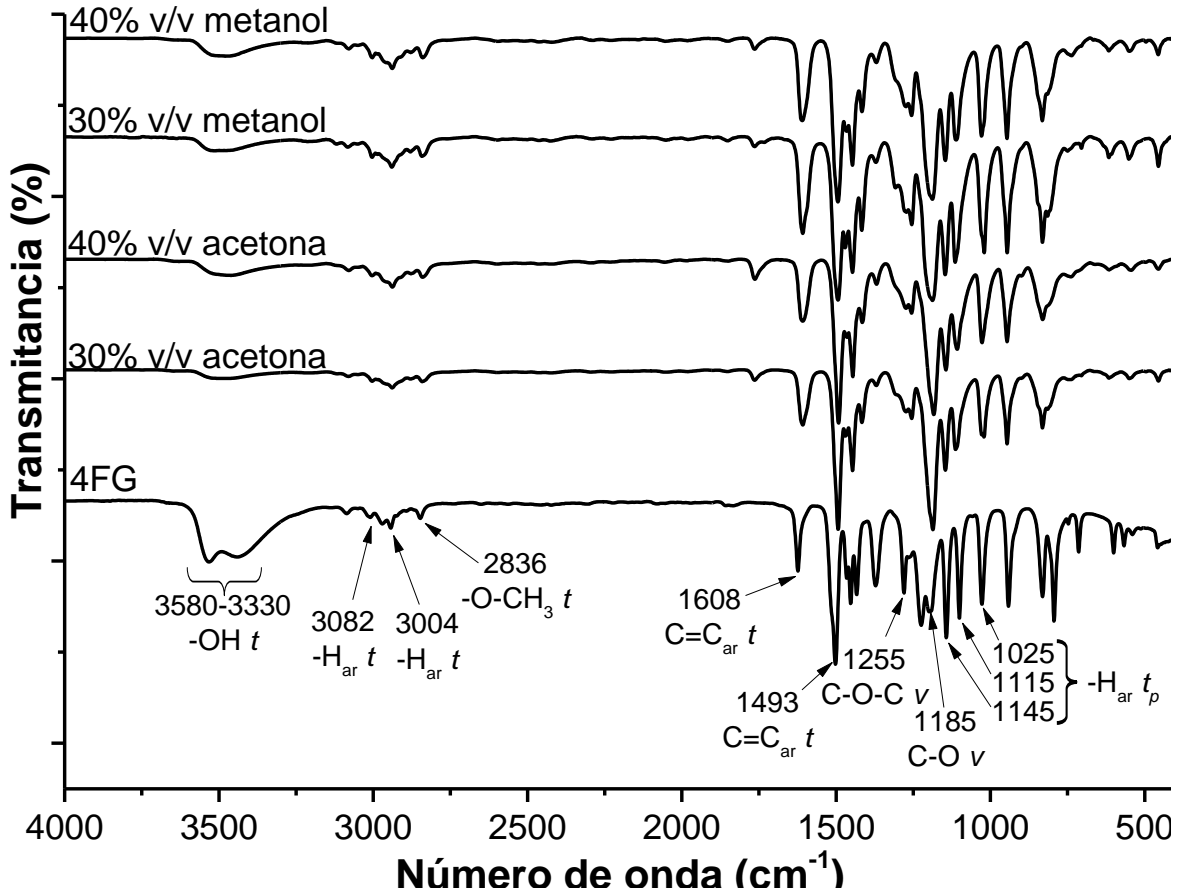


Figura 32. Espectros FT-IR de los derivados de 4FG a las 48 h. *t*: tensión, *ar*: aromático, *v*: vibración, *t_p*: torsión en el plano.

Por otro lado, en la figura 33 se muestra el espectro de MALDI-TOF del derivado sintetizado a 30% de acetona y 48 h. Este análisis MALDI-TOF consiste básicamente en mezclar la muestra con una matriz adecuada (ácido trans-3-indoleacrílico para derivados fenólicos) en exceso, dejándose evaporar el solvente sobre una superficie metálica de tal manera que la muestra y la matriz co-cristalizan. Luego, esta preparación se somete a pulsos cortos de láser a alto vacío lo que provoca que la energía absorbida por la matriz se convierta en energía de excitación y en transferencia de H^+ a la muestra (ionización) dando lugar, normalmente, a especies monocargadas. El calentamiento del área irradiada provoca que los iones cargados desorban de la fase sólida hacia la fase gaseosa desde dónde se mide de forma muy precisa el tiempo necesario para alcanzar al detector TOF.

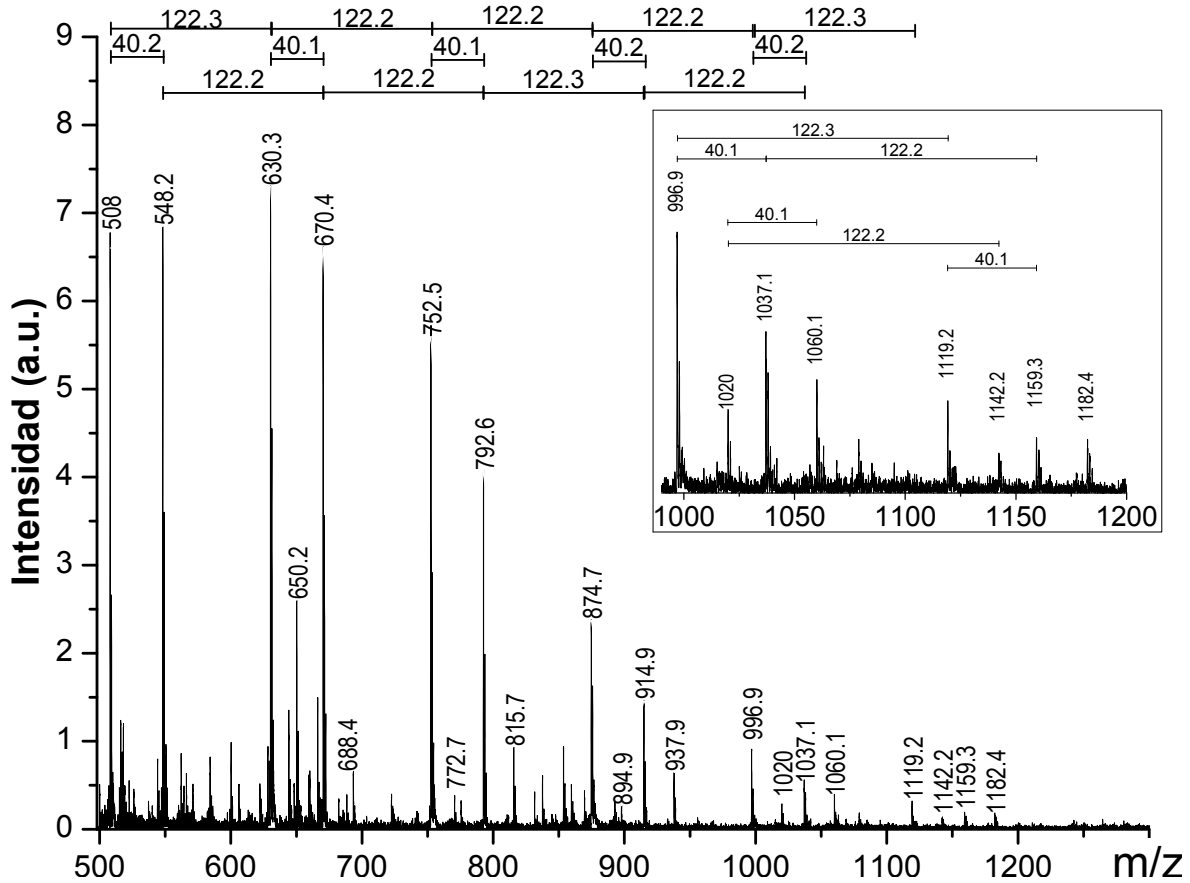


Figura 33. Espectro MALDI-TOF del derivado FGA302.

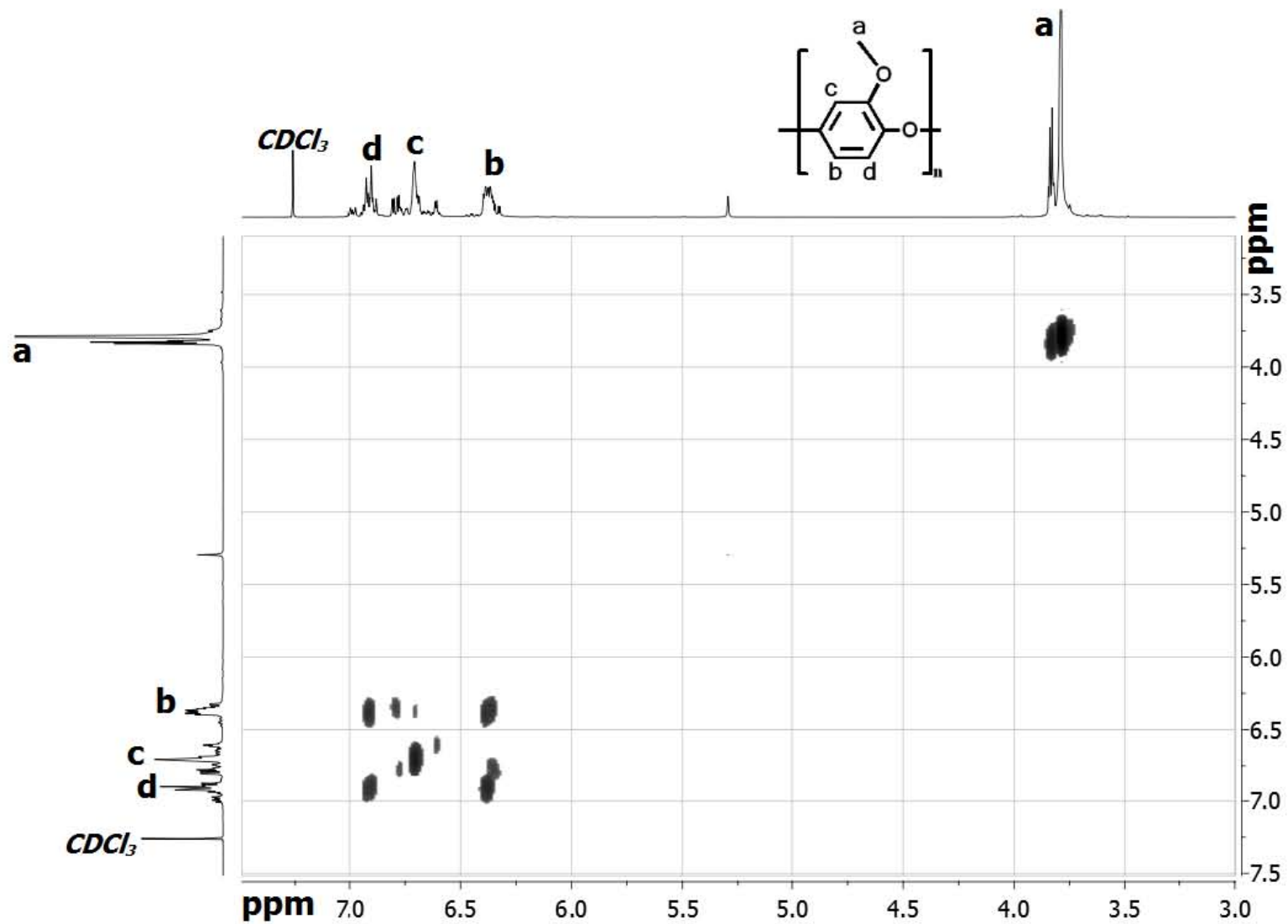
Se observó, en los espectros de todos los derivados analizados por esta técnica, una serie de picos entre 508 y 1200 m/z , con una separación entre ellos de 122 m/z . Esta serie fue consistente con la fórmula condensada $C_7H_6O_2F + n(C_7H_6O_2) + C_7H_7O_2$ ($m/z = 141 + n(122) + 123$) con n en un intervalo de 2 a 7, lo cual es consistente con un acoplamiento vía fenil-oxi entre el grupo hidroxilo radical y el C4, vía una deshalogenación. Adicionalmente, se observó una segunda serie de picos consistente con la fórmula condensada $2(C_7H_6O_2F) + n(C_7H_6O_2) - m/z = 282 + n(122)$ con n en un intervalo de 2 a 7. También se observaron series de picos desplazadas por 40 m/z respecto a las series de picos mencionadas, que pudieron deberse a iones potasio presentes en la solución amortiguadora. Cabe mencionar que al no poder obtenerse la distribución de pesos moleculares m/z por debajo de los 500, debido a la baja relación señal-ruido

provocada por la matriz, no fue posible determinar un peso molecular promedio para comparar con el obtenido por SEC.

Por su parte, los espectros de RMN ^1H , ^{13}C y ^{19}F del 4FG y de un derivado, se muestran en la sección Anexos. En los espectros de RMN de los derivados producidos, se observó un ensanchamiento y multiplicidad de las señales características, debido a la polimerización. Para ayudar a la asignación de las señales observadas, se realizaron espectros de RMN bidimensionales. En la figura 34 se muestra el espectro de RMN ^1H - ^1H COSY, en el que las señales características son las mismas que en el RMN monodimensional, con la diferencia que al estar graficada en dos ejes, y como función de t_2 , los picos característicos forman una diagonal ya que resultan de la contribución del mismo núcleo, mientras que los picos fuera de la diagonal se originan por el acoplamiento entre núcleos y aparecen como señales simétricas a la diagonal. En esta técnica espectroscópica, se observaron, además de las señales de la diagonal, dos señales intensas en {6.4, 6.9} ppm, que indican un acoplamiento de protones adyacentes, por lo que la señal en 6.7 ppm debe corresponder al protón unido al C3 de la unidad de repetición; adicionalmente, se logró observar una señal en {6.3, 6.7}, por lo que es factible asignar el corrimiento químico en 6.3 ppm al protón unido al C5, ya que el protón unido al C6 se encuentra muy alejado (a 6 enlaces de distancia) del protón del carbono 3 y por tanto, no aparecieron señales de acoplamiento en {6.7, 6.9} ppm. La señal en 3.8 ppm se asignó a los protones del grupo metoxilo. Cabe mencionar que en estos espectros de RMN bidimensionales se observó junto a esta señal en 3.8 ppm, la señal de protón característica del etanol, presente como contaminante.

Con la ayuda del espectro RMN ^1H - ^{13}C HSQC (figura 35), se asignaron las señales del espectro de RMN ^{13}C en 102.4, 107.6 y 121.6 ppm a los carbonos 3, 5 y 6, respectivamente, ya que las señales observadas en el espectro HSQC indican acoplamientos a un solo enlace, es decir, acoplamientos entre el protón y el carbono al que están directamente enlazados.

Por su parte, en la figura 36 se muestra el espectro ^1H - ^{13}C HMBC RMN de los derivados de 4FG. Ya que con esta técnica es factible observar señales de acoplamiento protón-carbono hasta 4 enlaces de distancia, es una técnica útil para asignar las señales características observadas en el espectro de RMN ^{13}C . En la tabla 3 se resumen las principales señales de acoplamiento protón-carbono observadas; cabe señalar que se observó la escisión característica del acoplamiento a 1 enlace de distancia, mientras que el acoplamiento más intenso fue asignado a 3 enlaces de distancia. Cabe mencionar que la falta de un pico no confirma que el par de núcleos protón-carbono se encuentre a más de 4 enlaces de distancia.

Figura 34. Espectro de RMN ^1H - ^1H COSY del derivado FGM402.

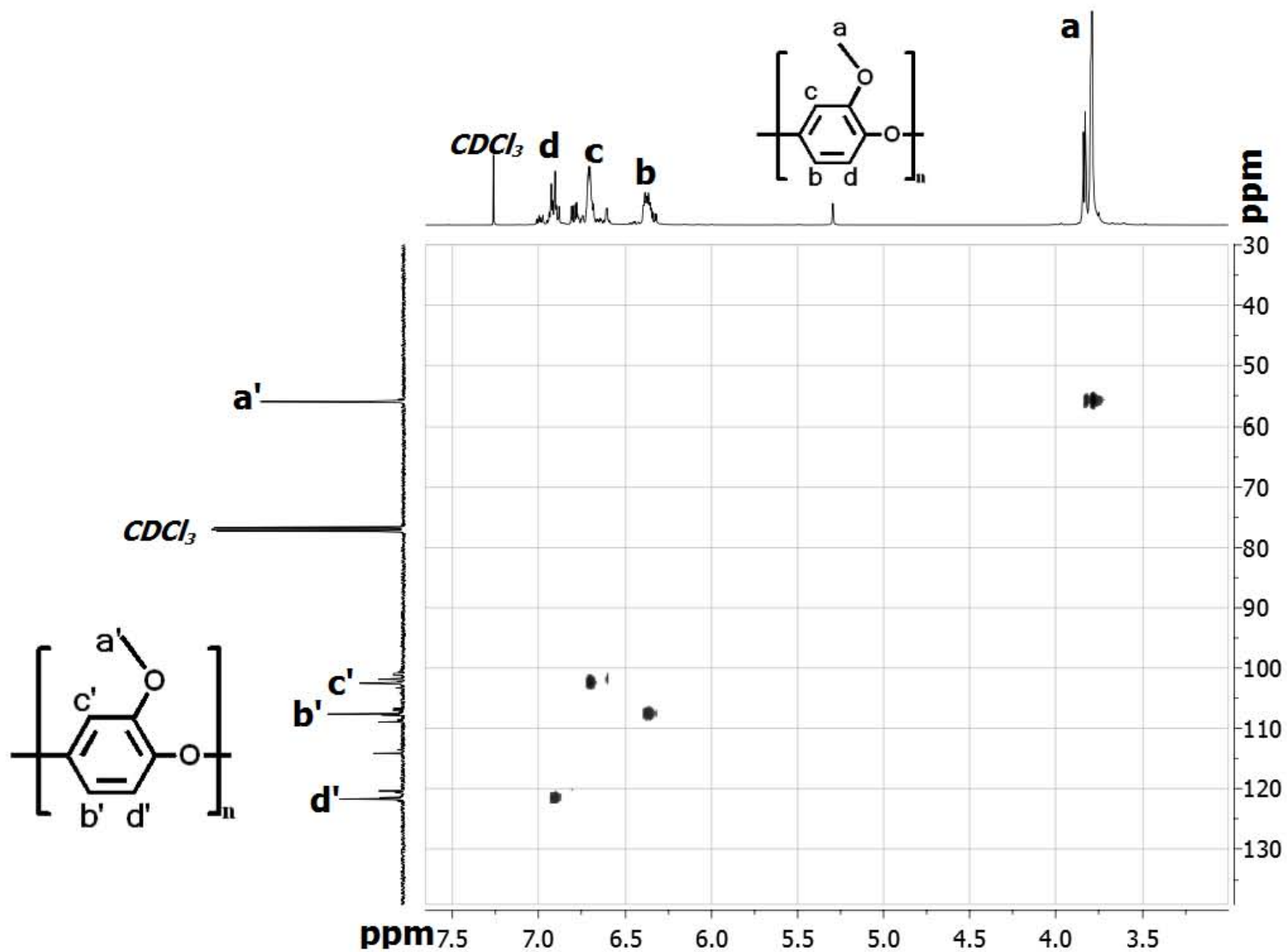


Figura 35. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HSQC del derivado FGM402.

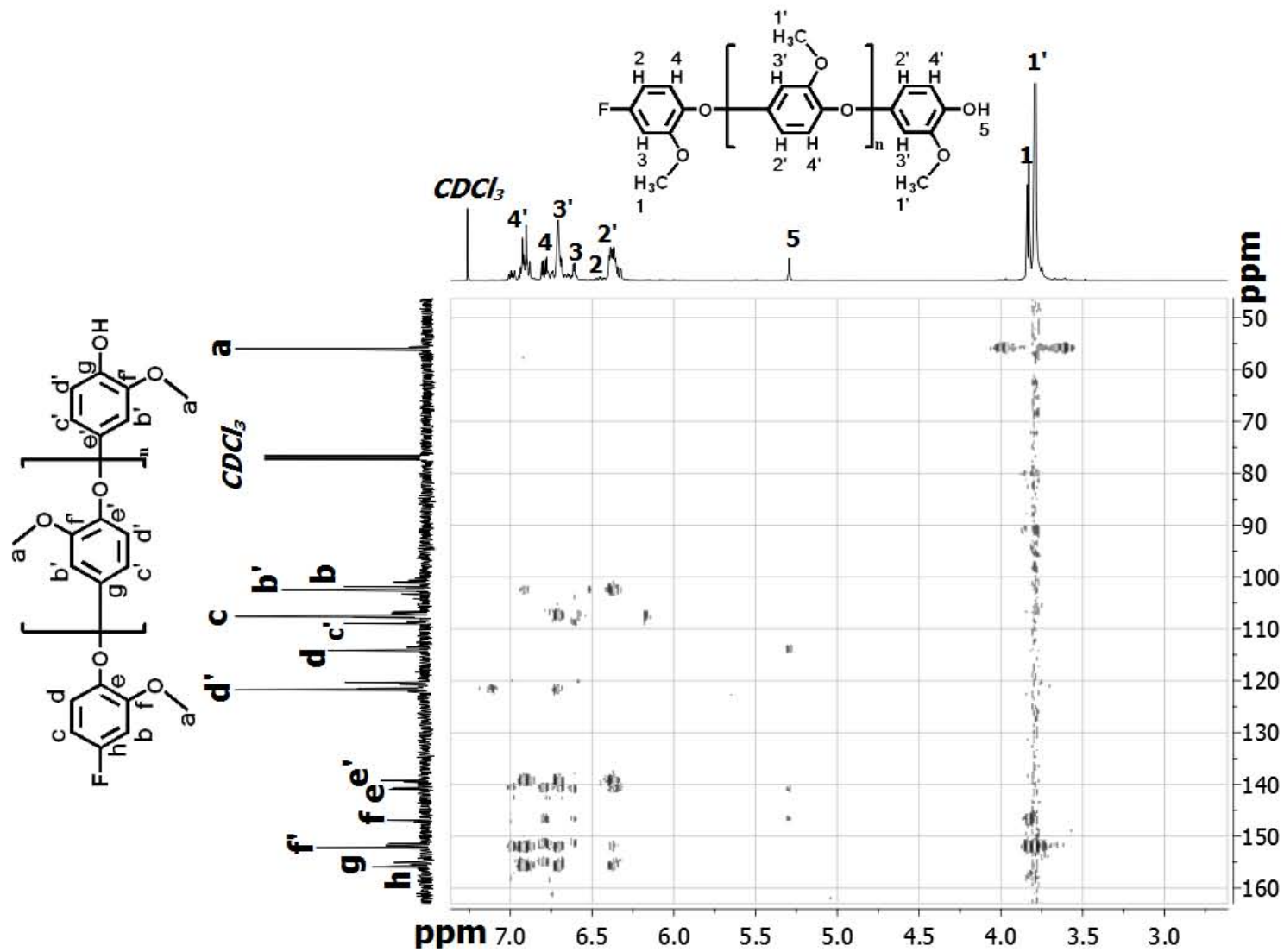


Figura 36. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HMBC del derivado FGM402.

Tabla 3. Señales de acoplamiento observadas en el espectro de RMN ^1H - ^{13}C HMBC del derivado FGM402.

δ_{H} (ppm)	δ_{C} a 1 enlace (escindido)	δ_{C} a 2 enlaces	δ_{C} a 3 enlaces	δ_{C} a 4 enlaces
3.8	55.8	(oxígeno)	152.1	146.8
5.3	(oxígeno)	140.9	114.0, 146.8	-
6.4	107.5	155.7	102.3, 139.2	152.2
6.6	-	146.9, 151.4	108.9, 141.0	-
6.7	102.5	152.2, 155.5	107.5, 139.6	-
6.8	120.0	140.7	151.5, 155.0	-
6.9	122.8	140.8	152.2, 155.5	-

Con base en las señales de acoplamiento observadas, se asignaron las señales de corrimiento químico del espectro de RMN ^{13}C tal como se esquematiza en la figura 36. Adicionalmente, se realizó la integración de los picos de los espectros de RMN ^1H a las 48 h. De acuerdo a la estructura del monómero, la integral de los protones unidos al C7 debe ser el triple que las diferentes integrales de los protones aromáticos unidos a los carbonos 3, 5 y 6. En la tabla 4 se muestran los resultados de dichas integrales.

Tabla 4. Integración de los picos de los espectros de RMN ^1H .

Clave	$\int_{3.6}^{3.9} H_{\text{C7}}$	$\int_{6.3}^{6.5} H_{\text{C5}}$	$\int_{6.5}^{6.8} H_{\text{C3}}$	$\int_{6.8}^{7.1} H_{\text{C6}}$
FGA302	1.00 ± 0.00	0.30 ± 0.01	0.34 ± 0.00	0.34 ± 0.00
FGA402	1.00 ± 0.00	0.29 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.34 ± 0.01
FGM302	1.00 ± 0.00	0.28 ± 0.00	0.33 ± 0.01	0.34 ± 0.01
FGM402	1.00 ± 0.00	0.28 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.33 ± 0.01

Pudo observarse que la relación entre los protones aromáticos de los carbonos 3 y 6 y los protones metílicos unidos al C7 fue muy cercana al del

monómero, es decir, 0.33:1.00, mientras que la relación del protón unido al C5 disminuyó ligeramente, a cerca de 0.29:1.00 en promedio, lo cual podría indicar que el C5 participó en menor medida en reacciones de acoplamiento, pero no los carbonos 3 y 6, aunque fue mayoritario el acoplamiento vía deshalogenación en el C4.

Los resultados obtenidos de los espectros de RMN, indican que el crecimiento de la cadena se realizó principalmente vía fenil-oxi, acoplándose el grupo fenoxi radical al C4 vía una deshalogenación y al C5, en menor medida, en concordancia con el MALDI-TOF y el FT-IR. En conclusión la estructura molecular mayoritaria fue completamente identificada tal y como aparece esquematizada en la figura 37, generada de acuerdo al mecanismo de reacción propuesto en la figura 38.

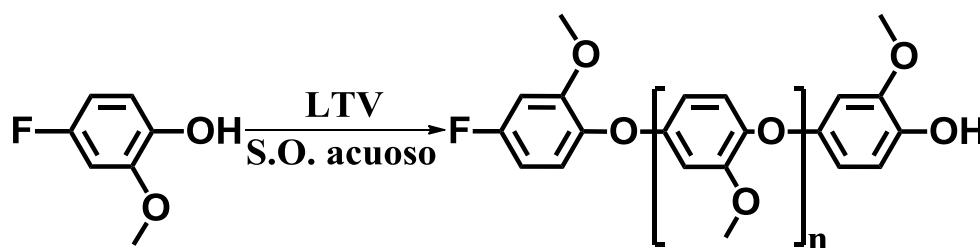


Figura 37. Esquema de reacción propuesto para la polimerización oxidativa enzimática de 4FG con LTV.

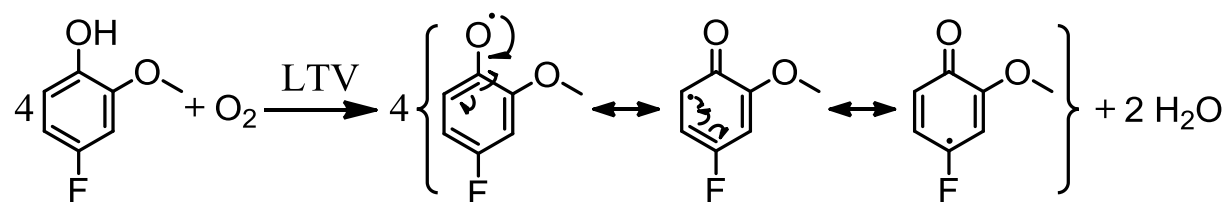
La deshalogenación durante la polimerización es factible, ya que existen trabajos previos como el realizado por Dec *et al.* (2003),¹⁸ quienes estudiaron la liberación de diversos sustituyentes de compuestos fenólicos durante reacciones de acoplamiento oxidativo mediante actividad enzimática; la liberación de sustituyentes halógenos (-Cl) fue más viable que la de otros sustituyentes como el grupo carboxilo (-COOH), metoxilo (-OCH₃) y metilo (-CH₃), alcanzándose porcentajes de deshalogenación de hasta el 41%, y esto explicaría que la polimerización se haya llevado principalmente entre el C4 y el grupo radical fenoxi. Asimismo, Roy-Arkand *et al.* (1991)⁷³ describieron el uso de LTV para deshalogenar parcialmente varios clorofenoles, encontrando que la dechloración

era dependiente tanto de la naturaleza del sustrato como de la concentración enzimática y que dicha decloración conducía a la polimerización del sustrato.

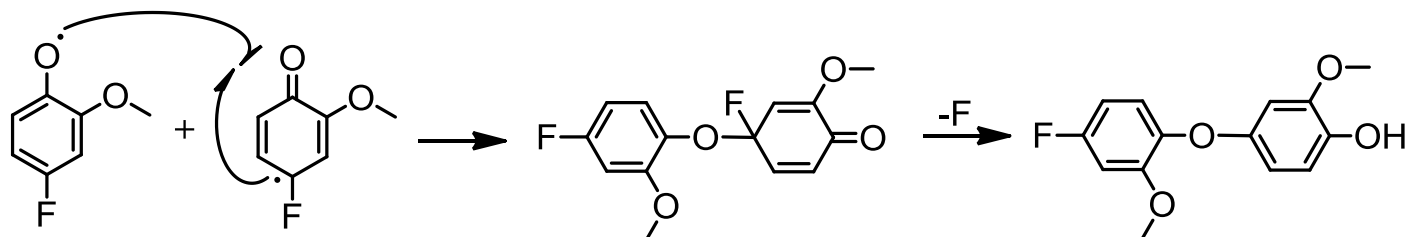
Por otra parte, de los análisis térmicos TGA (figura 39) y DSC (figura 40) se determinó que la temperatura de degradación del 5% en peso se encontró en todos los casos cercana a los 300 °C, mientras que la temperatura de fusión de los distintos derivados se localizó entre los 160 y los 180 °C. Esto permitió la fundición del material para moldeo sin pérdida de sus propiedades.

Por su parte, de los espectros de PXRD (figura 41) se determinó que el porcentaje de cristalinidad de los diferentes derivados de 4FG se encontraba alrededor del 51%.

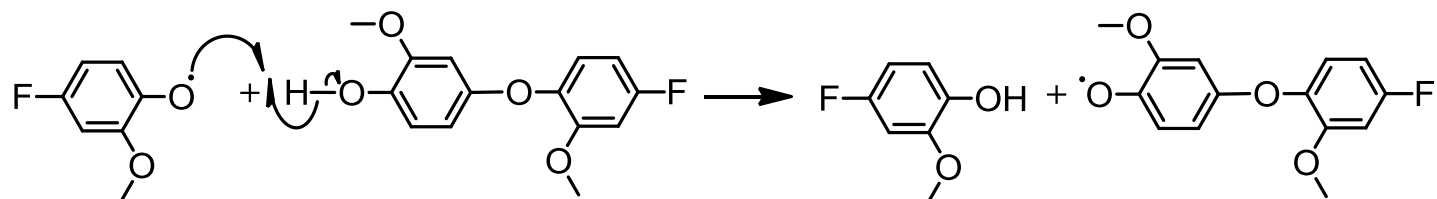
a) Iniciación y resonancia



b) Acoplamiento



c) Transferencia



d) Propagación

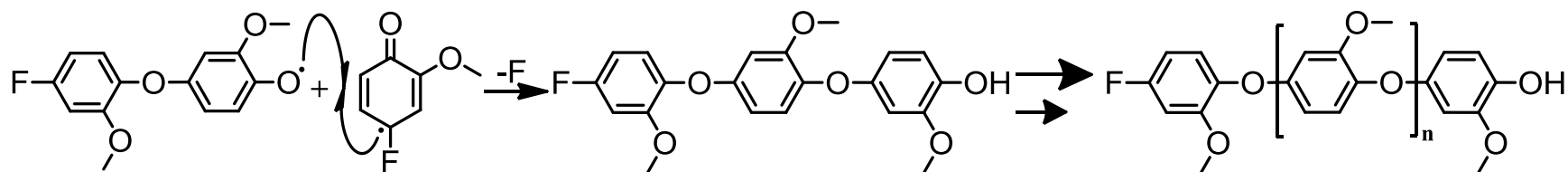


Figura 38. Mecanismo de reacción propuesto para la polimerización con LTV del 4FG.

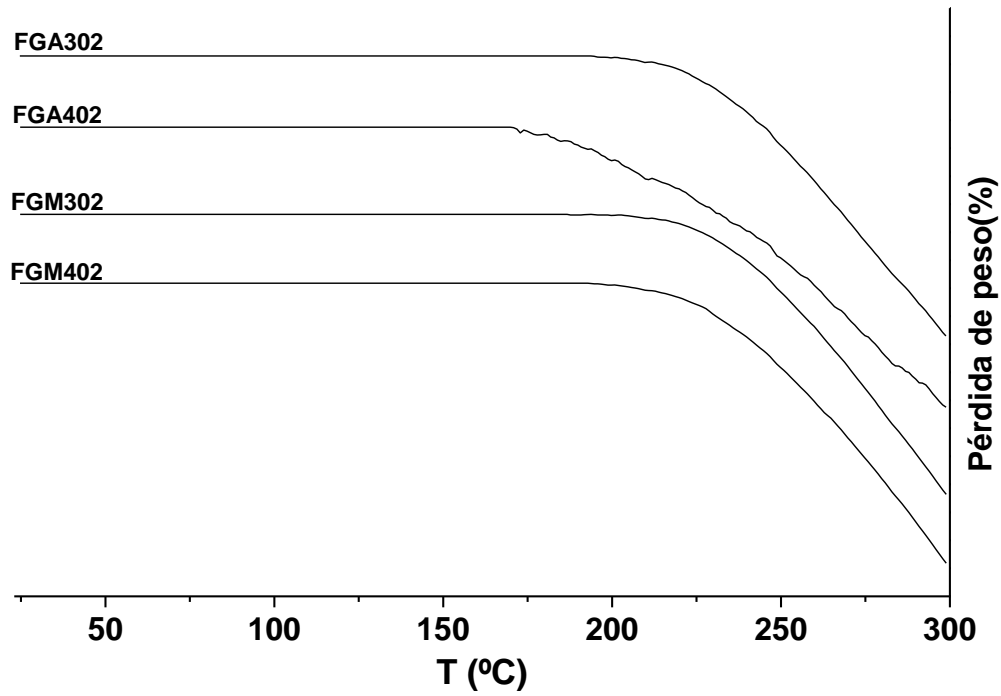


Figura 39. Termograma de TGA de los derivados de 4FG a las 48 h.

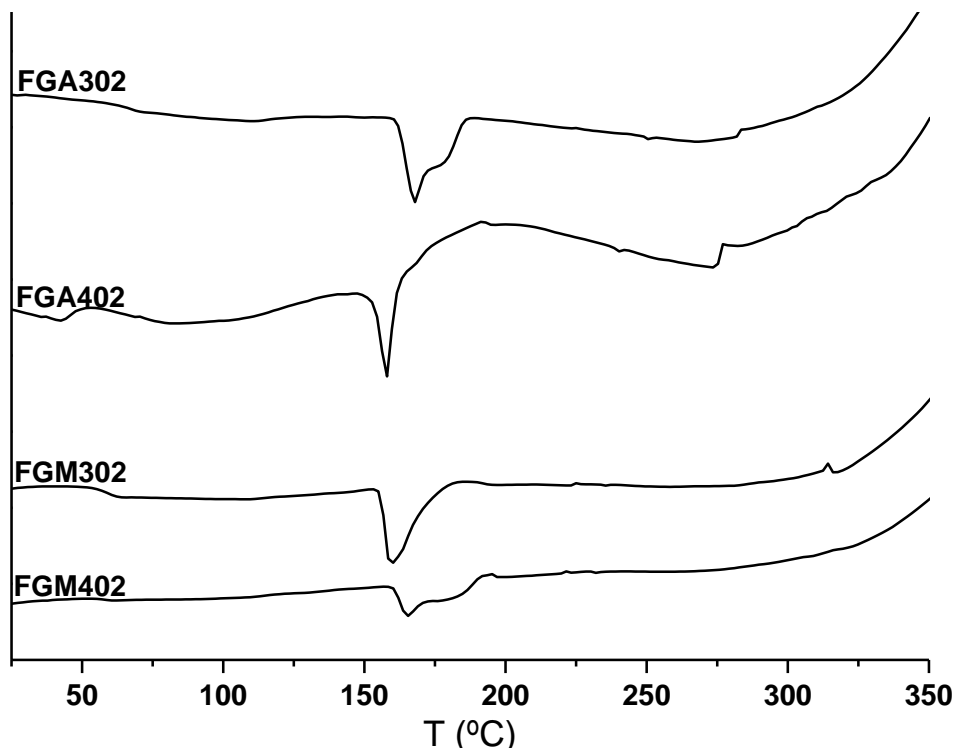


Figura 40. Termograma de DSC de los derivados de 4FG a las 48 h.

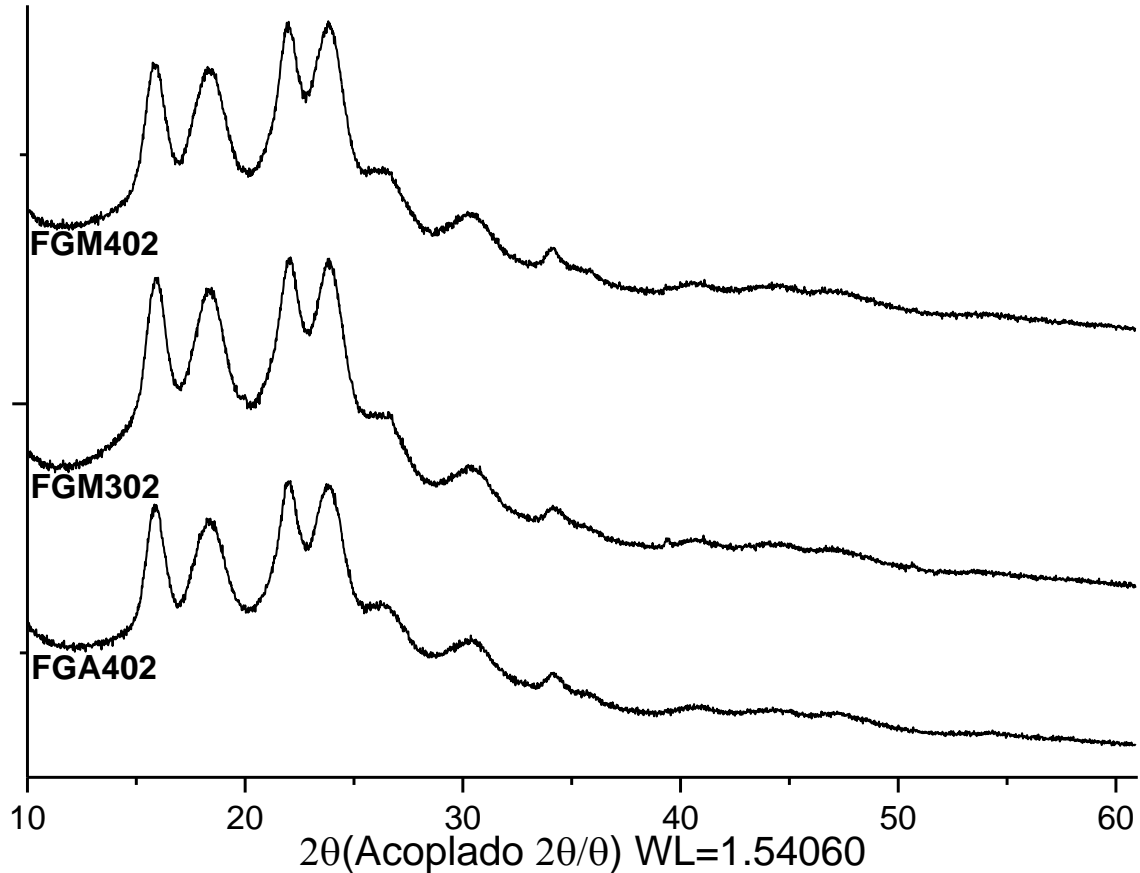


Figura 41. Espectros de PXRD de los derivados de 4FG a las 48 h.

4.2.3. Propiedades físicas de los materiales derivados de 4FG

Como parte de la caracterización electro-óptica, se realizaron a los derivados de 4FG análisis de absorción UV-Vis, fotoluminiscencia, conductividad y microscopia confocal. En la figura 42 se muestran los espectros UV-Vis de los derivados de 4FG a las 48 h, comparados con la del monómero (inciso A); puede verse que, en general, los derivados exhibieron una región de absorción entre 235 y 332 nm, con picos de absorción máxima a 265 y 300 nm, aproximadamente, en contraste con la región más estrecha de absorción del monómero entre 235 y 300 nm, con 3 picos de absorción máxima a 243 (intensidad media), 270 y 289 nm.

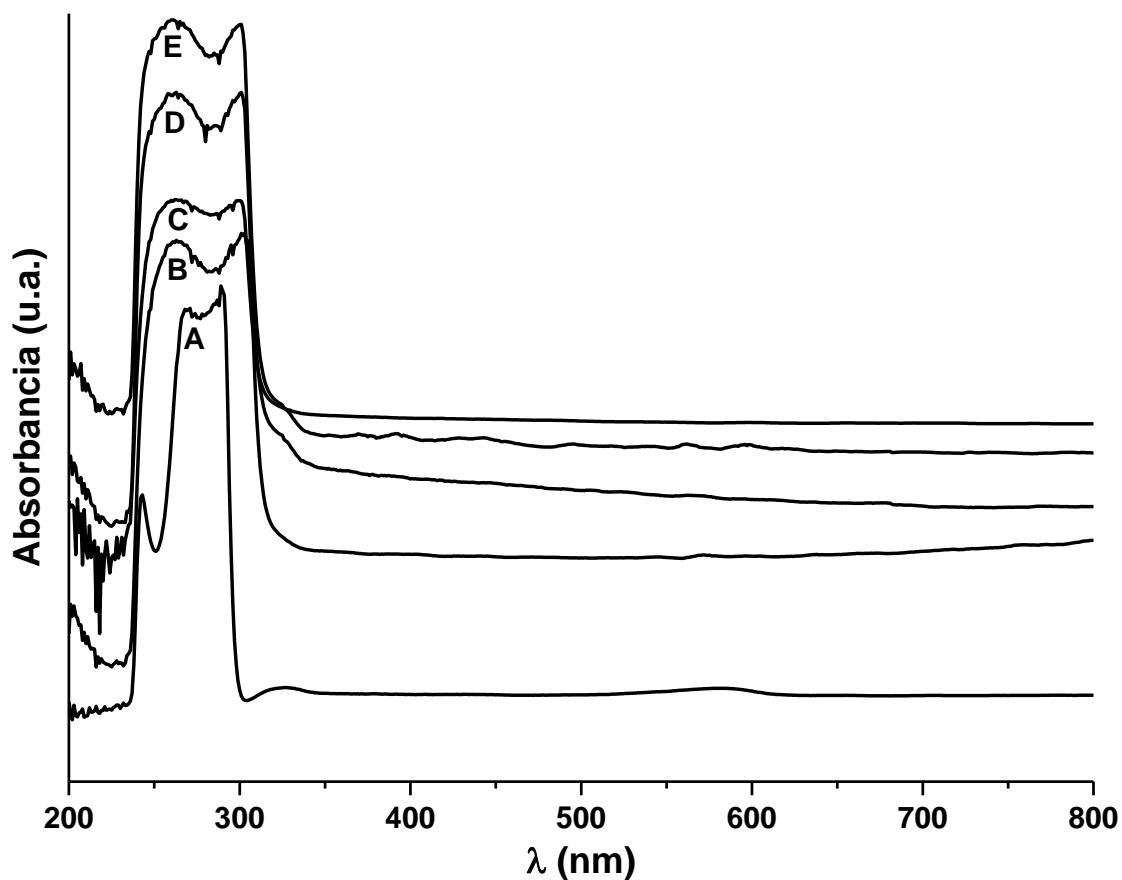


Figura 42. Espectros de absorción UV-Vis de los derivados de 4FG a las 48 h. (A) 4FG, (B) FGA302, (C) FGA402, (D) FGM302 y (E) FGM402

Este desplazamiento hacia el rojo de 32 nm en el espectro de absorción de los derivados, se puede atribuir a una ligera disminución de la energía de transición π - π^* derivado de un bajo aumento en la conjugación de enlaces, consistente con el bajo porcentaje de enlaces fenil-fenil determinados por titulación de hidroxilos y con la baja conductividad de los derivados (nunca mayor a 10^{-10} Sm^{-1}), en contraste con los derivados de AG.

Con respecto a la fotoluminiscencia, en la figura 43 se muestran los espectros de fotoluminiscencia de la muestra FGA302 bajo diferentes longitudes de excitación (λ_{ex}).

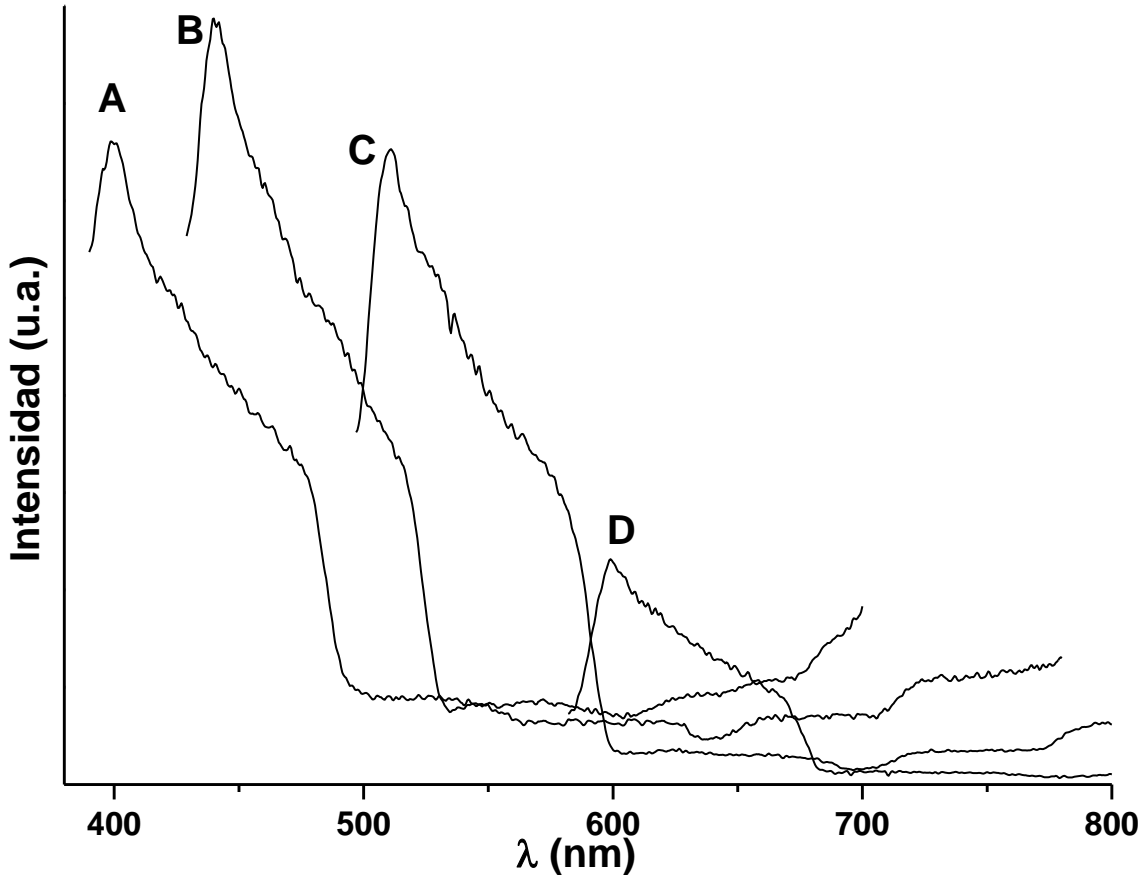


Figura 43. Espectros de fotoluminiscencia de la muestra FGA302. λ_{ex} (nm): A) 365, B) 405, C) 473 y D) 559.

Esta técnica consiste en la excitación de la muestra mediante la absorción de fotones de luz (hacia un estado electrónico excitado); dicha muestra, al regresar al estado electrónico basal (de menor energía) emite un fotón de menor energía que el usado para la excitación. Se mantiene constante la longitud de onda de la luz de excitación mientras se realiza un barrido a mayores longitudes de onda para detectar la emisión de luz por parte de la muestra. En el caso de los productos obtenidos, se observaron picos máximos de emisión de fotoluminiscencia (λ_{em}) desplazadas alrededor de 40 nm hacia el rojo de las longitudes de excitación, aunque la emisión fue exhibida en un intervalo de aproximadamente 80 nm en cada caso. Esto indicó que los materiales exhibían fluorescencia, por lo que se procedió a realizar el análisis de LSCM. En el anexo se incluyen los espectros de fotoluminiscencia de otras muestras; en general,

todas las muestras analizadas exhibieron comportamientos muy similares en este análisis.

Como se mencionó anteriormente, se realizó LSCM a las películas obtenidas por fundición de los distintos derivados de 4FG. Esta técnica usa el mismo principio de la PS con la diferencia de que es posible obtener imágenes de las superficies fluorescentes. Para ello, en la LSCM la fuente de luz consta de uno o varios rayos láseres, que inciden sobre la muestra realizando barridos rápidamente sobre el área en forma de una serie de líneas. La fluorescencia detectada en cada punto se filtra a longitudes de onda objetivo y medidas en un tubo fotomultiplicador. En la figura 44 se muestran las imágenes obtenidas por medio de este análisis de la muestra FGA402 y en el apartado de anexo se incluyen las imágenes obtenidas de las otras muestras; en general, todas exhibieron fluorescencia en los campos azul (λ_{em} 425-460 nm), verde (λ_{em} 485-545 nm) y rojo (λ_{em} 575-620 nm). Al realizar la integración para cuantificar dicha fluorescencia (cuyos resultados se sintetizan en la figura 45) se observó, a un día de reacción y comparando el mismo co-solvente, una disminución en la intensidad de la fluorescencia al aumentar la concentración del co-solvente en los tres campos; además, a la misma concentración de co-solvente y un día de reacción dicha intensidad fue mayor al usar acetona comparado con metanol en todas las regiones, y en todos los casos la fluorescencia en la región verde fue mayor que en la azul y la roja. En contraste, la intensidad de fluorescencia de los derivados obtenidos a dos días de reacción fue mayor al aumentar la cantidad de co-solvente comparando cada solvente, mientras que al comparar la misma concentración de co-solvente, los derivados sintetizados en metanol exhibieron menores intensidades en el campo azul y mayores intensidades en los campos verde y rojo.

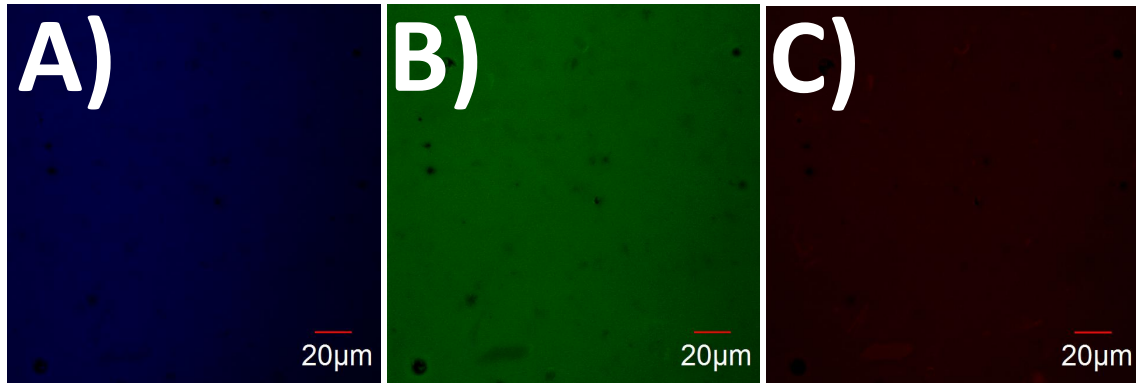


Figura 44. Imágenes de LSCM de la muestra FGA402 bajo diferentes campos de excitación. λ_{em} (nm): A) 425-460, B) 485-545 y C) 575-620.

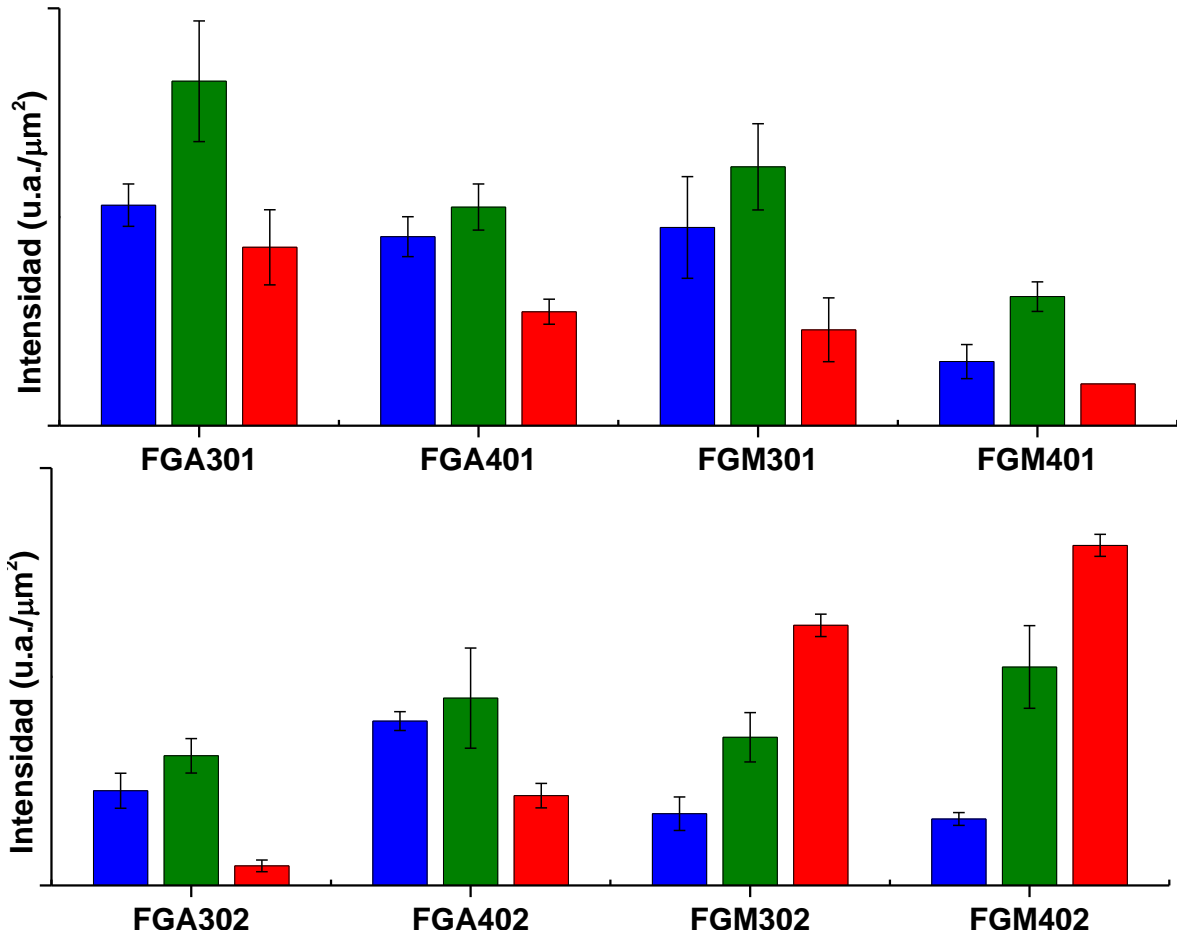


Figura 45. Intensidad de fluorescencia cuantificada por LSCM. λ_{em} (nm): 425-460 (azul), 485-545 (verde) y 575-620 (rojo).

De acuerdo a los resultados, la intensidad de fluorescencia parece estar relacionada con el peso molecular y sobre todo con la naturaleza del co-solvente, ya que en general a un día de reacción con pesos moleculares más bajos, el campo más intenso en todos los casos fue el verde; mientras que a dos días de reacción, con pesos moleculares más altos, en el caso de la acetona se mantuvo el mismo comportamiento de la intensidad de los tres campos, sólo que dicha intensidad disminuyó notablemente; no obstante, en el caso del metanol, la intensidad de fluorescencia se desplazó hacia el rojo. Esto resulta especialmente interesante si se busca sintetizar el derivado para obtener un comportamiento objetivo, por ejemplo si se buscara un material que fuera más eficiente en el campo rojo, se propondrían las condiciones de síntesis de la muestra FGM402, mientras que si se buscara una mayor eficiencia en el campo verde, sería mejor sintetizarlo bajo las mismas condiciones de la muestra FGA301.

5. CONCLUSIONES

Se polimerizó oxidativamente AG de forma exitosa mediante la enzima LTV, obteniéndose un derivado semiconductor (10^{-4} Sm^{-1}) con rendimientos de hasta 82% y pesos moleculares promedio de hasta 3,500 g/mol. Se halló evidencia experimental de que la elongación polimérica se dio mediante enlaces fenil-fenil.

La polimerización oxidativa del 4-fluoroguayacol se llevó a cabo exitosamente mediante la enzima LTV, obteniéndose un versátil derivado fluorescente en 3 campos: azul, verde y rojo, con rendimientos y pesos moleculares promedios de hasta 52% y 1,190 g/mol, respectivamente. La evidencia experimental apuntó a que el acoplamiento se llevó a cabo vía enlaces fenil-oxi y deshalogenación.

6.PERSPECTIVAS

Para trabajos futuros, se recomienda:

- Evaluar la oxigenación del medio de reacción, para mejorar tanto la productividad como, posiblemente, una mejora en las características objetivo de los derivados.
- Caracterizar los derivados de AG con otras técnicas, tales como SEC acoplado a un detector de luz láser multiángulo (MALLS) para un mejor conocimiento del peso molecular así como seguir trabajando en la obtención de espectros válidos de MALDI-TOF manejando diferentes matrices o condiciones de análisis.
- Dopar a los derivados de AG, por ejemplo con yodo, lo que podría mejorar o modificar las características electro-ópticas.
- Evaluar la electroluminiscencia de los derivados de 4FG, ya que si tuviera esta característica podría ser posible diseñar un prototipo de dispositivo OLED, utilizando los derivados de AG como capas inyectoras de electrones y/o de huecos, mientras que los productos de 4FG se utilizarían como capa emisora.

7.REFERENCIAS

- (1) Kadokawa, J.; Kobayashi, S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 145–153.
- (2) Dordick, J. S.; Marletta, M. A.; Klivanov, A. M. *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *30*, 31–36.
- (3) Mikolasch, A.; Schauer, F. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *82*, 605–624.
- (4) Desentis-Mendoza, R. M.; Hernandez-Sanchez, H.; Moreno, A.; Rojas del C, E.; Chel-Guerrero, L.; Tamariz, J.; Jaramillo-Flores, M. E. *Biomacromolecules.* **2006**, *7*, 1845–1854.
- (5) Shirakawa, H.; Louis, E. J.; MacDiarmid, A. G.; Chiang, C. K.; Heeger, A. J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1977**, 578–580.
- (6) Cui, Y.; Han, X.; Ding, Y.; Lu, Z. *Polym. Bull.* **2010**, *64*, 647–656.
- (7) Zaragoza-Gasca, P.; Gimeno, M.; Hernández, J. M.; Bárzana, E. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2011**, *72*, 25–27.
- (8) Liu, W.; Bian, S.; Li, L.; Samuelson, L.; Kumar, J.; Tripathy, S. *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 1577–1584.
- (9) Bilici, A.; Kaya, T.; Yildirim, M.; Doğan, F. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2010**, *64*, 89–95.
- (10) Turac, E.; Sahmetlioglu, E. *Synth. Met.* **2010**, *160*, 169–172.
- (11) Nabid, M. R.; Taheri, S. S.; Sedghi, R.; Rezaei, S. J. T. *Macromol. Res.* **2011**, *19*, 280–285.
- (12) Hollmann, F.; Arends, I. W. C. E. *Polym.* **2012**, *4*, 759–793.
- (13) Kobayashi, S.; Makino, A. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5288–5353.
- (14) Dwivedi, U. N.; Singh, P.; Pandey, V. P.; Kumar, A. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2011**, *68*, 117–128.
- (15) Polak, J.; Jarosz-Wilkolazka, A. *Process Biochem.* **2012**, *47*, 1295–1307.
- (16) Morozova, O. V.; Shumakovich, G. P.; Gorbacheva, M. A.; Shleev, S. V.; Yaropolov, A. I. *Biochem.* **2007**, *72*, 1136–1150.

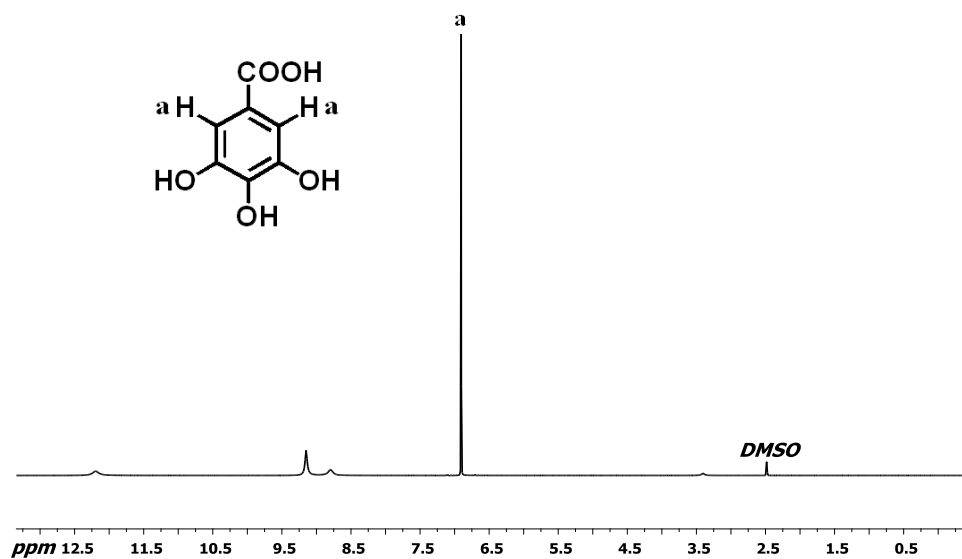
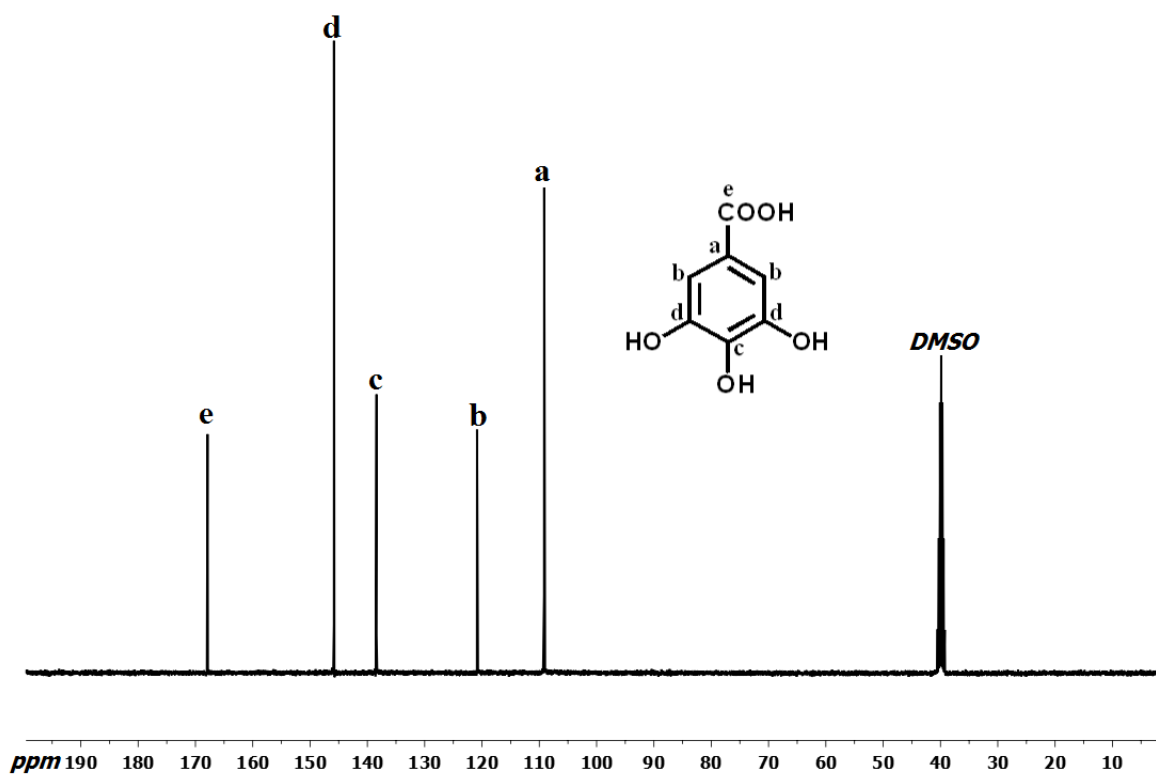
-
- (17) Ayyagari, M. S.; Marx, K. A.; Tripathy, S. K.; Akkara, J. A.; Kaplan, D. L. *Macromolecules*. **1995**, *28*, 5192–5197.
- (18) Dec, J.; Haider, K.; Bollag, J.-M. *Chemosphere*. **2003**, *52*, 549–556.
- (19) Lv, S. H.; Hou, M. M. *Appl. Mech. Mater.* **2011**, *80-81*, 391–395.
- (20) Zhang, J.; Xu, Z.; Chen, H.; Zong, Y. *Biochem. Eng. J.* **2009**, *45*, 54–59.
- (21) Mita, N.; Tawaki, S.; Uyama, H.; Kobayashi, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2004**, *77*, 1523–1527.
- (22) Mita, N.; Maruichi, N.; Tonami, H.; Nagahata, R.; Tawaki, S.; Uyama, H.; Kobayashi, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2003**, *76*, 375–379.
- (23) Tonami, H.; Uyama, H.; Kobayashi, S.; Kubota, M. *Macromol. Chem. Phys.* **1999**, *200*, 2365–2371.
- (24) Uyama, H.; Kobayashi, S. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2002**, *19*, 117–127.
- (25) Lv, S.; Li, D.; Ju, H.; Ma, Y.; Qiu, C.; Zhang, G. *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, *128*, 523–529.
- (26) Kobayashi, H.; Kobayashi, A.; Tajima, H. *Chem. an Asian J.* **2011**, *6*, 1688–1704.
- (27) Inokuchi, H.; Akamatu, H. *J. Chem. Phys.* **1952**, *20*, 1481–1483.
- (28) Vannikov, A. *Polym. Sci. Ser. A.* **2009**, *51*, 351–371.
- (29) Hall, N. *Chem. Comm.* **2003**, *9*, 1–4.
- (30) Zhao, X.; Zhan, X. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3728–3743.
- (31) Dhar, A. Organic Optoelectronics: A Future Promise http://www.phy.iitkgp.ernet.in/ptaccd2/Speakers_manuscript/ADhar.pdf (accessed Feb 28, 2011).
- (32) AlSalhi, M. S.; Alam, J.; Dass, L. A.; Raja, M. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 2036–2054.
- (33) Larsson, O. Empirical parameterization of organic electrochemical transistors, Linköpings Universitet, 2004, p. 57.

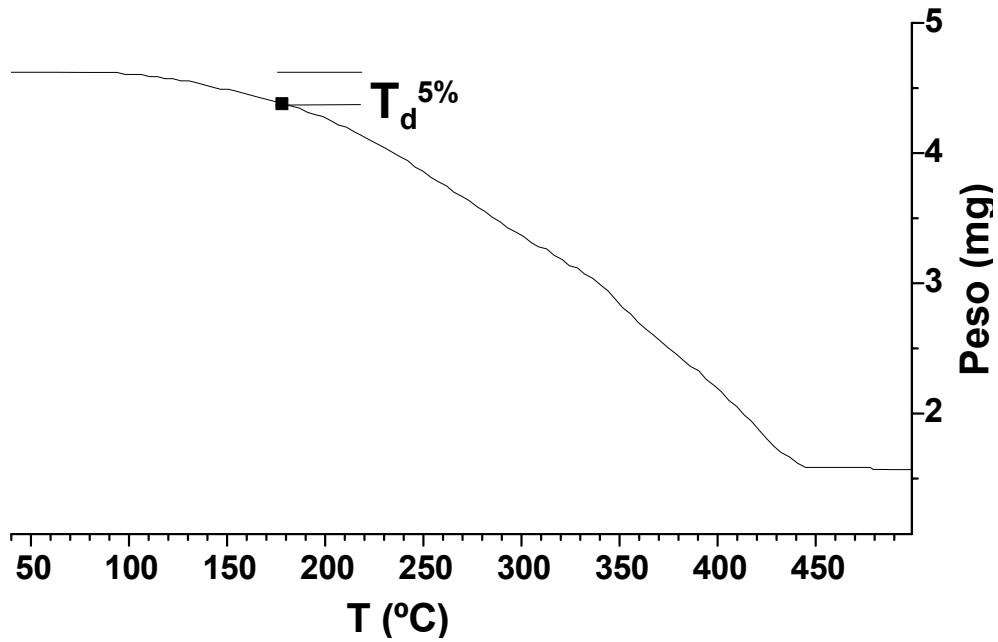
-
- (34) Friend, R. H.; Gymer, R. W.; Holmes, A. B.; Burroughes, J. H.; Marks, R. N.; Taliani, C.; Bradley, D. D. C.; Dos Santos, D. A.; Brédas, J. L.; Lögdlund, M.; Salaneck, W. R. *Nature* **1999**, *397*, 121–128.
- (35) Yu, P.; Cardona, M. *Fundamentals of semiconductors physics and materials properties*; 4th ed.; Springer Science Business Media, LLC: New York, USA, 2010; p. 793.
- (36) Rockett, A. In *The Materials Science of Semiconductors*; Springer US, 2008; pp. 395–435.
- (37) *Physical properties of polymers handbook*; Mark, J. E., Ed.; 2nd ed.; Springer Science Business Media, LLC: New York, USA, 2007; p. 1076.
- (38) Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. *Food Chem.* **2006**, *99*, 191–203.
- (39) Saha, A.; Roy, B.; Garai, A.; Nandi, A. K. *Langmuir.* **2009**, *25*, 8457–8461.
- (40) Beniwal, V.; Chhokar, V.; Singh, N.; Sharma, J. *J. Am. Sci.* **2010**, *6*, 389–397.
- (41) *The Merck Index*; Budavari, S., Ed.; 11th ed.; Merck & Co., Inc.: New Jersey, USA, 1989; Vol. 226, p. 10100.
- (42) Alañón, M. E.; Castro-Vázquez, L.; Díaz-Maroto, M. C.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Gordon, M. H.; Pérez-Coello, M. S. *Food Chem.* **2011**, *129*, 1584–1590.
- (43) Kricheldorf, H. R.; Stukenbrock, T. *J. Polym. Sci., Part A Polym. Chem.* **1998**, *36*, 2347–2357.
- (44) Jeon, J.-R.; Kim, E.-J.; Murugesan, K.; Park, H.-K.; Kim, Y.-M.; Kwon, J.-H.; Kim, W.-G.; Lee, J.-Y.; Chang, Y.-S. *Microb. Biotechnol.* **2010**, *3*, 324–335.
- (45) De Almeida, A. C.; Cabral Marques, O.; Arslanian, C.; Condino-Neto, A.; Ximenes, V. F. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *660*, 445–453.
- (46) Houser, K. R.; Johnson, D. K.; Ishmael, F. T. *J. Inflamm.* **2012**, *9*, 6.
- (47) Engels, F.; Renirie, B. F.; Harv, B. A.; Labadie, R. P.; Nijkamp, F. P. *FEBS Lett.* **1992**, *305*, 254–256.
- (48) Eker, B.; Zagorevski, D.; Zhu, G.; Linhardt, R. J.; Dordick, J. S. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2009**, *59*, 177–184.
- (49) Das, D.; Dasgupta, A.; Das, P. K. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 5635–5639.

-
- (50) Sgalla, S.; Fabrizi, G.; Cacchi, S.; Macone, A.; Bonamore, A.; Boffi, A. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2007**, *44*, 144–148.
- (51) Zaragoza-Gasca, P.; Villamizar-Gálvez, O. J.; García-Arrazola, R.; Gimeno, M.; Bárzana, E. *Polym. Adv. Tech.* **2010**, *21*, 454–456.
- (52) Aydinoğlu, T.; Sargin, S. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2013**, *36*, 215–222.
- (53) Wang, F.; Guo, C.; Liu, C.-Z. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *40*, 141–150.
- (54) Risdianto, H.; Sofianti, E.; Suhardi, S. H.; Setiadi, T. *ITB J. Eng. Sci.* **2012**, *44*, 93–105.
- (55) Piontek, K.; Antorini, M.; Choinowski, T. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 37663–37669.
- (56) Ghouil, M.; Chebil, L. In *Springer Briefs in Molecular Science. Green Chemistry for Sustainability.*; Sharma, S. K., Ed.; Springer: New York, USA, 2012; p. 47.
- (57) Veitch, N. C. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 249–259.
- (58) Ryu, K.; Dordick, J. S. *Biochem.* **1992**, *31*, 2588–2598.
- (59) Kobayashi, S.; Uyama, H.; Ikeda, R. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 4754–4760.
- (60) Chelikani, R.; Kim, Y. H.; Yoon, D.-Y.; Kim, D.-S. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2009**, *157*, 263–277.
- (61) Li, C.; Li, T.; Li, A.; Cui, G.; Zhang, R.; Liu, S. In *Symposium on Photonics and Optoelectronic, SOPO 2010 - Proceedings*; IEEE, 2010.
- (62) Bouldin, R.; Ravichandran, S.; Kokil, A.; Garhwal, R.; Nagarajan, S.; Kumar, J.; Bruno, F.; Samuelson, L.; Nagarajan, R. *Synth. Met.* **2011**, *161*, 1611–1617.
- (63) Keesey, J. *Biochemica Information*; First Edit.; Boehringer Mannheim: Indianapolis, In, 1987; p. 58.
- (64) ASTM. Standard Test Method for Hydroxyl Value of Fatty Oils and Acids D 1957-86, 2001.
- (65) Tianzhi, W.; Yi, L.; Weiping, L.; Hongwen, W.; Feng, Y.; Dingquan, W.; Songsheng, Q. *Thermochim. acta.* **1997**, *303*, 191–196.

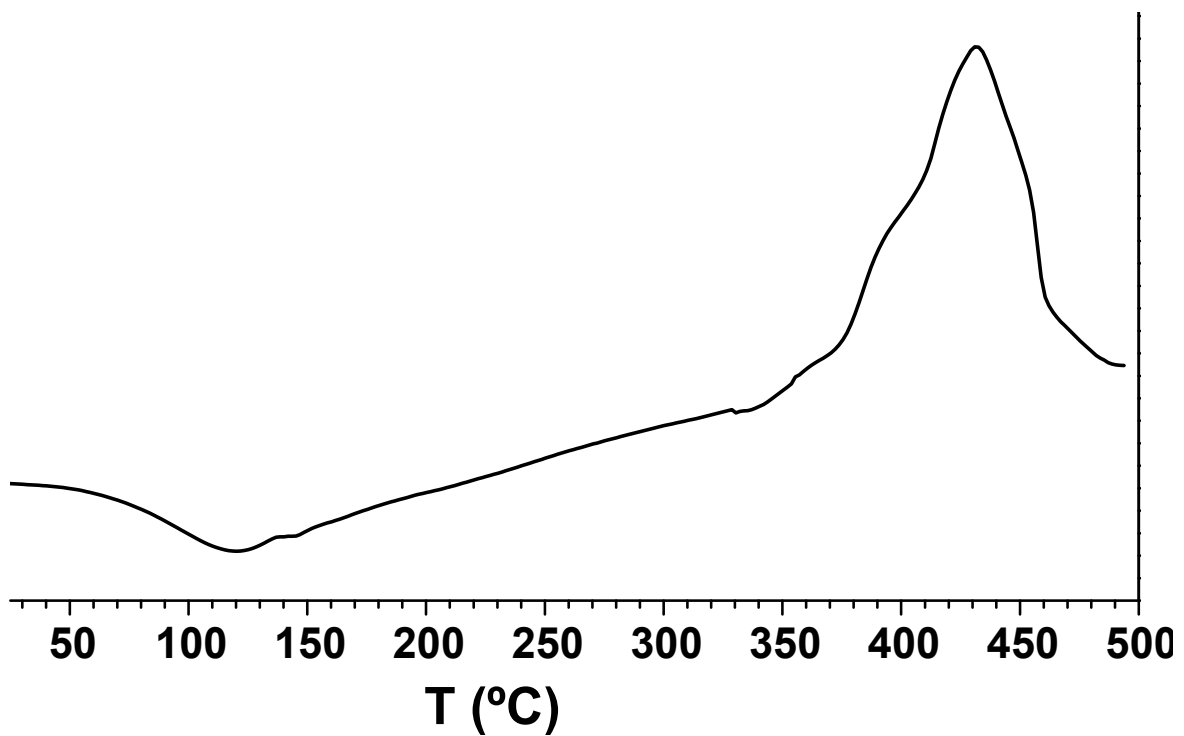
-
- (66) Sun, X.; Bai, R.; Zhang, Y.; Wang, Q.; Fan, X.; Yuan, J.; Cui, L.; Wang, P. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2013**, *171*, 1673–1680.
- (67) Kulicke, W.; Otto, M. *Macromol. Chem. Phys.* **1993**, *194*, 751–765.
- (68) Aktaş, N.; Şahiner, N.; Kantoğlu, Ö.; Tanyolaç, A. *J. Polym. Environ.* **2003**, *11*, 123–128.
- (69) Kaya, Í.; Yıldırım, M.; Kamacı, M. *Eur. Polym. J.* **2009**, *45*, 1586–1598.
- (70) Kaya, Í.; Kamacı, M.; Arıcan, F. *J. Appl. Polym. Sci.* **2012**, *125*, 608–619.
- (71) Ceylan, H.; Kubilay, S.; Aktaş, N.; Sahiner, N. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 2025–2031.
- (72) Ikeda, R.; Uyama, H.; Kobayashi, S. *Macromolecules.* **1996**, 3053–3054.
- (73) Roy-Arcand, L.; Archibald, F. S. *Enzyme Microb. Technol.* **1991**, *13*, 194–203.

8. ANEXOS

Anexo 1. Espectro de RMN ^1H del AG.Anexo 2. Espectro de RMN ^{13}C del AG.

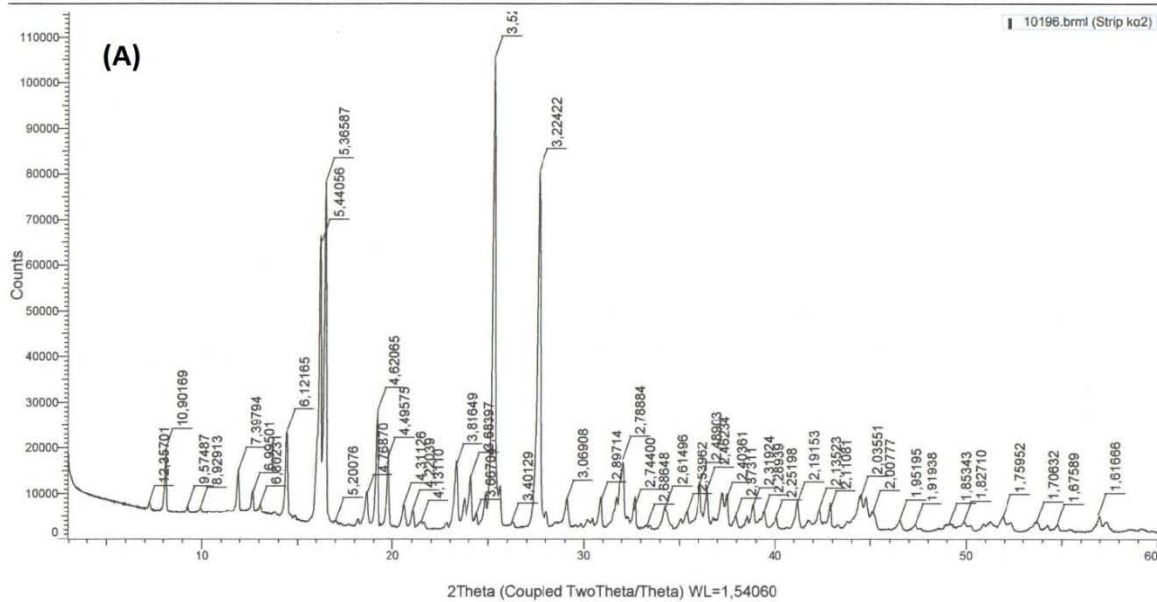


Anexo 3. Termograma de TGA de un derivado de AG.



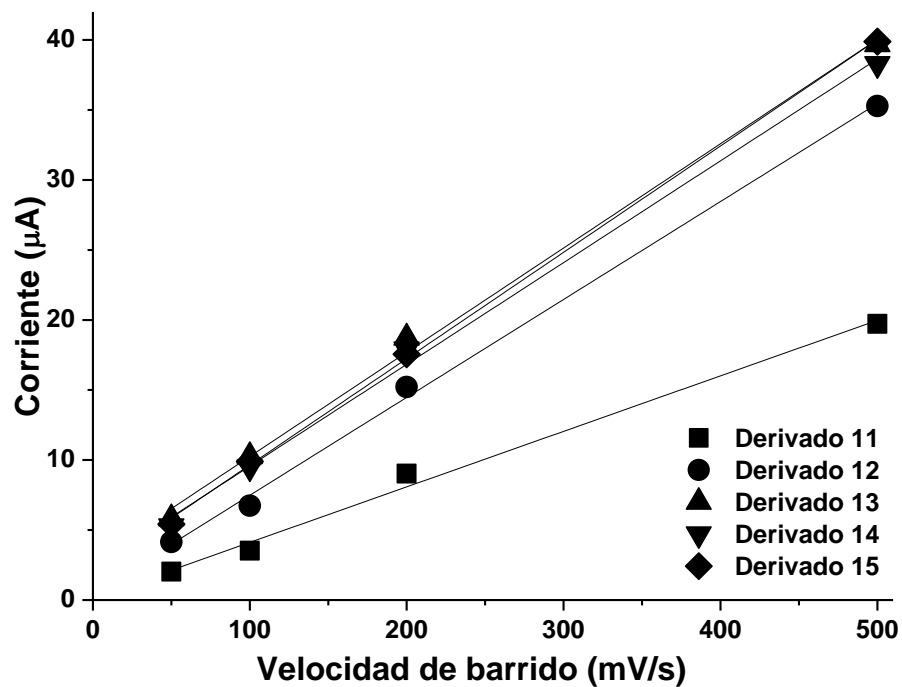
Anexo 4. Termograma DSC de un derivado de AG.

Facultad de Química, USAI, UNAM México
10196_GA (Coupled TwoTheta/Theta)

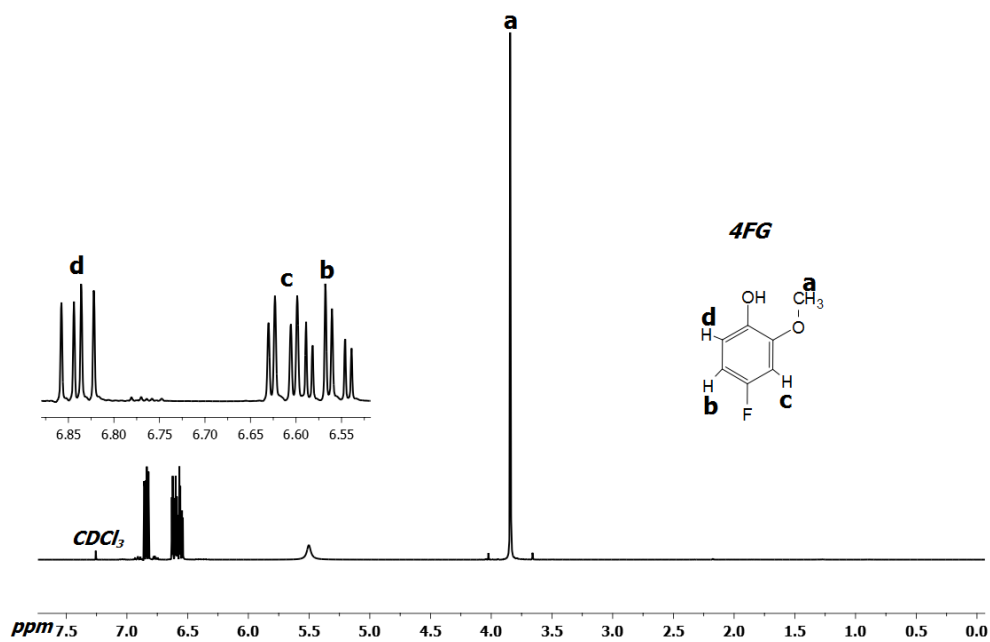


(B)

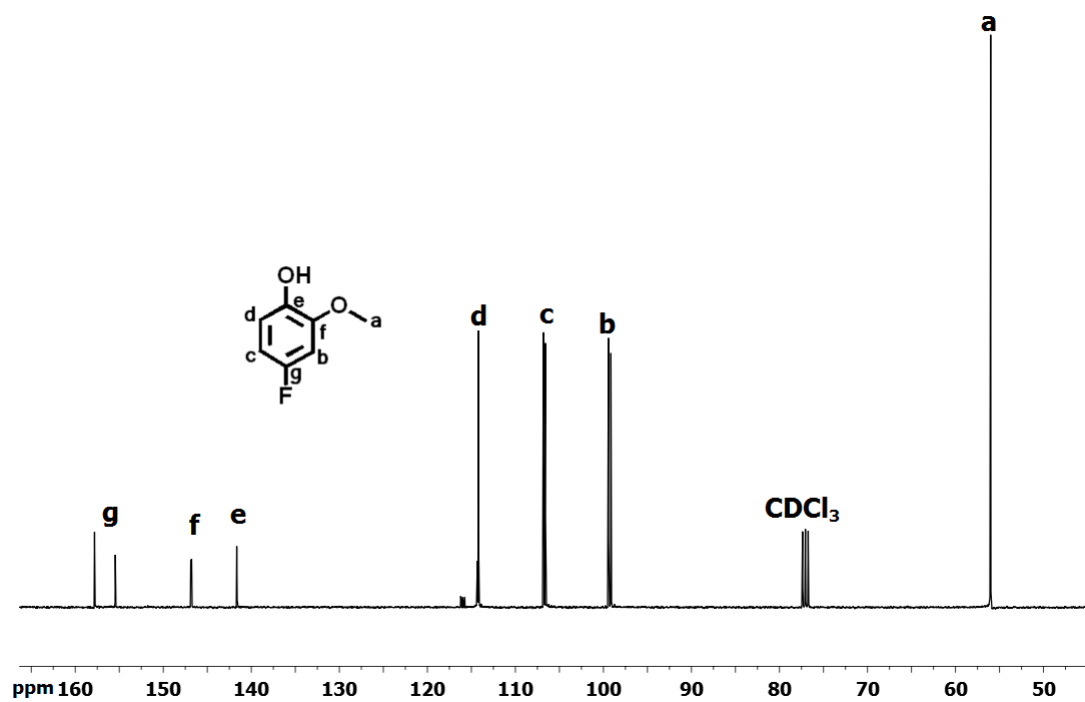
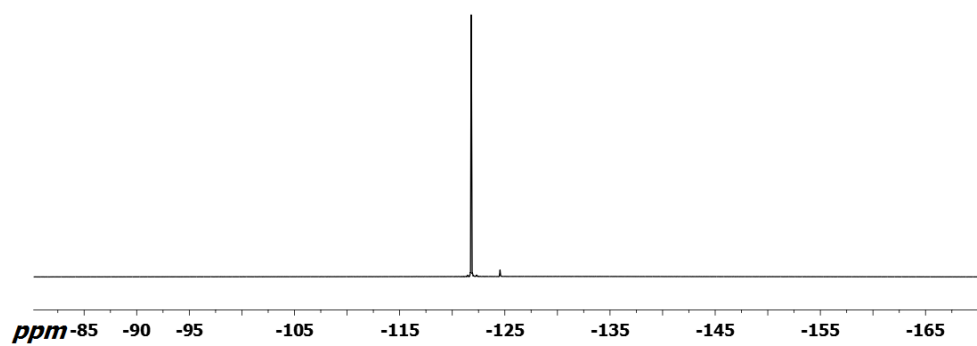
Anexo 5. Espectros PXRd de AG (A) y de su derivado (B).

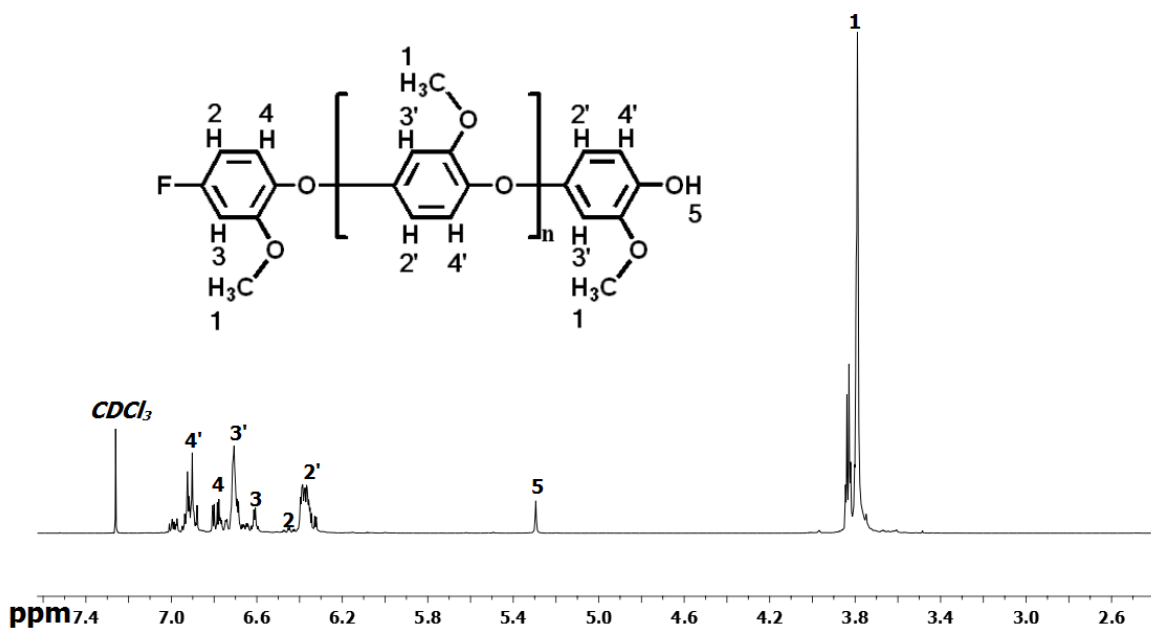
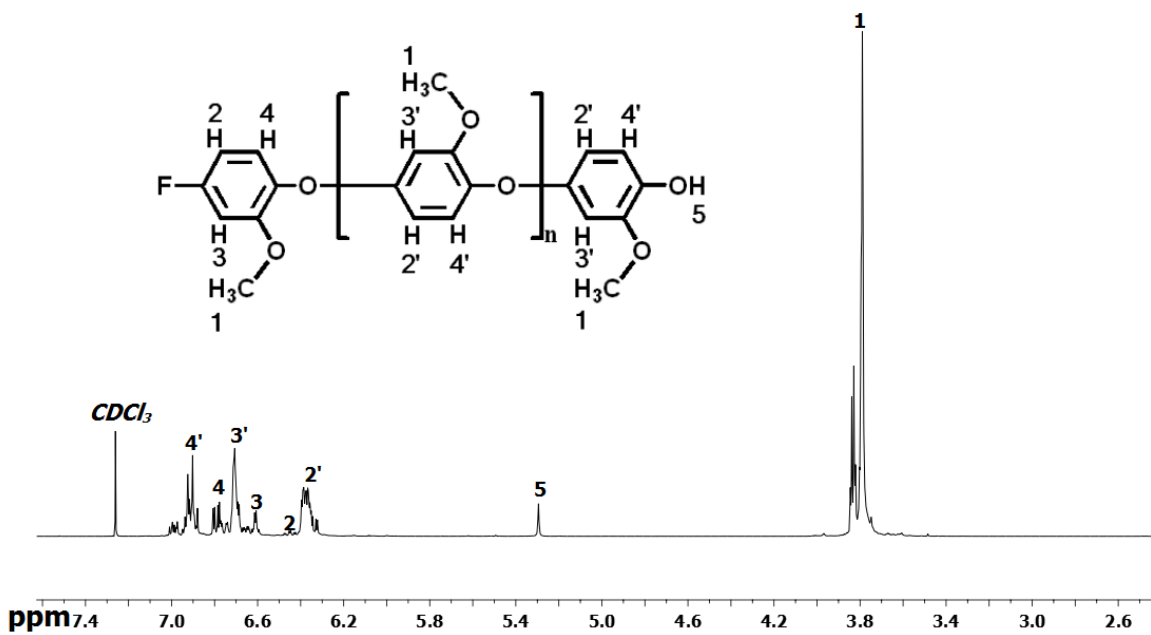


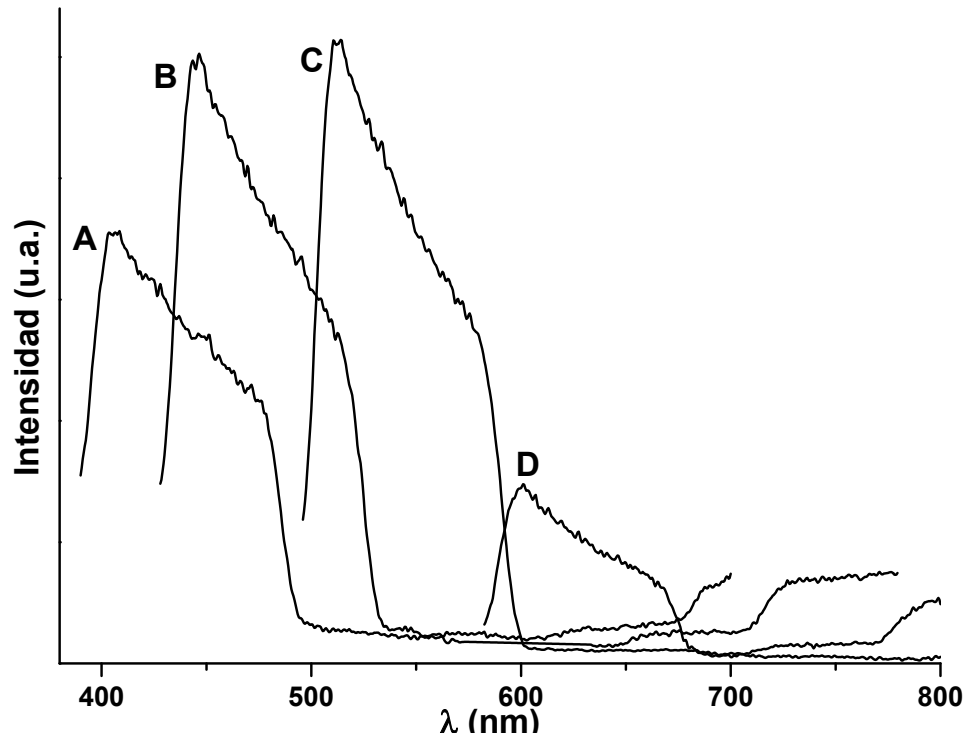
Anexo 6. Gráfico de la corriente del pico de reducción como función de la velocidad de barrido de los derivados de AG 11 al 15 de acuerdo a tabla 1



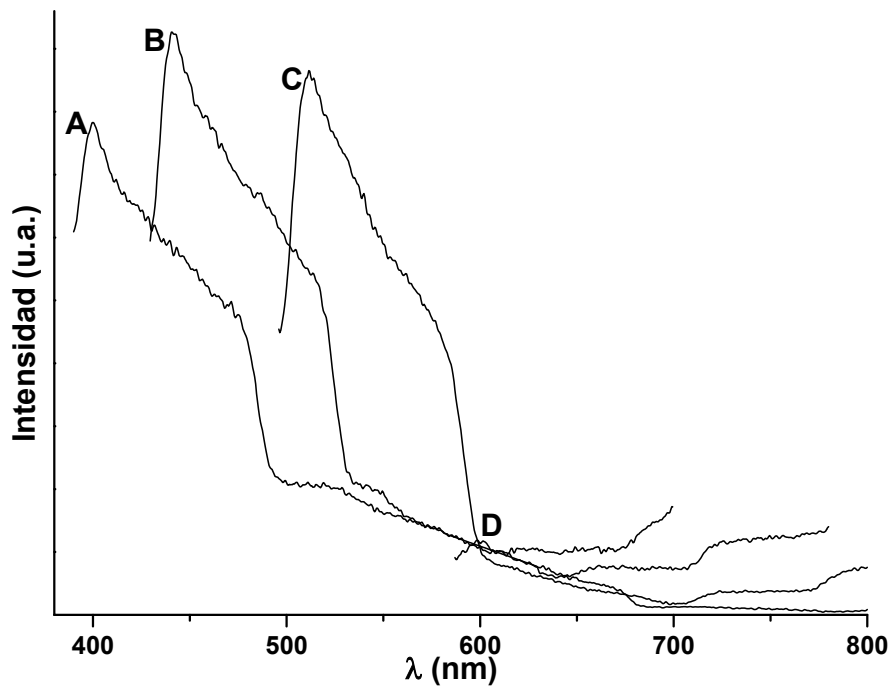
Anexo 7. Espectro de RMN ^1H del 4FG.

Anexo 8. Espectro de RMN ^{13}C del 4FG.Anexo 9. Espectro de RMN ^{19}F del 4FG.

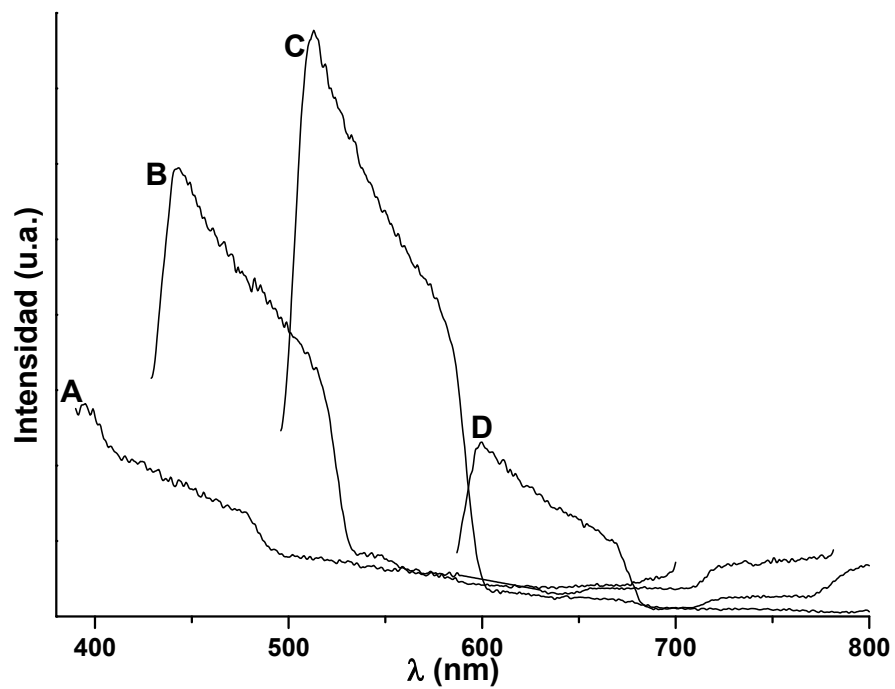
Anexo 10. Espectro de RMN ^1H de un derivado de 4FG.Anexo 11. Espectro de RMN ^{13}C de un derivado de 4FG.



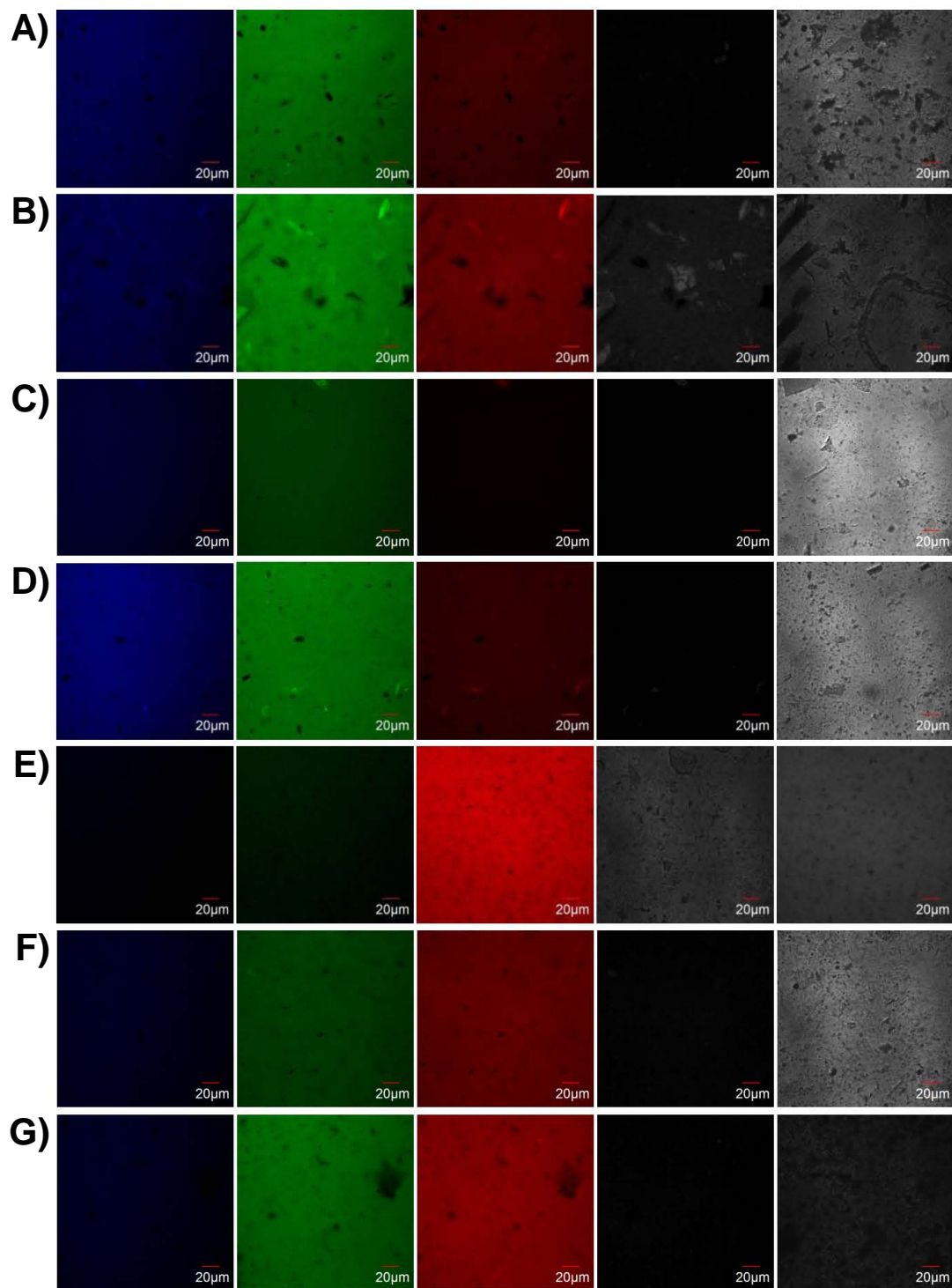
Anexo 12. Espectros de fotoluminiscencia de la muestra FGA402. λ_{ex} (nm): A) 365, B) 405, C) 473 y D) 559.



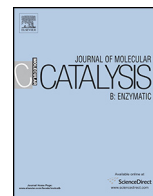
Anexo 13. Espectros de fotoluminiscencia de la muestra FGM302. λ_{ex} (nm): A) 365, B) 405, C) 473 y D) 559.



Anexo 14. Espectros de fotoluminiscencia de la muestra FGM402. λ_{ex} (nm): A) 365, B) 405, C) 473 y D) 559.



Anexo 15. Imágenes de LSCM de los derivados de 4FGA bajo diferentes campos de excitación. A) FGA301, B) FGA401, C) FGA302, D) FGM301, E) FGM401, F) FGM302 y G) FGM402. De izquierda a derecha: λ_{em} (nm): 425-460, 485-545, 575-620, 655-755 y campo normal.



Trametes versicolor laccase oxidation of gallic acid toward a polyconjugated semiconducting material



Juvenio López^a, José M. Hernández-Alcántara^b, Pedro Roquero^c, Carmina Montiel^a, Keiko Shirai^d, Miquel Gimeno^{a,*}, Eduardo Bárzana^{a,**}

^a Depto. Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, D.F. 04510, Mexico

^b Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, D.F. 04510, Mexico

^c Depto. Ingeniería Química, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, D.F. 04510, Mexico

^d Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalpa, Depto. Biotecnología, Laboratorio de Biopolímeros, San Rafael Atlixco 186, Mexico City, C.P. 09340, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 May 2013

Received in revised form 1 July 2013

Accepted 31 July 2013

Available online xxx

Keywords:

Gallic acid

Enzyme

Laccase

ABSTRACT

This study is concerned with the successful synthesis of a semiconducting polyphenol in high yield (82%) from *Trametes versicolor* laccase-mediated oxidative polymerization of the naturally abundant gallic acid. The determined K_M was 0.418 mM, thus showing high affinity of this enzyme for the substrate. The polymer can be solubilized in water up to 150 mg mL⁻¹, whereas it presents poor solubility in organic solvents. The molecular structure presented phenylene propagation which allowed for a maximum conductivity in solid state of 10⁻⁴ S m⁻¹ with a band gap (E_g) of 2.41 eV. In addition, a growing absorption peak at 450 nm monitored by UV-spectra was observed during polymerization. Cyclic voltammetry studies in aqueous solution of the polymers displayed a cathodic wave around 0.35 V vs Ag/Ag⁺ and two anodic waves between 0.4 and 0.8 V vs Ag/Ag⁺ at any scan rate for all samples, interestingly, the peak current of the waves increased with the increase of the scan rate.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Polyphenolics with highly conjugated structures have found application in microelectronics, non-linear optics and sensors because of their good thermal stability and mechanical strength [1–3]. Enzymatic synthesis of polyphenols has been proposed using oxidoreductases, mainly horseradish peroxidase (HRP) and in a lesser extent, chloroperoxidase (CPO), soybean peroxidases (SBP) and laccases. The enzyme-mediated synthesis of polyphenols has many advantages over chemical routes, especially the mild reaction conditions in absence of toxic catalysts and the use of environmentally friendly processes [4,5]. These processes involve enzyme activation by hydrogen peroxide or molecular oxygen substrates in aqueous or organic/buffer mixture and generation of O radicals to the reaction media. Nevertheless, research on the enzyme-mediated synthesis of polyphenols with opto-electronic properties is recent, and the reports are restricted to peroxidase-mediated reactions [6–9]. In this regard, Nabid et al. [9] described

the HRP biocatalyzed synthesis of poly(luminol) to attain a maximum conductivity of 10⁻⁵ S m⁻¹, which was higher than the previous material from HRP-mediated hydroxy-functionalized carbazole polyoxidation (10⁻⁸ S m⁻¹) by Bilici and co-workers in 2010 [7]. In the latter work, an increase in conductivity up to 10⁻³ S m⁻¹ was achieved after iodine doping. Generally, H₂O₂ solutions are added dropwise to avoid the so-called “suicide” HRP hemoprotein inactivation by excess of peroxide in the reaction media. Alternatively, the laccases have trinuclear copper active sites with an additional mononuclear copper site and are activated by molecular oxygen [10]. Similarly to peroxidases, coupling selectivity can be controlled by the selection of reaction conditions and monomers [5]. Basic pH is often reported for optimized fungal laccase activities [11], although they are significantly inhibited at pH below 3. Generally, optimum activities of laccases in polyoxidation of phenolic substrates are reported at pH 5, just above its isoelectric point. Aktaş and Tanyolaç described the oxidative polymerization of catechol by laccase from *Trametes versicolor* (LTV) in wastewater treatment studies at pH 5 in acetone/buffer mixture media saturated with molecular oxygen [12]. In another work, Ceylan et al. found an optimum pH of 6 for this enzyme in polymerization studies involving 1-naphthol in water–acetone mixtures [13]. We are the first to report the enzymatic polyoxidation of gallic acid (GAL), a non-toxic and naturally abundant phenolic molecule, using LTV in buffer media at

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56225310.

** Corresponding author.

E-mail addresses: mgimeno@unam.mx, mgimeno@servidor.unam.mx (M. Gimeno), ebg@unam.mx (E. Bárzana).

pH 5 to attain a water-soluble material. Polyconjugated structures were obtained, which attained remarkable conductivity values, as inferred from solid state conductivity and cyclic voltammetry (CV) studies. The obtained product may have potential application in electronic devices, as a novel semiconducting polymer from natural sources, synthesized in mild and environmentally friendly conditions.

2. Methods

2.1. Materials

LTV (free lyophilized protein stored at -20°C) was supplied by Fluka (USA). GAL (reactive grade) was purchased from Sigma–Aldrich (USA). Methanol (technical grade) was supplied by Química Barsa SA de CV (México). 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) was purchased from Fluka (USA). All other commercially supplied chemical were analytically pure and all the reagents were used as received.

2.2. Enzyme activity assay

LTV activity was measured at 25°C using 9.1 mM ABTS in monobasic phosphate buffer pH 5 (100 mM). 25 μL of protein (1 mg mL^{-1}) in the phosphate buffer was added to 2.9 mL of the ABTS solution [14]. Absorbance was measured at 420 nm ($E_{420} = 36\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) using a Lambda 2S UV-visible spectrophotometer (Perkin Elmer, USA). The enzyme activities were expressed in international units (U), defined as the amount of enzyme needed to produce 1 μmol of oxidized ABTS per min. The commercial LTV used in this study displayed an activity of 5.12 U/mg of protein.

2.3. Enzymatic polymerization experiments

In a typical procedure: 850.6 mg (5 mmol) of GAL were added to a mixture of 25 mL of acetate buffer (pH 5) and 2 mL of NaOH (2 M) in a 50 mL round-bottom flask equipped with a magnetic stirrer. Reactions were conducted at 25°C and pH 5 under stirring (500 rpm) and air was bubbled using an air pump aquarium Elite 800 (Hagen Inc, Canada) until an oxygen concentration of 6 mg L^{-1} is attained, as measured by an Aplisens DO sensor connected to ez-OD-controler (Applikon, Netherlands). Afterwards, the units of activity of LTV, as indicated, were added and the reaction mixture was stirred and bubbled with air to keep the oxygen concentration at 6 mg L^{-1} throughout reaction time. Products were precipitated into 250 mL of cold methanol (5°C) under stirring, then filtered and dried in vacuum to yield the polymer as black powders. Yields were calculated as weight percentage of precipitated material related to the initial GAL weights. Blank experiments carried out without added enzyme did not yield any product, which implies that the presence of the biocatalyst is necessary for the polymerization to occur. All experiments were carried out by duplicate. Found C 49.75%, H 2.53%; $(\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_5)_n$ requires C 50%, H 2.43%. ^{13}C NMR (δ , ppm): 108 s, b overlapped (3C, C=C and C-COOH); 133 s, b (2C, =C-OH); 146 (1C, =C-OH); 177 (1C, COOH). FT-IR: $3000\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ broad band (O-H stretching); 1350 and 1060 cm^{-1} phenolic O-H bending and phenolic C-O stretching; 1570 cm^{-1} aromatic C=C stretching.

2.4. Michaelis constant (K_M) based on GAL conversion and O_2 consumption

23 mL of acetate buffer (pH 5) was placed in a 50 mL flask and bubbled with air until oxygen saturation ($5.9 \pm 0.1\text{ g/m}^3$) as measured by the O_2 -electrode sensor. 2 mL of NaOH (2 M) and GAL (final concentration of $2.35\text{ }\mu\text{L mg}^{-1}$ GAL) were then added to the buffer solution and stirred at 500 rpm until solubilization. Subsequently,

2 mL of LTV aqueous solution (10.24 U) was added and the dissolved oxygen (DO) was measured each 10 s during 5 min at $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Control reactions without added GAL showed no variations in the DO concentrations; whereas blank experiments without added LTV and GAL concentrations below 25 mM showed a slight DO drop lower than 0.1 g/m^3 after 20 min of reaction time and remained unchanged afterwards. The initial reaction rate was calculated by linear regression of DO data ($R^2 > 0.99$). All experiments were done by duplicate.

2.5. Measurements

The number average molecular weights (M_n) and polydispersity (PDI) of polymer samples were measured by size exclusion chromatography (SEC) in an Agilent 1210 series (USA) liquid chromatographer equipped with a Refractive index detector and a Waters (USA) Ultrahydrogel 500 ($7.8 \times 300\text{ mm}$) column calibrated with polyethylene glycol standards (Varian, USA). Samples were eluted with deionized water (flow = 0.8 mL min^{-1}) containing LiCl (0.1 M) in order to prevent association of polyphenolic chains. Samples and standards were dissolved in the mobile phase and filtered ($0.45\text{ }\mu\text{m}$) prior to injection in the chromatographer. Infrared (IR) spectra were recorded in an ATR-FTIR spectrophotometer (Perkin Elmer Spectrum 100). X-ray powder diffraction (XRD) analyses were carried out in a Siemens D-5000 unit with $\text{K}\alpha$ radiation Cu and $k = 1.54\text{ \AA}$. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded in a Varian Unity Innova (USA) spectrometer operating at 400 MHz using deuterated water or deuterated dimethylsulfoxide as solvents. ^{13}C solid state NMR spectra were recorded in a Bruker Avance II 300 unity at 75 MHz, equipped with a detector CP-MAS BB (BradBand, diameter of 4 mm, MAS of 8 kHz). UV spectra of polymers and monomer were conducted in aqueous solutions (0.1 mg mL^{-1}) in a Perkin-Elmer Lambda 2S UV-Vis between 200 and 400 nm scan rate. Conductance measurements were carried out under atmospheric conditions at ambient temperature on a home-made device with copper contacts using pellets of the polymers of $4 \times 5 \times 1\text{ mm}$. Cyclic voltammetry was performed at ambient temperature with a 263 A, Princeton Applied Research Potentiostat-Galvanostat, in a conventional three-electrode cell composed of a platinum disk with a surface area of 0.008 cm^2 as working electrode, a Ag wire as reference electrode and a platinum wire as auxiliary electrode. NaOH (0.1 M) solution was employed as supporting electrolyte. All CV experiments were carried out without stirring. The open circuit potential (OCP) was measured during 10 min, and the potential scans were first carried out from the OCP value toward positive potentials, up to an inversion potential of 1.35 V vs Ag/Ag $^+$, then reversed toward negative potentials. Slope and R^2 values were calculated from the least square method using software (Origin 8.0 $^{\text{®}}$). Thermogravimetric analyses (TGA) were conducted on a TA Instruments Hi-Res TGA 2950 (US) under nitrogen atmosphere in the $25\text{--}500^{\circ}\text{C}$ at a heating rate of $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Differential scanning calorimetry (DSC) measurements were carried out in a DuPont DSC 2100 (US) between 10 and 300°C (rate = $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$) under nitrogen atmosphere.

3. Results and discussion

3.1. Laccase-mediated polyoxidation

The polymerization rates reached a maximum when initial GAL concentration was above 10 mM, showing a characteristic Michaelis behavior (Fig. 1). The remarkable high affinity for the substrate was ascribed to a $K_M = 0.418\text{ mM}$ for GAL according to the Lineweaver–Burk plot ($R^2 = 0.93$). The only previous report by

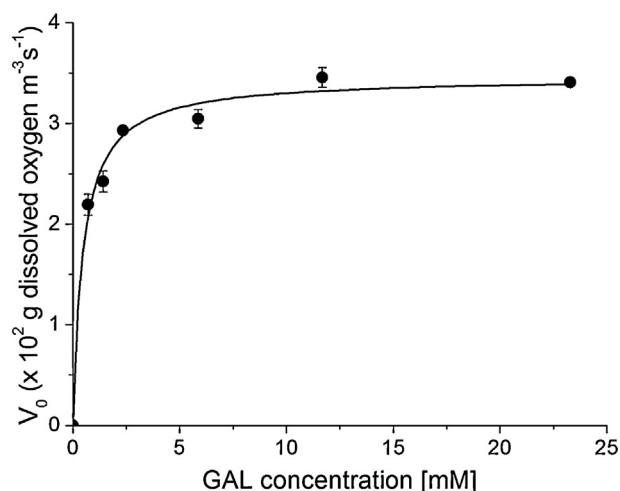


Fig. 1. Effect of GAL initial concentration on LTV activity.

Tianzhi and co-workers [15] indicated a $K_M = 6.92$ mM for *Rhus vernicifera* laccase, therefore GAL affinity is higher for LTV.

The polymer sample entries from best reaction conditions conducted at pH 5, as described in Section 2.3, are included in Table 1. Noteworthy, initial experiments carried out at pH 6 and 7 or at pH 5 without oxygenation of the media gave poor product characteristics, as shown in Fig. 2. The yields attained in this work are shown in Fig. 2A with a maximum of 82% at 24 h reaction. As can be observed, yields increase with the reaction time up to 24 h for the enzyme to monomer weight percentage of 0.59 wt% (33 mg of GAL per U of LTV) and 1.18 wt% (16.5 mg GAL per U of LTV) in samples from Table 1 entries 6–15, and then remain constant, while lower yields were always obtained with 0.29 wt% (67.3 mg GAL per U of LTV) feed (entries 1–5 in Table 1). The results on reactions conducted at higher pH, or without oxygenation, render lower yields as shown in Fig. 2A. The measured M_n and PDI of the polyphenolic samples synthesized with the best results are shown in Fig. 2B and Table 1, respectively. The measured molecular weights slightly increase with the reaction time and with the enzyme to monomer weight percentage, as shown in Fig. 2B, and all samples displayed low PDI (Table 1). The characteristics of products obtained at pH higher than 5 and those without oxygenation of the media are shown in Fig. 2B, exhibiting mainly oligomers. Interestingly, our synthesized polyphenolic samples were soluble in water (100 – 150 mg mL $^{-1}$), unlike the

Table 1

LTV-mediated oxidative polymerization of GAL conducted at pH 5 with oxygen concentration of 6 mg mL $^{-1}$.

Entry	Enzyme ^a (wt%)	Time (h)	PDI ^b	Slope ^c	R ² ^c
1	0.29	6	1.04	0.784	0.991
2	0.29	12	1.05	0.640	0.975
3	0.29	18	1.05	0.713	0.963
4	0.29	24	1.05	0.765	0.992
5	0.29	48	1.07	0.758	0.996
6	0.59	6	1.04	0.889	0.995
7	0.59	12	1.05	0.895	0.993
8	0.59	18	1.05	0.807	0.999
9	0.59	24	1.07	0.868	0.993
10	0.59	48	1.10	0.864	0.999
11	1.18	6	1.05	1.019	0.985
12	1.18	12	1.05	0.953	0.990
13	1.18	18	1.06	0.836	0.999
14	1.18	24	1.10	0.865	0.999
15	1.18	48	1.12	0.864	0.999

^a Enzyme weight percentage with respect to GAL.

^b Polydispersity index (PDI) as measured by SEC software.

^c Slope and R² from the linear log cathodic current peak–log scan rate relationship in CV studies.

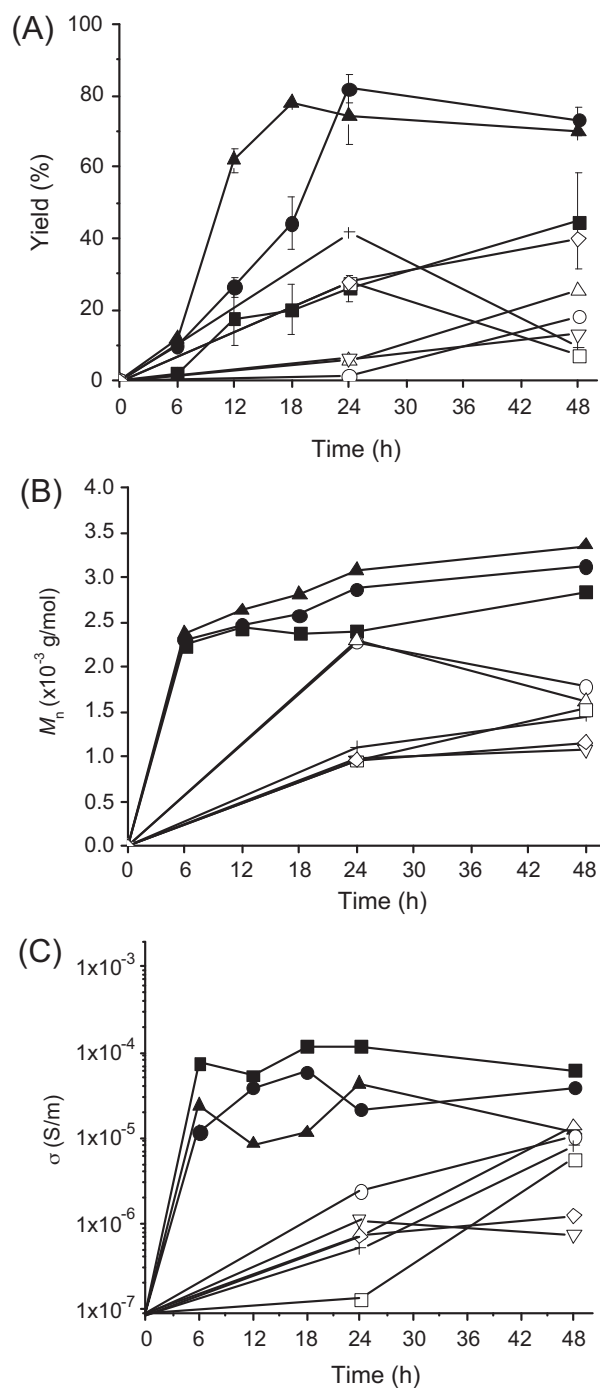


Fig. 2. Polymer yield (%)–reaction time relationships (A); number average molecular weight by SEC ($M_n \times 10^{-3}$)–time relationships (B) and conductivity (σ)–reaction time (C) at pH 5 and oxygenated for enzyme to monomer weight percentage of 0.29% (■), 0.59% (●) and 1.18% (▲); at pH 5 and without oxygenation for enzyme/monomer wt% relations of 0.59% (○) and 1.18% (△); at pH 6 without oxygenation for enzyme/monomer wt% relations of 0.59% (+) and 1.18% (v); at pH 7 without oxygenation for enzyme/monomer wt% relations of 0.59% (□) and 1.18% (◇).

aforementioned reported semiconducting polyphenols, although poorly soluble (<10 mg mL $^{-1}$) in acetone, DMSO, DMF and pyridine and non-soluble in hexane, toluene, chloroform, dichloromethane and acetonitrile.

^1H NMR spectra for the enzymatically synthesized polymers confirmed the absence of signals of aromatic hydrogen owing to C–C coupling in the polymeric chain (Fig. 3D). Fig. 3B and C shows

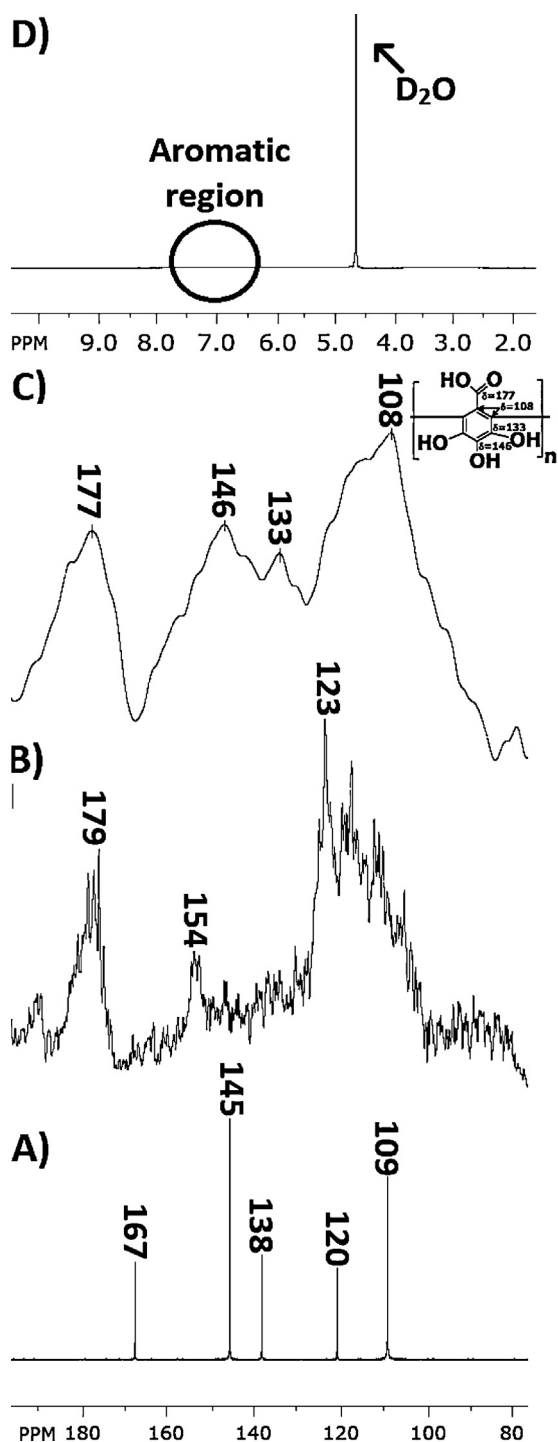


Fig. 3. Comparative spectra of ^{13}C NMR of GAL (A), ^{13}C NMR of polymer (B); ^{13}C CP-MAS NMR of polymer (C) and ^1H NMR of polymer (D).

the representative aromatic regions of the ^{13}C NMR and ^{13}C CP-MAS-NMR spectra, respectively, of entry 4 in Table 1 against the ^{13}C NMR spectrum of GAL (Fig. 3A). As observed, the polymer exhibited poor signal-to-noise ratios and broad bands (Fig. 3B and C), despite the long time for spectrum acquisition (21 h), which might be attributed to shortened T_2 relaxation times owing to the high rigidity of the polymer [16]. Nonetheless, the ^{13}C NMR spectra for the polymer showed four broad bands in the aromatic region which suggests that the carbons 1, 2 and 6 of the aromatic ring have a very similar chemical shift due to the phenylene coupling. In the FTIR spectra of all synthesized polymers, no bands are observed

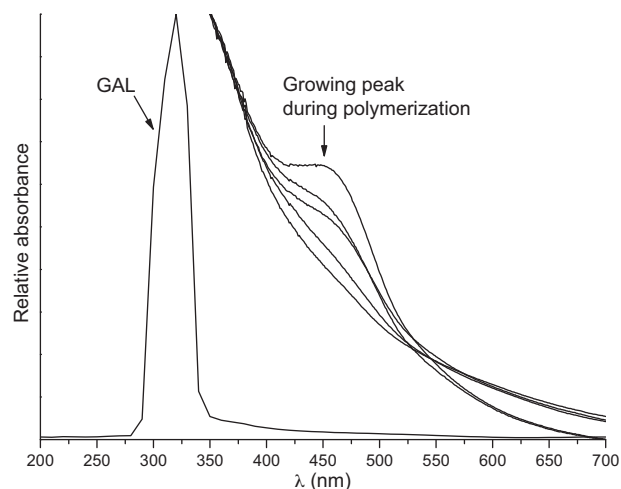


Fig. 4. Changes of growing absorption peak at 450 nm during the enzymatic oxidative polymerization as analyzed by UV spectroscopy.

in the $1230\text{--}1270\text{ cm}^{-1}$ region, characteristic of aromatic C–O–C stretch [17] (see supplementary data for FTIR spectra of sample entry 4 in Table 1). According to TGA data, all the polymer samples displayed a 5 wt% loss above $178\text{ }^\circ\text{C}$, which confirms the relatively high thermal resistance of the polymers. Glass transition temperatures and melting points of the polymers could not be observed from DSC analyses. Additionally, X-ray diffraction spectra for all the synthesized polymers displayed amorphous structures (see supplementary data for powder X-ray diffraction spectra of GAL crystals and that for polymer).

3.2. Conductivity measurements

The conductivities of the polymer samples were calculated in solid state from conductance data using the Ohm's law $\sigma = \rho^{-1}$. As shown in Fig. 2C, the conductivity of the polymer samples synthesized at pH 5 with oxygenation of the media varied between 10^{-5} and 10^{-4} S m^{-1} , whereas samples from polymerizations conducted at pH higher than 5 or without oxygenation render low conductivity, which might be explained by their oligomeric structure similar to the non-conducting GAL. However, the results on conductivity for each enzyme to monomer weight percentage indicate that it is independent of the molecular weight or the yield. Nonetheless, the maximum conductivity for each relation was reached for samples synthesized with reaction times between 18 and 24 h, and increased with decreasing enzyme to monomer weight percentage. Noteworthy, the maximum conductivity of the polymers is up to 3 orders of magnitude higher if compared to the chemically synthesized polyphenols derived from *o*-dianisidine (10^{-7} S m^{-1}) reported by Kaya et al. [18] and 4 orders as compared to the 4-fluorobenzaldehyde reported elsewhere [19]. Regarding the reports on enzyme-mediated syntheses of semiconducting polyphenols, our materials show higher conductivity than the reported poly(luminol) [9] and as well, the maximum conductivity is above the non-doped hydroxy-functionalized carbazole (10^{-8} S m^{-1}) [7].

The changes in the absorption peak in UV spectra during polymerization are shown in Fig. 4 for samples in entries 6–10 in Table 1 with a growing absorbance at 450 nm, corresponding to $\pi\text{--}\pi^*$ transitions, while the maximum absorbance sharp peak of GAL is observed at 320 nm. This lower energy for the $\pi\text{--}\pi^*$ transition of the polymer agrees with C–C coupling. From the absorption edges, the optical band gaps values (E_g) were calculated using the equation $E_g\text{ (eV)} = 1240\lambda_{\text{on}}^{-1}\text{ (nm)}$ [7] to give 3.88 and 2.41 eV for

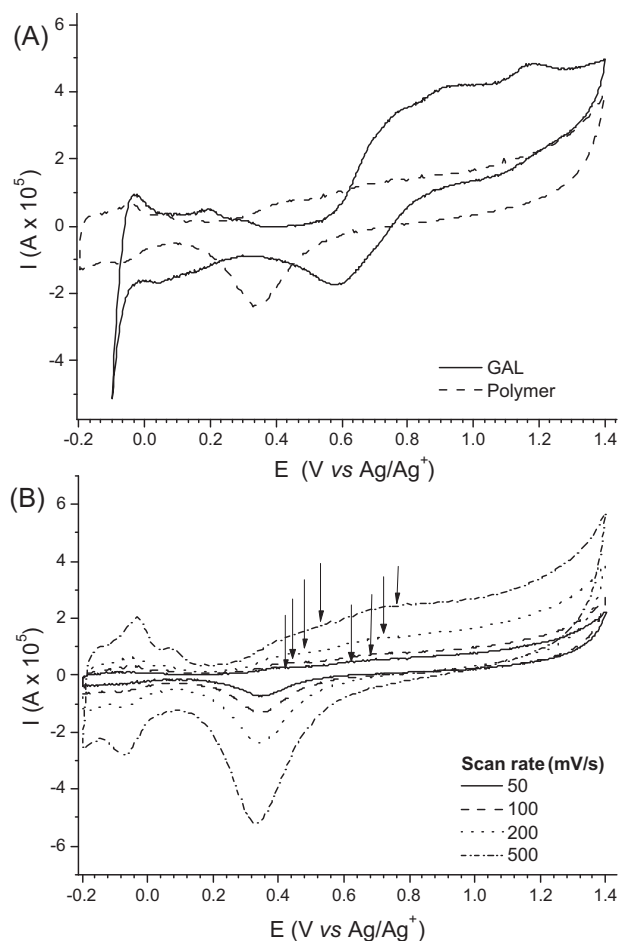


Fig. 5. Cyclic voltammetry responses of (A) the monomer and polymer (entry 4 in Table 1) at a scan rate of 0.2 V s⁻¹; (B) an enzymatically synthesized polyphenolic (entry 4 in Table 1) at different scan rates. Arrows indicate the slope changes in the anodic wave, corresponding to two oxidation steps, for each scan rate.

the monomer and that for the highest conducting polymer, respectively.

3.3. Cyclic voltammetry

CV studies were conducted with the highest semi-conducting polymers are described in Table 1. The solubility of the polymers in water allowed its study in this media and it represents, to the best of our knowledge, the first CV study on enzymatically synthesized polyphenolic materials. Typical CV current response plots for the monomer, and that for the polymer sample of entry 4 in Table 1, are shown in Fig. 5. All the polymer samples showed similar behavior with one marked cathodic wave around 0.35 V and two weak anodic waves between 0.4 and 0.8 V at any scan rate. The anodic and cathodic peaks between -0.2 and 0.15 V vs Ag/Ag⁺ are characteristic of the platinum electrode, and correspond to proton adsorption–desorption phenomena at different planes of the Pt crystal, and to the molecular hydrogen discharge. Comparison of the monomer and polymer electrochemical responses is presented in Fig. 5A. The anodic wave corresponding to GAL presents three slope changes between 0.6 and 1.25 V vs Ag/Ag⁺, while the polymer, with lower currents, presents two oxidation steps at 0.4 and 0.8 V vs Ag/Ag⁺. Noteworthy, the proton adsorption–desorption currents observed at negative potentials are considerably diminished, and the H₂ evolution current is suppressed by the presence of the polymer, even at lower potentials than in the case of the control monomer sample, indicating that the polyphenolic strongly

adsorbs on Pt and modifies the surface activity of the electrode toward this reaction. The main cathodic wave observed is shifted by more than 200 mV with respect to control, indicating a large difference in the adsorption free energies. The oxidation steps of the polymer, presented in Fig. 5B, are slightly shifted toward positive potentials as the scan rate is increased, while the cathodic wave is located at 0.35 V at any scan rate. The potential of this reduction current is coincident with one of the Pt characteristic peaks, and this current should thus be considered as the sum of at least two different electron transfer processes. Interestingly, the plot presenting the current of this peak as a function of the scan rate reveals that the current increases as the mean molecular weight of the polymer increases (see supplementary data file for graphical representations of current peak at 0.35 V (μA) vs scan rate (mV s⁻¹) for each entry in Table 1). In addition, the peak current of the wave at 0.35 V increased with the scan rate. A linear log cathodic current peak-log scan rate relationship was found with R² > 96, as summarized in Table 1. Additionally, the value of the slope (Table 1) suggests that the reduction of the polyphenol takes place by means of a mixed diffusion–adsorption process.

4. Conclusions

The enzymatic polymerization of GAL catalyzed by LTV was successfully achieved in a pH 5 buffer medium, at room temperature, with the aid of oxygenation. The experimental evidences pointed out that the established reaction conditions gives polymeric chain growth via C–C coupling and the materials exhibited good conductivity in solid state (up to 10⁻⁴ S m⁻¹) and in CV studies, which is an improvement over other reported semi-conducting polyphenols. Interestingly, this enzymatically synthesized polymer is water soluble and it possesses active pendant groups, which might increase its range of applications. This material is obtained from naturally abundant sources and it might be an alternative to other semiconducting polymers obtained by other synthetic routes.

Acknowledgments

We gratefully thank financial support by CONACyT (National Council for Science and Technology in Mexico) for postgraduate scholarship (JL) and funding project SEP-Básica 2011 (J3) #165757 and DGAPA-UNAM funding project Papiit-IA201813. We also thank to Dr. Atilano Gutierrez Carrillo at the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa for his help on NMR spectroscopy.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.07.020>.

References

- [1] H. Shirakawa, E.J. Louis, A.G. MacDiarmid, C.K. Chiang, A.J. Heeger, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1977) 578–580.
- [2] Y. Cui, X. Han, Y. Ding, Z. Lu, *Polym. Bull.* 64 (2010) 647–656.
- [3] P. Zaragoza-Gasca, M. Gimeno, J.M. Hernández, E. Bárzana, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 72 (2011) 25–27.
- [4] J.S. Dordick, M.A. Marletta, A.M. Klivanov, *Biotechnol. Bioeng.* 30 (1987) 31–36.
- [5] A. Mikolasch, F. Schauer, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82 (2009) 605–624.
- [6] W. Liu, S. Bian, L. Li, L. Samuelson, J. Kumar, S. Tripathy, *Chem. Mater.* 12 (2000) 1577–1584.
- [7] A. Bilici, T. Kaya, M. Yıldırım, F. Doğan, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 64 (2010) 89–95.
- [8] E. Turac, E. Sahmetlioglu, *Synth. Met.* 160 (2010) 169–172.
- [9] M.R. Nabid, S.S. Taheri, R. Sedghi, S.J.T. Rezaei, *Macromol. Res.* 19 (2011) 280–285.
- [10] S. Kobayashi, H. Higashimura, *Prog. Polym. Sci.* 28 (2003) 1015–1048.
- [11] G.S. Nyanhongoa, J. Gomesa, G. Gübitzb, R. Zvauyac, J.S. Readd, W. Steinera, *Bioresour. Technol.* 84 (2002) 259–263.

- [12] N. Aktaş, A. Tanyolaç, *Bioresour. Technol.* 87 (2003) 209–214.
- [13] H. Ceylan, S. Kubilay, N. Aktaş, N. Sahiner, *Bioresour. Technol.* 99 (2007) 2025–2031.
- [14] J. Keeseey, *Biochemica Information*, first ed., Boehringer Mannheim, Indiana, 1987.
- [15] W. Tianzhi, L. Yi, L. Weiping, W. Hongwen, Y. Feng, W. Dingquan, Q. Songsheng, *Termochim. Acta* 303 (1997) 191–196.
- [16] W. Kulicke, M. Otto, *Macromol. Chem. Phys.* 194 (1993) 751–765.
- [17] N. Aktaş, N. Şahiner, Ö. Kantoğlu, A. Tanyolaç, *J. Polym. Environ.* 11 (2003) 123–128.
- [18] İ. Kaya, M. Yildirim, M. Kamaci, *Eur. Polym. J.* 45 (2009) 1586–1598.
- [19] İ. Kaya, M. Kamaci, F. Arican, *J. Appl. Polym. Sci.* 125 (2012) 608–619.



biocat2014 decision letter

1 message

papers@biocat2014.de <papers@biocat2014.de>

Thu, Jul 3, 2014 at 10:23 AM

To: cjuvlopez@gmail.com

Dear Mr. López

We are pleased to inform you that your abstract entitled:

#26 - Poly-oxidation of gallic acid with Trametes versicolor laccase toward a semiconducting material

has been accepted by the Scientific Committee for presentation as poster for biocat2014 in Hamburg, August 31 – September 4. Your poster has been attributed the number **P3-11**.

Poster size should not exceed 95 cm in width and 148 cm in height. The posters will be displayed during the whole meeting and ample time will be allocated to poster discussions. Assistance and material (tape etc.) for mounting the posters will be provided at the congress. All posters should be removed at the end of the congress on Thursday, September 4th.

A preliminary timetable can be found at <http://biocat2014.de/timetable/>

In case you have not registered yet, you can still take advantage of the early registration conditions until July, 11, 2014.

Please note that papers will be withdrawn from the book of abstracts if the presenting author has not registered and paid the registration fee.

We are looking forward to meeting you in Hamburg.

Sincerely,

G. Antranikian
and the Local Organizing Committee
Congress Chair
Garo Antranikian
Hamburg University of Technology (TUHH), Hamburg, Germany

Organizing Committee
Kerstin Sahn, Hamburg University of Technology
Ralf Grote, Hamburg University of Technology
Andreas Liese, Hamburg University of Technology
Gerlinde Löbkens, TuTech Innovation GmbH

Contact / Information
biocat2014 Congress Office
Ms. Gerlinde Loebkens
TuTech Innovation GmbH
Harburger Schloßstr. 6-12
D-21079 Hamburg, Germany
Phone: + 49 40 76629 6551
Fax: + 49 40 76629 6559
E-Mail office@biocat2014



Juvencio Lopez <cjuvlopez@gmail.com>

RV: Your Submission

mgimeno <mgimeno@unam.mx>

Sat, Jul 26, 2014 at 11:39 AM

To: Carlos López Jiménez <cjuvlopez@gmail.com>

De: ees.molcab.c.2ad332.19d008be@eesmail.elsevier.com <ees.molcab.c.2ad332.19d008be@eesmail.elsevier.com> en nombre de Jon Stewart <jds2@chem.ufl.edu>

Enviado: sábado, 26 de julio de 2014 08:02 a.m.

Para: mgimeno

Asunto: Your Submission

Ms. Ref. No.: MOLCAB-D-14-00247

Title: Novel Photoluminescent material by Laccase from *Trametes versicolor* polyoxidation of 4-Fluoroguaiacol throughout defluorination

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic

Dear Professor Gimeno,

I have now received comments on your paper from two knowledgeable reviewers. Both are generally positive, although some points need to be addressed in a revised submission.

For your guidance, reviewers' comments are appended below.

If you decide to revise the work, please submit a list of changes or a rebuttal against each point which is being raised when you submit the revised manuscript. Please note you must respond to each of the Reviewers' comments separately and indicate the page and line number where revisions have been undertaken.

To submit a revision, please go to <http://ees.elsevier.com/molcab/> and login as an Author.

Your username is: mgimeno@servidor.unam.mx

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/molcab/automail_query.asp

On your Main Menu page is a folder entitled "Submissions Needing Revision". You will find your submission record there.

Your revised manuscript should be submitted within 2 months. After this period your submission will be withdrawn and the revised manuscript will be regarded as a new submission.

When submitting this revised manuscript, please ensure that you upload the source files (e.g. Word). Uploading a PDF file at this stage will create delays should your manuscript be finally accepted for publication as it is difficult to accurately extract text from a PDF and Re-keying leads to costly errors being introduced

PLEASE NOTE: The journal would like to enrich online articles by visualising and providing details of chemical structures defined as the main chemical compounds described in Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic articles. For this purpose, corresponding mol files can be uploaded in our online submission system. Submitted mol files will be available for downloading

from your online article on ScienceDirect. Elsevier will generate InChI keys from the mol files and include them in the online article, which increase the online searchability of your article (e.g., in Google). More information can be found at http://help.elsevier.com/app/answers/detail/p/7923/a_id/661. If you wish, you can submit MOL files along with your revised submission.

Please note that this journal offers a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown next to published articles on ScienceDirect (see also <http://www.elsevier.com/audioslides>). If your paper is accepted for publication, you will automatically receive an invitation to create an AudioSlides presentation.

Yours sincerely,

Jon D. Stewart, Ph.D.
Editor
Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.