



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Polioxidación enzimática de 4-fluoro-2-metoxifenol
con Lacasa de *Trametes versicolor*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA:

ERICK MIGUEL ALONSO OMLIN



MÉXICO, D.F., a 20 de noviembre de 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: AGUSTÍN LÓPEZ MUNGUÍA CANALES
VOCAL: ARTURO NAVARRO OCAÑA
SECRETARIO: MIQUEL GIMENO SECO
1er. SUPLENTE: EDUARDO RODRÍGUEZ DE SAN MIGUEL GUERRERO
2do. SUPLENTE: CAROLINA PEÑA MONTES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 314, Departamento de Alimentos y Química Ambiental, Conjunto E,
Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Miquel Gimeno Seco

SUSTENTANTE:

Erick Miguel Alonso Omlin

Agradecimientos

Se agradece a DGAPA PAPIIT por el proyecto IA201813 por beca de estudios de licenciatura y financiamiento de la investigación.

Se agradece a CONACyT por el proyecto SEP-BÁSICA 2011 165757 por financiamiento del proyecto.

ÍNDICE	5
RESUMEN	7
I. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Polímeros.....	9
1.2 Polifenoles.....	12
1.3 Enzimas	15
1.4 Enzimas y su importancia en la síntesis de polímeros.....	17
1.5 Lacasa de <i>Trametes versicolor</i>	20
II. ANTECEDENTES	24
III. HIPÓTESIS	27
IV. OBJETIVOS	28
4.1 Objetivo general.....	28
4.2 Objetivos particulares.....	28
V. METODOLOGÍA	29
5.1 Mediciones.....	29
5.2 Ensayo de actividad enzimática.....	30
5.3 Diseño de experimentos.....	30

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
6.1 Selección de monómero y enzima.....	32
6.2 Actividad enzimática.....	33
6.3 Rendimiento de reacción.....	34
6.4 Caracterización estructural del producto.....	37
6.5 Espectroscopía de Infrarrojo.....	44
6.6 Espectroscopía de Rayos X.....	45
6.7 Cromatografía de Permeación en Gel.....	46
6.8 Análisis térmicos.....	48
6.9 Fotoluminiscencia.....	51
6.10 Microscopía confocal.....	52
VII. CONCLUSIÓN	56
VIII. BIBLIOGRAFÍA	57

RESUMEN

La polimerización es una de las tecnologías de fabricación de nuevos materiales más importantes utilizadas por los seres humanos en los últimos 50 años. En el proceso de la polimerización, las condiciones de reacción y el uso de catalizadores desempeñan un papel sumamente importante, ya que pueden ser determinantes para la adecuada producción y abastecimiento de los materiales, así como para impartir a los polímeros características únicas que los diferencian de otros materiales encontrados en la naturaleza o sintetizados.

Dentro de los muchos tipos de polímeros que existen, se encuentran los polifenoles, los cuales pueden ser sintetizados pero también están ampliamente distribuidos en la naturaleza en vegetales. Principalmente, se han estudiado los efectos de los mismos para la prevención y alivio de padecimientos como el cáncer, la neuroinflamación, diabetes y el envejecimiento, por sus características antioxidantes y antiinflamatorias (Owona Ayissi, 2013). Sin embargo, se pretende encontrar una aplicación novedosa para compuestos polifenólicos además de los mencionados, en específico para la utilización en dispositivos optoelectrónicos.

Muchos compuestos poliméricos en la industria actual se llevan a cabo con vías de síntesis que involucran reacciones de óxido-reducción, por ejemplo en polimerizaciones de emulsión a bajas temperaturas, en donde se usan compuestos tóxicos como la piridina y el formaldehído, además de catalizadores organometálicos basados, entre otros, en cobre. Sin embargo, esto trae consigo problemas de tipo ambiental, ya que la incorrecta disposición de los residuos generados durante estas actividades antropogénicas contamina de metales pesados los suelos y las fuentes de agua. Por lo tanto, es de interés encontrar alguna vía alterna de síntesis polimérica que no necesite de iones metálicos como iniciadores de reacciones de óxido-reducción. Las oxidorreductasas son enzimas que promueven reacciones de óxido-reducción.

En el grupo de trabajo se reportó anteriormente que es posible utilizar la enzima oxidorreductasa Lacasa de *Trametes versicolor* para la oxidación de ácido

gálico y la formación de un material policonjugado semiconductor (López, 2013), así como la síntesis de un material fotoconductor a partir de 4-fluoro-2-metoxifenol y la enzima oxidoreductasa Peroxidasa de Rábano (HRP, por sus siglas en inglés) en medios orgánicos y líquido iónico (Zaragoza-Gasca, 2011).

Por consiguiente, se planteó la síntesis de un polímero fenólico a partir de alguna de estas dos enzimas mencionadas anteriormente, que presente nuevas propiedades optoelectrónicas.

De esta manera, se buscó determinar tanto las condiciones como el medio de reacción que permita obtener el polifenol de interés, caracterizarlo en función de su estructura y propiedades de fluorescencia y conducción.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Polímeros

Los polímeros son macromoléculas que se caracterizan por estar compuestas por unidades de repetición. Las moléculas que reaccionan entre sí para formar un polímero se denominan monómeros, y las reacciones por las cuales esto se lleva a cabo se denominan reacciones de polimerización. En un polímero puede haber desde diez hasta millones de unidades de repetición, lo que provoca que los pesos moleculares de un polímero puedan llegar a ser de hasta millones de Da (Odián, 2004).

Hoy en día, los polímeros son ampliamente utilizados en diversos campos de la industria. Los más comunes son los que conocemos en forma de empaques y envolturas, hules y ligas, carcasas, autopartes, impermeabilizantes, pinturas, pantallas de computadoras, televisiones y celulares, entre otros usos. Estas macromoléculas se clasifican de diversas formas:

- Origen
 - Polímeros naturales o Biopolímeros: aquellas macromoléculas que existen en la naturaleza, por ejemplo: proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos.
 - Polímeros semisintéticos: aquellos polímeros obtenidos a partir de la transformación de polímeros naturales, por ejemplo: caucho natural vulcanizado o hidroximetilcelulosa.
 - Polímeros sintéticos: aquellos que se obtienen a partir de la síntesis de monómeros en la industria, por ejemplo los vinílicos, como puede ser el: policloruro de vinilo (PVC) o el poliestireno, polietilentereftalato (PET), u otros como los poliésteres, Nylon, o polifenoles, entre muchos otros.

- Aplicaciones

- Elastómeros: son polímeros que pueden deformarse en gran manera cuando se le aplica un esfuerzo, recuperando su forma inicial una vez que el esfuerzo deja de aplicarse.
- Plásticos: cuando un polímero se deforma irreversiblemente después de aplicar un esfuerzo lo suficientemente grande, se le denomina plástico.
- Fibras: se utilizan para confeccionar tejidos cuya forma debe de permanecer estable. Poseen una baja elasticidad.
- Recubrimientos: son materiales, principalmente líquidos, que se aplican a alguna superficie para otorgarle alguna propiedad característica del polímero.
- Adhesivos: son polímeros diseñados para unir dos objetos por contacto superficial a través de una alta cohesión y una alta adhesión.

Los polímeros como tal, son muy importantes debido a su amplia gama de propiedades, que dependen del monómero utilizado, así como de su fracción en el polímero cuando se trata de copolímeros. Un copolímero es una macromolécula que consta de dos o más monómeros que pueden polimerizar de cinco formas diferentes:

1. Homopolímero: todas las unidades de repetición son iguales y corresponden a un mismo monómero.
2. Copolímero alternado: diferentes unidades de repetición se alternan a lo largo de la cadena polimérica.
3. Copolímero aleatorio: las unidades de repetición se enlazan sin ningún orden en particular.
4. Copolímero en bloques: secciones completas del copolímero corresponden a una sola unidad de repetición.

5. Copolímero ramificado: una unidad de repetición forma el esqueleto del polímero, mientras que otra se enlaza lateralmente formando ramificaciones que pueden o no ser de una longitud específica.

Lo anterior queda representado gráficamente en la Figura 1 (A y B representan monómeros distintos):



Fig. 1: Representación esquemática del ordenamiento de los monómeros A y B en las distintas posibilidades de copolimerización.

Las propiedades que presenta un polímero pueden variar desde una alta resistencia química, rigidez y dureza, a una baja dureza, alta elasticidad, y gran flexibilidad, pudiendo combinar estas propiedades dependiendo de las fracciones de copolímero en el material final (Nicholson, 2006).

Cada monómero presenta ciertas características al polimerizar, y debido a que la existencia de monómeros es muy alta, es importante analizar y estudiar los diversos polímeros creados y las propiedades que éstos le otorgan al producto final. La misma estructura de la unidad repetitiva puede otorgar un indicio de la estructura final del polímero: una cadena polimérica con muchos anillos aromáticos será más rígida que una cadena lineal de carbonos de la misma

longitud. Es entonces muy relevante el correcto análisis y creación de nuevos polímeros, buscando nuevas aplicaciones con ventajas tecnológicas debido a la amplia gama de propiedades que los polímeros ofrecen.

1.2 Polifenoles

Antes de denominarse polifenoles, estos compuestos naturales derivados de plantas se llamaban comúnmente “taninas vegetales” debido a la utilización de extractos que los contenían en gran medida para la fabricación de cuero a partir de pieles animales desde el período arcaico (ca. 800-500 a.C.) por los Griegos Antiguos. Sin embargo, la primera mención de las taninas vegetales en la literatura se atribuye a Teorofasto de Eressus (371-286 a.C.) en su enciclopedia de plantas *Historia Plantarum* (Quideau, 2011).

A principios del siglo XX y en adelante, se llevaron a cabo numerosos estudios para poder determinar la química de las taninas de manera que se pudiera caracterizar la estructura polifenólica de sus constituyentes. Grandes químicos como Emil Fischer fracasaron en la investigación de los polifenoles vegetales a nivel molecular, debido principalmente a la ausencia de herramientas analíticas de alto desempeño.

A mediados del siglo XX, Theodore White, un químico industrial que trabajaba en la industria de los extractos de la planta sudamericana quebracho para la fabricación del cuero, señaló que el término de “tanina” debería ser utilizado solamente para aquellos polifenoles que tuvieran una masa molecular de entre 500 y 3000 Da, haciendo así por primera vez una diferencia entre los términos polifenol y tanina. En la Figura 2 se observa al ácido tánico como ejemplo de un polifenol.

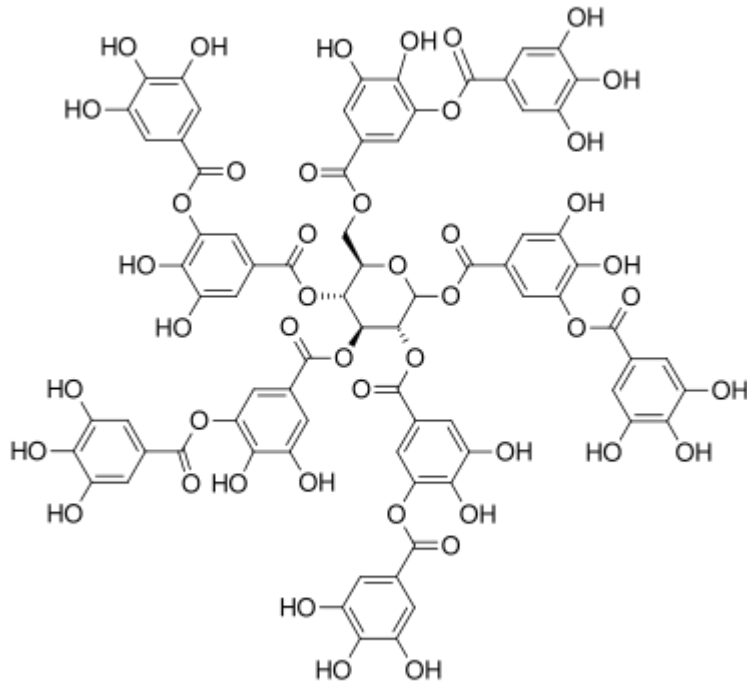


Fig. 2: Estructura del ácido tánico, un polifenol resultante de la esterificación de diez equivalentes de ácido gálico a un núcleo de monosacárido (glucosa).

La baquelita por ejemplo, nombrada tras su creador Leo Baekeland, fue el primer plástico poli aromático formado de manera puramente sintética. Consiste en una cadena polimérica con alto grado de entrecruzamiento, lo que provoca que sea muy rígido y que sea un plástico termofijo. Este material creado en 1907 es producto de la reacción entre moléculas de fenol y formaldehído, por lo que además de ser el primer polímero sintético, también fue el primer polifenol formado por rutas sintéticas.

Actualmente, los polifenoles vegetales gozan de un estatus reconocido no solamente por la comunidad científica, sino también por el público en general debido a su presencia y abundancia en frutas, semillas y vegetales y los supuestos beneficios de salud que trae el consumo regular de estos compuestos, que incluyen la prevención del envejecimiento por sus propiedades antioxidantes así como la prevención de otros malestares y enfermedades provocados por el mismo (Quideau, 2011).

La definición más reconocida de los polifenoles, la definición de White-Bate-Smith-Swain-Haslam (WBSSH), es una extensión de la definición establecida por Theodore White mencionada anteriormente y declara que un polifenol es aquella sustancia que cumpla los siguientes criterios (Haslam, 1994):

1. Solubilidad mínima en agua.
2. Peso molecular de entre 500 y 4000 Da.
3. Por cada 1000 Da de peso molecular relativo, el compuesto debe presentar entre 12 y 16 grupos fenólicos y aproximadamente 5 a 7 anillos aromáticos.
4. Aparte de presentar las reacciones fenólicas comunes, debe ser capaz de precipitar alcaloides, gelatinas y otras proteínas en solución.

Cabe mencionar que no todos los compuestos conocidos como polifenoles cumplen todas las reglas de la definición WBSSH. De manera informal, compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza, como el ácido gálico, también son llamados polifenoles a pesar de no ser realmente un polímero como tal, sino debido a su origen fenólico.

En las plantas, los polifenoles cumplen diversas tareas. Ayudan en la resistencia contra patógenos microbianos y depredadores herbívoros como insectos, es decir, les proporcionan a las plantas herramientas antibióticas y de protección. También fueron vitales en la evolución de la flora en la Tierra al proteger a las plantas de la radiación solar (luz UV-B) dañina para el ADN presente en las mismas. Otras tareas de los polifenoles incluyen influencias en la reproducción, nutrición y crecimiento de las plantas entre otras (Quideau, 2011).

Por otro lado, la cantidad de artículos relacionados con la investigación de polifenoles ha aumentado drásticamente en los últimos 20 años, como se observa en la Figura 3. Esto se debe principalmente a que se ha relacionado la ingesta de polifenoles con potenciales beneficios para la salud humana. Ya desde hace miles

de años, muchos remedios herbolarios como extractos de plantas, hierbas y especias ricas en polifenoles han sido utilizados en la medicina oriental tradicional.

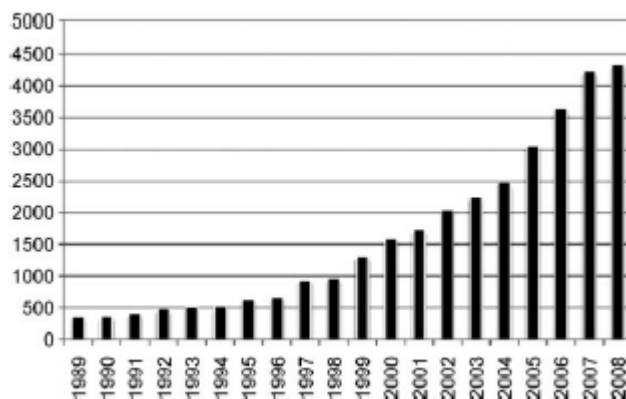


Fig. 3: Evolución del número de publicaciones relacionadas con polifenoles de 1989 a 2008 (Fuente: SciFinder Scholar).

En su forma estructural más básica, los fenoles constituyen una entidad anfifílica que reúne las características hidrofílicas del sustituyente hidroxilo que es polar, con las características hidrofóbicas del anillo aromático. Esto le permite actuar ya sea como un aceptor o como un donador de enlaces de hidrógeno, facilitando la interacción física con otras biomoléculas, principalmente proteínas y en específico para esta investigación, con enzimas.

1.3 Enzimas

Las enzimas son catalizadores de naturaleza proteica en seres vivos, especializados en reacciones orgánicas. Esto quiere decir que disminuyen la energía de activación de una reacción, acelerando su tasa de reacción sin desplazar el equilibrio químico. Las enzimas, al provenir de organismos vivos, son amigables con el medio ambiente y pueden ser una solución a algunos problemas de catálisis que surgen en la industria de los polímeros. Incluso a pesar de ser proteínas y por lo tanto moléculas relativamente frágiles, desarrollan su poder catalítico en disoluciones acuosas diluidas, a pH biológico y a temperatura moderada, lo que contrasta de gran manera con las condiciones extremas con las

cuales se debe trabajar en un laboratorio o en la industria para acelerar una reacción química. Trabajan en condiciones suaves de reacción, son eficientes y catalizan una amplia gama de reacciones químicas. Sin embargo, las enzimas son altamente específicas. Por un lado, hay enzimas que catalizan la reacción de tan sólo un sustrato determinado y no atacarán a moléculas muy similares estructuralmente, mientras que por el otro lado, hay enzimas que atacan toda una clase de moléculas con un respectivo común denominador estructural (Lehninger, 1982).

Las enzimas se clasifican según las reacciones que catalizan y los grupos principales son los siguientes:

Oxidoreductasas (EC 1): La primera de las clasificaciones de enzimas corresponde a aquellas que catalicen reacciones de óxido-reducción, por lo que reciben el nombre de oxidoreductasas. Dependiendo del grupo funcional sobre el cual actúen, se les asigna un segundo número con fines clasificatorios. Existen seis de estas subclasificaciones para las oxidoreductasas. Cuando catalizan enlaces para una molécula sobre el grupo funcional correspondiente a un alcohol o hidroxilo, se les asigna el número 1, teniendo entonces la EC 1.1. (EC significa clasificación de enzimas por sus siglas en inglés). Lo mismo ocurre sucesivamente en enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción en moléculas cetónicas (EC 1.2), dobles enlaces de carbono (EC 1.3), aminas primarias (EC 1.4), aminas secundarias (EC 1.5) y con NADH o NADPH (EC 1.6).

Transferasas (EC 2): Es el segundo tipo de enzimas según la clasificación, las cuales transfieren grupos funcionales de una molécula donadora a otra molécula receptora. Dichas transferencias pueden ser de grupos con una sola molécula de carbono (EC 2.1), grupos aldehídicos o cetónicos (EC 2.2), grupos acilo (EC 2.3), glucosilo (EC 2.4), grupos fosfatos principalmente en vías metabólicas (EC 2.7) y grupos generalizados que cuenten con la presencia de un átomo o más de azufre (EC 2.8).

Hidrolasas (EC 3): A todas aquellas enzimas que catalicen reacciones de hidrólisis, se les adjudica al tercer grupo de enzimas, las hidrolasas. Siguiendo la lógica de clasificación aplicada en las demás categorías enzimáticas, se les ordena dependiendo del tipo de molécula que hidrolicen. Estas son principalmente ésteres (EC 3.1), moléculas con enlaces glucosídicos (EC 3.2), con enlaces peptídicos (EC 3.4) u otros enlaces C-N (EC 3.5), así como anhídridos de ácido (EC 3.6).

Liasas (EC 4): En la cuarta categoría se enlistan las diversas familias correspondientes a las liasas, enzimas que catalizan reacciones formadoras de enlaces dobles. Las principales son aquellas que forman dobles enlaces C=C (EC 4.1), C=O (EC 4.2) o C=N (EC 4.3).

Isomerasas (EC 5): La quinta categoría corresponde a las isomerasas, que son aquellas enzimas responsables de catalizar la racemización y cambios de posición de un grupo funcional en una determinada molécula para obtener su forma isomérica. La familia más importante de isomerasas son las racemasas (EC 5.1).

Ligasas (EC 6): Finalmente, la sexta categoría es la de las ligasas. Estas enzimas catalizan la degradación o síntesis de enlaces con escisión del ATP, ya sean moléculas con enlaces C-O (EC 6.1), C-S (EC 6.2), C-N (EC 6.3) o C-C (EC 6.4).

1.4 Enzimas y su importancia en la síntesis de polímeros

La síntesis de polímeros se considera en general un proceso poco amigable con el medio ambiente, ya que es una gran fuente de contaminación. En los años ochenta en Estados Unidos, mediante el acta de prevención de la contaminación y con ayuda de algunos investigadores, se inició la concientización sobre el daño

provocado en la fabricación de materiales tóxicos y contaminantes. Se introdujo entonces la filosofía de la Química Verde, la cual tiene como base la prevención de la contaminación del medio ambiente mediante el diseño apropiado de procesos y tecnologías, así como la utilización de fuentes químicas diferentes a las de hidrocarburos petroquímicos (Espinosa, 2011).

Históricamente, se pueden reconocer hasta el día de hoy tres etapas de la catálisis en la industria de la polimerización (Kobayashi, Enzymatic Polymerization, 2012).

La primera, inicia aproximadamente en 1920, en la cual los catalizadores utilizados se denominan catalizadores clásicos y se dividen en ácidos (ácidos de Brønsted y de Lewis, así como cationes) y bases (bases de Lewis y aniones).

La segunda etapa de la catálisis polimérica empieza aproximadamente en 1950 e involucra el uso de catalizadores de Ziegler-Natta, así como catalizadores metatésicos basados en metales raros y de transición. Estos últimos siguen siendo de gran importancia en la industria polimérica actual.

La tercera y última etapa se ha desarrollado en las últimas dos décadas e involucra el uso de biocatalizadores, como lo son las enzimas.

Específicamente en el área industrial de polímeros, la utilización de solventes orgánicos contaminantes, iones metálicos, así como de altas temperaturas y condiciones de reacción que pueden afectar al medio ambiente, es indispensable que se haga investigación para mejorar y renovar los procesos y tecnologías de polimerización o encontrar polímeros nuevos que sean menos agresivos con el medio ambiente que los utilizados actualmente.

Las enzimas resultan ser ventajosas en la industria en dos rubros específicos: por un lado, son una alternativa viable a catalizadores metálicos utilizados convencionalmente (en la industria polimérica, estos se usan en la polimerización en cadena) y por el otro, pueden ser ampliamente usados en la biorremediación de contaminación previamente existente, como es el caso de suelos contaminados con metales pesados (Gaur, 2014).

Además, al poder llevar a cabo reacciones de síntesis orgánica a condiciones suaves de temperatura, pH y presión, las vías de síntesis enzimática

presentan una eficiencia energética muy alta que se refleja en un impacto positivo económico y ambiental. (Kobayashi, Enzymatic Polymerization, 2001)

Los catalizadores metálicos agregados en disolución en forma de iones en la polimerización en cadena tienen la principal función de fungir como iniciadores de la reacción al producir radicales libres. Las enzimas son capaces de reproducir esta misma función, sin presentar riesgos para el medio ambiente por contaminación de mantos acuíferos o zonas silvestres por metales pesados. Esto quiere decir que se reducen los riesgos por contaminación tras un pobre tratamiento de los residuos, accidentes o fugas durante el procesamiento. Además, es posible ya sea inmovilizar las enzimas para su reutilización en múltiples lotes de producción o formar nanoemulsiones de la misma en aquellos casos en los que la reacción así lo necesite, presentando ventajas económicas en comparación con los catalizadores convencionales que deben ser reemplazados cada cierto tiempo dependiendo del proceso.

En algunas otras tecnologías, como en el blanqueamiento de fibras de algodón, se ha encontrado que el uso de enzimas presenta ventajas en varios rubros importantes para la industria, como lo son el costo final de producción, la calidad del producto, el consumo energético, el tiempo de producción y la reducción de aditivos químicos, en este caso peróxido de hidrógeno, a lo largo de todo el proceso (Goncalves, 2013). Esto representa una opción muy llamativa para sustituir los actuales procesos agresivos con el medio ambiente, por una alternativa que no solo trae consigo un producto de mejor calidad, sino también un menor costo de producción y menores riesgos ambientales.

Como ventaja adicional, el uso de catalizadores biológicos presenta una mejora en la regulación estereoquímica de la síntesis de materiales, al poseer este tipo de catalizadores propiedades de alta enantio-, regio- y quimioselectividad (Kobayashi, Enzymatic Polymerization, 2001).

Resulta evidente que las enzimas presentan muchas ventajas a las tecnologías actuales en el área de la producción de nuevos materiales y polímeros, siempre y cuando se escoja la enzima correcta para el proceso en

cuestión. Es entonces indispensable que se lleve a cabo investigación en este campo para fomentar los principios de la Química Verde y crear tecnologías que no solo sean atractivas desde un punto de vista ecológico sino también económico y social.

1.5 Lacasa de *Trametes versicolor*

Desde hace muchos años, se han llevado a cabo investigaciones con el objeto de desarrollar procesos enzimáticos para el tratamiento de compuestos aromáticos tóxicos. Esto con el fin de poder desarrollar tratamientos que utilicen enzimas que han sido aisladas de sus organismos madre (Karam, 1997). Dichas técnicas de biorremediación son diversas y dependen del compuesto a eliminar. Un ejemplo puede ser la polimerización de compuestos tóxicos en mantos acuíferos, con la intención de disminuir su solubilidad y provocar así la precipitación de los mismos, facilitando la recuperación del compuesto tóxico de interés mediante técnicas físicas.

Los procesos enzimáticos deberían poder ser utilizados en diversas aplicaciones industriales: el tratamiento de químicos específicos en mezclas complejas provenientes de procesos, la purificación de aguas tratadas para alcanzar calidades aceptadas por las normas estándar, tratamiento de aguas residuales en la fuente de las mismas para su reutilización en procesos diversos, facilitación de recuperación de productos, así como en el tratamiento de contaminantes de baja concentración como lo podrían ser trazas de medicamentos o contaminantes industriales. (Nicell, 2003)

Sin embargo, para que una enzima pueda utilizarse en procesos industriales, debe cumplir algunos criterios importantes como lo son (Kurniawati, 2008):

- Bajos costos de producción
- Cofactores baratos o ausencia de cofactores
- Estabilidad bajo condiciones de almacenamiento moderadas

- Habilidad de ejercer su actividad catalítica a altas tasas de reacción bajo condiciones de reacción necesarias
- Especificidad amplia para sustratos

Una opción potencialmente viable son las lacasas, producidas por una gran variedad de microorganismos, plantas y hongos, que cumplen estos criterios satisfactoriamente (Mayer, 2002). Muchas lacasas de origen fúngico se encuentran disponibles comercialmente ya que presentan altas tasas catalíticas y utilizan oxígeno como sustrato, siendo relativamente estables almacenadas a pH neutro y a temperaturas por debajo de las ambientales. (Bonomo, 2001)

Además, las lacasas pueden ser consideradas fuertes candidatas para numerosos procesos ambientales y otras aplicaciones, como la delignificación, modificación de la fibra de madera, blanqueamiento de fibras, síntesis química, desarrollo de biosensores, en análisis de compuestos, clarificación de vino y ensayos inmunológicos (Archibald, Paice & Jurasek, 1990; Bourbannais, 1995; Duran & Esposito, 2000; Gianfreda, 1999; Patel, 1994; Thurston, 1994; Yaropolov, 1994).

Las propiedades catalíticas de las lacasas han sido explotadas en una variedad de aplicaciones tecnológicas, principalmente para la biorremediación de suelos y aguas y en plantas de papel y pulpa para desarrollar procesos ambientalmente más amigables, así como en la industria textil para mejorar los procesos de blanqueado en telas. (Xuejiao Sun, 2013)

Entre las lacasas, la perteneciente a *Trametes versicolor* es la que tiene el valor más alto reportado de potencial redox, de 785 mV frente a un electrodo estándar de hidrógeno (Yaropolov, 1994), haciendo a esta enzima una de las más llamativas para posteriores investigaciones, ya que se ha demostrado que altos potenciales redox están directamente relacionados con altas actividades de lacasa. (Li, 1999)

La especie *Trametes versicolor* se encuentra distribuida globalmente (United States Department of Agriculture, 2006), lo que presenta un punto a favor de la utilización de la lacasa proveniente de la misma, ya que esto disminuye los

costos de producción al poder utilizar especies nativas para la extracción de la enzima.

La LTV facilita el transporte de electrones de una molécula donadora (o agente reductor) a una molécula receptora (o agente oxidante). Su estructura del sitio activo se puede observar en la Figura 4.

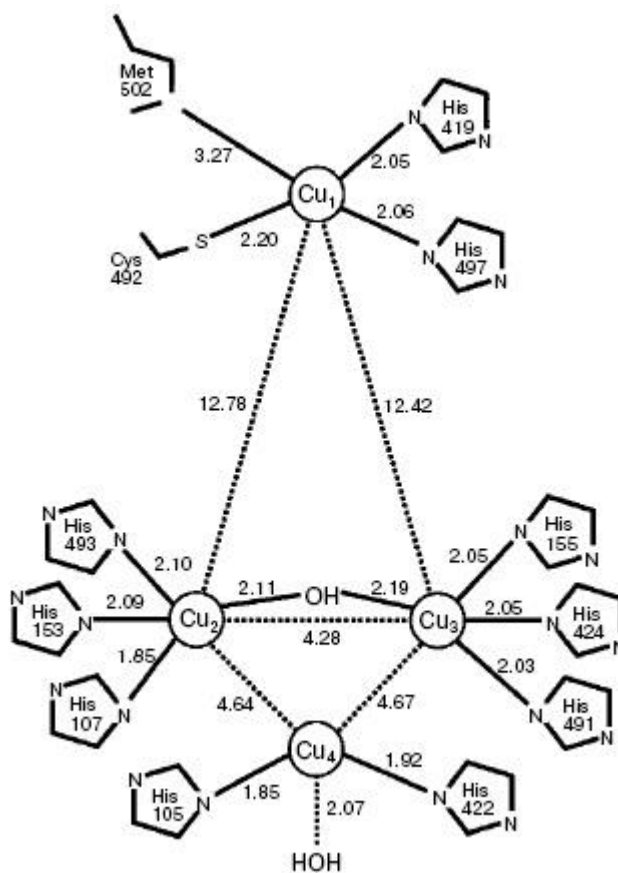


Fig. 4: Estructura de la enzima lacasa presente en la especie *Trametes versicolor*, que es una seta poliporo ampliamente extendida a nivel mundial. Su nombre se debe a que esta seta puede ser encontrada en muchos diversos colores, dependiendo de la variedad de la misma. Su sitio activo se debe a átomos de cobre.

Ésta se aisló por primera vez en Japón en 1883, del árbol *Rhus venicifera*, sin embargo, se ha encontrado que muchas especies tanto de plantas como de hongos, poseen lacasas. Se asocia directamente con la síntesis y/o degradación del biopolímero lignina. Su amplia especificidad a sustratos le permite catalizar muchas reacciones de oxidación de un electrón, principalmente compuestos

fenólicos como los que se desean estudiar. Estos sustratos donan electrones para la reducción de oxígeno atmosférico a agua, formando un radical fenólico en el proceso (Armstrong, 2007). La amplia especificidad a sustratos es lo que hace de las lacasas una de las enzimas con más aplicaciones posibles en la industria.

Las lacasas catalizan la reducción de cuatro electrones de O_2 a H_2O , acoplado con la oxidación de un solo electrón de cuatro donadores de hidrógeno. Esto lo logra hacer la lacasa a través de un conjunto de cuatro átomos de cobre que forman el sitio activo de la misma. Estos átomos de cobre se dividen en tres tipos. En el cobre tipo 1 ocurre la oxidación monoelectrónica del sustrato, mientras que los átomos del tipo 2 y 3 forman una estructura trinuclear en la que ocurre la reducción del oxígeno a agua. El resultado neto es la oxidación de cuatro moléculas de sustrato para producir cuatro radicales, reduciendo una molécula de O_2 para formar dos moléculas de H_2O . Estos radicales comenzarán una serie de reacciones no enzimáticas, como la formación de enlaces C-C y C-O que darán a lugar a dímeros, trímeros, oligómeros y polímeros (Kudanga, 2011).

II. ANTECEDENTES

En búsqueda de vías de síntesis más amigables con el medio ambiente, se ha llevado a cabo extensa investigación en el área enzimática debido a su naturaleza orgánica.

Al ser muchas las reacciones de descomposición y de formación de macromoléculas reacciones de óxido-reducción, el estudio de la familia de las oxidorreductasas cobra mayor importancia. En la literatura ya existen múltiples reportes de síntesis en las que se involucran tanto las peroxidasas como las lacasas, siendo estas últimas las menos estudiadas. Sin embargo, presentan la ventaja de ser activadas con oxígeno molecular en contraste con el peróxido de hidrógeno que requieren las peroxidasas.

En general, las ventajas de usar enzimas en la producción de polímeros y materiales nuevos son muchas, entre las cuales destacan (Gross, 2010):

- su origen de fuentes renovables,
- alta enantio- y regioselectividad,
- la inmovilización y por tanto reciclaje de las mismas, que impacta de manera positiva el costo asociado con la catálisis
- la facilidad en la que las enzimas pueden catalizar reacciones en una amplia gama de sistemas fisicoquímicos como lo son solventes, mezclas bifásicas de solvente y agua, sistemas con fluidos supercríticos,
- sustentabilidad,
- reemplazo de catalizadores tóxicos a base de metales pesados (Na, Cu, Pd o Ni),
- operan a condiciones suaves de pH, temperatura y presión, reduciendo el consumo de energía en los procesos y aumentando la eficiencia energética.

Tales ventajas se traducen en muchas posibles aplicaciones para la tecnología enzimática del siglo XXI, aportando mejoras y alternativas a procesos que actualmente son muy costosos o que no poseen la sustentabilidad que la sociedad cada vez más ecológicamente consciente demanda de sus productos.

La gran diversidad de reacciones con sustratos diferentes que pueden catalizar las enzimas, y en el caso específico de esta tesis, las lacasas, proporcionan a su vez un amplio campo de aplicaciones en diferentes sectores de la industria. La investigación en torno a las lacasas y sus ventajas sobre procesos actuales abarca sectores industriales muy diversos, como lo son la remediación ambiental, la modificación de materiales lignocelulosos, la industria textil, la industria alimenticia, la industria farmacéutica, la fabricación de biosensores y por supuesto, la síntesis orgánica de nuevos materiales.

Un ejemplo de las aplicaciones ambientales es el estudio que se llevó a cabo por Jolivalt *et al.* en el año 2000. La lacasa de *Trametes versicolor* fue inmovilizada sobre una membrana de microfiltración de polifluoruro de vinilideno (PVDF) con la intención de remover el pesticida *N',N'*-(dimetil)-*N*-(2-hidroxifenil)urea (2-HF) de aguas residuales. Utilizando una membrana con un área de 60 cm² de microfiltración efectiva, la membrana modificada fue capaz de transformar 200 ml de una solución de 0.1 g/l de 2-HF en menos de 5 min. Esto se debe a la oxidación del 2-HF catalizada por la enzima en un producto insoluble que la membrana es capaz de retener. (Jolivalt, 2000)

En el caso de síntesis de nuevos materiales, un artículo del año 2003 reporta el uso de lacasa de *Trametes versicolor* para polimerizar catecol, obteniendo oligómeros de peso molecular numeral promedio de 813 Da con una polidispersidad baja de 1.17. Los análisis estructurales que se llevaron a cabo revelaron que los enlaces formados entre las unidades de repetición corresponden a enlaces C-O-C. Estos oligómeros presentaron una aumentada estabilidad térmica del catecol en la estructura polimérica (Aktaş, 2003).

También se encuentra reportada la funcionalización de quitosano con ácido fenólico utilizando lacasa de *Trametes versicolor*, para generar un material que unifica las propiedades antibacteriales del quitosano con las propiedades antioxidantes del ácido fenólico (Božič, 2013).

Tanto las lacasas como las peroxidasas han sido estudiadas anteriormente en nuestro laboratorio 314 del Depto. de Alimentos y Biotecnología en el Conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se

reportó en el año 2011 por ejemplo, la polimerización de 4-fluoro-2-metoxifenol utilizando peroxidasa de rábano (HRP) en un medio de líquido iónico [BMIM][BF₄] y buffer de fosfatos (pH 5) por Zaragoza-Gasca *et al.* Este procedimiento dio como resultado un polímero fotoconductor, cuya conductividad aumentó hasta 5 órdenes de magnitud frente al blanco al ser irradiado con un láser a 532 nm de longitud de onda, obteniendo una corriente de 0.82 W/cm². Estructuralmente, el polímero presentó una propagación fenil-oxi y fenil-fenil, mientras que su peso molecular numeral promedio M_n fue de entre 2000 y 2200 Da.

Por otro lado y también del grupo de trabajo, López *et al.* reportó la síntesis de un material semiconductor policonjugado a partir de ácido gálico utilizando Lacasa de *Trametes versicolor* (LTV) en buffer de acetatos (pH 5) que presentó rendimientos de hasta 82% y una conductividad en estado sólido de 10⁻⁴ S/m. Este último polímero presentó solamente una propagación fenil-fenil. Siguiendo la línea de investigación y teniendo ya dos casos exitosos de materiales con propiedades optoelectrónicas, se decidió utilizar el monómero que presentó propiedades ópticas con la enzima que dio como resultado un material semiconductor, teniendo en mente que el material obtenido pudiera tener propiedades de interés para su utilización en dispositivos optoelectrónicos y además analizar la estructura molecular del producto obtenido bajo las condiciones de síntesis.

III. HIPÓTESIS

Si logramos sintetizar un polímero a partir de la oxidación enzimática con la Lacasa de *Trametes versicolor* (LTV) de 4-fluoro-2-metoxifenol, entonces obtendremos un material con propiedades optoelectrónicas de interés y de potencial aplicación en dispositivos orgánicos emisores de luz.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Polimerizar 4-fluoro-2-metoxifenol utilizando LTV y caracterizar el material resultante tanto química como físicamente.

4.2 Objetivos particulares

- I. Determinar las condiciones de reacción óptimas y metodología para sintetizar el polímero de interés, maximizando el rendimiento.
- II. Caracterizar el polímero en función de estructura molecular, distribución de pesos moleculares, capacidad de conducción y fotoluminiscencia.
- III. Determinar la actividad enzimática de la enzima utilizada bajo las diferentes condiciones de reacción.

V. METODOLOGÍA

5.1 Mediciones

Los espectros de ^1H RMN, ^{13}C RMN y ^{19}F RMN se llevaron a cabo en un espectrómetro Varian Unity Inova (USA), utilizando cloroformo deuterado (CDCl_3) para la disolución de las muestras. Los espectros de infrarrojo se realizaron en un espectrómetro Perkin Elmer 1605 FTIR. Los análisis MALDI-TOF se hicieron en un espectrómetro de masas Bruker MicroFlex (USA) en modo positivo lineal. Como matriz se utilizó ácido trans-3-indolacrílico (t-IAA), disuelta en una mezcla de dioxano/diclorometano con una relación volumétrica 1:1. Se analizó la difracción de Rayos X en polvo en un equipo Siemens D-5000 con radiación $K\alpha$ Cu y $k = 1.54 \text{ \AA}$. Las cromatografías de permeación en gel se llevaron a cabo en un equipo Agilent 1200 series HPLC (USA), equipado con un detector UV-Vis a 270 nm y dos columnas PLgel 10 μm MIXED-B LS (300 x 7.5 mm, Varian, USA) a 30 °C. Para calibrar el HPLC, se utilizaron estándares de poliestireno suministrados por Aldrich (USA). Una pequeña cantidad de los polímeros ya purificados se disolvió en cloroformo grado espectrofotométrico y se filtró utilizando un tamiz de 45 μm , para asegurar que en las muestras no se encontraran rastros de polímero no disuelto y que el HPLC otorgara los resultados más confiables posibles. Como fase móvil se utilizó cloroformo grado espectrofotométrico a un flujo volumétrico de 0.8 ml/min. Los análisis de espectroscopía de luminiscencia se realizaron en un espectrómetro de fluorescencia LS 55 (Perkin Elmer, USA), utilizando películas del polímero fundido sobre cubreobjetos de vidrio. Las muestras se excitaron con cuatro diferentes longitudes de onda y posteriormente se registraron las intensidades de fluorescencia en un intervalo de emisión entre 350 y 800 nm. También se hizo un barrido de absorbancia del polímero disuelto en cloroformo mediante un espectrofotómetro Cary 4000 (Varian, USA). Los análisis termogravimétricos se realizaron usando un equipo TA Instruments Hi-Res TGA 2950 (USA), en ambiente de nitrógeno y en un intervalo de temperaturas de 25 a 500 °C. Para el análisis de escaneado calorimétrico diferencial (DSC) se ocupó un equipo DuPont DSC 2100 (USA) en un intervalo similar de 25 a 500 °C, con un aumento de 15 °C/min en ambiente de nitrógeno. Durante la experimentación, se midió la cantidad

de oxígeno disuelto en el medio de reacción con ayuda de un sensor de oxígeno molecular Aplisens DO conectado a un controlador ez-OD (Applikon, Países Bajos). Los ensayos de actividad enzimática fueron llevados a cabo en un espectrómetro Perkin Elmer Lambda 2S.

5.2 Ensayo de actividad enzimática

Para determinar la actividad enzimática de la lacasa en los diferentes medios de reacción, se prepararon muestras con una concentración de 1 mg/ml de enzima libre en medios de buffer de fosfato monobásico 100 mM a pH=5 y 30, 40 o 50% v/v de acetona o metanol grado reactivo. Estas mezclas se mantuvieron a una temperatura controlada de 30 °C bajo agitación constante, para asegurar que las condiciones de los medios fueran idénticas a las de la polimerización. Una alícuota de 25 µl de estas mezclas se hizo reaccionar por triplicado con 2.9 ml una solución 9.1 mM de ABTS al momento de llevar a cabo las mezclas, a las 12, 24, 36 y a las 48 horas para determinar el efecto del medio de reacción sobre la actividad de la enzima a lo largo de los dos días que dura la reacción. También se realizó el mismo procedimiento para una solución blanco de enzima libre a una concentración de 1mg/ml en medio de solución tampón de fosfatos 0.5 M. Se midió la absorbancia a 420 nm, ya que la reacción entre la lacasa y el ABTS forma un compuesto de color verde oscuro que es fácilmente detectable a esta longitud de onda.

5.3 Diseño de experimentos

Se llevarán a cabo ensayos de polimerización utilizando 5 mg de enzima libre y 5 mmol (711 mg) de 4-fluoro-2-metoxifenol. La temperatura se controlará a 25 °C mediante un baño de agua, con tiempos de reacción de 24 y 48 h respectivamente. Las reacciones se llevarán a cabo mediante uso de agitación magnética a 400 rpm.

La síntesis tendrá como mezcla de reacción 25 mL de una solución de metanol o acetona grado reactivo al 30 y 40% v/v con una solución tampón de acetatos 0.25 M a pH=5 y se llevará a cabo en un matraz bola de 50 mL. Se debe

colocar un pivote que permita el ingreso de aire al matraz bola. Los diferentes compuestos se nombrarán de acuerdo a la tabla 1:

Tabla 1: Nombre asignado a cada compuesto dependiente de su medio de reacción.

Compuesto	Solvente	ml Solvente	% v/v	ml Buffer	mg Enzima	mmol Sustrato
A	Acetona	7.5	30	17.5	5	5
B	Acetona	10	40	15	5	5
C	Metanol	7.5	30	17.5	5	5
D	Metanol	10	40	15	5	5

Para detener la reacción, se procederá a filtrar al vacío para posteriormente llevar a cabo un lavado con agua destilada a temperatura ambiente y con metanol grado técnico a 5 °C. Esta muestra se deberá congelar a -80 °C por un mínimo de 4 horas, para su posterior secado en una bomba de disolventes. Los experimentos se llevarán a cabo por duplicado.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Selección de monómero y enzima

Siguiendo la línea de investigación llevada a cabo en el laboratorio 314 del Conjunto E de la Facultad de Química, en los cuales se obtuvieron buenos resultados de semiconducción con ácido gálico y de fotoconducción con 4-fluoro-2-metoxifenol mostrado en la Figura 4, se escogieron estas para la investigación y se evaluaron algunas otras estructuras fenólicas como potenciales precursores de polímeros con propiedades optoelectrónicas de interés. Se decidió trabajar en el presente estudio con el fenol fluorado (Fig. 4) debido a que no se había trabajado con éste y la LTV. Dado que trabajos anteriores con la HRP, la cual requiere de activación por peróxido de hidrógeno, había dado buenos resultados en términos de propiedades opto-electrónicas, este se trata de un líquido viscoso y denso, de color marrón/dorado. Su estructura molecular se puede apreciar a continuación en la Figura 5.

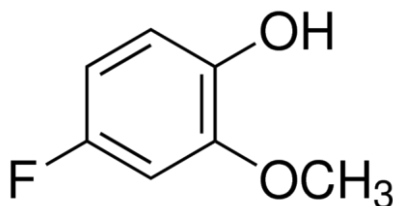


Fig. 5: Estructura del 4-fluoro-2-metoxifenol.

Se ha encontrado que este compuesto posee características de inhibición de fagocitosis de microorganismos por neutrófilos. En experimentación anterior en el laboratorio 314, se encontró que el polímero formado por este monómero utilizando HRP presentaba un aumento en la conducción de 3 órdenes de magnitud cuando se le incidía luz a una longitud de onda determinada. A este tipo de compuestos se les denomina fotoconductores.

Se procederá entonces a utilizar el monómero 4-fluoro-2-metoxifenol con la enzima LTV, ya que para utilizar esta enzima no se debe adicionar peróxido de hidrógeno en intervalos regulares como con HRP, además de que la experimentación de la polimerización utilizando la peroxidasa mencionada ya había sido previamente estudiado. El pH usado para este estudio fue de 5 debido a que es el óptimo reportado para esta enzima (Zaragoza-Gasca, 2011; López, 2013).

6.2 Actividad enzimática

Para poder determinar la estabilidad de la enzima en los diferentes medios de reacción, se decidió llevar a cabo un ensayo de actividad enzimática con ABTS a una temperatura controlada de 30 °C.

Para obtener un panorama más amplio del comportamiento de la enzima en el medio de reacción, se decidió preparar también una mezcla con 50% v/v de solvente orgánico y un blanco con enzima y buffer pH 5. Los resultados obtenidos se expresaron como el porcentaje de actividad que se fue obteniendo en cada medición con respecto al valor máximo inicial correspondiente al del blanco. Con fines de una fácil visualización se acomodaron a lo largo del tiempo y para cada medio de reacción en la figura 6.

La LTV presentó una actividad máxima inicial en el medio de reacción sin solvente orgánico. Se observa que de manera generalizada, exceptuando el caso del blanco, la actividad de la enzima disminuye a medida que pasan los dos días de contacto con el medio de solvente/buffer. Para una concentración del 40% v/v de solvente orgánico, la desactivación de la enzima fue del 70% en las primeras 12 horas, incrementándose esta hasta más del 90% después de transcurridas las 48 horas. En el caso del 50% v/v de cosolvente, la desactivación fue aún mayor, siendo de hasta 90% en las primeras 12 horas. A medida que la concentración de solvente aumenta, la tendencia que sigue la actividad de la enzima va en picada, soportando así la hipótesis de que a mayor cantidad de cosolvente orgánico, la enzima se desactiva más rápido. Sin embargo, es notoria la mayor disminución en

la actividad cuando el solvente se trata de metanol, lo que claramente nos indica que la enzima se desnaturaliza más fácil en metanol que en acetona. Esto nos indica que el cosolvente ideal de los dos disolventes orgánicos estudiados, por lo menos en cuestión de la estabilidad de la enzima durante la polimerización, se trata de la acetona.

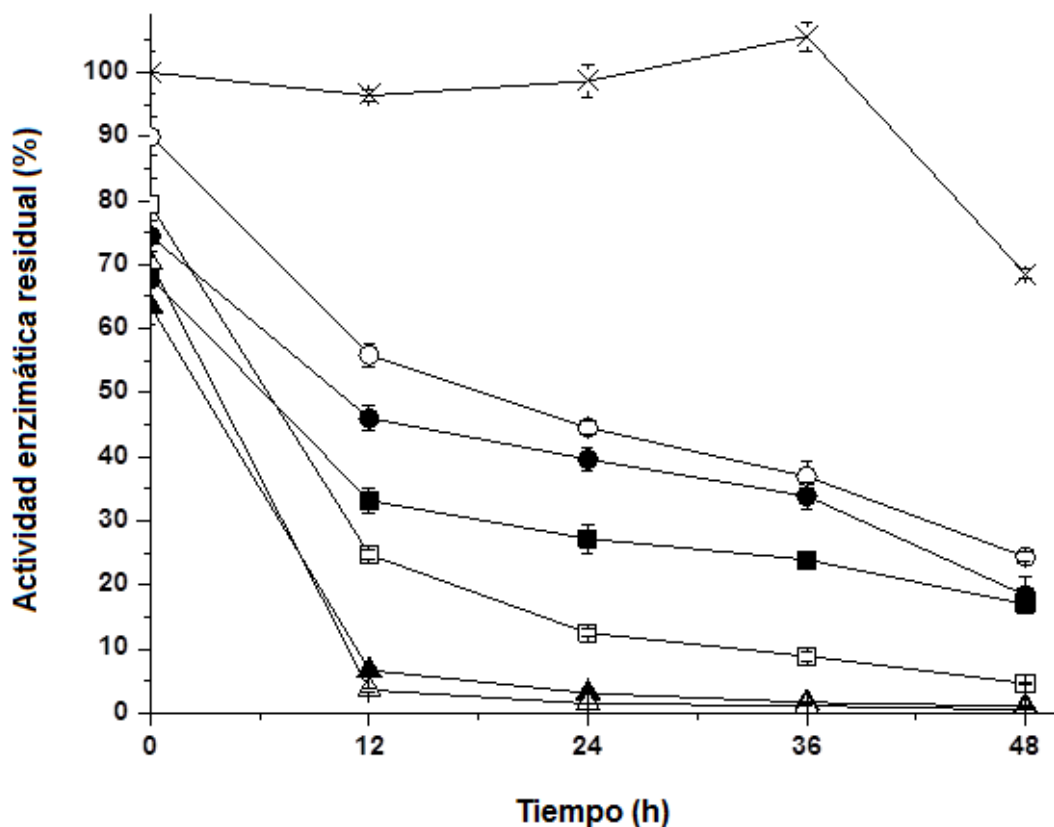


Fig. 6: Actividad residual de LTV después del tratamiento con disolventes orgánicos. Blanco (x), 30% acetona (●), 30% metanol (○), 40% acetona (■), 40% metanol (□), 50% acetona (▲), 50% metanol (△).

6.3 Rendimiento de reacción

A sabiendas de que la enzima usa oxígeno molecular como sustrato para su activación, se midió la concentración del oxígeno en el medio de reacción a lo largo de 24 horas, concluyendo que bajo la agitación establecida y con el matraz bola en contacto con aire, la concentración de oxígeno se mantiene constante y es dependiente del medio de reacción. Para el medio de metanol se obtienen valores

cercanos a los 7 mg/L de oxígeno molecular, mientras que para el medio de acetona el valor disminuye a 5.7 mg/L. Esto se aprecia en la figura 7.

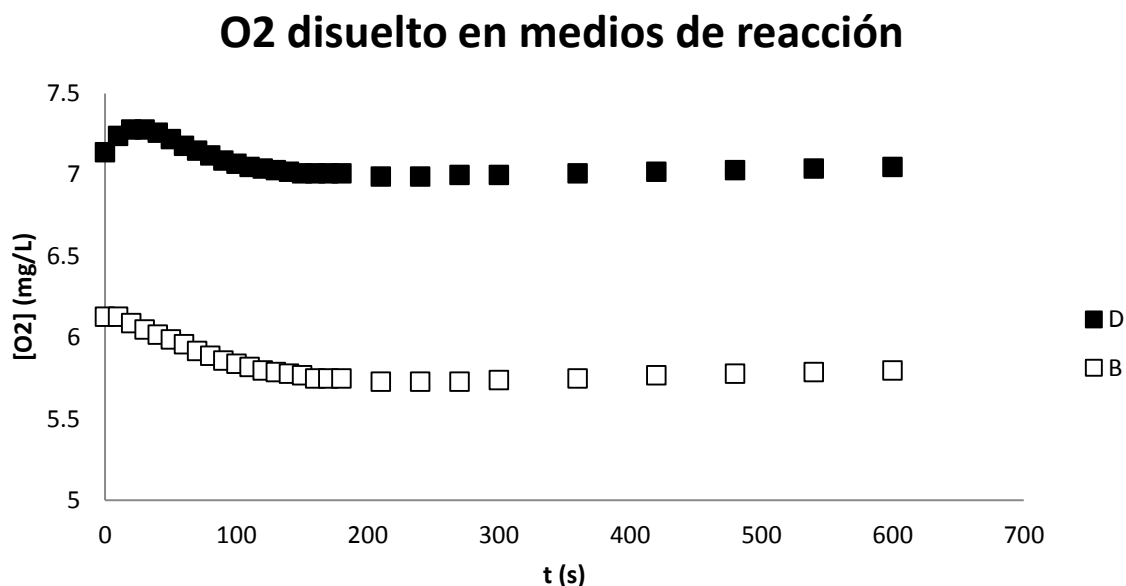


Fig. 7: Concentración de oxígeno molecular presente en los medios de reacción durante los primeros diez minutos, tiempo al cual la concentración comienza a estabilizarse a lo largo de las 24 h que duró el ensayo. B y D corresponden a las entradas de la Tabla 1.

Se aprecia una disminución inicial en la concentración que después aumenta ligeramente. Esto corresponde a la activación inicial de la enzima, en la que consume O₂ del medio de reacción, para posteriormente alcanzar el equilibrio con la continua disolución del oxígeno en el medio correspondiente por el contacto que existe entre el aire y el mismo, favorecido por la agitación magnética. Esto confirma que la enzima trabaja en el medio y que alguna reacción debe estarse llevando a cabo.

Para calcular el rendimiento de la reacción, se pesó el producto de todas las experimentaciones después de haber sido sometido al procesamiento de purificación y secado, para evitar la contaminación por monómero o enzima que pudieran alterar los resultados. Afortunadamente en este caso, el monómero se trata de un líquido y el polímero de un sólido, facilitando así la purificación por medio de un filtrado al vacío con su respectivo lavado para eliminar monómero.

Se calculó el rendimiento teórico en base a la cantidad de monómero agregado inicialmente al matraz bola al momento de polimerizar. Comparando este valor con el peso de la muestra final, podemos saber qué porcentaje reaccionó por acción de la lacasa para formar los oligómeros o polímeros finales, indicándonos qué medio de reacción fue el más adecuado para la síntesis a los dos tiempos estudiados de 24 y 48 h.

Los rendimientos se exponen en la figura 8:

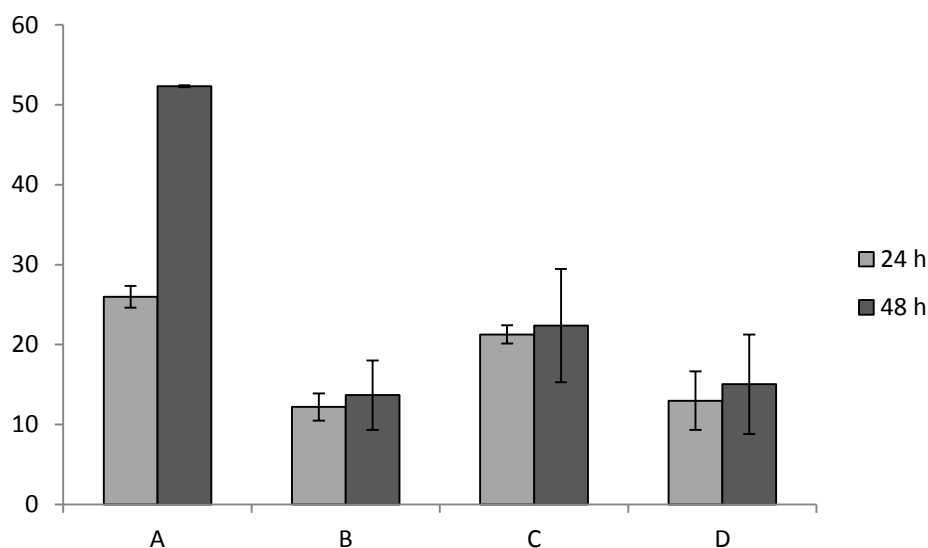


Fig. 8: Rendimiento de la reacción entre moléculas de 4-FG con LTV bajo diferentes medios de reacción. A, B, C y D corresponden a las entradas de la Tabla 1.

Los valores promedio muestran una ligera tendencia hacia el aumento del rendimiento cuando la reacción se lleva a cabo durante 48 h. Sin embargo, para los medios de reacción de acetona 40% v/v y ambos medios de metanol, no se aprecia dicha diferencia cuando se toma en cuenta la desviación estándar de los datos.

La única excepción es acetona al 30% v/v, donde no sólo el rendimiento aumenta casi al doble, sino que también la desviación estándar resultó ser muy baja, confirmando la exactitud de dichas mediciones. Se puede determinar que de los casos estudiados, utilizando como cosolvente a la acetona en una proporción del 30% frente al buffer en volumen, se tiene por mucho el mejor rendimiento y por ende, el mejor medio de reacción para esta polimerización.

6.4 Caracterización estructural del producto

La caracterización estructural del polímero obtenido consistió principalmente en la interpretación de los datos de los análisis MALDI-TOF y de Resonancia Magnética Nuclear, cuyos resultados fueron respaldados mediante otras técnicas como la espectroscopía de infrarrojo y también la cromatografía de permeación en gel, esta última técnica se llevó a cabo para obtener valores de distribución de pesos moleculares.

Al analizar el espectro de MALDI-TOF obtenido de las diferentes muestras experimentales, se observa que consiste en una serie de picos entre 500 y 1200 m/z, se observó que en todas existía una separación de 122 m/z entre las señales principales del espectro, lo que sugiere que las moléculas pierden su átomo de flúor al polimerizar. Esta observación se basa en que la diferencia de pesos moleculares entre el monómero y la unidad de repetición del polímero es consistente con una defluorinación. En la Figura 9 se presenta un ejemplo del análisis de los picos en el espectro. Nótese que también existe una señal a aproximadamente 40 m/z de distancia de los picos principales, esto se debe al corrimiento de las señales inducido por la presencia del ion de potasio, presente en el buffer, en la muestra.

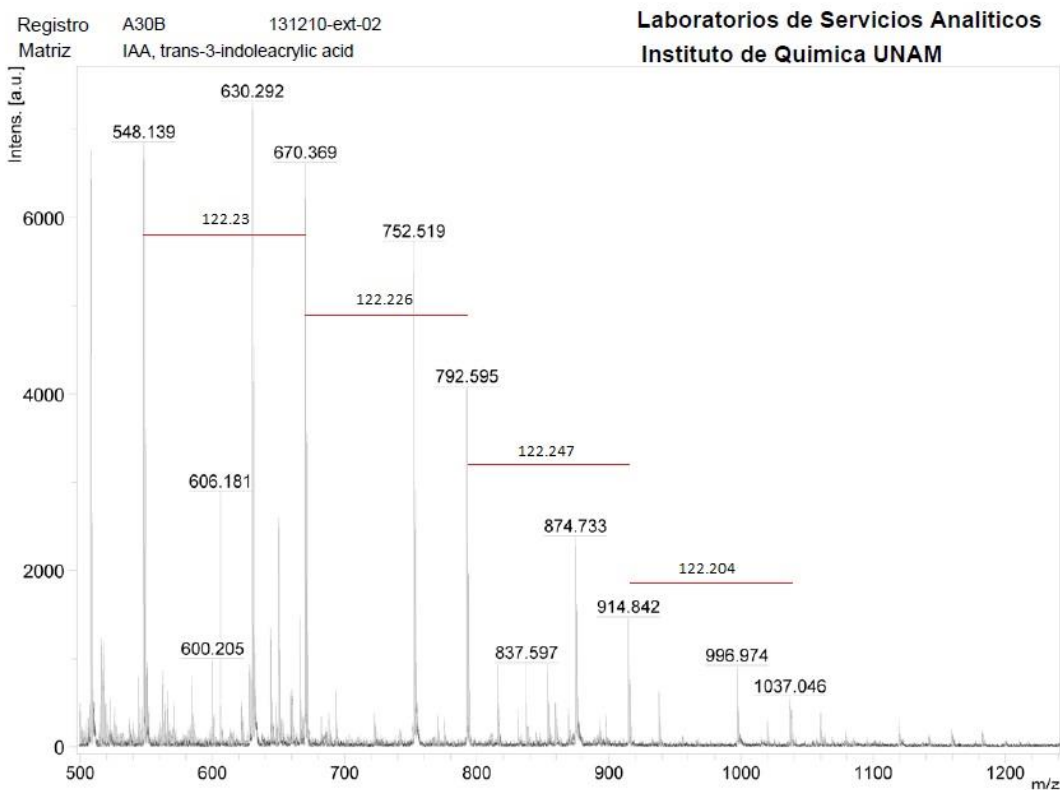


Fig. 9: Espectro de MALDI-TOF para la muestra A de la Tabla 1.

Asimismo, los espectros de ^{19}F RMN evidenciaron una disminución considerable en la intensidad correspondiente a la señal de flúor, lo que implica que la molécula pierde una gran cantidad de este halógeno durante la polimerización. Esto se puede apreciar en las siguientes figuras 10a y 10b:

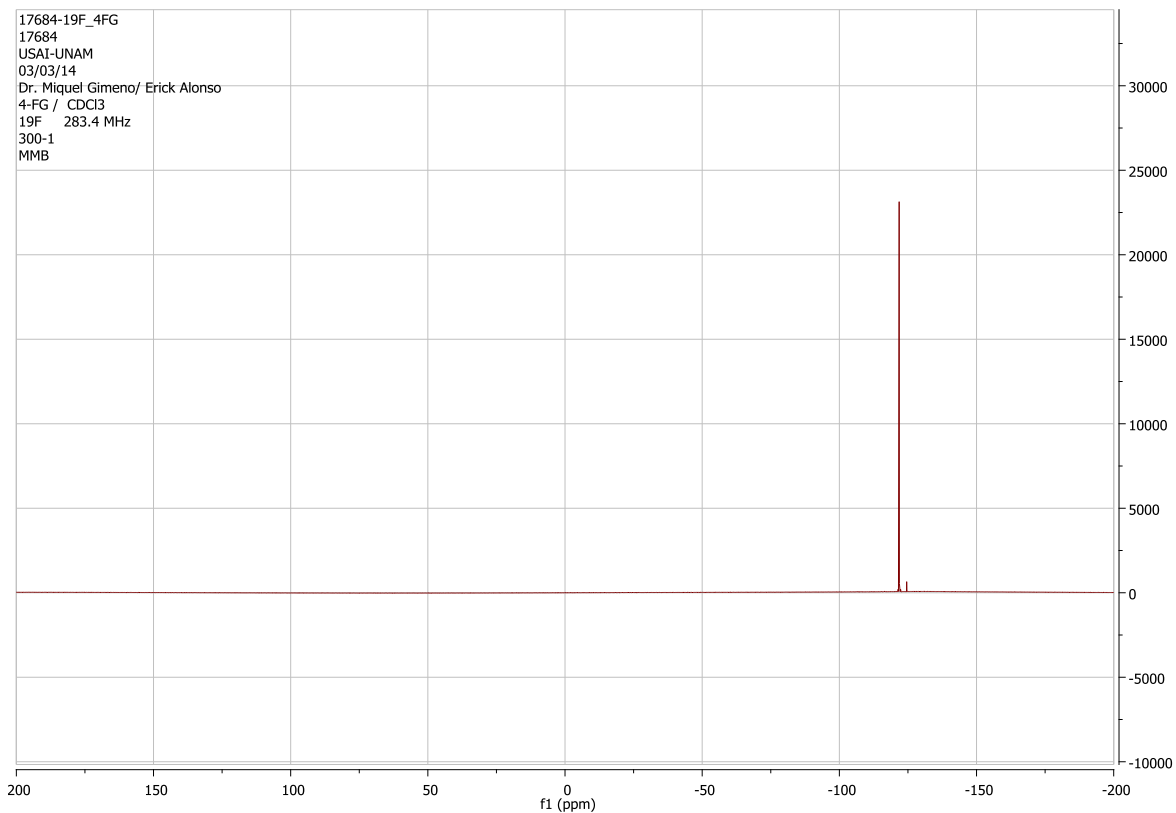


Fig. 10a: Espectro de RMN de ^{19}F para el monómero, 4-fluoro-2-metoxifenol.

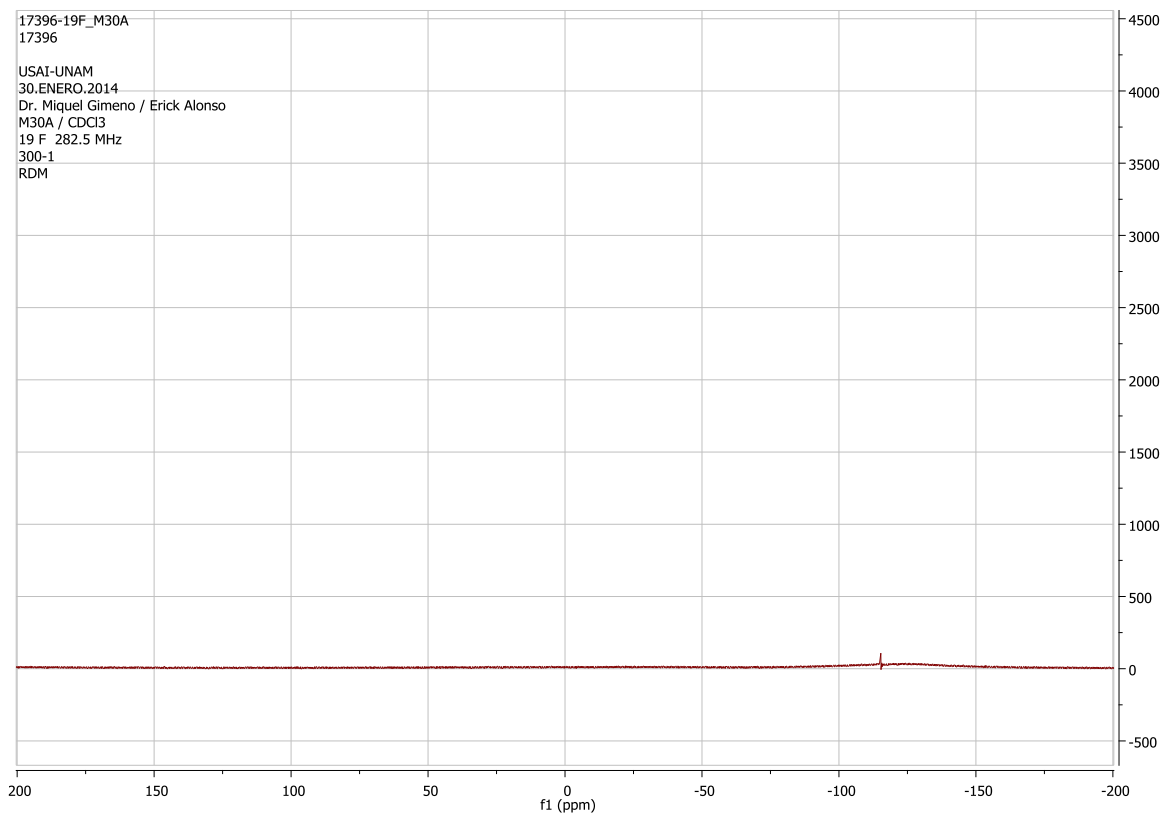


Fig. 10b: ^{19}F RMN para la muestra C de la Tabla 1.

Debido a que el monómero presenta una clara señal de flúor mientras que el polímero no, durante la polimerización debe existir una reacción de deshalogenación que dé lugar a las estructuras poliméricas subsecuentes.

Como en todas las muestras se obtuvieron espectros de RMN similares, a continuación se expone una muestra representativa de lo que se observó en los correspondientes espectros que se llevaron a cabo de los polímeros. Para observar todos los espectros véase el Anexo en la pág 56.

En los espectros de ^1H RMN que se muestran a continuación en las figuras 11a y 11b, se aprecia un ensanchamiento de las señales relacionadas con los carbonos aromáticos, sugiriendo que nuevos enlaces en esta zona de la molécula son los que provocan las distorsiones en comparación con el espectro del monómero.

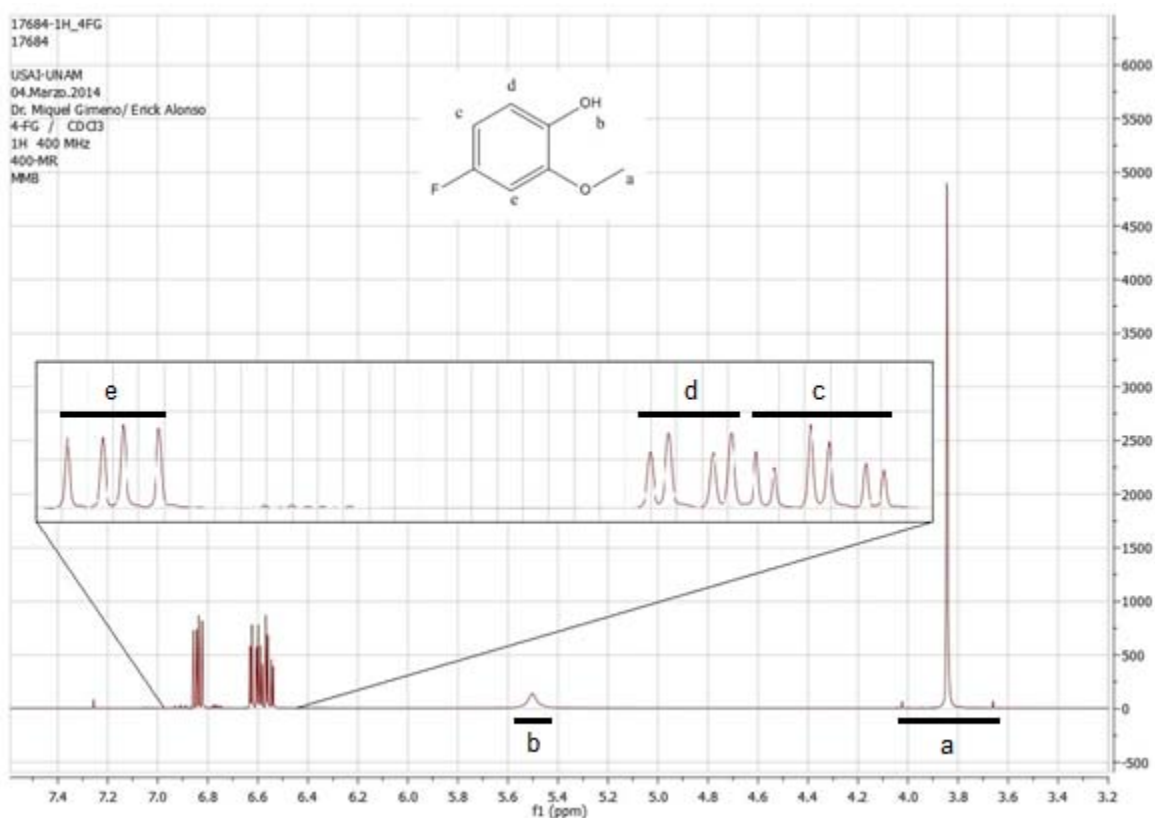


Figura 11a: Espectro de ^1H RMN del 4-fluoroguaiacol.

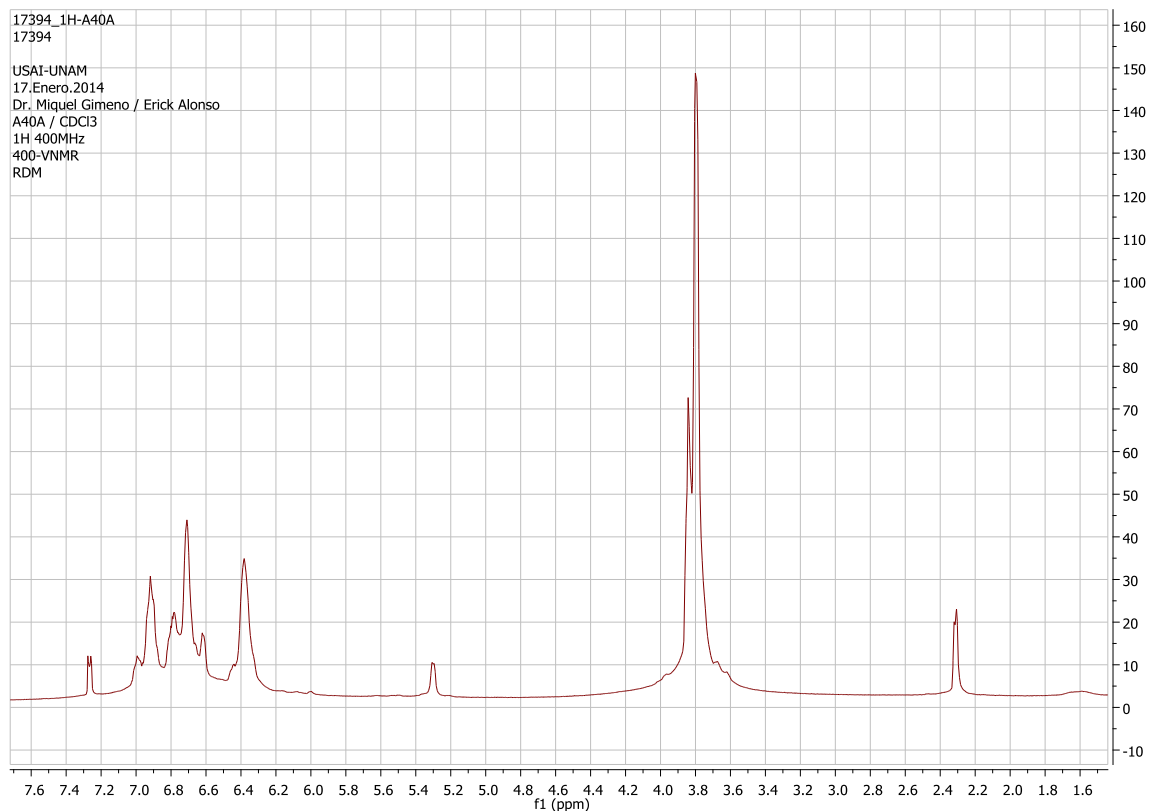
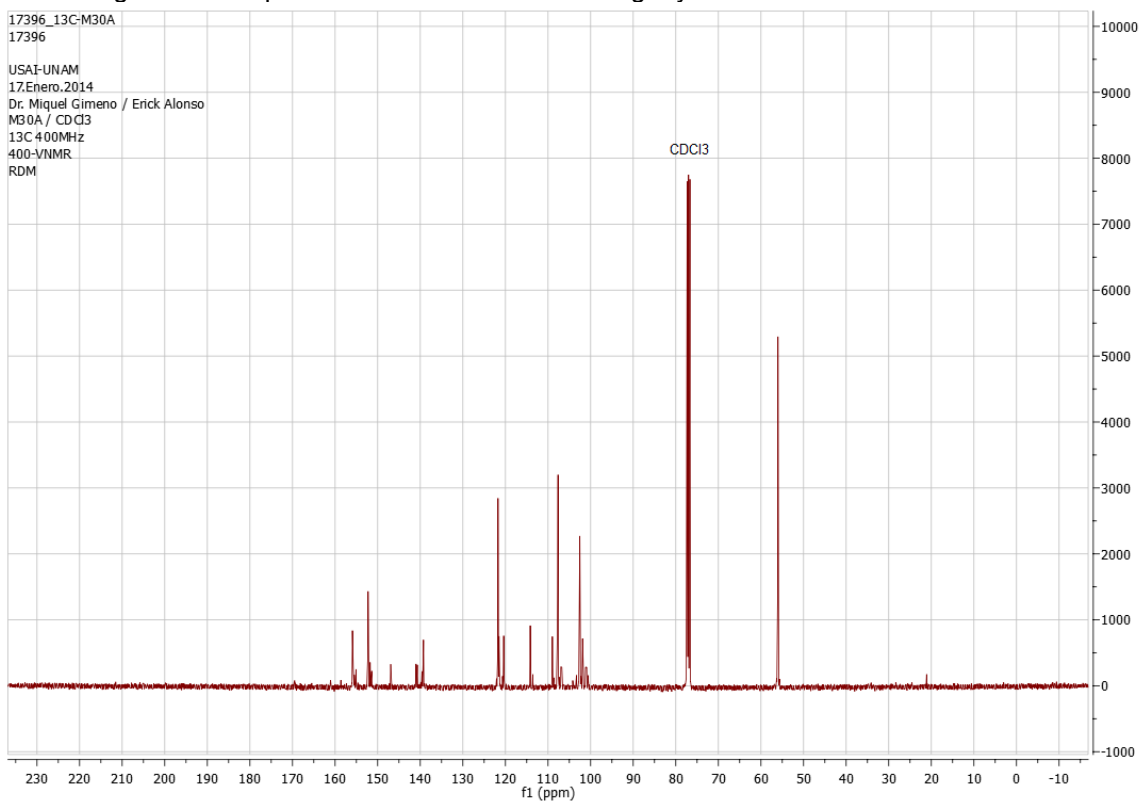
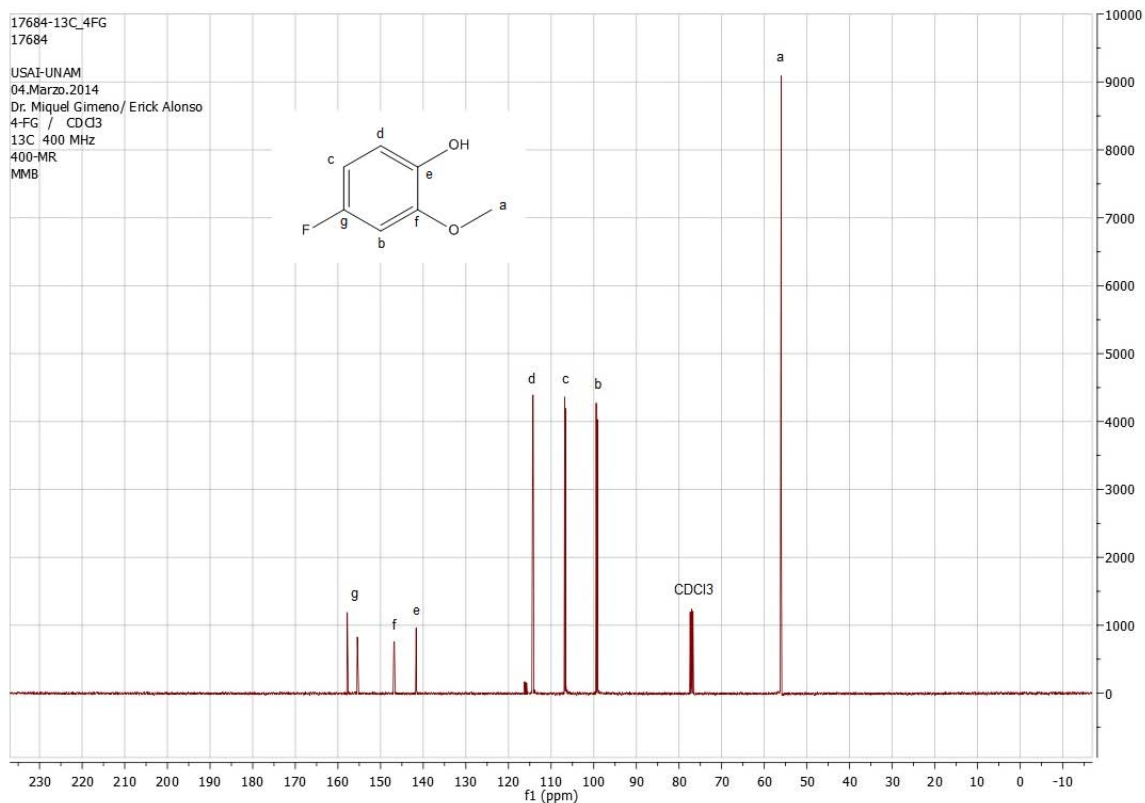


Fig. 11b: Espectro de ^1H RMN obtenido para el polímero B de la Tabla 1.

La pequeña señal observada en aproximadamente fue asignada al hidrógeno perteneciente al hidroxilo.

Por otro lado, los análisis de ^{13}C RMN confirman que los enlaces poliméricos tienen lugar en la sección aromática de la molécula, al ensancharse y distorsionarse las señales que corresponden a los carbonos 3,4 y 5 principalmente. Esto sugiere que, aunado con la deshalogenación demostrada por los espectros de ^{19}F , uno de los enlaces de polimerización ocurre en el carbono 4 del monómero liberando un átomo de flúor al medio de reacción. En las figuras 12a y 12b se observan los espectros correspondientes:



Por otro lado, se llevó a cabo una titulación de hidroxilos de los polímeros en una disolución de piridina. Esto se hizo siguiendo el método descrito por Zaragoza-Gasca *et al* (2011). Los resultados de la titulación indicaron que en el polímero final siguen existiendo grupos hidroxilo, aunque en menor cantidad. Esto sugiere que este grupo funcional se encuentra en la estructura del polímero y podría deberse a las unidades terminales, lo cual estaría en concordancia con el peso molecular como se discutirá posteriormente. Los resultados concretos de la titulación se pueden apreciar de manera resumida en la Tabla 2 en la pág 46.

Debido a la evidencia de la disminución de hidroxilos después de la polimerización, la defluorinación que sufre la molécula y la formación de un enlace en el carbono 4, se puede proponer la estructura siguiente para el polímero sintetizado en la Figura 13:

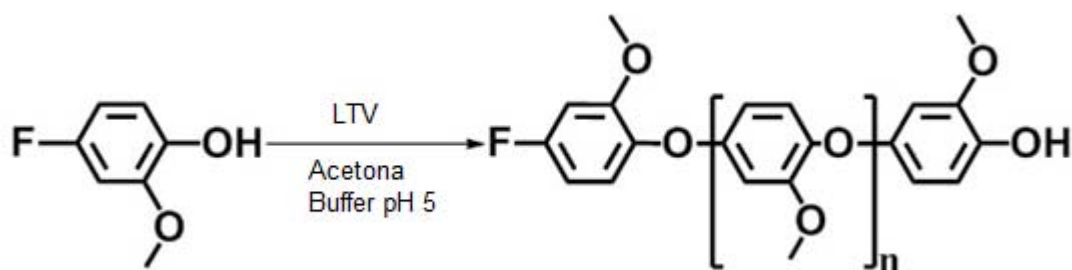


Fig. 13: Estructura propuesta del polímero resultante de la reacción entre moléculas de 4-FG con LTV.

De esta manera, la unidad de repetición tiene un peso molecular de 122 Da, consistente con los resultados obtenidos de la técnica de MALDI-TOF, así como un enlace en el carbono 4 y la polimerización fenil-oxi entre este carbono y el grupo hidroxilo de otra molécula, resultante de la interpretación de los espectros de RMN y la titulación con piridina. Se propone que el polímero posea una unidad inicial y una terminal, cada una poseyendo un átomo de flúor y un hidroxilo respectivamente. Teniendo en mente la participación del carbono fluorado y el grupo hidroxilo durante la polimerización, así como de la deshalogenación de la unidad repetitiva, es

posible deducir que para que ambas especies se puedan detectar después de llevada a cabo la polimerización, es necesario que dichas especies se encuentren presentes en formas terminales del polímero.

6.5 Espectroscopía de Infrarrojo

Los resultados de los espectros de infrarrojo sirvieron para apoyar la analítica anterior, ya que en ellos se puede observar una disminución drástica en el contenido de grupos hidroxilo en la muestra tras las reacciones de polimerización. La reducción de este grupo funcional se puede apreciar en la la señal observada entre 3200 y 3500 cm^{-1} en los espectros que se encuentran en el anexo. Esta señal es característica del estiramiento o *stretching* del enlace O-H. Donde para el monómero se aprecia una señal importante de la transmitancia en esta zona, para los polímeros la señal se reduce, indicando que el estiramiento ocurre en menor cantidad porque este enlace ya no se encuentra presente con la magnitud inicial. Se logra percibir en la comparación que en la gran mayoría de las señales, las vibraciones registradas permanecen prácticamente constantes. Esto es el caso para el stretch de grupos C-H aromáticos en la región entre 3000 y 3100 cm^{-1} , la señal correspondiente al grupo metoxi (-O-CH₃) a 2836 cm^{-1} y las vibraciones relacionadas con los dobles enlaces de carbono en compuestos aromáticos C=C a 1493 y 1608 cm^{-1} . Sin embargo, las señales que sí difieren del monómero son las que nos otorgan más información, como fue el caso para la desaparición de la señal correspondiente a los grupos hidroxilo. Por otro lado, a 1255 cm^{-1} se observa la aparición de un pico más definido. Esta vibración corresponde a un enlace C-O-C, lo que aunado al incremento de enlaces C-O observado a 1185 cm^{-1} , nos sugiere que se están formando enlaces C-O-C durante la polimerización. Tomando en cuenta los análisis de RMN previos y la desaparición de los grupos hidroxilo en los espectros de IR y de la titulación como evidencia de esto, se confirma que el acoplamiento entre las unidades de repetición procede por la formación de un enlace C-O-C a

partir del grupo hidroxilo y el carbono halogenado de la siguiente unidad repetitiva. La disminución de las señales correspondientes a diferentes posiciones de C-H con influencia de un sustituyente halogenado a 1025, 1115 y 1145 cm^{-1} también indican lo anterior. En la Figura 14 se pueden observar los espectros del monómero y de los polímeros:

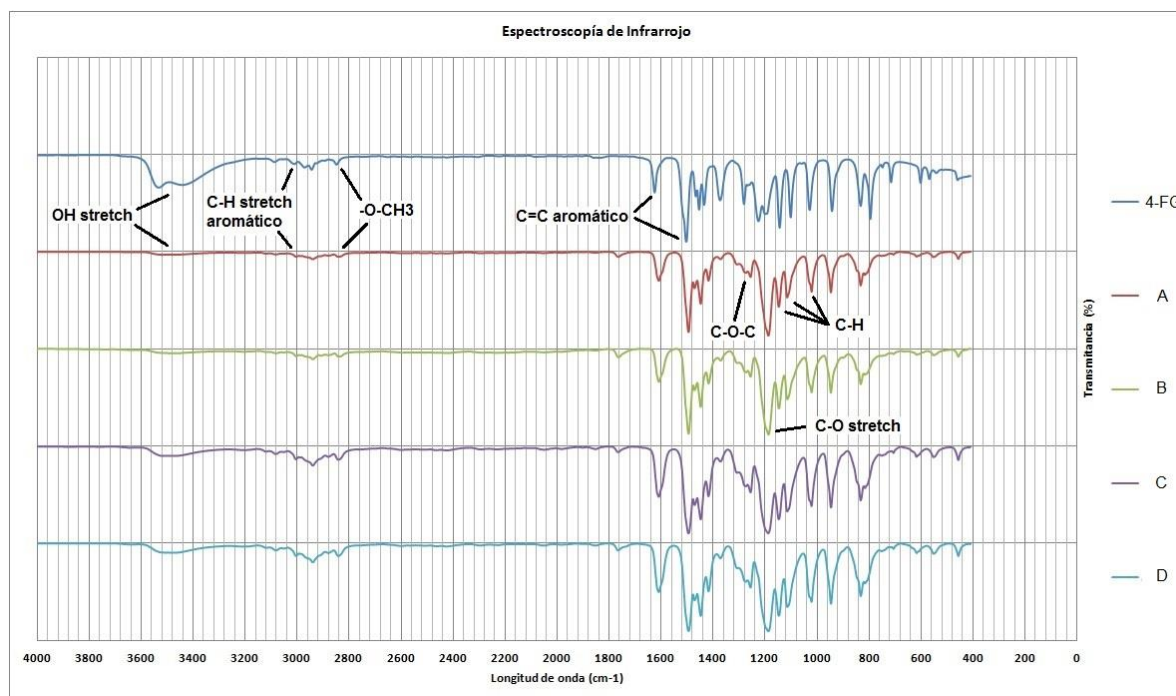


Fig. 14: Espectro de emisión infrarroja para el monómero y todas las entradas de la Tabla 1.

6.6 Espectroscopía de Rayos X

Los análisis de difracción de Rayos X en polvo revelaron por integración de las áreas en el espectro, que el polímero tiene una cristalinidad de aproximadamente 51%, independientemente del medio de reacción. Las áreas de picos definidos en el espectro son las que corresponden a zonas cristalinas, mientras que aquellas que no poseen señales claras corresponden a regiones amorfas. Al poseer estos polímeros una cristalinidad del 51%, se puede decir que es un material semicristalino. Los espectros se aprecian a continuación en la Figura 15:

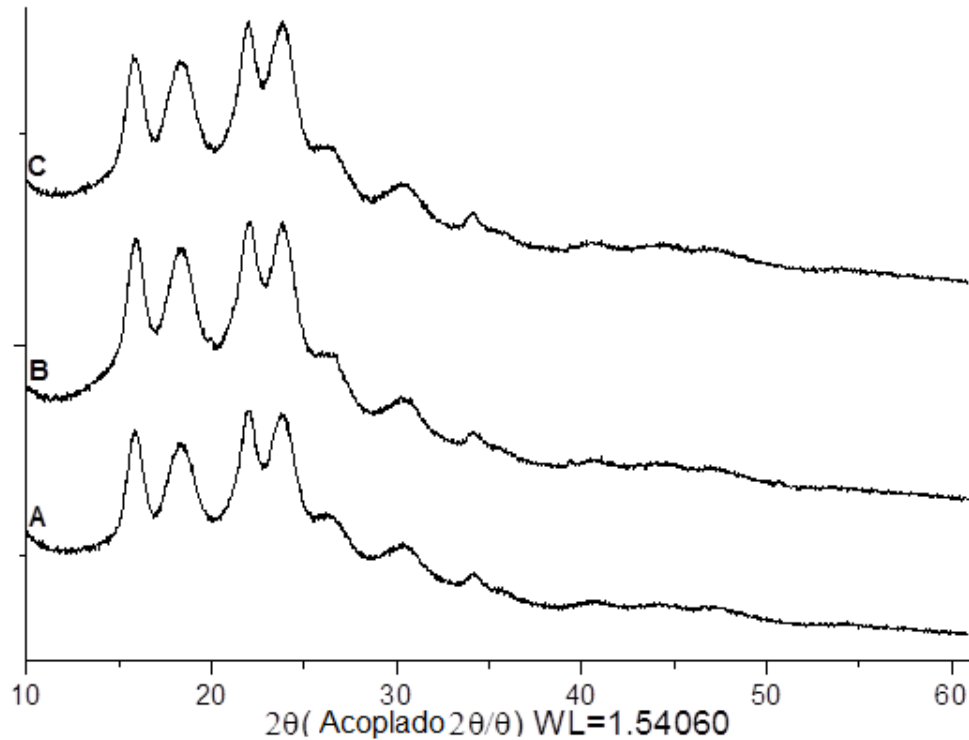


Fig. 15: Espectros de Difracción de Rayos X en Polvo para las muestras A, B y C de la Tabla 1.

6.7 Cromatografía de permeación en gel

Como segundo análisis para determinar el peso molecular de los polímeros formados, se procedió a hacer una cromatografía de permeación en gel.

Los resultados arrojaron que los polímeros alcanzan un peso molecular promedio numeral (M_n) de hasta 1190 Da, contra un peso molecular promedio ponderado (M_w) de hasta 2200 Da, esto da una polidispersidad cercana a 2. Se puede concluir que existe una relativamente amplia distribución de pesos moleculares, lo cual es característico para muchos procesos de polimerización por radicales libres cuando no se tiene un control estricto de la reacción en el medio, como lo es el caso de esta polimerización batch.

En la siguiente gráfica se aprecian los resultados condensados obtenidos de las dos corridas que se llevaron a cabo (para ver los resultados completos, véase la Tabla 2 en la pág. 46):

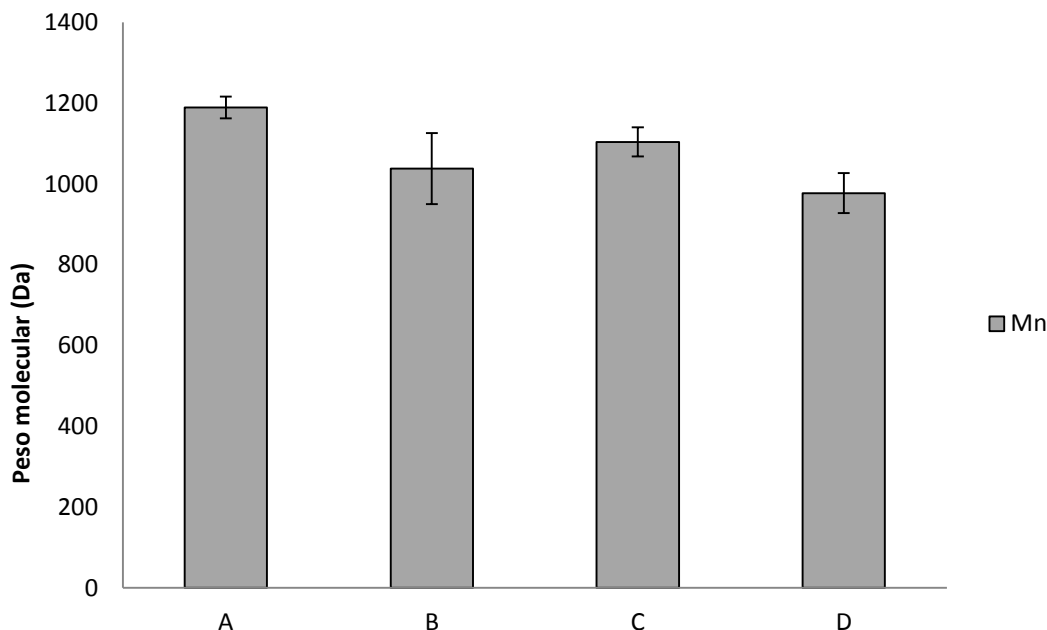


Fig. 16: Pesos moleculares de los polímeros establecidos por medio de la comparación de los cromatogramas del mismo con estándares de poliestireno por medio de la cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) con una fase móvil de cloroformo.

A simple vista se observa que aquellos polímeros que se llevaron a cabo en un medio de reacción que contenía solamente el 30% v/v del cosolvente orgánico respectivo (A y C) son ligeramente mayores a aquellos en los que la proporción de solvente era mayor (B y D). Esto nos indica que la presencia de solvente orgánico en solución repercute en el tamaño final de los polímeros, ya sea por desactivación de la enzima o por interacciones electrostáticas en el medio que favorezcan el crecimiento de la cadena polimérica, siendo así una opción para controlar el peso molecular deseado en futura experimentación.

Con la información previamente obtenida de los análisis MALDI-TOF, se calcula la cantidad aproximada de unidades de repetición que contienen

los polímeros, estableciendo así que en promedio se tienen aproximadamente 8 unidades de repetición por molécula. Por la pequeña cantidad de unidades de repetición en las muestras, se puede decir que estas moléculas son mayormente oligómeros.

Comparando los picos obtenidos en el cromatograma con los estándares de poliestireno, se puede llevar a cabo una aproximación bastante cercana del peso molecular de las muestras introducidas en la columna. Se trata de una técnica de determinación aproximada y no exacta, ya que los estándares no se tratan del mismo compuesto polimérico y por ende, las interacciones que tiene el volumen hidrodinámico de las moléculas al permear en la columna empacada no son iguales. Esto puede provocar pequeñas discrepancias en cuanto al tiempo de retención y afecta la interpretación de los pesos moleculares, por lo que se recomienda mejor utilizar en futuras referencias los valores obtenidos en los análisis MALDI-TOF, que son más precisos por tratarse de una técnica espectrométrica.

6.8 Análisis térmicos

Se llevaron a cabo los TGA para definir la resistencia térmica de los polímeros. Se calentó una masa de muestra conocida desde 25 hasta 500 °C y se determinó por medio de la disminución de la masa de la muestra, la temperatura a la que el 5% de la misma se descompone, dando un promedio aproximado para todos los polímeros de 317 °C. Dicha información se observa en la Figura 17:

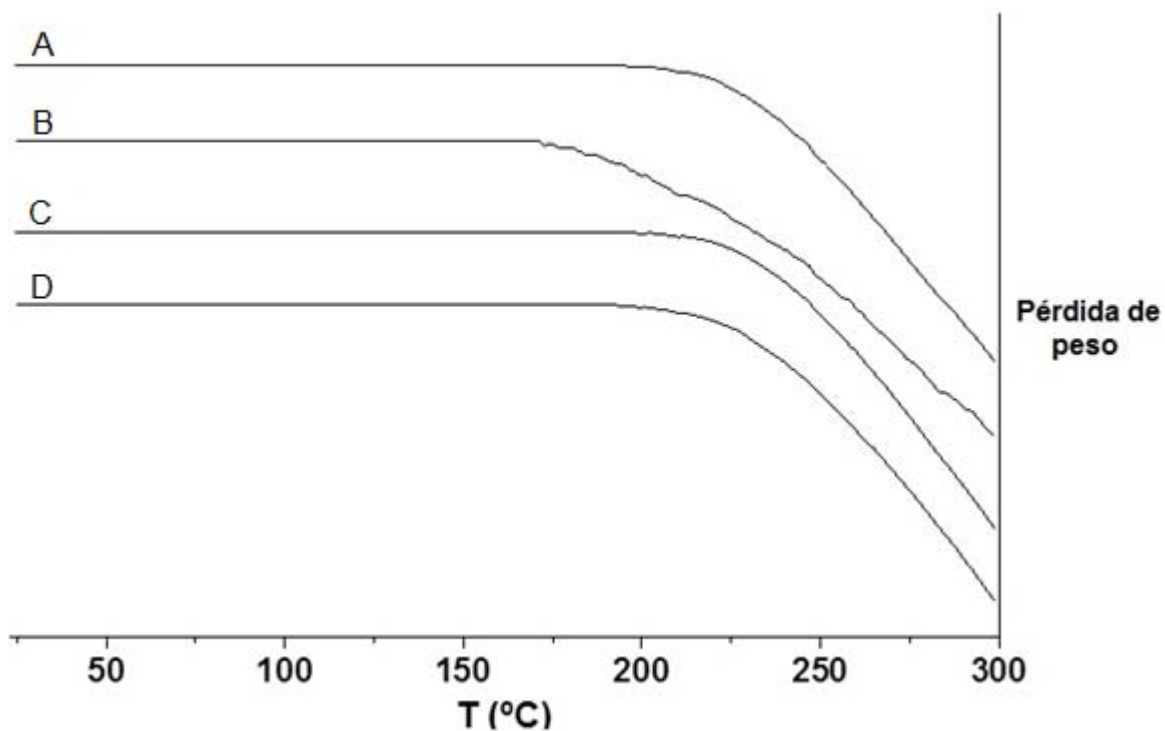


Fig 17: Representación de los TGA de 25 a 300 °C hasta alcanzar la temperatura de descomposición del 5% del polímero. Las letras A, B, C y D corresponden a las entradas respectivas en la Tabla 1.

Por otro lado, también se llevaron a cabo análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC), dando como resultado una temperatura de fusión T_m del poli(4-FG) que varía entre 160 a 180 °C, como se observa en la gráfica a continuación. La temperatura de fusión corresponde al mínimo local que se observa en la función de calentamiento.

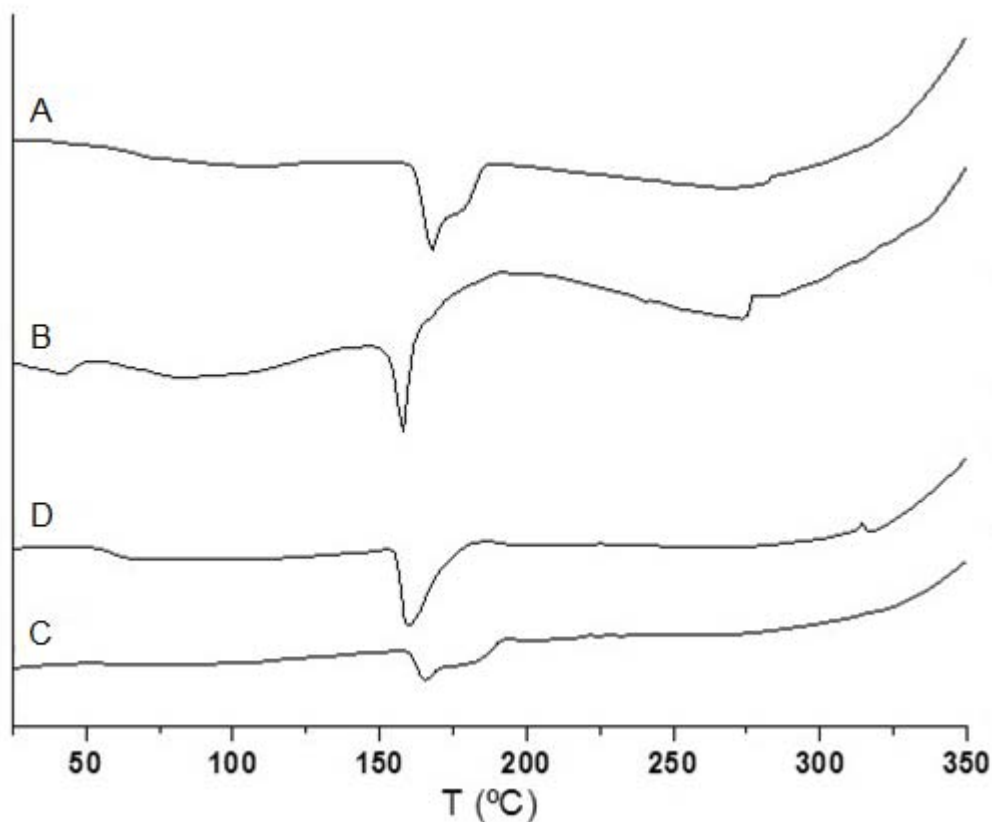


Fig 18: DSC para las diferentes muestras de 25 a 300 °C. Los mínimos locales que se observan entre 150 y 200 °C corresponden a la temperatura de fusión de cada uno de los polímeros. Las letras A, B, C y D corresponden a las entradas respectivas en la Tabla 1.

Con estos resultados, ya se puede concluir la caracterización físicoquímica de los polímeros obtenidos. Estos se condensan en la siguiente Tabla 2:

Tabla 2: Polioxidación de 4-fluoro-2-metoxifenol mediada por LTV en medio de reacción de solvente orgánico/buffer.

Muestra	Solvente orgánico (vol %)	Rendimiento (%)	M_n^α (g/mol)	PDI ^α	Relación Ph/Ox ^β	T_d (5% peso) ^γ
A	Acetona (30)	52.3 ± 0.1	1190	1.8	24/76	332.1
B	Acetona (40)	13.7 ± 4.3	1038	1.6	22/78	327.1
C	Metanol (30)	22.4 ± 7.1	1104	2.1	26/74	298.5
D	Metanol (40)	15.4 ± 5.7	977	1.9	29/71	311.1

α: Determinado por medio de la cromatografía de permeación en gel (GPC) con estándares de poliestireno, β: determinado por titulación en solución de piridina, γ: determinado por TGA.

6.9 Fotoluminiscencia

Procediendo a analizar las propiedades electro-ópticas del polímero, se llevó a cabo un análisis de espectroscopía de fotoluminiscencia.

Las muestras se excitaron con cuatro diferentes longitudes de onda y posteriormente se registraron las intensidades de fluorescencia en un intervalo de emisión entre 350 y 800 nm. Se encontraron diferentes máximos de emisión para cada longitud de onda como se puede ver en la figura 19:

Fig. 19: Espectroscopía de fluorescencia para el polímero con la entrada B en la Tabla 1. Las letras A, B, C y D corresponden en este caso a las longitudes de onda de excitación de 365, 405, 473 y 559 nm respectivamente.

Estos análisis nos confirman que los polímeros presentan características de emisión de fluorescencia en un intervalo grande de excitación, haciéndolo interesante para posterior investigación y futura aplicación en dispositivos optoelectrónicos.

También se llevó a cabo un barrido de absorbancia del polímero disuelto en cloroformo. Este dio como resultado que el polímero absorbe una mayor cantidad de luz que el monómero en la zona correspondiente a luz UV de entre 230 y 310 nm:

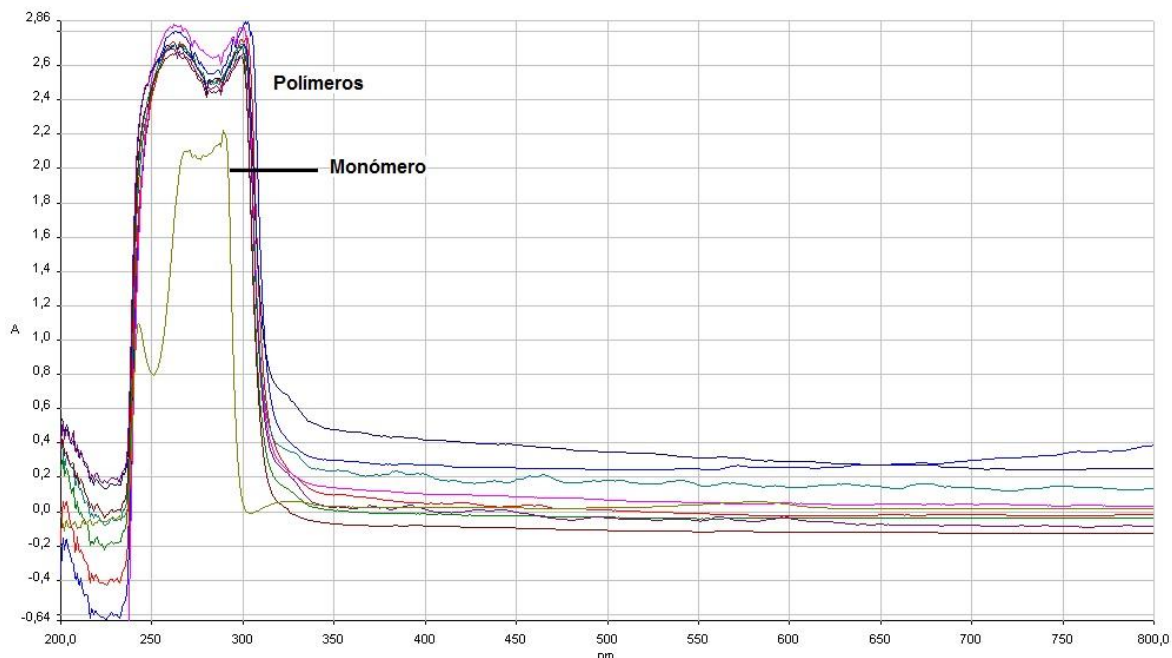


Fig. 20: Barrido de absorbancia del monómero y los polímeros derivados en el intervalo de 200 a 800 nm.

6.10 Microscopía confocal

Un microscopio confocal es un microscopio de fluorescencia que posee la característica de poder crear imágenes muy detalladas de objetos a través de una técnica que comenzó a utilizarse en 1955 por Marvin Minsky (Minsky, 1988).

En un microscopio de fluorescencia común, toda la muestra es irradiada por una misma fuente de luz de manera homogénea, lo que provoca que la detección de la fluorescencia por el fotodetector o por la cámara incluya mucha fluorescencia de fondo, o “ruido” provocado por la fluorescencia que emiten zonas que nos están siendo enfocadas por el objetivo. A diferencia de esta técnica, en la microscopía confocal se irradia la muestra con iluminación de dispersión de punto, lo que provoca que, en

conjunción con una rendija pequeña, al detector de fotones sólo llegue luz proveniente de muestra que se encuentre muy cercana al plano focal, incrementando su resolución. En un lenguaje más coloquial, la microscopía confocal es capaz de detectar la fluorescencia de una muestra en “rebanadas” más delgadas, omitiendo así fluorescencia de fondo y mejorando la calidad de las imágenes.

En el caso del 4-fluoro-2-metoxifenol, se tomaron tres imágenes de secciones representativas de las respectivas muestras.

Utilizando la información que se obtuvo de los análisis térmicos, podemos formar entonces películas de polímero por medio de la técnica de fundido en moldes de dimensiones conocidas. Estas películas presentan las características apropiadas para el análisis por medio de la microscopía confocal, ya que poseen una altura y densidad homogénea y pueden formarse sobre una superficie de vidrio (cubreobjetos) que permita el directo análisis en el microscopio.

Todas las películas fueron creadas por fundición a 200 °C, temperatura a la cual según los TGA y DSC, el polímero debe fundir sin descomponerse significativamente, lo que implica que mantiene sus propiedades físicoquímicas.

Para cada sección fotografiada, se obtuvieron tres diferentes imágenes. En cada una de ellas, se registra la fluorescencia cuando se irradia con luz de diferente longitud de onda. En la siguiente tabla, se aprecian las longitudes de onda de excitación y de emisión correspondientes a los canales observados por el microscopio:

Tabla 3: Longitudes de onda que el microscopio confocal Olympus FluoView FV 1000 utiliza en sus diversos canales. La longitud de onda de excitación corresponde a la luz con la que es irradiada la muestra, la de emisión es la longitud de onda que emite la muestra y que detecta el equipo.

λ (nm)	Canal 1	Canal 2	Canal 3
Excitación	405	473	559
Emisión	425-460 (azul)	485-545 (verde)	575-620 (rojo)

Las imágenes que se obtienen del microscopio se pueden observar en la Figura 21:

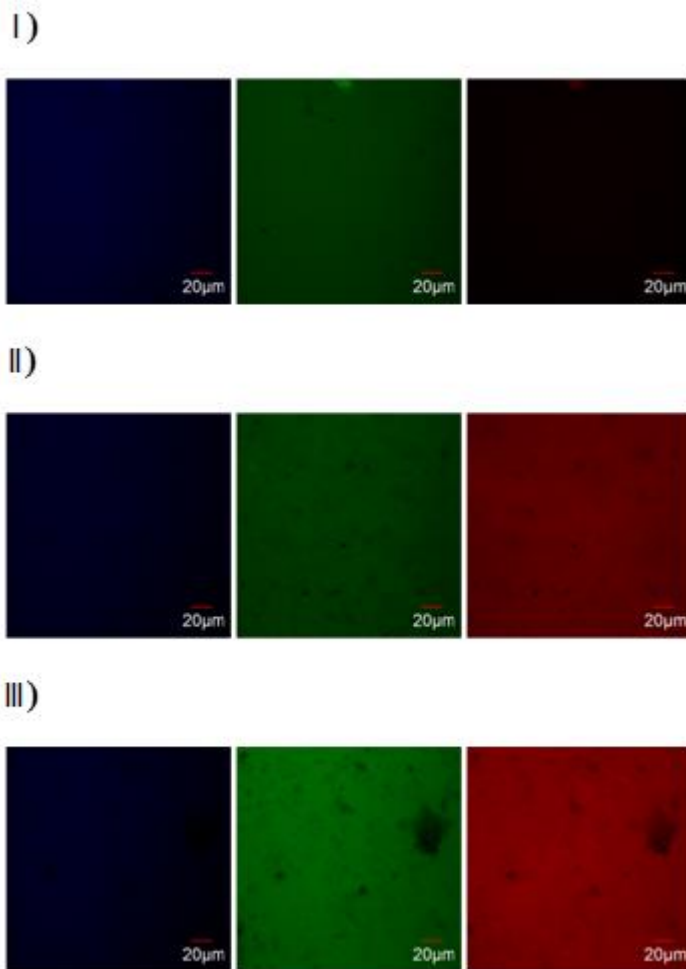


Figura 21: Imágenes del poli(4-FG) obtenidas de la microscopía confocal. I) Entrada A, II) Entrada C, III) Entrada D de la Tabla 1. De izquierda a derecha: λ_{em} 425-460 nm, λ_{em} 485-545, λ_{em} 575-620 nm.

Se observa que el polímero presenta fluorescencia en los tres canales analizados. Esto es bueno ya que emite luz a lo largo de un intervalo de longitudes de onda amplio, haciéndolo interesante para futuras investigaciones para su aplicación en dispositivos electrónicos OLED. Utilizando el software para integrar las áreas de fluorescencia en las imágenes obtenidas por el microscopio confocal, podemos comparar la intensidad de fluorescencia de cada polímero entre sí. Esto se hace

normalizando los valores obtenidos de fluorescencia/área directamente del software, obteniéndose la siguiente gráfica de la Figura 22:

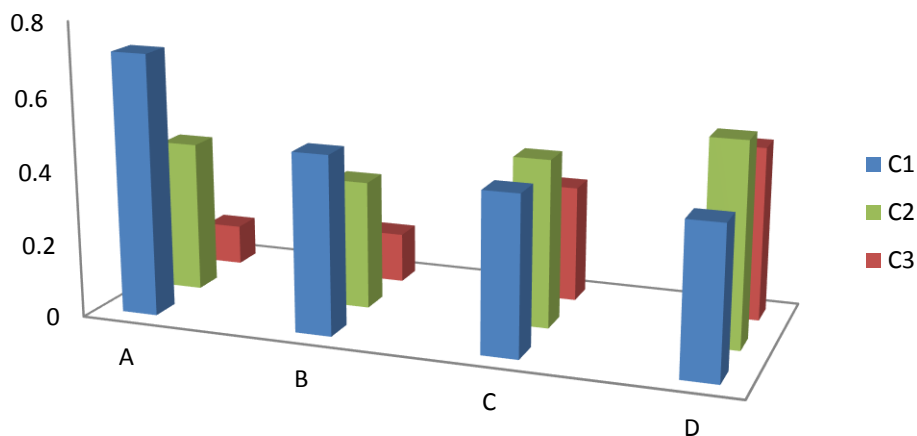


Fig. 22: Intensidad de fluorescencia por canal y medio de reacción, determinado estadísticamente tras el análisis de integración de área para las imágenes del Microscopio Confocal. C1, C2 y C3 son los canales que registra el equipo, las longitudes de onda de excitación y de emisión se determinaron en la Tabla 3.

Es relevante mencionar que aparentemente, aquellas muestras que reaccionaron en un medio de acetona, parecen tener una mayor intensidad de fluorescencia en el campo azul en comparación con las reacciones en metanol. Lo opuesto sucede en el campo rojo de fluorescencia, en donde aquellos polímeros sintetizados en metanol tienen intensidades mayores. En el intervalo de longitudes de onda correspondientes al color verde, no parece ser que ninguno de los dos solventes tenga una influencia sobre la intensidad de fluorescencia, ya que en ambos casos se observa aproximadamente el mismo promedio.

VII. CONCLUSIÓN

La hipótesis y los objetivos establecidos al comienzo de esta investigación fueron cumplidos satisfactoriamente. No sólo se obtuvo un material con propiedades optoelectrónicas como lo es la fluorescencia, sino que además se llevó a cabo mediante el uso de la tecnología enzimática caracterizando estructuralmente el material. Las condiciones de reacción óptimas para el polímero en cuestión fueron en un medio de acetona al 30% v/v en buffer de acetatos pH = 5, obteniendo así un rendimiento de reacción del 52%. MALDI-TOF y SEC arrojaron que los materiales eran oligómeros de aproximadamente 8 unidades de repetición con una polidispersidad cercana a 2. El material demostró una resistencia térmica alta al presentar un valor para la temperatura de descomposición del 5% de la masa de $T_d^{5\%} = 332 \text{ }^\circ\text{C}$ y una temperatura de fusión $T_f = 170 \text{ }^\circ\text{C}$.

La reacción procede por medio de la deshalogenación del carbono 4 y la posterior formación de un enlace C-O-C entre dicho carbono y el oxígeno correspondiente al grupo hidroxilo del anillo aromático de la siguiente unidad repetitiva.

El polímero con mayor rendimiento presentó mayores emisiones de luz en el espectro azul que en el rojo, presentando un valor intermedio de fluorescencia en la gama verde del espectro visible. Se comprobó un incremento en la absorbancia de radiación UV entre 230 y 310 nm en comparación con el monómero.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Aktaş, N. (2003). Biosynthesis and Characterization of Laccase Catalyzed Poly(Catechol). *Journal of Polymers and the Environment*, 11(3), 123-128.

Archibald, F., Paice, M., & Jurasek, L. (1990). Decolorization of kraft bleachery effluent chromophores by *Coriolus versicolor* enzyme. *Microbiological Technology*, 846-853.

Armstrong, F. (2007). *The Armstrong Research Group*. Recuperado el 26 de Septiembre de 2013, de <http://armstrong.chem.ox.ac.uk/laccase.html>

Bonomo. (2001). Comparison of three fungal laccases from *Rigidoporus lignosus* and *Pleurotus ostreatus*: correlation between conformation changes and catalytic activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 67-75.

Bourbannais. (1995). Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator ABTS in kraft lignin depolymerization. *Applied Environmental Microbiology*, 1876-1880.

Božič, M. (2013). Laccase-initiated reaction between phenolic acids and chitosan. *Reactive and Functional Polymers*, 77(10), 1377-1383.

Duran, N., & Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B-Environmental*, 83-99.

Espinosa, M. I. (Abril de 2011). *Ciencia Cierta*. Recuperado el 16 de Enero de 2014, de <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC26/8verde.html>

Gaur, N. (2014). A review with recent advancements on bioremediation-based abolition of heavy metals. *Environmental Sciences: Processes and Impacts*, 180-193.

Gianfreda, L. (1999). Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation*, 1-25.

Goncalves, I. (2013). Sonochemical and hydrodynamic cavitation reactors for laccase/hydrogen peroxide cotton bleaching. *Ultrasonics Sonochemistry*, 774-781.

Gross, R. (2010). Enzyme-catalysis breathes new life into polyester condensation polymerizations. *Trends in Biotechnology*, 438-443.

Haslam, E. (1994). Plant Polyphenols (Vegetable Tannins*): Gallic Acid Metabolism. *Natural Products Reports*, 41-65.

Hoh, C. (2006). *The Enzyme Classification, in Industrial Biotransformations*. Wiley-VCH Verlag GmbH.

Jolival, C. (2000). Immobilization of laccase from *Trametes versicolor* on a modified PVDF microfiltration membrane: characterization of the grafted support and application in removing a phenylurea pesticide in wastewater. *Journal of Membrane Science*, 180(1), 103-113.

Karam, J. (1997). Potential applications of enzymes in waste treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 141-153.

Kobayashi, S. (2001). Enzymatic Polymerization. *Chemical Reviews*, 3793-3818.

Kobayashi, S. (2012). Enzymatic Polymerization.

Kudanga, T. (2011). Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 195-208.

Kurniawati, S. (2008). Characterization of *Trametes versicolor* laccase for the transformation of aqueous phenol. *Bioresource Technology*, 7825-7834.

Lehninger, A. L. (1982). *Biochemistry*. Nueva York: Worth Publishers.

Li, K. (1999). Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Applied Environmental Microbiology*, 2654-2660.

López, J. (2013). *Trametes versicolor* laccase oxidation of gallic acid toward a polyconjugated semiconducting material. *Journal of Molecular Catalysis*, 100-105.

Mayer, A. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 551-565.

Minsky, M. (1988). Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope. *Scanning*, 128-138.

Nicell, J. (2003). *Enzymatic treatment of waters and wastes*. Tarr M.A.

Nicholson, J. W. (2006). *The Chemistry of Polymers*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.

Odian, G. (2004). *Principles of Polymerization*. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons.

Owona Ayissi, V. B. (2013). Epigenetic effects of natural polyphenols: A focus on SIRT1-mediated mechanisms. *Molecular Nutrition & Food Research*, 22-32.

Patel, R. (1994). Potential use of a white-rot fungus *Antrodia* sp. RK1 for biopulping. *Journal of Biotechnology*, 19-23.

Quideau, S. (2011). Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 586-621.

Thurston, C. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 19-26.

United States Department of Agriculture. (16 de Septiembre de 2006). *Agricultural Research Service*. Recuperado el 26 de Marzo de 2014, de http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/new_allView.cfm?whichone=FungusHost&thisName=Trametes%20versicolor&organismtype=Fungus&fromAllCount=yes

Veitch, N. C. (Febrero de 2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3), 249-259.

Xuejiao Sun, R. B. (2013). Laccase-Catalyzed Oxidative Polymerization of Phenolic Compounds. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.

Yaropolov, A. (1994). Laccase - properties, catalytic mechanism and applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 257-280.

Zaragoza-Gasca, P. (2011). Novel photoconductive polyfluorophenol synthesized by an enzyme. *Journal of Molecular Catalysis*, 25-27