



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE POLÍMEROS AZUFRADOS A PARTIR DE TIOLES
AROMÁTICOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. ESTEFANÍA SIERRA IBARRA

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Marcela Ayala Aceves

[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Edmundo Castillo Rosales

[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Dra. Hailin Zhao Hu

[Instituto de Energías Renovables, UNAM](#)

Cuernavaca., Morelos Junio, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría de la Dra. Marcela Ayala Aceves en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los Estudios de doctorado se realizaron gracias a la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Dedico este trabajo a mis padres Gloria y Hernando por su amor, apoyo constante y enseñanzas de vida. Sin ustedes nunca habría llegado hasta aquí. Extiendo esta dedicatoria a esa persona especial que siempre estuvo conmigo durante la realización del proyecto, brindándome su apoyo y cariño incondicional.

Agradecimientos

A mi tutora la Dra. Marcela Ayala por todas sus enseñanzas, paciencia y gran ejemplo, no solo en el ámbito académico sino en mi crecimiento como persona.

A los miembros de mi comité tutor: Dr. Edmundo Castillo por sus aportes al proyecto y colaboración en el uso del programa COSMO-RS. Dra. Hailin Zhao Hu igualmente por su gran contribución a la realización de este proyecto y ayuda en la medición de la conductividad.

A los integrantes del jurado revisor de esta tesis: Dr. Agustín López-Munguía, Dr. Alfredo Martínez, Dr. Daniel Segura, Dra. Carmina Montiel y Dr. Miquel Gimeno, por su excelente disposición y tiempo para revisar mi trabajo y sus valiosos aportes al mismo.

A la Dra. Patricia Altúzar (IER-UNAM) por su valiosa ayuda con los análisis de espectroscopía de infrarrojo.

A los miembros del Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE) del CCADET – UNAM por su gran colaboración en el uso del equipo de espectroscopía de Raman.

A los doctores Alfredo Martínez y Alejandra Vargas por su colaboración con el uso del reactor para el proceso de melt Ring Opening Polymerization.

Al Dr. Alfonso Miranda por su colaboración en el análisis de los resultados de resonancia magnética nuclear.

A la bióloga Rosa Román por el apoyo técnico durante el desarrollo del proyecto.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por su apoyo económico para la asistencia a diferentes congresos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico en la realización de este trabajo, proyecto 179241.

También agradezco de manera muy especial...

A Hernando y Gloria los mejores padres del mundo.

A Vivi por todos estos años de compañía, aventuras, cantaleta y “roomiequéz”.

A los chicos del grupo de Biocatálisis Rédox: Mayra (un par de años a tu lado y aún no me gusta que me abrace), Joaaaaako, Eli “la dominatriz”, la Priscilanga, Ezequio “el inmortal”, Noé y Rouss. También a los vecinos Rudiños y ex-vecinos Lorenzos.

A mis amigos en Colombia y el mundo: Sara, Marce, Juli, Santi, PipeOso, Juancho, Tati, la Mona, Eli, Andrés, Frank, Joseph, doña Ana y los demás que se me puedan pasar. A pesar de la distancia sé que los lazos que nos unen siguen intactos.

A mis amigos en México: Dra. Ligia Luz Corrales, Dra. Edna Lorena Hernández, Darío, Elena, Fer, Iris, Majo, Xime, Andrea B., Santiago, Juana, Vale, Carlos Melesio, la Garibay, los Ramírez Castañeda, Montse, Argel, Ale Aquino, Cess, Mitsue, la flaca, Bere, Adri, Ale Var, Alyeri, Anyela, Orty y todos aquellos que han hecho de México mi hogar.

A mis bebés gatunos: Salvador Felipe Jacinto Dalí y Maryori Leonora por ser los peluditos más cariñosos del mundo.

RESUMEN

Los poli-disulfuros de fenileno son considerados materiales resistentes a altas temperaturas, así como a agentes químicos fuertes. Dichos polímeros también poseen características dieléctricas tales que pueden ser excelentes aislantes o semiconductores, dependiendo de las condiciones en que se encuentren. Una opción amigable con el ambiente para la síntesis de este tipo de compuestos es el uso de enzimas como catalizadores. En el presente trabajo de investigación se reporta un proceso quimioenzimático de síntesis de poli-disulfuros de fenileno, amigable con el ambiente.

La reacción enzimática para la obtención de poli-disulfuros de fenileno fue llevada a cabo en mezclas de solvente orgánico y agua, usando como sustratos 1,3-bencenoditiol y 1,4-bencenoditiol y la lacasa del hongo *Coriolopsis gallica* como catalizador. Los productos obtenidos fueron caracterizados e identificados como oligómeros cíclicos de disulfuros de fenileno. El análisis térmico de los productos demostró su factibilidad para ser empleados como precursores de poli-disulfuros de fenileno de alto peso molecular, al ser sometidos al proceso de melt Ring Opening Polymerization. La caracterización de los productos de dicho proceso indica que son poli-disulfuros de fenileno resistentes a altas temperaturas y con propiedades aislantes.

ABSTRACT

Poly(phenylene) disulfides are materials resistant to high temperatures and strong chemicals. Even more, they are able to work as insulating or semiconducting polymers due to their unique dielectric properties. The use of enzymes as catalyzers of the reaction for the synthesis of these materials can offer environmentally benign reaction conditions than chemical synthesis. Therefore, in this work we report the development of a chemioenzymatic eco-friendly process for the synthesis of poly(phenylene) disulfides.

The enzymatic reaction for poly(phenylene) disulfides synthesis was carried out in water/organic solvent mixtures, using 1,3-benzenedithiol and 1,4-benzenedithiol as substrates and the fungal laccase from *Coriolopsis Gallica* as catalyzer. The structure of the obtained products was determined as cyclic phenylene disulfide oligomers. The thermal characterization of the cycles showed that they could be used as precursors of high molecular weight poly(phenylene) disulfides by opening the cycles through a thermal process in the melt. The products of the aforementioned process are poly(phenylene) disulfides resistant to high temperatures and showed insulating properties.

Tabla de contenido

1	INTRODUCCIÓN	7
2	ANTECEDENTES.....	8
2.1	Polímeros lineales.....	8
2.2	Polímeros lineales azufrados	9
2.2.1	Polímeros conductores azufrados	10
2.2.2	Polímeros fotoconductores azufrados	12
2.2.3	El caso del súper polímero Sulfuro de Poli-fenileno.....	12
2.2.4	Los poli-disulfuros.....	14
2.3	Síntesis enzimática de poli-disulfuros de fenileno	16
2.3.1	La cloroperoxidasa y su actividad oxidante sobre el bencenotiol	17
2.3.2	La lacasa y su capacidad para oxidar bencenotioles	18
2.4	Condiciones de reacción de las enzimas	22
2.4.1	Mezclas solvente/agua como medio de reacción para la síntesis enzimática de polímeros ²³	
3	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	26
3.1	Hipótesis.....	26
3.2	Objetivos	26
3.2.1	Objetivo general	26
3.2.2	Objetivos particulares	26
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
4.1	Reactivos y enzimas	27
4.2	Ensayos de actividad enzimática	28
4.3	Determinación de las constantes catalíticas	28
4.4	Actividad en mezclas agua/solvente	29
4.5	Oxidación de los sustratos ditiólicos.....	29
4.6	Purificación de los productos de oxidación	30
4.7	Melt Ring Opening Polymerization	30
4.8	Caracterización de los productos	30
4.9	Métodos analíticos.....	31

4.9.1	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	31
4.9.2	Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR).....	31
4.9.3	Espectroscopía de Dispersión de Raman	31
4.9.4	Espectrometría de Masas	32
4.9.5	Calorimetría Diferencial de Barrido y Termogravimetría (DSC-TGA)	32
4.9.6	Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	33
4.9.7	Cromatografía de Permeación en Gel (GPC).....	33
4.9.8	Cromatografía de Capa Fina	33
4.10	Medición de la fotoconductividad	33
4.10.1	Construcción de películas	34
4.10.2	Respuesta eléctrica y cálculo de la conductividad	34
4.11	Cálculo de los coeficientes de actividad de diferentes solventes	35
4.12	Cálculo de la densidad de espín de fenoles y tiofenoles	35
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
5.1	Distribución de la densidad de espín en fenoles y tiofenoles	37
5.2	Estudio teórico de la solubilidad de los productos derivados del 1,4-BDT.....	39
5.3	Oxidación de 1,4-BDT catalizada por la CPO de <i>C. fumago</i>	41
5.4	Actividad de la lacasa de <i>C. gallica</i> en mezclas agua/solvente.....	44
5.5	Caracterización cinética de la oxidación de tiofenoles con la lacasa de <i>C. gallica</i>	46
5.6	Oxidación de 1,3 y 1,4-BDT con la lacasa de <i>C. gallica</i> : síntesis y recuperación de productos.....	49
5.7	Análisis de solubilidad de los productos de oxidación en diferentes solventes	51
5.8	Oxidación de tioles y formación de enlaces disulfuro: análisis espectroscópico.....	53
5.8.1	Oxidación de tioles: espectroscopía de infrarrojo FT-IR	53
5.8.2	Formación de enlaces disulfuro: espectroscopía de dispersión de Raman	55
5.9	Las disulfuros de fenileno sintetizados enzimáticamente tienen una conformación cíclica: análisis de espectrometría de masas	59
5.9.1	Análisis de los productos del 1,4-BDT	59
5.9.2	Análisis de los productos del 1,3-BDT	62
5.10	El análisis de resonancia magnética nuclear confirma la estructura cíclica de las moléculas sintetizadas enzimáticamente	65
5.11	Los CAD sintetizados enzimáticamente pueden ser usados como precursores de PPDS: caracterización térmica.....	67

5.12	Melt Ring Opening Polymerization de los ciclos aromáticos azufrados	69
5.13	Los productos de mROP tienen una estructura de anillos aromáticos unidos por enlaces disulfuro: espectroscopía de infrarrojo y Raman	71
5.14	La polimerización por mROP genera polímeros de tamaño uniforme	73
5.15	Los ciclos <i>para</i> -sustituidos forman cadenas lineales durante el proceso de mROP: ¹ H-RMN	75
5.16	Los polímeros azufrados sintetizados por mROP son resistentes a altas temperaturas	76
5.17	Los CAD y los polímeros sintetizados por mROP son aislantes.....	78
5.17.1	Análisis de conductividad de los CAD	78
5.17.2	Análisis de conductividad de los productos de mROP.....	80
6	CONCLUSIONES	83
7	PERSPECTIVAS	84
8	BIBLIOGRAFÍA.....	85
9	ANEXOS	93

Índice de figuras

Figura 1. Capas electrónicas y longitud de enlace con el carbono del nitrógeno, oxígeno y azufre.	10
Figura 2. Estructura del poli-sulfuro de fenileno	13
Figura 3. Ciclos de poli-disulfuros de fenileno (figura adaptada de Ding y Hay, 1996 ⁴⁶)	15
Figura 4. Obtención de dímeros unidos por enlaces disulfuro a partir de tioles alifáticos y bencenotiol (figura adaptada de Cruz, 2010 ³).....	18
Figura 5. Representación del sitio activo de la lacasa de <i>Coriolopsis gallica</i> (imagen proporcionada por Mayra Avelar).....	19
Figura 6. Representación esquemática del método de placas planas paralelas para la determinación de la conductividad	34
Figura 7. Distribución de la densidad de espín en radicales fenoxilo y tiofenoxilo	37
Figura 8. Estabilización de radicales fenoxilo y tiofenoxilo	39
Figura 9. Consumo de 1,4-BDT en la mezcla ternaria usando dos peróxidos diferentes: (a) H ₂ O ₂ , (b) tBHP.....	41
Figura 10. Efecto de la concentración de solvente en la actividad de LCg.....	44
Figura 11. Actividad de LCg en amortiguador luego de la incubación en medios con solvente	45
Figura 12. Ajuste a una cinética de Michaelis-Menten de la oxidación de 1,4 y 1,3-BDT por LCg.....	47
Figura 13. Actividad residual de LCg durante la oxidación de ditiolos aromáticos	49
Figura 14. Apariencia de los productos de oxidación con LCg derivados de a)1,4-BDT y b)1,3-BDT	50
Figura 15. TLC de las fracciones solubles de los productos derivados de a)1,4-BDT y b)1,3-BDT en diferentes solventes. Fase móvil: tolueno	52
Figura 16. Espectro de infrarrojo para los productos (azul) derivados de 1,4-BDT (violeta)	53
Figura 17. Espectro de infrarrojo para los productos (azul) derivados de 1,3-BDT (violeta)	53
Figura 18. Espectro de dispersión de Raman para los productos (morado) derivados del 1,4-BDT (azul)	56
Figura 19. Espectro de dispersión de Raman para los productos (morado) derivados de 1,3-BDT (azul)	57
Figura 20. Principales iones encontrados en los perfiles de ionización de productos del 1,4-BDT	59
Figura 21. Espectro de masas del producto derivado de 1,4-BDT sintetizado en baja concentración de solvente (10% acetona o ACN)	60
Figura 22. Espectro de masas del producto derivado de 1,4-BDT sintetizado en concentración de solvente media (50% acetona o 60% ACN)	61
Figura 23. Principales iones encontrados en el perfil de ionización de productos del 1,3-BDT	62
Figura 24. Espectro de masas del producto de 1,3-BDT sintetizado en ACN 10%	63
Figura 25. Síntesis de PPDS a partir de mROP de moléculas cíclicas generadas químicamente (adaptada de Ding y Hay, 1996 ⁴⁶)	65
Figura 26. Detalle del espectro de ¹ H-RMN de los productos derivados del 1,4-BDT	66
Figura 27. Detalle del espectro de ¹ H-RMN de los productos derivados del 1,3-BDT	67
Figura 28. Reactor empleado en el mROP de los CAD.....	70

Figura 29. Apariencia de los precursores cíclicos y los productos del proceso de mROP	70
Figura 30. Espectro de dispersión Raman de los CAD (verde) y productos de mROP (morado) derivados del 1,4-BDT	72
Figura 31. Espectro de dispersión Raman de los CAD (verde) y productos de mROP (morado) derivados del 1,3-BDT	72
Figura 32. meta-polifenilen disulfuro: polímero sintetizado por mROP a partir de ciclos derivados de 1,3-BDT	75
Figura 33. Síntesis de poli-disulfuros usando ciclos de 4,4'-isopropiliden-bistiofenol.....	75
Figura 34. Apariencia de las películas a obtenidas a partir de las diferentes soluciones. Ampliación 10X. a) Productos del 1,3-BDT en CS ₂ , b) Productos del 1,3-BDT en DMF, c) Productos del 1,4-BDT en DMF, d) Productos del 1,4-BDT en CS ₂	79
Figura 35. Perfiles de conductividad de los productos poliméricos de a) 1,4-BDT y b) 1,3-BDT. c) Perfil de intensidad de corriente del control.	80
Figura 36. Conductividad de polímeros dopados y no dopados comparada con otros materiales (adaptada de MacDiarmid, 2001 ¹³³)	81

Índice de tablas

Tabla 1. Enzimas comúnmente empleadas en la síntesis de polímeros (adaptada de Kobayashi, 1999 ⁴⁸).....	16
Tabla 2. Constantes catalíticas de la oxidación de diversos sustratos con diferentes lacasas fúngicas	21
Tabla 3. Reactivos y solventes utilizados en esta investigación	27
Tabla 4. Características de los solventes analizados y valores promedio de Υ	39
Tabla 5. Velocidad de desaparición de sustrato en las reacciones con CPO-S y los controles sin enzima.....	41
Tabla 6. Constantes cinéticas para la oxidación de diferentes sustratos por LCg.	47
Tabla 7. Constantes cinéticas para aril dianilina, difenol y ditiol orto-sustituidos	48
Tabla 8. Rendimientos producto/sustrato del proceso de producción completo	50
Tabla 9. Solventes orgánicos ensayados en la prueba de solubilidad.....	52
Tabla 10. Vibración de los componentes del anillo aromático (datos tomados de Varsányi, 2012 ¹¹⁸)	55
Tabla 11. Relación entre picos de los espectros de Raman.....	58
Tabla 12. Ángulo diedro CSSC de los disulfuros de fenileno lineales y cíclicos.....	64
Tabla 13. Propiedades térmicas de los CAD	68
Tabla 14. Relación de intensidad de las señales de los espectros de Raman del 1,4-BDT y sus productos.....	72
Tabla 15. Relación de intensidad de las señales de los espectros de Raman del 1,3-BDT y sus productos.....	73
Tabla 16. Parámetros característicos de peso molecular* de los productos de mROP derivados de 1,3-BDT	74
Tabla 17. Comportamiento térmico de los productos de mROP.....	76
Tabla 18. Conductividad de los productos sintetizados a partir de 1,3-BDT	79
Tabla 19. Intensidad de corriente y conductividad de los polímeros de 1,4 y 1,3-BDT.....	80

1 INTRODUCCIÓN

La obtención de polímeros novedosos sintetizados a través de métodos amigables con el ambiente es uno de los retos de la ciencia de materiales. Los polímeros lineales con átomos de azufre en su estructura, como el sulfuro de polifenileno (PPS)¹ y el polietilendioxitiofeno (PEDOT)², tienen propiedades importantes desde el punto de vista de su aplicación, como conductividad y estabilidad térmica. Sin embargo, la investigación en lo referente a la síntesis de polímeros azufrados es un área en la que aún queda mucho por estudiar, en especial la síntesis enzimática que se considera favorable con el ambiente.

En nuestro grupo de investigación se tiene como antecedente la oxidación de tioles alifáticos y aromáticos por la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*, y su posterior dimerización mediante el acoplamiento por medio de enlaces disulfuro³. El uso de un catalizador enzimático sería ideal para la polimerización de ditioles aromáticos unidos por enlaces disulfuro con el fin de generar polímeros azufrados similares al PPS: los poli-disulfuros de fenileno, materiales cuya síntesis no ha sido ampliamente estudiada a pesar de exhibir características interesantes como semiconductividad, termoestabilidad, resistencia a ácidos, bases y solventes, además de presentar excelente adhesión a vidrio, metales y concreto^{4, 5}. La lacasa de *Corioloopsis gallica*, otra oxidorreductasa que también se ha estudiado en nuestro grupo de trabajo, constituye una buena opción para la síntesis de estos polímeros debido a que sólo utiliza oxígeno molecular como sustrato y tiene un alto potencial redox⁶.

En el presente trabajo se pretende estudiar la síntesis enzimática de polímeros azufrados de carácter aromático que contienen grupos funcionales disulfuro. Asimismo, se plantea realizar la caracterización fisicoquímica de los polímeros obtenidos.

2 ANTECEDENTES

2.1 Polímeros lineales

El desarrollo de materiales con propiedades mejoradas que puedan entenderse y medirse a nivel tanto macro como micromolecular, ha sido uno de los principales retos de la ingeniería de materiales en los últimos años. Dentro del estudio en desarrollo de materiales, una de las áreas de mayor interés es la relacionada con la síntesis de polímeros y las propiedades que exhiben dependiendo de las condiciones de polimerización, monómeros empleados, longitud de la cadena, grupos funcionales presentes en la estructura polimérica, entre otros⁷. Estas propiedades a su vez determinarán la utilidad de los polímeros en diferentes campos de la industria.

En general los polímeros lineales tiene un amplio intervalo de aplicaciones industriales debido a que son elásticos cuando se encuentran como cadenas individuales, presentan mayor rigidez en su forma cristalina, es decir cuando las cadenas lineales están orientadas de manera uniforme en una matriz tridimensional y tienen alta resistencia a condiciones extremas de temperatura, pH y agentes químicos fuertes cuando se entrecruzan por medio de enlaces no covalentes entre átomos de diferentes cadenas. Esta versatilidad los hace de gran interés en áreas que emplean productos de alto valor agregado como la farmacéutica⁸ y la química analítica^{9, 10}. Además, los polímeros lineales constituyen un importante foco de estudio en el campo de la ingeniería de materiales, puesto que al mezclarse físicamente con uno o más polímeros diferentes o polimerizarse químicamente (copolímeros), es posible obtener materiales con determinadas propiedades elásticas y térmicas que pueden ser manipuladas dependiendo de las cantidades relativas del polímero presente^{8, 11}.

Otra característica importante de los polímeros lineales es su capacidad para transportar electrones a través de la cadena, siempre y cuando ésta tenga la configuración adecuada de enlaces pi. A su vez, las propiedades de los polímeros dependerán no solo de la linealidad, sino también de los grupos sustituyentes y heteroátomos presentes en la estructura.

2.2 Polímeros lineales azufrados

En el campo de los polímeros en general la presencia de heteroátomos les confiere diferentes propiedades térmicas, cristalinas, elásticas, ópticas, conductivas y fotoconductoras, dependiendo de las características de cada heteroátomo. En este sentido, el azufre, junto con el nitrógeno y el oxígeno, es uno de los heteroátomos que mayor presencia tiene en los polímeros orgánicos¹²⁻¹⁴. Desde el siglo XIX, se empleó el azufre en la fabricación de polímeros, no como parte de la cadena polimérica orgánica *per se* sino como aditivo, debido a su capacidad bajo ciertas condiciones de formar cadenas de sus propios átomos y reaccionar con los átomos de carbono de otras cadenas, dando lugar al entrecruzamiento. La vulcanización es un proceso mediante el cual se calienta el caucho crudo en presencia de azufre, la proporción de azufre que contiene el material final influye en las propiedades mecánicas y viscoelásticas del mismo^{13, 15}.

Por otra parte, en estudios más recientes se han reportado resultados exitosos en ensayos con diferentes clases de polímeros que contienen azufre. El poli(ditiotrietileno tereftalato) (PSSTET) y el poli(ditiotrietileno adipato) (PSSTEAD) fueron sintetizados por condensación y se determinaron sus propiedades térmicas y elásticas para compararlos con materiales análogos sin azufre, encontrándose que la presencia del heteroátomo en las cadenas poliméricas generó un aumento en la flexibilidad de las mismas debido a la longitud del enlace C-S, que es mayor a la de otros enlaces como C-O o C-N, ya que el azufre posee una capa electrónica adicional (hibridación sp^3)¹³ (Figura 1). El aumento en la flexibilidad dio lugar a la disminución de la temperatura de transición vítrea (T_g) y al incremento en la velocidad de cristalización del polímero, puesto que al ser las cadenas más flexibles y móviles se rearreglan con mayor facilidad en un orden tridimensional y permiten una mayor eficiencia de empaquetamiento dentro de la red cristalina, generando también un aumento en la temperatura de fusión (T_m) del material¹³. Es así como un ensayo con poli(tidietileno naftalato) generó resultados similares a los anteriores en cuanto a T_g , T_m y cristalización¹².

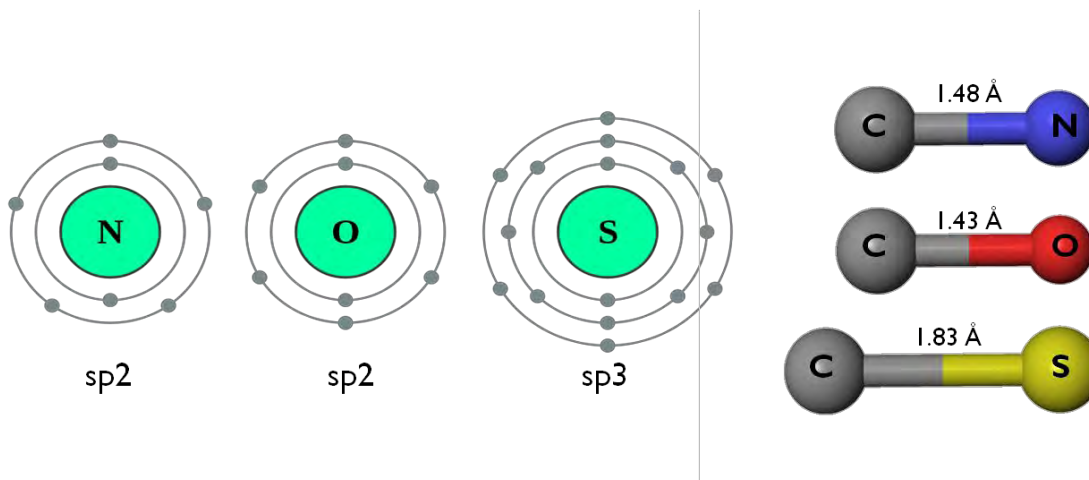


Figura 1. Capas electrónicas y longitud de enlace con el carbono del nitrógeno, oxígeno y azufre

En el campo de los polímeros conductores, semiconductores y fotoconductores el azufre también ha jugado un papel importante debido a sus características electrónicas.

2.2.1 Polímeros conductores azufrados

En la década de los 70s y con el descubrimiento del poli(sulfuro nitruro) que torna superconductor a bajas temperaturas, cobró importancia una nueva clase de materiales denominados polímeros intrínsecamente conductores¹⁶, los cuales presentaban alta conductividad eléctrica en estado parcialmente oxidado o menos frecuentemente, reducido¹⁷. A partir de este momento, la idea de los polímeros orgánicos como materiales estrictamente aislantes fue reemplazada por un creciente interés en sus propiedades eléctricas, electroquímicas y ópticas, así como su alta estabilidad, cualidades que les confieren un amplio espectro de aplicaciones^{16, 18}.

Para que el uso de los polímeros conductores sea viable a nivel industrial, su síntesis y purificación deben ser de bajo costo, así como presentar buena estabilidad química y eléctrica¹⁸. Entre sus diversos usos se encuentran la fabricación de dispositivos tipo LED¹⁹, biosensores¹⁶, electrocatálisis¹⁶, cromatografía¹⁶, membranas¹⁸, baterías recargables¹⁸, microelectrónica¹⁷, cubiertas antiestáticas¹⁸, electrónica orgánica y fotovoltaica²⁰, fotocrómica²⁰ y biomateriales²⁰, entre otros.

Los polímeros conductores poseen un sistema conjugado de enlaces π que consta de enlaces dobles y sencillos alternados a través de la cadena polimérica. El sistema conjugado diferencia a los materiales conductores de los polímeros saturados aislantes, confiriéndoles además de la conductividad otras propiedades electrónicas como bajo potencial de ionización y alta afinidad por los electrones^{16, 21}. La conductividad eléctrica, es decir, el transporte de electrones en la cadena polimérica, se asume ocurre por el movimiento de un electrón a través del sistema conjugado de enlaces dobles y sencillos^{17, 22}. Sin embargo, dicho mecanismo guarda un alto grado de complejidad puesto que en la mayoría de los casos está constituido por una mezcla de diferentes mecanismos dentro de diferentes regímenes^{16, 21}. Adicionalmente, el sistema conjugado *per se* no es suficiente para que el polímero alcance valores de conductividad similares a los exhibidos por metales.

Para alcanzar mayores grados de conductividad se debe aumentar el transporte de carga en forma de electrones mediante un proceso denominado dopaje²². El dopaje consiste en el tratamiento de los materiales con agentes que oxidan (crean “huecos” positivos) o reducen (adicionan electrones) parcialmente el sistema conjugado de enlaces π , de tal forma que se obtiene un sistema π deslocalizado a través del cual podrán moverse los electrones a un mayor flujo, aumentando la conductividad eléctrica^{16, 17, 20, 23}.

Por su parte, el azufre es uno de los heteroátomos más comunes en la estructura de algunos polímeros conductores; de hecho, el primer polímero conductor sintetizado en los años 70 fue el nitruro de azufre (SN)_x, material inorgánico que se tornaba conductor a bajas temperaturas²⁴. Sin embargo, los polímeros conductores con contenido de azufre más ampliamente estudiados y producidos a nivel industrial son los polímeros orgánicos de tipo politiofeno²⁵, en especial el poli(3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT), cuya síntesis se ha llevado a cabo por métodos químicos, electroquímicos y enzimáticos²⁶. La importancia de los politiofenos radica en su amplio intervalo de aplicaciones, tanto de los polímeros dopados como no dopados, que se emplean en la fabricación de celdas fotovoltaicas y fotoelectroquímicas²⁵.

Además de los politiofenos, otros polímeros azufrados como el poli-sulfuro de fenileno (PPS), el poli(2,5-dimetilfenileno sulfuro) y el polivinileno sulfuro, mostraron conductividades superiores a 0.1 S/cm luego de ser dopados con AsF₅²⁷. Este fenómeno se

debe principalmente a que el azufre, un heteroátomo más grande que el oxígeno y el nitrógeno y con electrones altamente polarizables, constituye un poderoso donador de electrones cuando se encuentra anclado en los extremos de un sistema conjugado, así como un trasmisor de carga efectivo cuando hace parte de la cadena conjugada²⁷⁻²⁹.

2.2.2 Polímeros fotoconductores azufrados

Los polímeros fotoconductores son aquellos en los que se generan acarreadores de carga debido a su estimulación por longitudes de onda externas, es decir, se tornan conductores o semiconductores cuando sobre ellos incide algún tipo de radiación³⁰. Este tipo de materiales tienen gran variedad de aplicaciones tecnológicas como la elaboración de celdas fotosensibles, celdas de fotodetección y elaboración de fotorreceptores empleados en la fabricación de equipos de impresión y copiado digital, entre otros³⁰⁻³².

Debido al costo menor que tienen los foto y semiconductores orgánicos respecto a los inorgánicos (metales)³³, los investigadores han dirigido sus esfuerzos hacia la búsqueda de mejorar las propiedades de los primeros. Una de las estrategias que se han ensayado con éxito es la incorporación de heteroátomos como el azufre y el nitrógeno en la estructura de los polímeros fotoconductores, encontrándose que su presencia aumenta la fotosensibilidad de dichos polímeros y más aún, en el caso del azufre, se genera fotoconductividad al irradiar con longitudes de onda correspondientes al espectro visible películas poliméricas que contienen este heteroátomo³⁴. Varios autores han reportado resultados exitosos de fotoconductividad en polímeros azufrados derivados del tiofeno^{20, 27, 34, 35}, así como en polímeros sintetizados a partir de disulfuro de carbono (CS₂), que contienen enlaces disulfuro en la cadena polimérica³⁶.

2.2.3 El caso del súper polímero poli-sulfuro de fenileno

El poli-sulfuro de fenileno (PPS de sus siglas en inglés) es un polímero lineal cuya cadena está compuesta de anillos aromáticos unidos por átomos de azufre en un enlace tioéter (Figura 2). El material de apariencia opaca, rígido y clasificado como termoplástico, es

considerado un súper polímero o polímero de alta ingeniería debido a sus múltiples propiedades como resistencia a altas temperaturas ($>250^{\circ}\text{C}$) y agentes químicos fuertes como ácidos, bases y solventes, así como sus excepcionales características dieléctricas que lo hacen un excelente aislante o un material semiconductor cuando se aplica el estímulo adecuado^{1,37}. Esta serie de propiedades hacen del PPS de gran interés industrial en campos como el automotriz, eléctrico y electrónico, así como en industrias dedicadas a la elaboración de material quirúrgico y dental, equipo de laboratorio y material de cocina, entre otros.

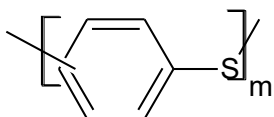


Figura 2. Estructura del poli-sulfuro de fenileno

La principal desventaja del uso del PPS a nivel industrial es su alto costo de producción, el cual restringe considerablemente las aplicaciones que puede tener el material. Lo principales métodos de síntesis de PPS se basan en la reacción de *p*-diclorobenceno con sales azufradas o azufre molecular, los cuales al emplear agentes catalizadores fuertes y condiciones de reacción extremas resultan costosos y poco amigables con el ambiente. Adicionalmente, la alta viscosidad y baja solubilidad de los oligómeros lineales de PPS dificultan el crecimiento de la cadena polimérica³⁸.

Dada la importancia del PPS en la industria, desde 1990 se han realizado numerosos estudios con el fin de hacer su producción más eficiente. En este sentido, una de las estrategias más exitosas ha sido la síntesis química de oligómeros cíclicos de disulfuro de fenileno, los cuales pueden emplearse como precursores de PPS de alto peso molecular³⁹⁻⁴². El interés en las moléculas cíclicas se debe a que tienen baja viscosidad (lo que facilita su manipulación), son solubles en varios solventes, no requieren catalizadores químicos para iniciar la polimerización y no liberan productos secundarios durante la misma⁵. Al usar estos precursores se han obtenido polímeros de tipo PPS de alto peso molecular, aislados con pocos pasos de purificación^{39, 42, 43}.

2.2.4 Los poli-disulfuros

A diferencia del PPS, los polímeros lineales con enlaces disulfuro en su cadena principal no han sido tan ampliamente estudiados. Sin embargo, en la literatura se encuentran reportes y numerosas patentes que demuestran las importantes propiedades de esta clase de materiales. En el caso de los poli-disulfuros alifáticos, han despertado gran interés en el campo de los biomateriales, más específicamente para su uso como agentes con capacidad de encapsular medicamentos, cuya liberación en las células o espacio extracelular puede ser controlada por el ambiente redox de cada zona, el cual determina que los enlaces disulfuro se rompan o formen dependiendo si el ambiente es reductor (citósol) u oxidante (extracelular)⁴⁴.

Por otra parte, el interés tecnológico en los poli-disulfuros aromáticos radica en sus propiedades similares a las ya mencionadas para el PPS, además de ser rígidos, cristalinos y presentar excelente adhesión a diferentes materiales como madera, vidrio, metales y concreto⁴⁵. Incluso, moléculas oligoméricas de disulfuros de fenileno al ser dopadas con ácido clorosulfónico⁴, exhiben propiedades semi-conductivas similares a las de algunos metales.

Al igual que el PPS, una de las alternativas más convenientes para la síntesis de poli-disulfuros de fenileno es el uso de moléculas cíclicas como precursores, las cuales pueden polimerizarse por medio del proceso denominado “*melt ring opening polymerization* (mROP)” que se basa en una reacción de termólisis a temperaturas por encima de la temperatura de fusión (T_m) del ciclo; esta reacción genera disulfuros de poli-fenileno debido al intercambio de disulfuros entre los ciclos abiertos, que se produce sin requerimiento de catalizadores químicos ni solventes^{45,46}. En la figura 3 se muestran algunos de los precursores cíclicos que se han sintetizado por métodos químicos con miras a la síntesis de poli-disulfuros aromáticos.

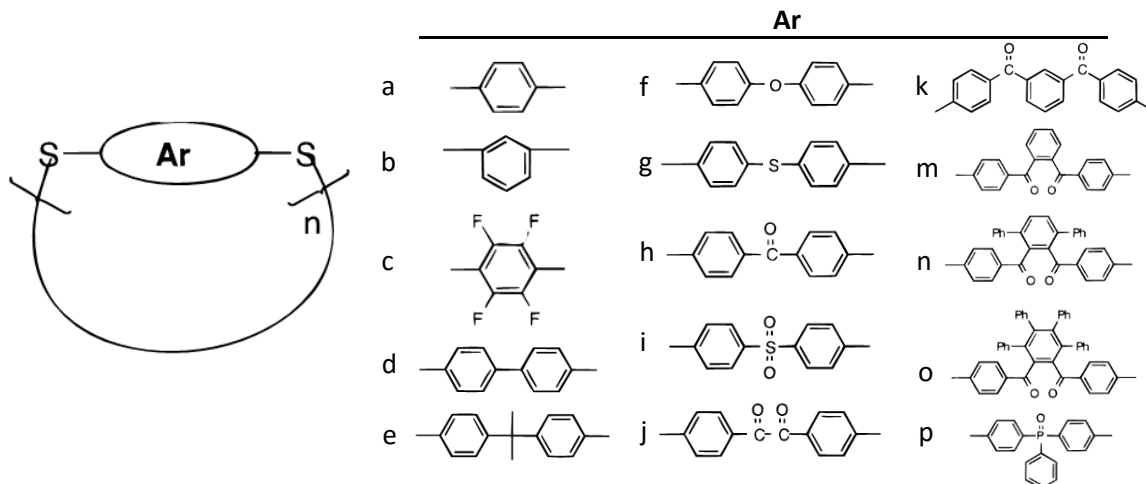


Figura 3. Ciclos de poli-disulfuros de fenileno (figura adaptada de Ding y Hay, 1996 ⁴⁶)

Cabe notar que no todos los ciclos de la figura 3, para los cuales el grado de polimerización “n” se determinó entre 3 y 9, se han estudiado como precursores de poli-disulfuros de fenileno; sin embargo, de acuerdo a sus propiedades térmicas en principio todos podrían ser polimerizados por el método de mROP, ya que su temperatura de fusión se encuentra en el intervalo de 150 a 300°C y su degradación comienza a temperaturas superiores a 350°C, lo cual es deseable desde el punto de vista cinético en el intercambio de disulfuros que da lugar a la polimerización.

De los ciclos de la figura 3 se tomó como modelo el obtenido a partir del monómero 4,4'-isopropilidenebistiofenol (Figura 3e) para sintetizar el respectivo polímero por medio de apertura del anillo en solución, así como en ausencia de solvente (*melt*)⁴⁵. De acuerdo a los resultados obtenidos para la caracterización del material, éste es resistente a altas temperaturas (>360°C); además, el polímero sintetizado por medio de mROP tiene mayor peso molecular que el sintetizado en solución, demostrando la gran utilidad del método que no emplea catalizadores ni genera subproductos.

2.3 Síntesis enzimática de poli-disulfuros de fenileno

En general, el uso de enzimas como biocatalizadores de las reacciones de polimerización ha surgido como una opción prometedora en diferentes campos de la investigación y la industria de polímeros, debido a las características ventajosas que presenta, como son: alta enantio, regio y quimio-selectividad; condiciones suaves de reacción como temperatura, presión y pH amigables con el ambiente; además, constituyen un catalizador no tóxico, a diferencia de los metales pesados y agentes químicos fuertes que son comúnmente empleados en catálisis química; alta eficiencia energética y rendimiento de producto; escalabilidad del proceso y facilidad de purificación; mayor grado de control en la cinética de la reacción; catálisis de reacciones que son difíciles y costosas de llevar a cabo por métodos químicos y alta estabilidad del polímero generado^{18,20}.

Adicionalmente, no sólo la síntesis de polímeros amigable con el ambiente, sino también de precursores de los mismos, ha despertado gran interés en los procesos industriales ya que gran parte de los precursores poliméricos son derivados del petróleo, lo cual hace el proceso de síntesis de polímeros poco sostenible y de alto impacto ambiental⁴⁷

Por otra parte, son variados los tipos de enzimas que se han empleado para reemplazar los métodos químicos en la síntesis de polímeros, dependiendo del sustrato y la reacción deseada. En la tabla 1 se resumen las enzimas más comúnmente empleadas en la síntesis de materiales poliméricos en general.

Tabla 1. Enzimas comúnmente empleadas en la síntesis de polímeros (adaptada de Kobayashi, 1999⁴⁸)

Enzimas	Polímeros típicamente sintetizados
Oxidoreductasas	polifenoles, polianilinas, polipirroles, politiofenos
Transferasas	polisacáridos, oligosacáridos cíclicos, poliésteres
Hidrolasas	polisacáridos, poliésteres, policarbonatos, poli(amino ácido)s

Las oxidoreductasas son las enzimas más adecuadas para la síntesis de poli-disulfuros de fenileno usando ditioles aromáticos como monómeros, ya que estas enzimas de manera análoga a su acción sobre el grupo hidroxilo de los fenoles o el amino de las anilinas, podrían oxidar el grupo tiol y generar radicales tiofenoxilo, que posteriormente se acoplaran

en enlaces disulfuro para dar lugar a la elongación de la cadena polimérica. Aunque hasta el momento no se han encontrado reportes que estudien la reacción de polimerización usando oxidorreductasas, sí existen evidencias acerca de la oxidación de tioles aromáticos por parte de este tipo de enzimas^{3, 49}.

2.3.1 La cloroperoxidasa y su actividad oxidante sobre el bencenotiol

La cloroperoxidasa (CPO) es una enzima del tipo *hemo*-tiolato peroxidasa de aproximadamente 42 kDa producida por el hongo filamentoso *Caldariomyces fumago*. Esta enzima tiene la particularidad de llevar a cabo diferentes reacciones, dependiendo de la naturaleza de los sustratos y el pH del medio de reacción⁵⁰. Por una parte, puede catalizar reacciones selectivas de halogenación dependientes de H₂O₂ a pH 3; además también presenta actividad peroxidasa a pH 5-6 y catalasa (dismutación de H₂O₂); igualmente, cataliza reacciones de peroxigenación similares a las exhibidas por el citocromo P₄₅₀^{3, 22, 51-54}. La variedad de reacciones en las que participa y la baja especificidad que tiene por los sustratos le otorgan a la CPO un gran interés a nivel industrial.

En lo referente a las características estructurales, la CPO es una enzima glicosilada cuyo contenido de carbohidratos corresponde entre 25 y 30% de su peso total⁵¹. A diferencia de las demás peroxidasas, la CPO tiene un residuo de cisteína (Cys29) en vez de histidina coordinado como ligando proximal del grupo *hemo*; adicionalmente, el residuo lejano de histidina que participa en la catálisis es reemplazado por un residuo de glutamato (Glu183) que cumple similares funciones de catalizador ácido-base. Estas variaciones aunque están relacionadas con las características excepcionales que presenta la enzima, no son las únicas responsables de las diferentes actividades de la CPO^{52, 54, 55}.

La CPO es capaz de catalizar dos tipos de reacciones de oxidación sobre compuestos azufrados; por una parte, puede realizar la sulfoxidación de sulfuros de carácter tanto alifático como aromático^{3, 56}, siendo mayor su actividad sobre los segundos³. Además de la actividad peroxigenasa sobre sulfuros, la CPO también tiene actividad peroxidasa sobre tioles (aromáticos y alifáticos) bajo ciertas condiciones, lo que da lugar a la formación de radicales

que pueden acoplarse en enlaces disulfuro³. Por tanto, la enzima sería ideal para la polimerización de ditioles aromáticos unidos por este tipo de enlaces.

Por otra parte, la energía de ionización (8.2 eV⁵⁷) de la CPO es mayor a la calculada de manera teórica para diferentes ditioles de carácter aromático en el intervalo de 6.7 a 7.1 eV. En este sentido, en nuestro grupo de investigación se estudió la oxidación de tioles alifáticos y aromáticos catalizada por CPO, encontrándose que el acoplamiento de los radicales obtenidos de la reacción quimioenzimática se daba en forma de enlaces disulfuro³ (figura 4).

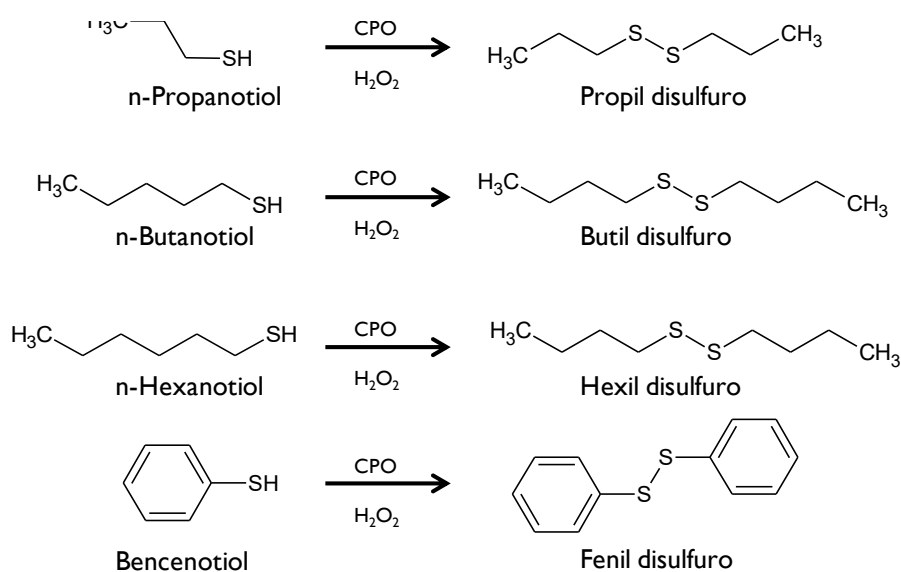


Figura 4. Obtención de dímeros unidos por enlaces disulfuro a partir de tioles alifáticos y benzenotiol (figura adaptada de Cruz, 2010³)

2.3.2 La lacasa y su capacidad para oxidar benzenotioles

Otro tipo de enzimas de la familia de las oxidoreductasas que han sido utilizadas en la síntesis de polímeros lineales son las lacasas (EC 1.10.3.2). Dichas enzimas son oxidasas multicobre azules que catalizan la oxidación de compuestos aromáticos, principalmente fenoles y aminas, acoplada a la reducción de oxígeno molecular a agua⁵⁸. Las lacasas además de oxidar fenoles también han demostrado capacidad de oxidar aminas aromáticas y benzenotioles⁴⁹.

Las lacasas más ampliamente estudiadas son las de origen fúngico debido a su alto potencial redox y afinidad por un amplio intervalo de sustratos aromáticos, lo que las hace de gran interés biotecnológico ⁵⁹, sin embargo también han sido estudiadas algunas lacasas de plantas, bacterias e insectos. En los hongos, la principal función de las lacasas está relacionada con roles fisiológicos como la morfogénesis, interacción del hongo con otros organismos y degradación de lignina, entre otros ⁵⁸.

En general las lacasas fúngicas son proteínas monoméricas, extracelulares y glicosiladas (10-30%) que en su sitio catalítico presentan 4 átomos de cobre (Cu1, Cu2 y Cu3a-b) distribuidos en 3 sitios denominados T1, T2 y T3 (figura 5), definidos de acuerdo a sus propiedades espectroscópicas. En el sitio T1 se lleva a cabo la oxidación, en la cual ocurren 4 oxidaciones mono-electrónicas del sustrato a costa de la reducción del Cu1 que actúa como aceptor de electrones. Posteriormente los electrones son transferidos al cluster trinuclear conformado por Cu2 y Cu3a-b donde ocurre la reducción de O₂ a agua⁶⁰.

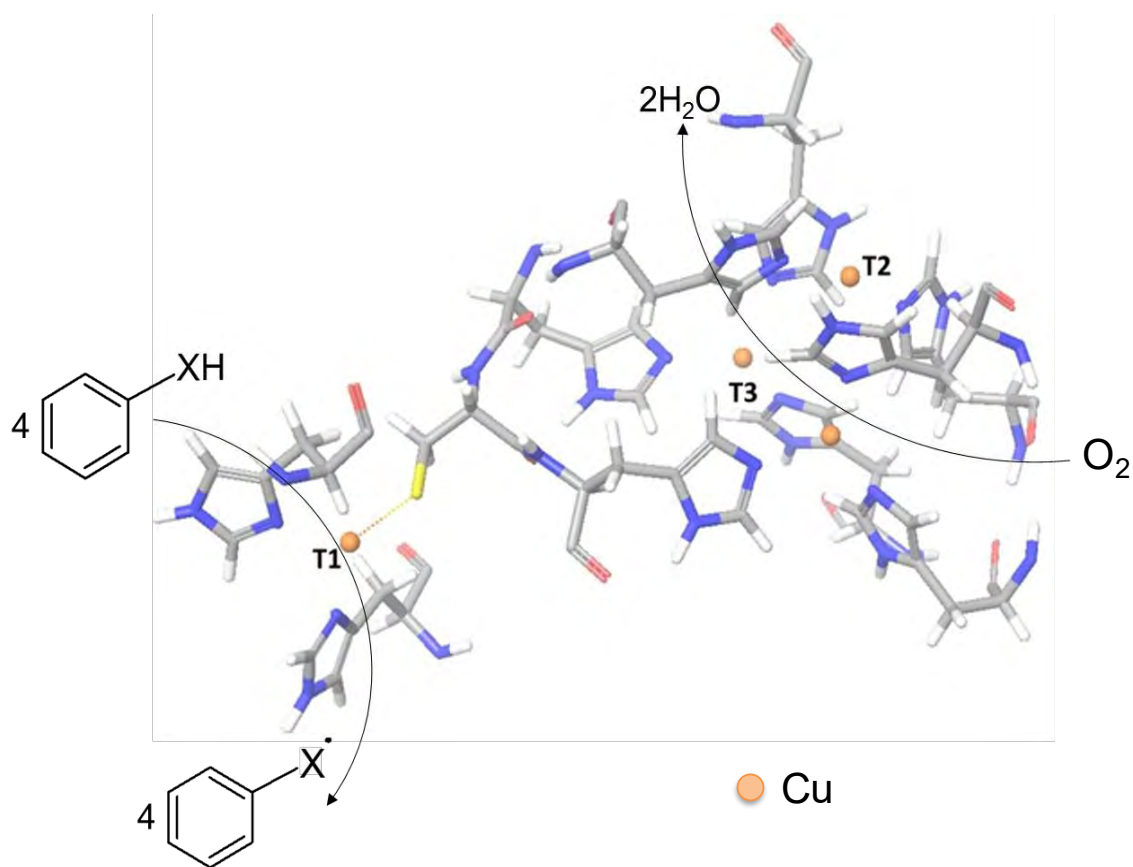


Figura 5. Representación del sitio activo de la lacasa de *Corioloopsis gallica* (imagen proporcionada por Mayra Avelar)

Como se mencionó anteriormente, las aplicaciones biotecnológicas de las lacasas son variadas. Entre éstas se cuentan la deslignificación de pulpas, degradación de colorantes, tratamiento de aguas residuales, modificación de fibras textiles y fabricación de biosensores, entre otros⁶¹. Con respecto a la síntesis de polímeros, la mayoría de estudios se han enfocado en la polimerización de fenoles en procesos relacionados con las biorremediación^{59, 60, 62}. Por otra parte, las lacasas también se han empleado para la síntesis de polímeros conductores basados en polianilina^{63, 64} y la polimerización de naftoles para la obtención de colorantes^{65, 66}. Adicionalmente, el hecho que las lacasas usen como último aceptor de electrones oxígeno molecular es ventajoso cuando se emplean sustratos fácilmente oxidables como los bencenotioles, ya que se evita la sobre-oxidación de los mismos, esto es, la conversión en óxidos de azufre como ácidos sulfónicos, sulfonas y sulfóxidos.

Por su parte, la oxidación de tioles aromáticos con lacasas no ha sido estudiada ampliamente. Sin embargo, algunos autores han reportado resultados exitosos en lo referente a la oxidación de tioles con lacasas; entre estos trabajos se encuentra el realizado por Xu (1996)⁴⁹, quien reportó el estudio cinético de la oxidación de 1,2-bencenoditiol y 2-metoxifenol con la lacasa de *Trametes villosa*. Al comparar los valores de las constantes cinéticas K_M y k_{cat} , obtenidos para los tioles con respecto a los de fenoles y aminas (determinados en el mismo trabajo), se encontró que son superiores (tabla 2). Más aún, de acuerdo al consumo de O_2 durante la reacción, los autores mencionan que los tioles oxidados posiblemente se están acoplando en enlaces disulfuro, aunque no lo demuestran. En general, en la tabla 2 puede apreciarse que la oxidación de tioles con lacasas es comparable, desde el punto de vista cinético, a la oxidación de fenoles con estas enzimas.

Tabla 2. Constantes catalíticas de la oxidación de diversos sustratos con diferentes lacasas fúngicas

Lacasa	Sustrato	K_M (mM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$)	Referencia
<i>Coriolopsis gallica</i>	Siringaldazina	7.9×10^{-1}	5.30^2	6.71×10^{-2}	Medina <i>et al.</i> , 2013 ⁶⁷
	Siringaldehído	1.2×10^{-1}	2.30×10^{-2}	1.92×10^{-3}	
<i>Trametes villosa</i>	1,2-dianilina	4.7×10^{-1}	2.10×10^{-3}	4.47×10^{-3}	Xu, 1996 ⁴⁹
	1,2-difenol	1.9×10^{-1}	3.30×10^{-3}	1.74×10^{-4}	
	1,2-bencenoditiol	8.0×10^{-1}	4.50×10^{-4}	5.63×10^{-4}	
	2-metoxianilina	1.6	9.60×10^{-2}	6.00×10^{-2}	
	2-metoxifenol	1.3×10^{-1}	2.40×10^{-3}	1.85×10^{-4}	
Lacc I <i>Cerrena unicolor</i>	ABTS	7.0×10^{-3}	2.2×10^{-4}	3.25×10^{-6}	Michniewicz <i>et al.</i> , 2006 ⁶⁸
	Siringaldazina	9.8×10^{-3}	5.77×10^{-3}	6.42×10^{-5}	
Lacc II <i>Cerrena unicolor</i>	ABTS	2.7×10^{-1}	1.24×10^{-4}	4.61×10^{-4}	
	Siringaldazina	1.3×10^{-1}	4.73×10^{-3}	3.64×10^{-4}	

Por otra parte, Abdel-Mohsen y colaboradores (2013)⁶⁹ estudiaron la oxidación de tioles heterocíclicos empleando un sistema lacasa-mediador, encontrando que oxida los tioles con rendimientos entre 50 y 95%; igualmente, comprobaron el posterior acoplamiento de los radicales en enlaces disulfuro sin encontrar otro tipo de productos generados en la reacción

2.3.2.1 Lacasa de *Coriolopsis gallica*

La lacasa de *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 proviene de un hongo basidiomiceto aislado de efluentes de decoloración de papel⁷⁰. La masa molar de la enzima es de 66 kDa, su punto isoeléctrico es de 3.4 y tiene un 21% de glicosilación⁷¹. Entre las características que hacen a la lacasa de *C. gallica* (LCg) de interés para uso biotecnológico es su estabilidad en diferentes solventes⁷², así como una mayor eficiencia catalítica en la oxidación de sustratos típicos de las lacasas como la siringaldazina y el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazol-6-sulfónico) (ABTS por sus siglas en inglés), cuando se compara con otras lacasas como las de *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor*⁷³. Además, esta enzima se produce en nuestro laboratorio con alta pureza y a bajo costo⁶.

Hasta ahora los estudios llevados a cabo con miras a la utilización de LCg a nivel biotecnológico se han enfocado en el tratamiento de aguas contaminadas con fenoles, oxidación de hidrocarburos policíclicos aromáticos⁷² y degradación de colorantes⁷⁴. Igualmente, se han desarrollado celdas de combustible que involucran el uso de la enzima⁷⁵. Por otra parte, en el área de la síntesis de polímeros de interés industrial aún no se ha reportado el empleo de LCg, sin embargo, debido a su alto potencial redox, estabilidad y capacidad de oxidar diferentes sustratos, esta enzima es un potencial catalizador para la obtención de polímeros aromáticos azufrados. No obstante, son numerosos los factores como afinidad por el sustrato y condiciones de reacción, que deben considerarse para lograr una catálisis eficiente durante la oxidación de bencenoditioles con LCg, así como la posterior polimerización de los radicales generados, reacción netamente química e independiente de la enzima.

2.4 Condiciones de reacción de las enzimas

Las condiciones de reacción como son temperatura, pH y medio de reacción influyen considerablemente en la actividad y estabilidad conformacional y estructural de las enzimas, así como en las características de los productos obtenidos⁷⁶. En el caso de la síntesis de polímeros aromáticos con oxidorreductasas, el medio de reacción es uno de los factores que tiene mayor efecto con relación al tamaño y estructura de los materiales sintetizados. Debido a que las moléculas de naturaleza aromáticas son poco solubles en agua, se requiere la presencia de solventes orgánicos en el medio con el fin de garantizar la solubilidad, tanto de los sustratos como de los productos, en la reacción de oxidación enzimática. Con respecto a los productos, es importante evitar que las cadenas en crecimiento se precipiten antes de alcanzar grados de polimerización considerables. En lo referente a la temperatura y el pH, hasta ahora son escasos los estudios que indiquen una influencia importante en las características de los polímeros sintetizados, por lo que dichos parámetros pueden ajustarse de acuerdo a los valores óptimos de la enzima utilizada. En general las reacciones con *hemo*-peroxidasas y lacasas se llevan a cabo a temperatura ambiente (25-30°C) y pH entre 3 y 6^{20, 77}.

2.4.1 Mezclas solvente orgánico/agua como medio de reacción para la síntesis enzimática de polímeros

Generalmente las reacciones catalizadas por enzimas se llevan a cabo en medios acuosos, sin embargo, el uso de co-solventes orgánicos ha cobrado importancia en los procesos biotecnológicos, debido a que al reemplazar parcial o completamente el agua como medio de reacción los sustratos hidrófobos pueden convertirse con mayor eficiencia y los productos, también hidrófobos, se obtienen con mayores rendimientos; incluso hay algunas enzimas que muestran mayor estabilidad en ambientes libres de agua⁷⁸. Sin embargo, en la mayoría de los casos al aumentar la concentración de solventes orgánicos en el medio se produce inactivación de las enzimas debido a cambios en su estructura^{78, 79}.

La naturaleza del efecto negativo de los solventes sobre la actividad varía dependiendo de las características de polaridad de cada solvente. En general, los solventes apolares tienden a aumentar la rigidez estructural de las enzimas, ya que la proteína pierde interacciones polares en su superficie y las interacciones electrostáticas (puentes salinos) tienden a incrementarse; esto se traduce en un aumento de rigidez, lo cual afecta negativamente la eficiencia en la catálisis enzimática puesto que la mayoría de enzimas requieren de cierta flexibilidad para catalizar las reacciones⁸⁰. Por otra parte, los solventes polares tienden a permear la estructura de la enzima y atrapar moléculas de agua que son esenciales para estabilizar la estructura tridimensional por medio de enlaces de hidrógeno; este fenómeno conlleva a la desnaturalización de la enzima y por ende la pérdida de actividad⁸¹. Para contrarrestar los efectos negativos se han empleado diversas estrategias como inmovilización en diferentes soportes, complejos con polímeros, atrapamiento en geles, entrecruzamiento con polietilenglicol, liofilización con agentes crio y lioprotectores, entre otros⁸².

2.4.1.1 Actividad catalítica de la CPO en solventes orgánicos

Son varios los autores que reportan el uso de mezclas de solventes orgánicos para realizar reacciones de oxidación catalizadas eficientemente por la CPO. En uno de los primeros trabajos, se estudió la actividad halogenasa y peroxidasa de la CPO en medios con

bajo contenido de metanol (10%) y dimetil sulfóxido (DMSO), encontrando 85% de pérdida de actividad en el medio con metanol y una fase inicial de inactividad de 4 minutos en DMSO⁵⁰. Asimismo, un reporte posterior evaluó la actividad halogenasa de la CPO en solventes polares y apolares, descubriendo que la enzima no presentó actividad en los solventes apolares con bajo contenido de agua (2.7%), incluso después de haber sido inmovilizada en perlas de vidrio; por el contrario, la enzima libre mostró actividad halogenasa bajo concentraciones de hasta 20% de solventes polares como acetonitrilo (ACN), dimetil formamida (DMF), DMSO y metanol⁸³.

A diferencia de los sistemas binarios solvente orgánico/agua donde la CPO perdió gran parte de su actividad catalítica, los sistemas terciarios compuestos por un solvente apolar, un alcohol de cadena corta y agua presentaron muy buenos resultados en ensayos de halogenación y epoxidación usando sistemas α -pineno/isopropanol/agua y hexano/isopropanol/agua⁸⁴. Este último sistema también fue empleado exitosamente en la transformación de asfaltenos⁸⁵. Los medios ternarios son considerados microemulsiones, donde la enzima se aloja en gotas microscópicas de agua dispersas en la fase orgánica que contiene los sustratos⁸⁶.

2.4.1.2 Actividad catalítica de LCg en solventes orgánicos

En el caso de las lacasas son numerosas las enzimas, tanto fúngicas como bacterianas, que son tolerantes a concentraciones moderadas de solventes polares como acetona, etanol, ACN y DMSO⁸⁷⁻⁹¹. En el caso de solventes apolares, una lacasa inmovilizada en esferas de vidrio catalizó exitosamente la oxidación de sustratos aromáticos complejos en medios bifásicos con solventes aromáticos como tolueno y benceno⁶⁶. Igualmente, la lacasa de *Trametes versicolor* inmovilizada en Nylon[®] presentó alta estabilidad operacional en dietil éter y etil acetato durante la oxidación de siringaldazina⁹². Por otra parte, los líquidos iónicos se han ensayado exitosamente para la catálisis con este tipo de enzimas⁹³, así como los sistemas micelares⁹⁴.

En el caso específico de la lacasa de *C. gallica* también se ha demostrado su tolerancia a concentraciones moderadas de solventes polares miscibles en agua. En uno de los estudios

se ensayó la capacidad de la enzima para oxidar sustratos típicos como la siringaldazina y ABTS, así como hidrocarburos policíclicos aromáticos (PHA) en un medio con 15% de ACN^{71, 72}. Los autores determinaron que la enzima modificada químicamente con polietilenglicol pudo oxidar varios sustratos aromáticos típicos con una eficiencia catalítica superior a $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; por su parte, la velocidad de oxidación de PHAs usando diferentes mediadores, en general fue mayor al emplear la enzima libre. Otros compuestos aromáticos heterocíclicos como los carbazoles también han sido oxidados exitosamente por LCg libre, en un medio similar al anteriormente mencionado⁹⁵.

3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

El uso de ditioles aromáticos como precursores en la síntesis enzimática de polímeros catalizada por la cloroperoxidasa de *C. fumago* y la lacasa de *C. gallica*, generará polímeros lineales.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo general

Sintetizar y caracterizar los polímeros azufrados obtenidos por métodos enzimáticos a partir de ditioles aromáticos.

3.2.2 Objetivos particulares

- ▶ Estudiar la eficiencia de las enzimas cloroperoxidasa y lacasa como catalizadores de la oxidación de ditioles aromáticos.
- ▶ Explorar condiciones propicias de reacción para la oxidación catalizada por la cloroperoxidasa y la lacasa en la obtención de polímeros a partir de ditioles aromáticos.
- ▶ Estudiar las características estructurales y las propiedades fisicoquímicas de los productos sintetizados con el fin de determinar sus posibles aplicaciones.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivos y enzimas

Los reactivos empleados en la realización de este trabajo se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Reactivos y solventes utilizados en esta investigación

Reactivo/solvente	Pureza	Proveedor
1,3-bencenoditiol	97%	Alfa Aesar
1,4-bencenoditiol	97%	Alfa Aesar
Ácido succínico	Grado reactivo, >99%	Sigma-Aldrich
Fosfato de sodio monobásico	Grado reactivo, >99%	J.T. Baker
Fosfato de sodio dibásico	Grado reactivo, >99%	J.T. Baker
Acetato de sodio	Grado reactivo, >99%	Sigma-Aldrich
Ácido acético	Grado reactivo, >99%	Sigma-Aldrich
Cloruro de potasio	Grado reactivo, >99%	J.T. Baker
Monoclorodimedona	Grado reactivo, >99%	Sigma-Aldrich
Siringaldazina	>99.9%	Sigma-Aldrich
Peróxido de hidrógeno (solución)	30% en H ₂ O w/v	Sigma-Aldrich
<i>t</i> -butil hidroperóxido (solución)	5 M en decano	Sigma-Aldrich
Acetonitrilo	Grado HPLC, >99.9%	J.T. Baker
Acetona	Grado HPLC, >99.9%	J.T. Baker
Dimetilformamida	Grado HPLC, >99.9%	Sigma-Aldrich
Tetrahidrofurano*	Grado HPLC, >99.9%	Honeywell
Dimetilsulfóxido	Grado HPLC, >99.9%	Honeywell
Isopropanol	Grado HPLC, >99.9%	Honeywell
2-metil-2-butanol	Grado reactivo, >99%	Sigma-Aldrich
Cloroformo	Grado HPLC, >99.9%	Sigma-Aldrich
Tolueno	Grado reactivo, >99%	Fisher Scientific
Diclorometano	Grado HPLC, >99.9%	Honeywell
Hexano	Grado HPLC, >99.9%	Honeywell
Octano	Grado HPLC, >99.9%	Sigma-Aldrich

*Destilado previo a su utilización

La cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* fue donada por el Dr. Michael A. Pickard (Universidad de Alberta, Canadá). La lacasa de *Corioloopsis gallica*, fue producida y purificada en nuestro laboratorio, según la metodología reportada previamente⁷².

4.2 Ensayos de actividad enzimática

La actividad enzimática de la CPO se determinó por medio del ensayo de oxidación de la monoclorodimedona (MCD), que consiste en el seguimiento por medio del espectrofotómetro de la aparición del producto de halogenación diclorodimedona a 278 nm ($\epsilon = 12.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La velocidad de aparición del producto permite determinar la actividad enzimática por medio de la ley de Lambert-Beer. 1 mL de mezcla de reacción contiene 0.1 mM de MCD, 20 mM de KCl, 1mM de H_2O_2 , amortiguador de acetatos pH 3 (60 mM) y una cantidad de enzima tal que el valor de absorbancia se mantenga entre 0.1-1 durante la medición. Una unidad de actividad de la CPO se define como la cantidad de enzima necesaria para obtener 1 μmol de producto por minuto.

La actividad de LCg se determinó espectrofotométricamente midiendo la aparición del producto de oxidación de la siringaldazina a 530 nm ($\epsilon = 6.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)⁷³. La velocidad de aparición del producto permite determinar la actividad enzimática por medio de la ley de Lambert-Beer. 1 mL de mezcla de reacción contiene 50 μM de siringaldazina, amortiguador de succinatos pH 4.5 (60 mM) y una cantidad de enzima tal que el valor de absorbancia no supere la unidad durante la medición. Una unidad de actividad de la lacasa se define como la cantidad de enzima necesaria para obtener 1 μmol de producto por minuto.

4.3 Determinación de las constantes catalíticas

Las constantes catalíticas de LCg para la oxidación de 1,3-bencenoditiol (1,3-BDT) y 1,4-bencenoditiol (1,4-BDT), se calcularon a partir de los datos obtenidos para el consumo de sustrato en 5 mL de medio de reacción, cuya composición consistió en: 0.02-1 mM de sustrato disuelto en ACN, amortiguador succinatos pH 4.5 (60 mM) y 10% v/v de ACN. El ensayo se llevó a cabo a 30°C, la reacción comenzó al agregar la enzima y se siguió durante 5 minutos. Con el fin de monitorear el progreso de la reacción en el tiempo, una muestra de 100 μL se tomó cada minuto y se le adicionaron 1.5 μL de HCl diluido para disminuir el pH a 3 y detener la reacción enzimática. La concentración de sustrato en el tiempo se midió por medio de HPLC. La velocidad inicial de la reacción para cada sustrato se calculó por medio de la disminución en el área del pico correspondiente y los datos obtenidos se ajustaron a la

ecuación de Michaelis-Menten, haciendo uso del programa GraphPad Prism 5. Todos los experimentos se hicieron por triplicado.

4.4 Actividad en mezclas agua/solvente

El efecto de la concentración de solvente sobre la actividad catalítica de la lacasa se determinó a 30°C en medios con diferentes concentraciones de acetona, ACN y tetrahidrofurano (THF). Para ello, se agregó la enzima a mezclas de solvente con buffer succinatos pH 4.5 (60 mM) y se tomaron alícuotas de 900 µL en el tiempo inicial y luego de transcurrida 1 hora de incubación en presencia de cada solvente. A cada alícuota se le agregaron 100 µL de siringaldazina y se determinó la actividad de la lacasa por el método descrito anteriormente. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

4.5 Oxidación de los sustratos ditiólicos

Para la oxidación de 1,4-BDT con la CPO se empleó la enzima liofilizada en presencia de sacarosa (1:1000). Como medio de reacción se hizo uso de un sistema ternario tolueno/isopropanol/amortiguador (2/6/2), el amortiguador empleado fue fosfatos pH 6 (10 mM). La concentración inicial de sustrato y enzima en 5 mL de medio fue 1 mM y 5 µg/mL respectivamente. Se ensayaron dos peróxidos diferentes como aceptores de electrones: 0.2 mM de H₂O₂ y 1 mM de *t*-butil hidroperóxido. Tanto los peróxidos como la CPO se agregaron cada media hora hasta agotar completamente el sustrato. El cambio en la concentración de sustrato se monitoreó por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

La oxidación de 1,4-BDT y 1,3-BDT catalizada por LCg se llevó a cabo en 4 mezclas de amortiguador succinatos pH 4.5/solvente: 10 y 50% de acetona y 10 y 60% de ACN. Para la preparación del medio de reacción se agregaron gota a gota, bajo agitación vigorosa, 500 µL de una solución *stock* 10 mM de cada ditiol a 4.5 mL de la mezcla agua/solvente, de esta manera la concentración inicial de sustrato fue 1 mM. Las reacciones se iniciaron agregando entre 0.5 a 1 U/mL de la lacasa y el progreso en el consumo de sustrato fue monitoreado por HPLC hasta el agotamiento total del ditiol.

Tanto para las reacciones con CPO, como con LCg, se realizaron experimentos control sin adición de enzima. En el caso del control de las reacciones con LCg, se burbujeó oxígeno en el medio. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

4.6 Purificación de los productos de oxidación

Los productos de oxidación de 1,3-BDT y 1,4-BDT precipitaron durante el transcurso de la reacción, por tanto, se filtraron con una membrana de nylon de 0.45 μm y se lavaron dos veces con 500 mL de la respectiva mezcla agua/solvente, con el fin de eliminar restos de la enzima, sales del amortiguador y trazas remanentes de sustrato. Los materiales obtenidos se secaron a 70°C por 24 a 48 horas. En el caso de los productos derivados del 1,3-BDT, se requirió una concentración previa por destilación en el rotavapor antes del proceso de filtración.

4.7 Melt Ring Opening Polymerization

Los productos de oxidación enzimática derivados del 1,3-BDT y el 1,4-BDT fueron polimerizados por medio del proceso de Melt Ring Opening Polymerization (mROP) que se llevó a cabo en un reactor de acero inoxidable 4540 de alta presión (Parr Instruments), equipado con un termopar y una chaqueta que le permiten operar a altas temperaturas (hasta 500°C). 100 mg de los respectivos productos se depositaron en vasos de precipitado Pyrex[®] y se calentaron en el reactor a 200°C por 2 horas bajo un flujo continuo de nitrógeno.

4.8 Caracterización de los productos

Las características fisicoquímicas de los productos de oxidación enzimática del 1,3-BDT y 1,4-BDT se determinaron por medio de espectroscopía de Raman e infrarojo, espectrometría de masas (MS-MS), calorimetría diferencial de barrido (DSC), termogravimetría (TGA), resonancia magnética nuclear (RMN) y análisis de conductividad. Los productos obtenidos por mROP se analizaron por medio de las mismas técnicas anteriormente mencionadas, excepto la espectrometría de masas. El producto derivado del

1,3-BDT se sometió a cromatografía de permeación en gel (GPC) en THF para determinar el grado de polimerización alcanzado.

4.9 Métodos analíticos

4.9.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Las concentraciones de 1,3 y 1,4-BDT se determinaron por medio de HPLC usando un cromatógrafo Agilent 1220 Infinity series equipado con una columna de fase reversa Nucleosil® C-18 (tamaño de partícula 5 μm , $L \times D.I.$ 25 cm \times 3.2 mm) y un detector UV a 260 nm. Como fase móvil se empleó una mezcla de agua y acetonitrilo. Se implementó un método escalonado pasando de 20 a 80% de solvente orgánico. Todas las muestras inyectadas en el equipo fueron previamente filtradas con filtros de nylon de 0.45 μm .

4.9.2 Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR)

El análisis de FT-IR de los diferentes productos se hizo en estado sólido, como polvo o película, empleando un equipo FT-IR System modelo Spectrum RX1 de Perkin Elmer® equipado con un dispositivo de medición ATR (reflectancia total atenuada) *Miracle Single-Reflection*. Los espectros se analizaron con el programa SpectraGryph v.1.0.7.

4.9.3 Espectroscopía de Dispersión de Raman

Al igual que el FT-IR, el análisis de Raman se realizó en estado sólido, haciendo uso de un espectrómetro dispersor de Raman Almega XR equipado con un microscopio Olympus (BX51) y un láser Nd:YVO4. El objetivo 50X se usó para enfocar el láser en la muestra y la dispersión de luz se colectó en una configuración de 180°. Los espectros se colectaron durante 25 s a 532 nm, con una resolución de 4 cm^{-1} . El análisis se realizó en el Laboratorio de Materiales y Nanotecnología del Centro para las ciencias Aplicadas y el Desarrollo Tecnológico de la Universidad Nacional Autónoma de México (CCADET-UNAM).

4.9.4 Espectrometría de Masas

El cambio en la concentración de 1,4-BDT en las reacciones con CPO se monitoreó por medio de un equipo de cromatografía de gases Agilent, modelo 6809 network GS system acoplado a un detector de masas Agilent modelo 5973 network mass selective detector. Para la cromatografía se empleó la columna no polar Agilent HP-5ms (30m \times 0.32mm \times 0.25 μ m) con un gradiente de temperatura de 25 a 300°C, a una velocidad de calentamiento de 18°C/min. Las muestras inyectadas en el equipo fueron previamente extraídas con diclorometano.

Para el análisis de los productos sólidos de las reacciones de oxidación con LCg se empleó un espectrómetro de masas de alta resolución JMS700-JEOL equipado con una sonda de inserción directa de sólidos. La técnica empleada fue electroionización con detección de iones positivos. Las condiciones del análisis fueron: perfluoroqueroseno (PFK) como estándar de calibración, temperatura de la cámara 250°C, velocidad de calentamiento 125°C/min, potencial de ionización 70 eV. El análisis se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIQ-UAEM).

4.9.5 Calorimetría Diferencial de Barrido y Termogravimetría (DSC-TGA)

El análisis térmico de los productos de oxidación enzimática y mROP se realizó en un equipo DSC-TGA instrument SDT Q600. En el caso de los productos de oxidación enzimática se empleó una rampa de calentamiento de 25 a 600°C a una velocidad de 10°C/min. Para los productos de mROP se realizó un análisis doble, usando primero una rampa de calentamiento de 25 a 280°C para eliminar impurezas y luego una segunda rampa de 25 a 600°C, en ambos casos a una velocidad de 10°C/min. El análisis se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIQ-UAEM).

4.9.6 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN) se obtuvieron a una frecuencia de 700 MHz (16.45 T) en un equipo Varian VNMR5. Para el análisis se prepararon soluciones de las muestras en N,N-dimetil-d₆-formamida (Sigma-Aldrich) a concentraciones de 6.5 y 1 mg/mL para los productos derivados del 1,3 y 1,4-BDT respectivamente. Los valores de desplazamiento químico se expresaron en partes por millón (ppm) tomando como referencia la señal del solvente a 8.03 ppm. Para el análisis y edición de los espectros se empleó el programa MestReNova v. 6.0.2-5475.

4.9.7 Cromatografía de Permeación en Gel (GPC)

El análisis de GPC de los productos derivados de 1,3-BDT sintetizados por mROP, se realizó haciendo uso de un cromatógrafo GPC-2695 acoplado a un detector UV-Vis Waters 2998 a 248 nm, equipado con 2 columnas mixed C arregladas en serie. El solvente empleado fue THF. Los datos de peso molecular aparente se calcularon usando poliestireno como estándar.

4.9.8 Cromatografía de Capa Fina

Para los ensayos de cromatografía de capa fina con diferentes soluciones de los productos azufrados, se utilizaron placas de aluminio recubiertas con sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck). 10 a 20 μL de las soluciones de producto se depositaron sobre la placa con ayuda de una micropipeta y se corrieron empleando diferentes solventes como fase móvil. Las placas fueron reveladas por medio de luz UV.

4.10 Medición de la fotoconductividad

La conductividad de los productos sintetizados fue medida haciendo uso del método de placas planas paralelas⁹⁶. Todos los procesos involucrados en el análisis conductivo se realizaron en el Instituto de Energías Renovables de la Universidad Nacional Autónoma de México (IER-UNAM).

4.10.1 Construcción de películas

Para la elaboración de películas de cada uno de los productos sintetizados se depositaron sobre sustratos de vidrio Corning® soluciones de 1 a 6 mg/mL de los productos disueltos (en algunos casos suspendidos) en 1,2-clorobenceno, disulfuro de carbono o dimetil formamida (DMF). El depósito se realizó por el método de *spin-coating* bajo las siguientes condiciones: 700 rpm, 30°C y 6 a 10 minutos de secado al vacío (dependiendo del solvente). Sobre cada película se dibujaron pares de electrodos de plata coplanares y paralelos usando plata líquida y un objeto fino de madera.

4.10.2 Respuesta eléctrica y cálculo de la conductividad

La respuesta eléctrica se determinó a través de los valores de intensidad de corriente (i) que se obtuvieron al aplicar durante 1 minuto un voltaje de 20V entre los pares de electrodos de plata dibujados sobre las películas. La aplicación del voltaje se hizo alternando condiciones de oscuridad e iluminación (20 s cada una) con una lámpara de Tungsteno-Halógeno de 40 mW/cm², para determinar la fotoconductividad del material. El valor de conductividad (σ) se calculó haciendo uso de una ecuación derivada de la Ley de Ohm y el concepto de resistencia por cuadro, que relacionan la conductividad con la intensidad de corriente y las dimensiones del sistema⁹⁷ (figura 6). Un control negativo se llevó a cabo midiendo la intensidad de corriente entre dos electrodos de plata depositados sobre un sustrato de vidrio sin película.

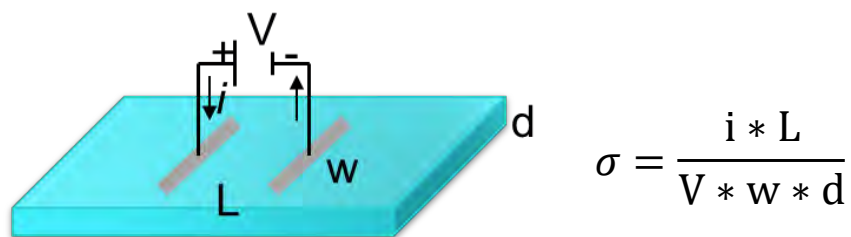


Figura 6. Representación esquemática del método de placas planas paralelas para la determinación de la conductividad

Para medir la longitud (w) de los electrodos y la separación entre ellos (L), se empleó un calibrador Vernier Ultra Cal Mark III (Sylvac – Fowler) con precisión de 0.02 mm. El espesor de las películas (d) se determinó haciendo uso de un perfilómetro Alpha Step Ambios XP-200. Todos los experimentos se hicieron por triplicado.

4.11 Cálculo de los coeficientes de actividad de diferentes solventes

El cálculo teórico de los coeficientes de actividad para predecir la solubilidad de los productos de oxidación enzimática en diferentes solventes, se realizó con el programa COSMOtherm C2.1 v. 01.07 (COSMOlogic GmbH & Co. KG, Leverkusen, Alemania)⁹⁸. Los conformeros estructurales de cada producto se obtuvieron con el programa Marvin Sketch 14.8.25.0 (v. 2014 ChemAxon). La generación de los archivos de entrada de COSMO para cada conformero se realizó por medio de un cálculo cuántico usando el paquete Turbomole 5.9.1 a nivel de la Teoría del Funcional Densidad (DFT) con una base triple-Z polarizada (TZVP). Los coeficientes de actividad (γ) se calcularon en modo no iterativo de COSMOtherm, bajo la suposición de dilución infinita en 10 solventes puros: DMSO, acetona, ACN, THF, tolueno, benceno, diclorometano, clorobenceno, hexano y octano. El valor obtenido de γ fue producto del promedio de la actividad de los conformeros en cada solvente.

4.12 Cálculo de la densidad de espín de fenoles y tiofenoles

La densidad de espín de moléculas aromáticas como fenoles y tiofenoles se calculó teóricamente con ayuda del programa Gaussian 09 E.01 (Gaussian, Inc.)⁹⁹. Cuatro moléculas fueron analizadas: fenol, difenol, tiofenol y 1,4-BDT. Las moléculas se construyeron haciendo uso de la interface gráfica GaussView v.5.0.8. Para el cálculo cuántico de las moléculas neutras y los radicales (como dobles, sin un electrón), se empleó un método DFT con el funcional B3LYP y la base 6-311G con doble función de polarización (d,p) y funciones difusas. Se minimizó la energía de cada molécula y se calcularon las densidades de espín por medio de las superficies de densidad de espín generadas en los orbitales moleculares usando

cargas de Mulliken. Todos los cálculos se hicieron en la Supercomputadora Miztli de la Universidad Nacional Autónoma de México.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Distribución de la densidad de espín en fenoles y tiofenoles

A excepción de los antecedentes mencionados para la oxidación de tiofenoles con enzimas, no se ha encontrado más información relevante con respecto al tema. Por tanto, como el propósito del presente trabajo fue sintetizar polímeros aromáticos azufrados lineales, cobró importancia llevar a cabo un estudio más profundo acerca de las reacciones que pueden ocurrir entre radicales tiofenoxilo después de la oxidación enzimática. Este planteamiento se hizo aún más relevante si se tiene en cuenta que las reacciones entre radicales fenoxilo, que han sido ampliamente estudiadas, generan polímeros altamente ramificados y amorfos¹⁰⁰ debido a la estabilización de los radicales en diferentes posiciones del anillo aromático.

De acuerdo a lo anterior, obtener información acerca de la estabilización de los radicales tiofenoxilo constituye una buena opción para inferir acerca de las reacciones que pueden ocurrir entre estos radicales y la posibilidad de obtener moléculas lineales al oxidar tiofenoles enzimáticamente. Con este fin, se realizó un aproximamiento teórico calculando la densidad de espín de diferentes radicales de fenoles (fenol y 1,4-difenol) y tiofenoles (tiofenol y 1,4-BDT) haciendo uso del programa Gaussian 09. Cabe notar que en este trabajo la distribución de densidad de espín generada en el cálculo cuántico se ilustra de forma cualitativa (figura 7), lo cual es válido para efectos de la información requerida; sin embargo, también es posible realizar dicho cálculo de manera cuantitativa.

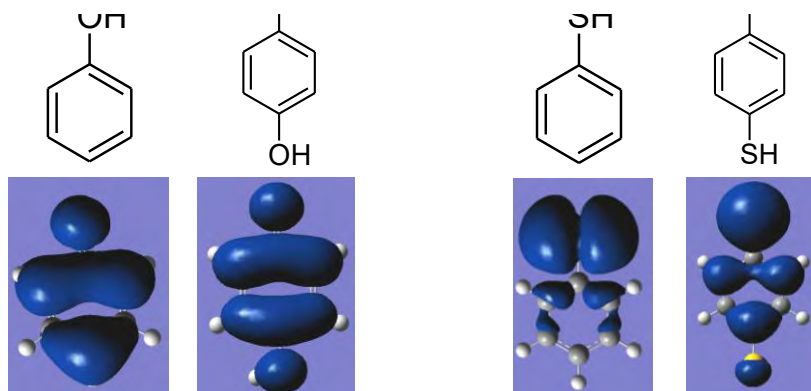


Figura 7. Distribución de la densidad de espín en radicales fenoxilo y tiofenoxilo

La densidad de espín se considera como la probabilidad que un electrón desapareado se aloje en un orbital determinado. Por tanto, de acuerdo a las superficies que representan la densidad de espín en la figura 7, en el caso de los radicales fenoxilo se observa una distribución homogénea para los átomos que conforman la molécula, lo cual confirma que en este tipo de moléculas el radical libre se encuentra deslocalizado, es decir, tiende a estabilizarse por resonancia no solo en el heteroátomo (oxígeno) sino también en el anillo. Por el contrario, en el caso de los radicales tiofenoxilo se observa una clara tendencia del radical a estabilizarse en el azufre, en especial para el bencenotiol, aunque también es notorio el fenómeno en el 1,4-BDT.

La diferencia de estabilización de radicales fenoxilo y tiofenoxilo puede explicarse con base en las características atómicas del oxígeno y el azufre. En general, los radicales libres tienden a ser menos estables en ambientes con poca densidad electrónica y por ende tienden a moverse hacia ambientes más ricos en densidad electrónica. El oxígeno (orbitales 2p) es un átomo electronegativo que atrae densidad electrónica y tiene una nube electrónica más pequeña que el azufre (orbitales 3p), el cual es un átomo altamente polarizable, menos electronegativo y con una nube electrónica grande, por lo que el orbital que está parcialmente ocupado (en donde se forma el radical libre), al encontrarse en un ambiente de mayor densidad electrónica se puede estabilizar más fácilmente al repartirse esta deficiencia de electrones en un área más grande y más alejada del núcleo. Por su parte, en el caso del oxígeno, el radical tenderá a estabilizarse en ambientes de mayor densidad electrónica como los dobles enlaces del anillo aromático.

La estabilización de radicales fenoxilo y tiofenoxilo ha sido estudiada anteriormente de manera teórica y experimental¹⁰¹⁻¹⁰⁴. Todos los estudios hasta ahora revisados coinciden en la estabilización de los radicales tiofenoxilo en el átomo de azufre, mientras que los fenoxilo se estabilizan tanto en el heteroátomo como en el anillo (figura 8). Resultados que confirman la tendencia de los radicales tiofenoxilo a acoplarse en enlaces disulfuro, que constituye la reacción deseada para efectos de este trabajo, puesto que dicho acoplamiento garantiza la formación de moléculas no ramificadas cuando se emplean ditioles aromáticos como sustratos. Cabe notar, que además de los antecedentes expuestos anteriormente sobre

el acoplamiento en enlaces disulfuro de radicales tiofenoxilo generados enzimáticamente, el fenómeno también ha sido reportado para radicales generados por métodos químicos^{101, 105}.

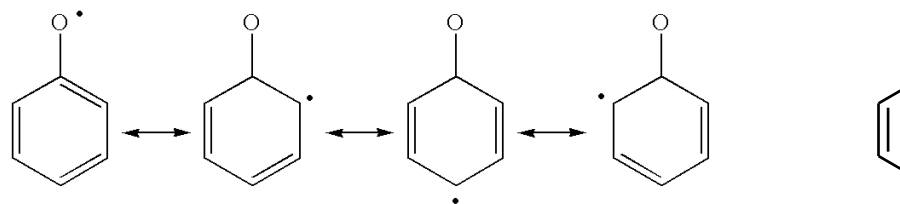


Figura 8. Estabilización de radicales fenoxilo y tiofenoxilo

5.2 Estudio teórico de la solubilidad de los productos derivados del 1,4-BDT

Con respecto al medio de reacción para la oxidación enzimática de ditiolos, son tres los factores principales a tener en cuenta: solubilidad del sustrato, solubilidad de los productos y actividad enzimática. Con el fin de favorecer la solubilidad de los productos sintetizados y de esta manera potenciar su elongación, se llevó a cabo un estudio teórico de la solubilidad de un oligómero lineal de 3 unidades derivado del 1,4-BDT. Dicho estudio se realizó empleando el programa COSMO-RS (CONductor like Screening MOdel for Real Solvents)⁹⁸, con el cual se calcularon los coeficientes de actividad (γ) para 19 conformeros del oligómero en 10 solventes con diferentes características de polaridad e hidrofobicidad (tabla 4). Los valores de γ corresponden al promedio de los 19 conformeros.

Tabla 4. Características de los solventes analizados y valores promedio de γ

Solvente	Índice de polaridad ¹⁰⁶	LogP*	γ
DMSO	7.2	-1.35	0.011
ACN	5.8	-0.34	0.015
Acetona	5.1	-0.042	0.026
Cloroformo	4.1	1.97	0.050
THF	4	0.62	0.091
Diclorometano	3.1	1.25	0.14
Benceno	2.7	2.13	0.18
Clorobenceno	2.7	2.84	1.04
Tolueno	2.4	2.73	2.91
Hexano	0	4	12.7
Octano	0	5.5	20.1

*LogP: coeficiente de partición octanol-agua

La actividad de un soluto en un solvente es proporcional a su concentración en el solvente y el coeficiente de actividad, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$a_i = \gamma_i x_i$$

Por tanto, un coeficiente de actividad pequeño indica baja actividad del soluto en el solvente, esto es, poca disponibilidad de dicho soluto. El hecho que el soluto se encuentre poco disponible se debe a que hay interacción entre el soluto y el solvente, entre mayor sea la interacción menor la disponibilidad y mayor la solubilidad. De acuerdo a esto, los solventes donde el coeficiente de actividad es menor son los que permitirían mayor solubilidad del trímico. Aunque no hay una tendencia clara entre la polaridad o la hidrofilia de los solventes estudiados y el coeficiente de actividad de la tabla 5, sí es posible notar que el trímico lineal es soluble principalmente en solventes polares como acetona, dimetilsulfóxido (DMSO), THF y ACN.

El hecho que el trímico interactúe principalmente con solventes polares puede deberse a diferentes factores entre los que se cuentan: los anillos aromáticos son medianamente polares debido a la resonancia; la molécula trimérica no es plana por lo que se forman dipolos debido a la presencia de los azufres; por último, el azufre *per se* es un átomo altamente polarizable que podría presentar interacciones polares con el solvente.

De acuerdo a los resultados obtenidos con COSMO-RS, los solventes más adecuados para la síntesis de oligómeros de disulfuros de *p*-fenileno son la acetona, DMSO, THF y ACN. Sin embargo, se ha reportado el uso de DMSO como agente oxidante para la oxidación de tiofenoles^{45, 46}, razón por la cual este solvente no sería una buena opción para los fines del presente estudio, dado que generaría interferencia por la oxidación química. Por ende, se pueden seleccionar la acetona, ACN y THF como probables co-solventes del medio de reacción para la oxidación enzimática de ditioles. Sin embargo, es importante determinar si la enzima que se desea emplear como catalizador es activa en dichos solventes.

5.3 Oxidación de 1,4-BDT catalizada por la CPO de *C. fumago*

La oxidación de 1,4-BDT con la CPO liofilizada en presencia de sacarosa (CPO-S) se realizó en una mezcla agua/solvente, usando dos diferentes tipos de peróxido como aceptores de electrones. Debido a la aromaticidad la solubilidad del 1,4-BDT en agua es muy baja, por esta razón y dada la solubilidad de este compuesto en tolueno ($>10\text{mM}$), como medio de reacción se hizo uso de la mezcla ternaria tolueno/isopropanol/agua 20/60/20, propuesta por Fedorak y colaboradores para la oxidación de asfaltenos¹⁰⁷, donde pudo detectarse que la CPO era activa y capaz de catalizar la oxidación de sustratos complejos. Igualmente, la concentración de H_2O_2 y enzima empleadas se seleccionaron de acuerdo con este reporte. En el caso del *t*-butil hidroperóxido (tBHP) no es un oxidante tan fuerte por lo que se agregó a la mezcla en una concentración de 1 mM. El consumo de sustrato se monitoreó por GC-MS cada media hora. Los resultados se ilustran en la figura 9 y la tabla 5.

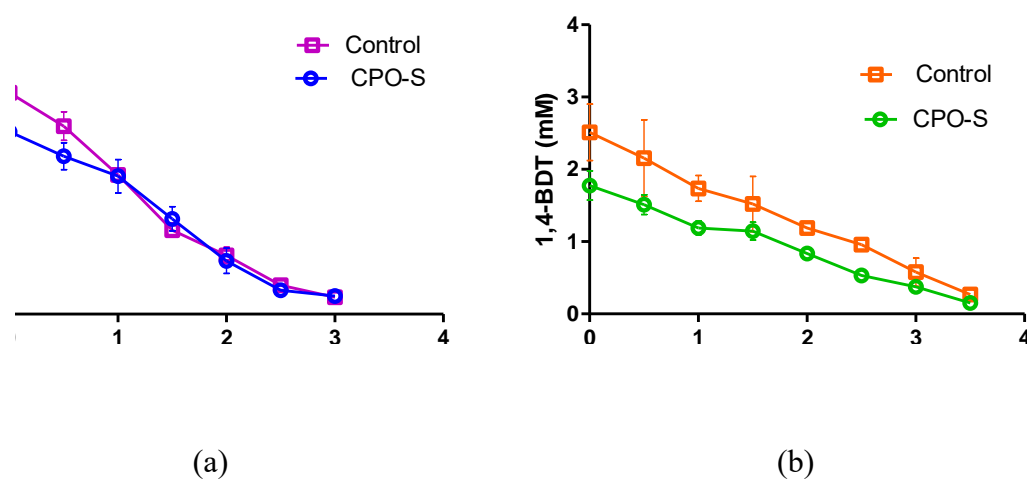
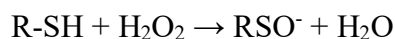


Figura 9. Consumo de 1,4-BDT en la mezcla ternaria usando dos peróxidos diferentes: (a) H_2O_2 , (b) tBHP

Tabla 5. Velocidad de desaparición de sustrato en las reacciones con CPO-S y los controles sin enzima

Reacción	Velocidad (mM/min)
CPO-S + H_2O_2	0.31 ± 0.01
Control H_2O_2	0.37 ± 0.01
CPO-S + tBHP	0.56 ± 0.02
Control tBHP	0.62 ± 0.06

Los resultados de la figura 9 y la tabla 5 indican que el 1,4-BDT está sufriendo oxidación química por acción de los peróxidos y que la enzima parece no estar participando de la reacción, pues de ser así se observaría una curva con pendiente más pronunciada para la reacción enzimática con respecto al control. El hecho de que la oxidación del sustrato sea netamente química puede deberse principalmente a dos factores: primero, está reportado que los tioles son compuestos altamente nucleofílicos y por tanto oxidables^{108, 109}, por lo que un agente oxidante fuerte como el H₂O₂ puede oxidarlos fácilmente; además, es probable que la actividad de la CPO-S en el sistema no sea suficientemente alta como para participar de la oxidación del 1,4-BDT. Cabe notar que dicha actividad no fue posible determinarla en la mezcla en cuestión. Por otra parte, está reportado que la sobre-oxidación de tioles con H₂O₂ genera ácidos sulfónicos de acuerdo a la siguiente reacción¹¹⁰:



Por tanto, la presencia de ácidos sulfónicos como productos de la reacción, corroboraría el hecho de una oxidación química del tiol y la necesidad de buscar nuevas estrategias para mantener la estabilidad operacional de la enzima en el medio, como por ejemplo la inmovilización de la misma en diferentes materiales. Por otra parte, si lo que se está obteniendo como producto presenta enlaces disulfuro, se puede entonces suponer que el peróxido está generando los radicales tiofenoxilo, sin embargo, la naturaleza de los productos aún no se comprueba. En este caso hipotético se requeriría de una enzima que fuera lo suficientemente activa en el medio como para mejorar la velocidad de la reacción con peróxido o una que no requiera peróxido para llevar a cabo las reacciones de oxidación y que además cumpla la condición anterior. De lo contrario, la síntesis enzimática de polímeros unidos con enlaces disulfuro no sería viable. Es importante notar que durante el transcurso de las reacciones no se observó la aparición de nuevas señales correspondiente a algún producto (por GC-MS) en el medio de reacción, por lo que es muy probable que éste o estos se hayan precipitado.

Otro factor que podría estar interfiriendo en la actividad de CPO-S es el hecho que el H₂O₂ es hidrofílico y por tanto es muy probable que se acumule preferencialmente en la fase acuosa, ya que las mezclas ternarias no son consideradas continuas sino microemulsiones de pequeñas gotas de agua dispersas en la mezcla tolueno/isopropanol⁸⁶. Debido a que la enzima

está inmersa en las gotas de agua, el aumento paulatino de la concentración de peróxido en esta fase podría estar causando una inactivación de la CPO y por tanto evitando la catálisis enzimática en las reacciones de oxidación¹¹¹.

Con respecto a la oxidación de 1,4-BDT en la mezcla ternaria con adición de tBHP (un peróxido orgánico que probablemente se acumule menos en la fase acuosa y se evite así la inactivación de la CPO), a pesar que la reacción control inicia a una concentración mayor de sustrato que la reacción con adición de enzima, las curvas de desaparición de sustrato son prácticamente paralelas, llegando a una concentración de BDT cercana a cero a las 3.5 horas de reacción. Este resultado indica, al igual que el obtenido con H₂O₂, que la oxidación del 1,4-BDT es química y la enzima parece no estar participando de la misma

Este resultado corrobora además la oxidación química por parte de los peróxidos, pues el tBHP al acumularse preferentemente en la fase orgánica y no tener los impedimentos de transferencia que podría presentar el H₂O₂, oxida a mayor velocidad el ditiol, tal como se aprecia en la tabla 4.

Es importante entonces determinar los productos de las reacciones anteriores, con el fin de saber si se tienen ácidos sulfónicos, enlaces disulfuro u otro tipo de grupo o enlaces que permitan inferir acerca del tipo de reacción que se está llevando a cabo. Debido a que en el GC-MS no se observó la aparición de una nueva señal correspondiente a algún producto en el transcurso de las reacciones, es probable que dicho producto sea muy grande (oligómero, polímero) y no logre volatilizarse para ser detectado o que el producto sea polar, como sucedería en el caso de ácidos sulfónicos, y por tanto no se una a la columna. Sin embargo, a pesar de realizar una derivatización de los medios finales de reacción no fue posible hallar una señal que pudiera corresponder a alguno de los productos.

A pesar de no tener mucha información sobre los productos de reacción, los resultados de las reacciones de oxidación de 1,4-BDT en la mezcla ternaria son un claro indicativo que la desaparición del producto es debida a la acción del peróxido, sin que haya participación de la enzima en su oxidación. Por tanto, una enzima que no requiera peróxido para catalizar la reacción de oxidación también constituye una excelente alternativa, siempre y cuando lleve a cabo la oxidación con mayor eficiencia que el peróxido y no se generen subproductos indeseados durante la reacción. La lacasa, a diferencia de las *hermo*-peroxidasas, no requiere

peróxido para llevar a cabo la catálisis y se ha demostrado su actividad en diferentes solventes polares, por lo que se considera una buena opción para su uso como catalizador de las reacciones de oxidación de ditioles.

5.4 Actividad de la lacasa de *C. gallica* en mezclas agua/solvente

Con el fin de establecer los medios más adecuados de reacción con los solventes seleccionados para la síntesis de las moléculas de interés, se realizaron ensayos de actividad enzimática de LCg en mezclas con diferentes concentraciones de acetona, ACN y THF. Para ello se incubó la enzima en el medio de estudio y se tomaron muestras a lo largo de 1 hora, a las cuales se les determinó la actividad enzimática usando siringaldazina, un sustrato estándar. El efecto de la concentración de cada solvente en la actividad de LCg sin incubar (inicial) y después de 1 hora de incubación (60 min) se ilustra en la figura 10.

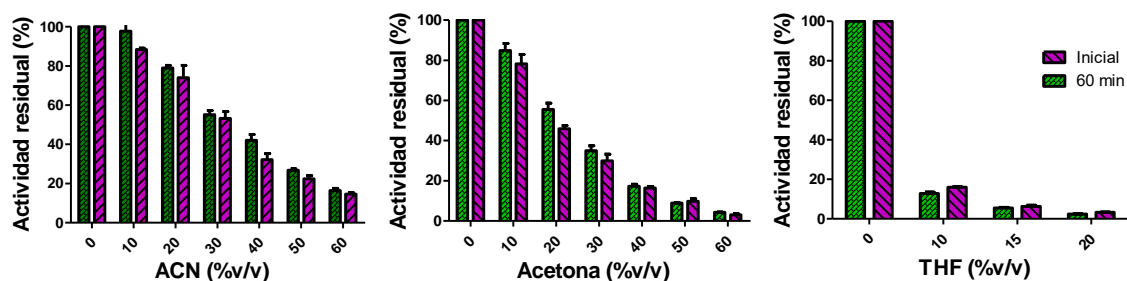


Figura 10. Efecto de la concentración de solvente en la actividad de LCg

De la figura 10 puede notarse que el solvente no inactiva a la enzima durante el tiempo del ensayo (60 min), debido a que la velocidad inicial es la misma después de 1 h de incubación y en ausencia de una incubación previa con la mezcla agua-solvente. Sin embargo, sí hay un claro efecto negativo del aumento en la concentración de solvente sobre la actividad de LCg, efecto que es inmediato y que se mantiene constante a lo largo del tiempo. La disminución de la actividad enzimática en presencia de solventes orgánicos polares se atribuye a diferentes factores, entre los que cuentan que los solventes penetran con mayor facilidad al interior de la proteína y desestabilizan las interacciones que mantienen su estructura nativa, esto es, enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals, iónicas y/o

hidrofóbicas⁸⁰. Igualmente, los solventes hidrofílicos tienden a atrapar moléculas de agua de la enzima desestabilizando su estructura⁸¹.

Sin embargo, el comportamiento observado en la figura 10 no puede explicarse con base en este tipo de fenómenos, pues de estar ocurriendo cambios estructurales se observaría la pérdida de actividad enzimática durante el tiempo de incubación al aumentar la concentración de solvente. Por tanto, la paulatina disminución en la actividad de LCg desde el inicio de la incubación al incrementar la cantidad de solvente en el medio, puede explicarse razonablemente por un efecto de disponibilidad del sustrato (siringaldazina), ya que, al estar más estabilizado termodinámicamente en el solvente orgánico, la enzima tiene menor acceso y por ende disminuye la actividad observada, fenómeno que ha sido reportado anteriormente con respecto a la actividad de lacasas en solventes polares⁸⁸. En este mismo sentido, el extraer la enzima del medio con solvente (60% de ACN o 50% de acetona) y ponerla en un sistema acuoso (100% amortiguador) la enzima recupera el 100% de actividad (figura 11) es decir, que la disminución de la actividad en presencia de solvente es completamente reversible, lo cual refuerza la hipótesis propuesta anteriormente.

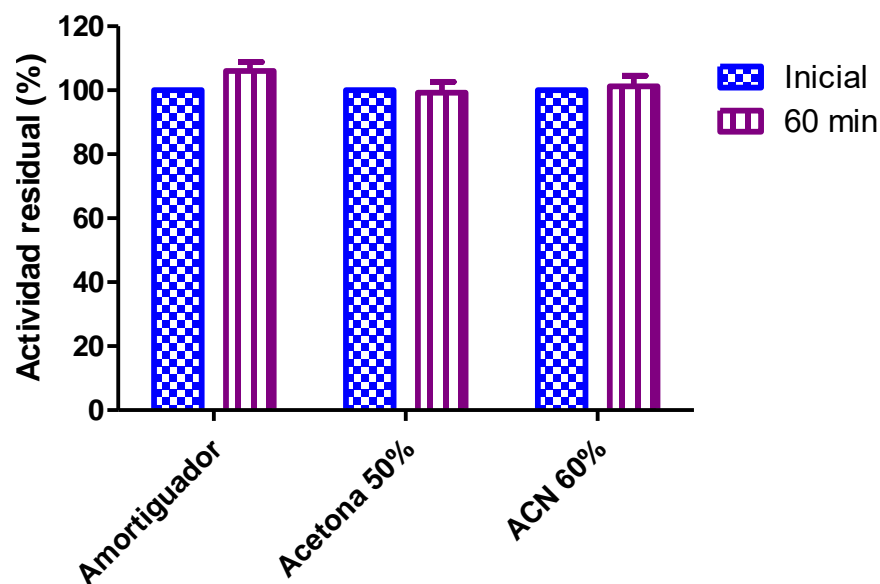


Figura 11. Actividad de LCg en amortiguador luego de la incubación en medios con solvente

En el caso del THF, es claro que genera una disminución en la actividad mucho más drástica que los otros dos solventes ensayados. El efecto más pronunciado del THF puede deberse a que al ser éste un solvente más hidrofóbico que la acetona y el ACN tiene mayor capacidad de estabilizar, termodinámicamente hablando, compuestos aromáticos como la siringaldazina, por lo que su uso tampoco sería deseable para la oxidación enzimática de tiofenoles.

El efecto negativo del THF sobre la actividad de diferentes enzimas ya ha sido reportado con anterioridad¹¹². Por otra parte, el empleo de este solvente no es recomendable desde el punto de vista ambiental¹¹³. Por el contrario, el uso de acetona y ACN como co-solventes en el medio de reacción para la oxidación enzimática de tiofenoles, es viable en concentraciones alrededor del 50%, donde la actividad es >10% a la actividad observada en ausencia de solvente y además no se observa pérdida de actividad enzimática después de 1 hora de incubación.

5.5 Caracterización cinética de la oxidación de tiofenoles con la lacasa de *C. gallica*

Como se mencionó anteriormente, es poco el conocimiento que se tiene sobre las reacciones de oxidación de tiofenoles con las lacasas. Por tanto, la caracterización cinética de dichas reacciones es importante en el marco del presente trabajo para la obtención de polímeros con dos sustratos ditiólicos: 1,3 y 1,4-BDT. Las constantes cinéticas para ambos ditióles se determinaron a partir de la velocidad inicial de consumo de sustrato, medida por HPLC, en un medio acuoso con 10% de acetonitrilo. En la figura 12 se ilustran los resultados obtenidos ajustados a una curva característica de Michaelis-Menten; por su parte, la tabla 6 contiene los valores de las constantes cinéticas para los ditióles calculados a partir de dicho ajuste, así como las constantes reportadas en la literatura para otros sustratos fenólicos.

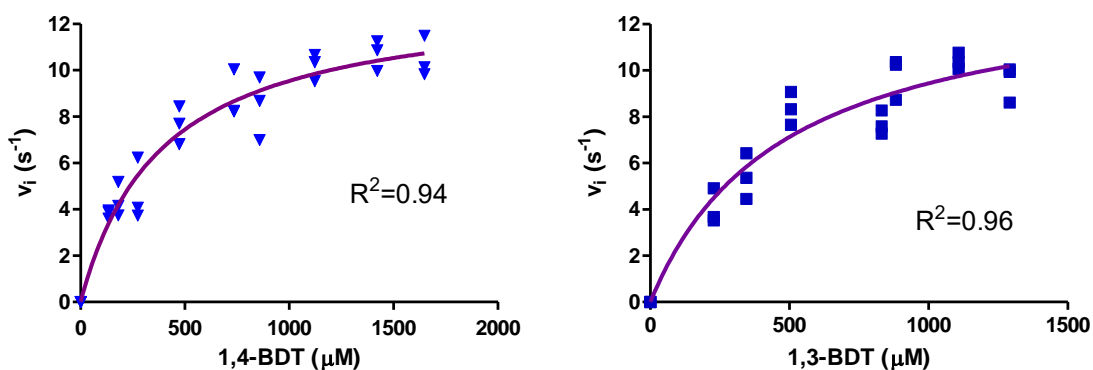


Figura 12. Ajuste a una cinética de Michaelis-Menten de la oxidación de 1,4 y 1,3-BDT por LCg

Tabla 6. Constantes cinéticas para la oxidación de diferentes sustratos por LCg.

Sustrato	k_{cat} (s^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M ($M^{-1} s^{-1}$)	Medio de reacción	Referencia
1,3-BDT	13.9 ± 1.3	481.7 ± 60	2.9×10^4	10% acetonitrilo en amortiguador	Este trabajo
1,4-BDT	13.3 ± 0.67	392 ± 58	3.4×10^4		
Siringaldazina	460	9	5.1×10^7	Amortiguador	Tinoco <i>et al.</i> , 2001 ⁷³
ABTS	1200	52	2.3×10^7		
Ácido cinápico	12.8	30	4.3×10^4	20% acetonitrilo en amortiguador	Medina <i>et al.</i> , 2013 ⁶⁷
Siringaldehído	3.8	120	3.2×10^4		
Siringaldazina	8.8	790	1.1×10^4		
3-Metoxicatecol	0.51	160	3.2×10^3		
Acetosiringona	0.83	740	1.1×10^3		
Ácido 4-Hidroxi-3-metoxibenzoico	0.2	320	6.3×10^2		

Al comparar los resultados obtenidos para ambos ditioles con respecto a los reportados en la literatura para sustratos fenólicos típicos de LCg como siringaldazina y ABTS⁷³, la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) es tres órdenes de magnitud menor en el caso de los ditioles. Este resultado no concuerda con el hecho que la oxidación de tioles por parte de LCg debería ser más eficiente que la de fenoles, puesto que los primeros tienen un potencial redox menor¹⁰⁵ y la actividad catalítica de las lacasas depende de la diferencia de potencial redox enzima-sustrato. En este sentido, a pesar de no haber sido ampliamente estudiada la oxidación de tioles con lacasas, en el estudio realizado por Xu y colaboradores en 1996⁴⁹ se demostró que la eficiencia catalítica para la lacasa de *Trametes villosa*, considerada de alto

potencial redox, es mayor en tioles *orto*-sustituídos con respecto a sus análogos de tipo fenol y anilina (tabla 7).

Tabla 7. Constantes cinéticas para aril dianilina, difenol y ditiol *orto*-sustituídos

Sustrato	k_{cat} (s^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M ($M^{-1} s^{-1}$)	Medio de reacción	Referencia
1,2-dianilina	35	470	7.4×10^4	Amortiguador	Xu, 1996 ⁴⁹
1,2-difenol	55	190	2.9×10^5		
1,2-bencenoditiol	750	800	9.4×10^5		

De acuerdo a lo discutido anteriormente, el medio de reacción puede explicar la relativamente baja actividad observada. La presencia de un solvente orgánico como el acetonitrilo puede afectar negativamente tanto la k_{cat} , por la disminución en la actividad enzimática en presencia de solvente, como la K_M debido a la partición del sustrato hacia el medio con solvente, que lo hace menos accesible a la enzima⁸². Este planteamiento se respalda por la diferencia de dos órdenes de magnitud en la K_M para un mismo sustrato (siringaldazina) en un medio acuoso con respecto a un medio con 20% de ACN. Igualmente, al comparar las k_{cat} de diferentes fenoles calculadas en presencia de 20% de ACN, son similares o menores a las calculadas para los ditioles.

En cuanto a la estabilidad de la enzima en el medio de reacción, se ha observado que la actividad de LCg y otras lacasas disminuye durante la oxidación de diferentes sustratos debido a la presencia de radicales libres^{114, 115}, que constituyen los productos directos de la oxidación enzimática llevada a cabo por las lacasas. Con el fin de comprobar si en este caso podría existir dicho fenómeno, se determinó la actividad de LCg durante el transcurso de la reacción de oxidación de los ditioles. Para ello se incubó la enzima en presencia de 1mM de 1,3 y 1,4-BDT y se midió la actividad de la lacasa en el sobrenadante. Como se observa en la figura 13, efectivamente la actividad de LCg disminuye durante la reacción en aproximadamente 20-30% después de 10 minutos.

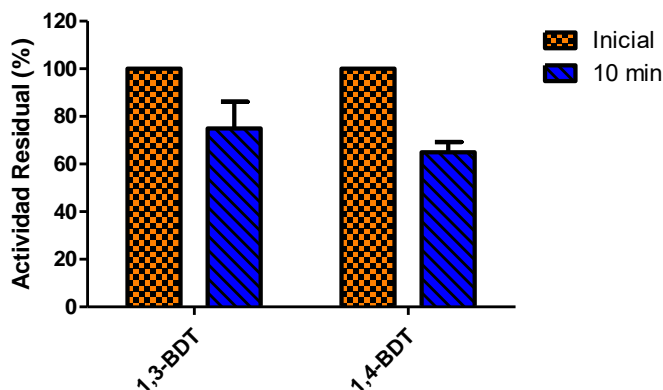


Figura 13. Actividad residual de LCg durante la oxidación de ditioles aromáticos

Estudios que se están realizando actualmente en nuestro grupo de investigación acerca de la inactivación de LCg por radicales libres, indican que el fenómeno es debido al ataque de los radicales sobre residuos aromáticos en inmediaciones del sitio activo (Mayra Avelar, datos no publicados). Con respecto a la diferencia en la inactivación por radicales fenoxilo, dado que los radicales tiofenoxilo son más reactivos al no estabilizarse el radical en el anillo¹⁰², pueden inactivar más rápidamente a la enzima. Por tanto, la diferencia en los parámetros cinéticos de la oxidación de tioles con la lacasa con respecto a la de fenoles, se puede explicar con base en el efecto combinado del solvente presente en el medio junto con la inactivación de la enzima por los productos (radicales) de oxidación

5.6 Oxidación de 1,3 y 1,4-BDT con la lacasa de *C. gallica*: síntesis y recuperación de productos

Conociendo que LCg puede oxidar tiofenoles eficientemente y con la información obtenida sobre la actividad de la enzima en diferentes solventes, se procedió a llevar a cabo las reacciones para sintetizar poli-disulfuros de fenileno a partir de la oxidación de 1,3 y 1,4-BDT. Para ello se emplearon los dos solventes seleccionados anteriormente: acetona y ACN a concentraciones baja (10%) y media (50 y 60% respectivamente). La decisión de emplear diferentes medios de reacción se tomó con el fin de estudiar los efectos del solvente y la

concentración del mismo en el grado de polimerización y estructura de los productos sintetizados.

Durante el transcurso de la reacción se observó la precipitación del producto en todos los medios ensayados. Al término de la reacción, definido por el completo agotamiento del sustrato en el medio (100% de conversión), se analizó la presencia de productos solubles en sin que se detectara algún compuesto orgánico. Independientemente del medio empleado, la apariencia de los productos del 1,4-BDT lavados y secos es en forma de polvo fino blanco (figura 14a). Por su parte, los derivados del 1,3-BDT son aglomerados de consistencia dura y color amarillo claro (figura 14b), cuya manipulación antes del secado fue complicada debido a su carácter pegajoso. En la tabla 8 se encuentran los valores de rendimiento producto/sustrato del proceso completo de producción, es decir el producto obtenido luego del proceso de purificación que comprende destilación (en el caso de los derivados de 1,3-BDT), filtración del sólido y secado.

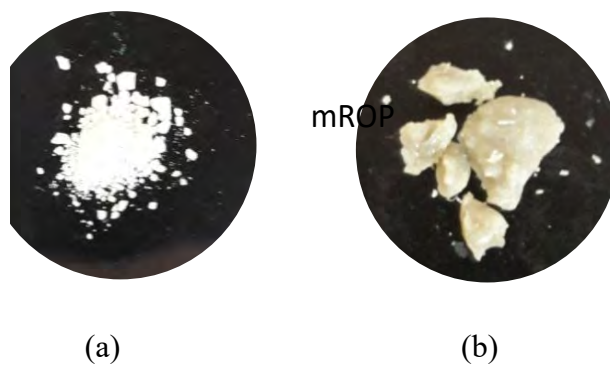


Figura 14. Apariencia de los productos de oxidación con LCg derivados de a)1,4-BDT y b)1,3-BDT

Tabla 8. Rendimientos producto/sustrato del proceso de producción completo

Sustrato	Medio	Rendimiento (%)
1,4-BDT	ACN 10%	80
	ACN 60%	86
	Acetona 10%	75
	Acetona 50%	79
1,3-BDT	ACN 10%	26
	ACN 60%	27
	Acetona 10%	22
	Acetona 50%	29

En la tabla 8 puede notarse que los rendimientos de los productos derivados del 1,4-BDT son significativamente mayores con respecto a los sintetizados a partir de 1,3-BDT. Esto se debe principalmente a las diferencias en el proceso de purificación de los productos, puesto que, para los primeros, los productos precipitados durante la síntesis se pueden recuperar fácilmente por filtración. Por el contrario, los productos del 1,3-BDT deben concentrarse primero por destilación antes de filtrarse; además, dichos productos son de carácter pegajoso lo que hace difícil su manipulación y tienden a quedarse adheridos a los recipientes donde se realiza la purificación.

Todos los productos obtenidos fueron estudiados por diferentes métodos analíticos para determinar sus características estructurales y sus propiedades fisicoquímicas.

5.7 Análisis de solubilidad de los productos de oxidación en diferentes solventes

A los productos secos obtenidos de la reacción en cada uno de los medios ensayados se les realizó una prueba de solubilidad en solventes orgánicos con diferente polaridad e hidrofobicidad (tabla 9), con el fin de obtener una solución del producto para facilitar su análisis. Para esta prueba se llevaron los productos a una concentración aproximada de 1 mg/mL en cada uno de los solventes y se calentaron bajo agitación entre 40 y 60°C (dependiendo del solvente) para aumentar la velocidad de disolución. Aunque no se observó completa disolución de los sólidos en los diferentes solventes, se realizó una cromatografía de capa fina (TLC de sus siglas en inglés) con los sobrenadantes de cada solución, con el objetivo de analizar la fracción soluble de los productos. En la figura 15a-b a manera de ejemplo se muestran los resultados del TLC para los productos sintetizados en el medio con 50% de acetona. En general, los resultados de TLC fueron similares para los productos derivados de cada sustrato en los diferentes medios.

Tabla 9. Solventes orgánicos ensayados en la prueba de solubilidad

Solvente	Índice de polaridad	LogP*
ACN	5.8	-0.34
Acetona	5.1	-0.24
2M2B	4.1	0.89
Isopropanol	3.9	0.05
Tolueno	2.4	2.73
Hexano	0	4

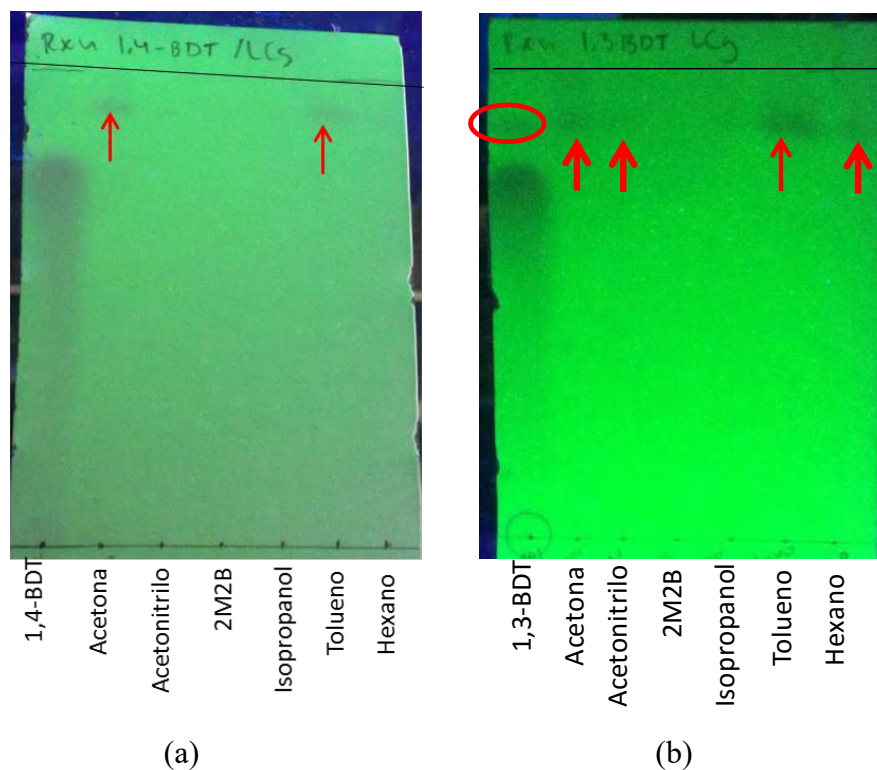


Figura 15. TLC de las fracciones solubles de los productos derivados de a)1,4-BDT y b)1,3-BDT en diferentes solventes. Fase móvil: tolueno

Con respecto a los productos derivados del 1,4-BDT, en la figura 15a pueden observarse dos bandas (marcadas con flechas rojas) correspondientes a una fracción soluble del producto de la reacción en el medio con acetona. Los mejores solventes para los productos obtenidos a partir de 1,4-BDT y 1,3-BDT son acetona y tolueno, y también acetonitrilo (aunque en menor grado) para los productos derivados de 1,3-BDT. Solamente se observó una banda en todos los casos, lo cual indica que no hay gran variedad de productos.

5.8 Oxidación de tioles y formación de enlaces disulfuro: análisis espectroscópico

5.8.1 Oxidación de tioles: espectroscopía de infrarrojo FT-IR

Con la muestra completa en estado sólido se realizó un análisis de infrarrojo de los productos obtenidos a partir de 1,3 y 1,4-BDT; específicamente, se analizó la ocurrencia de la oxidación de los tioles y el posterior acoplamiento en enlaces disulfuro de los radicales generados. Los espectros de infrarrojo para los productos sintetizados en diferentes medios fueron similares, por lo que solo se muestra a manera de ejemplo el espectro de un producto para cada uno de los sustratos empleados (figuras 16 y 17).

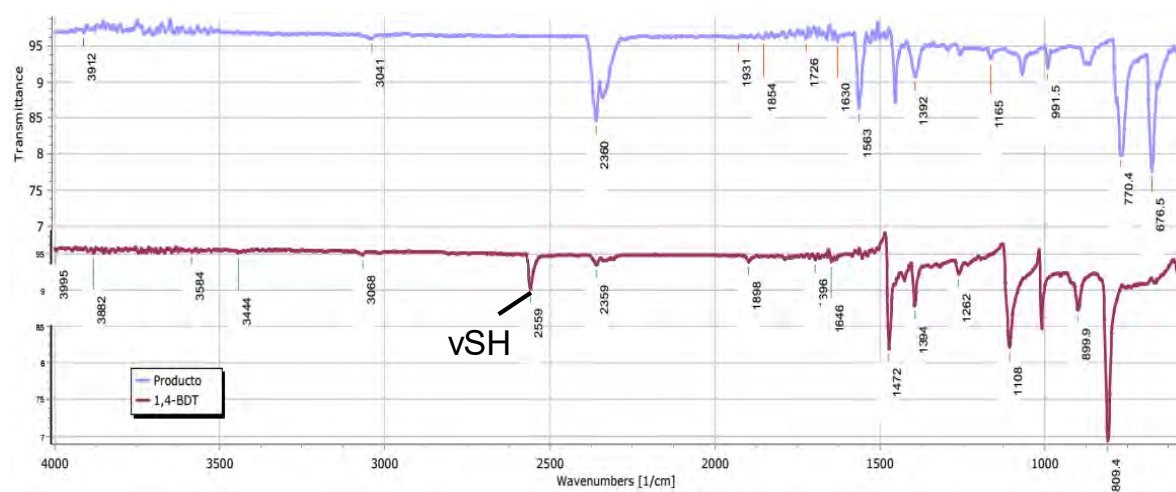


Figura 16. Espectro de infrarrojo para los productos (azul) derivados de 1,4-BDT (violeta)

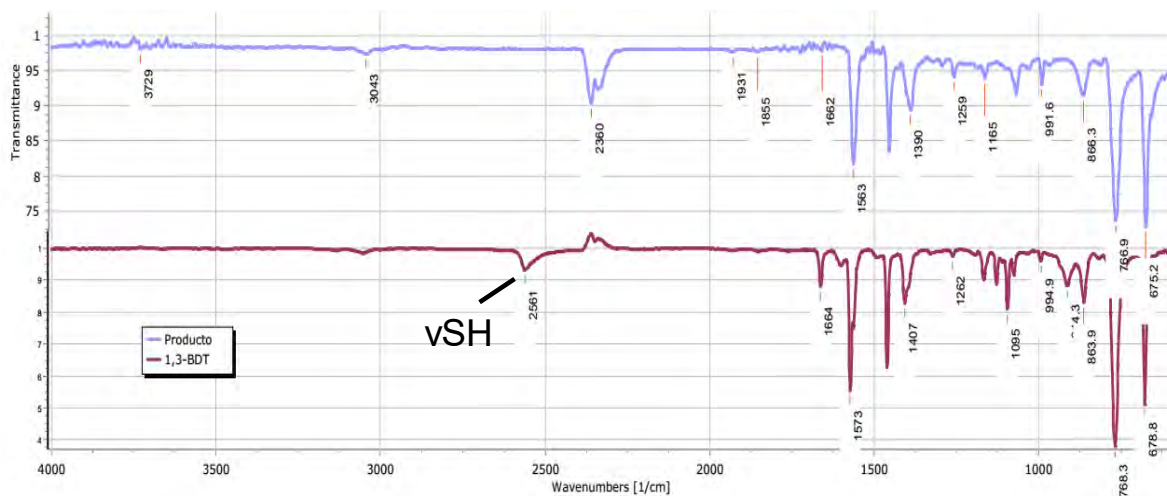


Figura 17. Espectro de infrarrojo para los productos (azul) derivados de 1,3-BDT (violeta)

En el espectro de los productos derivados del 1,4-BDT es importante notar que el pico correspondiente a la vibración de extensión (ν , 2559 cm^{-1}) del enlace tiol (S-H) desaparece completamente, indicando que efectivamente hay oxidación del tiol catalizada por la enzima. Con relación a las otras señales del espectro, éstas corresponden a diferentes modos vibracionales del anillo aromático *para*-sustituido¹¹⁶, los cuales se pueden agrupar en intervalos de número de onda, de acuerdo al tipo de vibración que genera la señal (tabla 10). La pérdida de intensidad o desplazamiento con respecto al número de onda es similar al comportamiento observado al unir moléculas de 1,4-BDT a superficies de oro; cambios que se le atribuyen a la disminución en la movilidad de las moléculas debido a la formación de nuevos enlaces¹¹⁷. De acuerdo a esto se puede inferir que evidentemente están ocurriendo uno o más tipos de reacción entre los radicales *p*-tiofenoxilo.

Por otra parte, en el caso de las señales obtenidas para el producto de oxidación derivado del 1,3-BDT (figura 17) se observó igualmente la desaparición del pico correspondiente a la vibración del tiol (ν , 2560 cm^{-1}), así como el cambio de intensidad y/o desplazamiento de las señales asignadas a los diferentes modos vibracionales del anillo *meta*-sustituido. Por otra parte, el mayor número de señales en el espectro del 1,3-BDT y sus productos, se debe a un efecto de menor simetría de la molécula *meta*-sustituida con respecto a la *para*-sustituida¹¹⁸.

Por tanto, al igual que lo observado para el 1,4-BDT, LCg también puede catalizar la oxidación de los grupos tiol del 1,3-BDT; sin embargo, la naturaleza de los enlaces formados a partir de la reacción de los radicales tiofenoxilo no puede determinarse inequívocamente ya que las señales del enlace disulfuro aparecen alrededor de 500 cm^{-1} , valor que está por fuera del intervalo de sensibilidad del equipo empleado, además su intensidad es muy débil en este tipo de espectro, al igual que las del enlace C-S¹¹⁹.

Tabla 10. Vibración de los componentes del anillo aromático (datos tomados de Varsányi, 2012 ¹¹⁸)

Sustrato	Número de onda (cm ⁻¹)	Tipo de enlace	Tipo de vibración
1,4-BDT	809	C-H	Flexión fuera del plano
	1011	C-H	Flexión en el plano
	1108		
	1394	C-C	Extensión
	1471		
1,3-BDT	678	C-C-C	Flexión en fase
	767	C-H	Flexión fuera del plano
	864		
	1077	C-H	Flexión en el plano
	1095		
	1129		
	1167		
	1407	C-C	Extensión
	1461		
	1563		
	1573		
	1663		

Otra técnica espectroscópica que podría otorgar mayor información acerca de las reacciones de los radicales tiofenoxilo generados enzimáticamente es la espectroscopía de Raman, la cual es ampliamente utilizada para el análisis de compuesto azufrados puesto que los enlaces con azufre presentan señales intensas en estos espectros; adicionalmente, abarca intervalos más amplios de número de onda, por lo que sería posible observar la formación de enlaces disulfuro.

5.8.2 Formación de enlaces disulfuro: espectroscopía de dispersión de Raman

Al igual que el FT-IR, el análisis de dispersión de Raman se realizó a los productos en estado sólido. Asimismo, los espectros obtenidos para los productos sintetizados en diferentes solventes fueron similares, por lo que en las figuras 18 y 19 se muestra el espectro de uno de los productos de cada sustrato con fines ilustrativos.

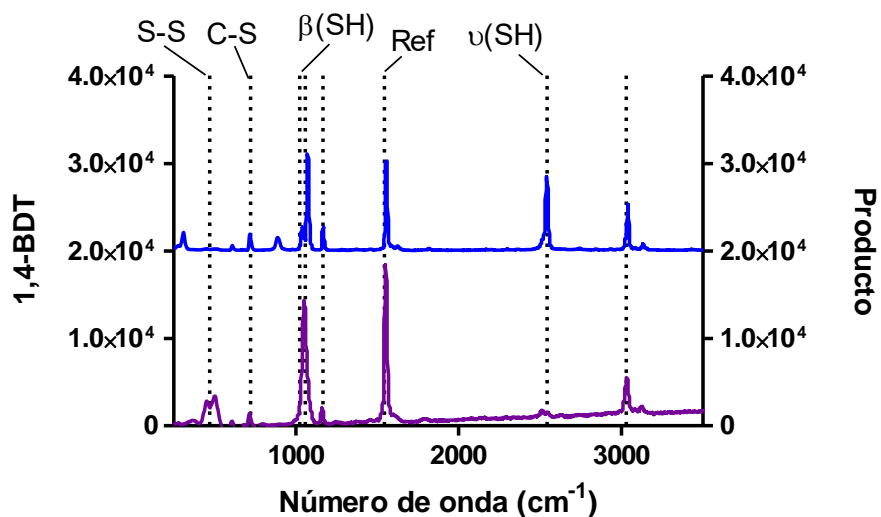


Figura 18. Espectro de dispersión de Raman para los productos (morado) derivados del 1,4-BDT (azul)

El espectro de Raman de la figura 18 ratifica la oxidación enzimática de los grupos tiol del 1,4-BDT, cuyas señales características de flexión ($\beta(\text{SH})$, 880 cm^{-1}) y extensión ($\nu(\text{SH})$, 2540 cm^{-1})¹¹⁷ desaparecen completamente en el espectro de los productos. Por otra parte, en este espectro sí es posible observar la señal correspondiente al enlace disulfuro (S-S, 490 cm^{-1})¹¹⁹ que aparece con similar intensidad en los espectros de los productos, y puede ser de múltiples picos debido al cambio en los ángulos diedros del conjunto C-S-S-C¹²⁰. Esta señal indica que los radicales generados por la oxidación enzimática se están acoplando en el enlace disulfuro, tal como se esperaba. El cambio de intensidad en la demás señales de los espectros, relacionadas con diferentes modos vibracionales del anillo, se debe probablemente a la pérdida de movilidad de los anillos, tal como se mencionó anteriormente para la señales en el espectro de infrarrojo¹¹⁷. Por otra parte, no es posible inferir acerca de la formación del enlace C-S debido a ramificaciones, puesto que el enlace ya se encuentra en el sustrato y no hay cambios aparentes en su señal de extensión a 710 cm^{-1} .

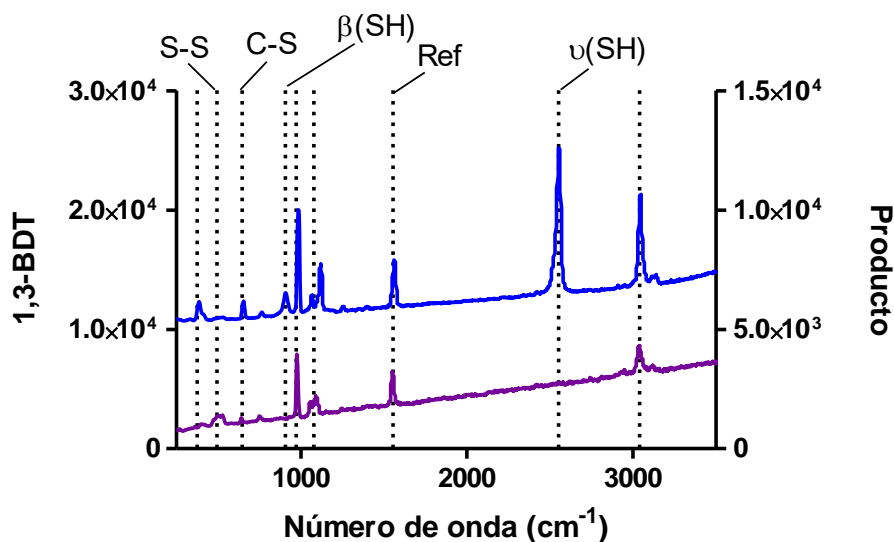


Figura 19. Espectro de dispersión de Raman para los productos (morado) derivados de 1,3-BDT (azul)

En un análisis similar al realizado anteriormente para los productos derivados del 1,4-BDT, los espectros de los productos del 1,3-BDT también muestran la oxidación de los tioles y la formación de disulfuros, así como el hecho que no parece haber generación de otro tipo de compuestos. Sin embargo, a diferencia del 1,4-BDT, estos espectros fueron difíciles de obtener debido a la consistencia de los productos *meta*-sustituídos, de tal modo que la intensidad de los picos es baja. Además, la fluorescencia de los productos es un fenómeno que dificulta la obtención de un espectro bien definido. Por tanto, para verificar la presencia de disulfuros se determinó la relación entre el área de dichas señales y la de un pico de referencia (Ref), en este caso la señal a 1550 cm^{-1} . En la tabla 11 se muestra la relación entre los picos mencionados, para los productos derivados de ambos sustratos. La relación indica que la señal remanente del tiol en los productos es menor al 5% respecto al sustrato; asimismo, la señal del enlace disulfuro en los productos tiene similar intensidad relativa. Los datos sugieren que independientemente del medio de reacción los productos son similares.

Tabla 11. Relación entre picos de los espectros de Raman

Sustrato	Sistema de reacción	Tiol (ν_{SH})/Ref (1560 cm^{-1})	Disulfuro/Ref (1560 cm^{-1})
1,4-BDT	1,4-BDT	0.836	0.012
	10% acetonitrilo	0.017	0.18
	60% acetonitrilo	0.020	0.209
	10% acetona	0.009	0.273
	50% acetona	0.019	0.236
1,3-BDT	1,3-BDT	3.078	0.054
	10% acetonitrilo	0	0.397
	60% acetonitrilo	0	0.369
	10% acetona	0	0.346
	50% acetona	0	0.398

En general, de los análisis espectroscópicos para todos los productos sintetizados es importante notar que en los diferentes medios ensayados con los dos sustratos de interés fue posible la completa oxidación de los grupos tiol catalizada por la lacasa; además, los radicales tiofenoxilo generados por acción de la enzima se acoplaron en enlaces disulfuro tal como se esperaba. Por otra parte, no hay sobre-oxidación de los azufres puesto que no se detectaron señales en los espectros de los productos que indiquen la formación de óxidos de azufre como sulfonas o ácidos sulfónicos, cuya señal entre 1000 y 1300 cm^{-1} es intensa en el espectro de Raman¹²¹.

Para obtener mayor información acerca de la conformación estructural de los productos como tamaño, presencia de ramificaciones y diferencias entre los productos sintetizados en cada medio de reacción, hicimos uso de otros métodos analíticos como se describe a continuación.

5.9 Las disulfuros de fenileno sintetizados enzimáticamente tienen una conformación cíclica: análisis de espectrometría de masas

5.9.1 Análisis de los productos del 1,4-BDT

Para el análisis de los diferentes productos del 1,4-BDT por espectrometría de masas de alta resolución se hizo uso del método de ionización electrónica con detección de iones positivos (EI⁺-MS) y se empleó una sonda de inserción directa de sólidos. En la figura 20 se ilustran y enumeran los principales iones encontrados en los patrones de fragmentación de los espectros. Los patrones de ionización fueron similares para los productos sintetizados en concentraciones de solvente baja y media, por lo que las figuras 21 y 22 corresponden a un ejemplo de cada una.

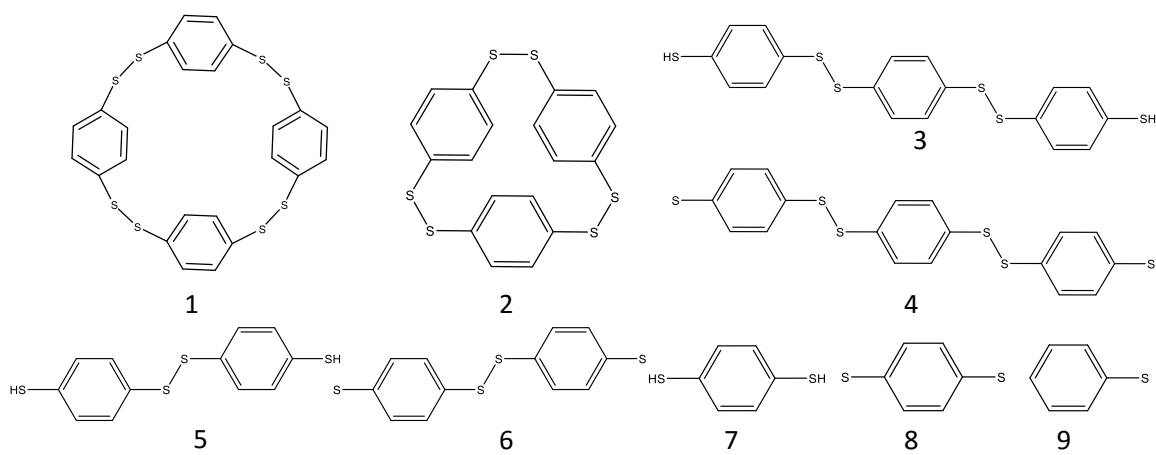


Figura 20. Principales iones encontrados en los perfiles de ionización de productos del 1,4-BDT

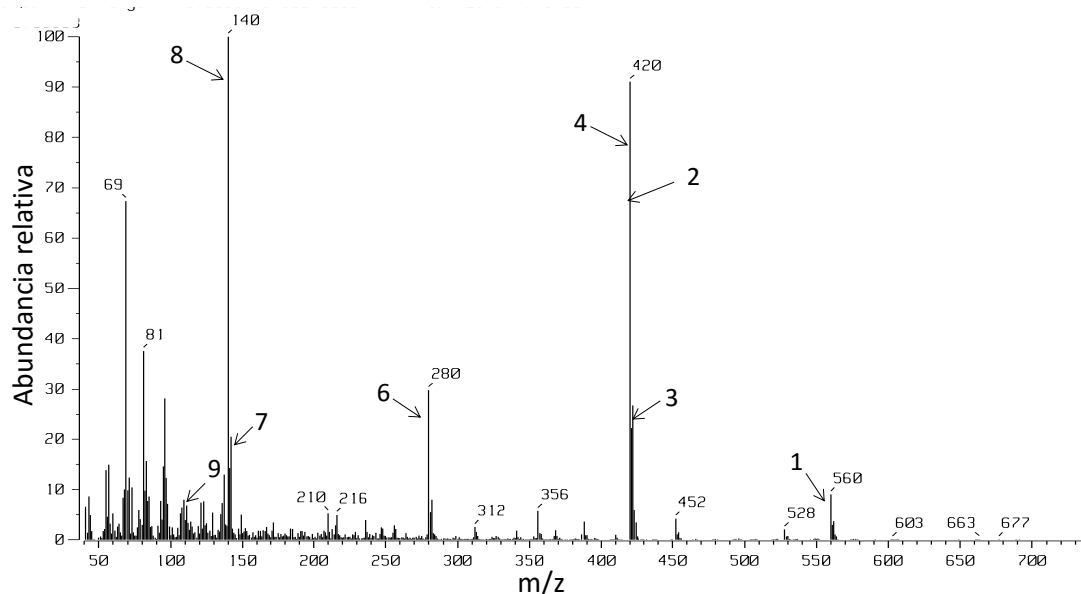


Figura 21. Espectro de masas del producto derivado de 1,4-BDT sintetizado en baja concentración de solvente (10% acetona o ACN)

A partir del espectro de la figura 21 se pudo determinar que los productos sintetizados en mezclas con baja concentración de solvente son similares y corresponden a tetrámeros (1) y trímeros (2) cíclicos, con iones moleculares en m/z 560 y 420 respectivamente. Los iones 8 (m/z 140), 6 (m/z 280) y 4 (m/z 420) son fragmentos de los anteriores. La obtención de trímeros y tetrámeros cíclicos de disulfuros de fenileno por oxidación química de 1,4-BDT ya ha sido reportada⁴⁶, encontrándose que estas dos conformaciones son las más abundantes al acoplarse los radicales libres del ditiol, esto es, son las conformaciones energéticamente más estables. En el caso de este trabajo no es posible determinar por el método de EI^+ -MS si el ion 2 (m/z , 420) corresponde exclusivamente al trímero cíclico, a un fragmento del tetrámero cíclico o a una mezcla de los dos.

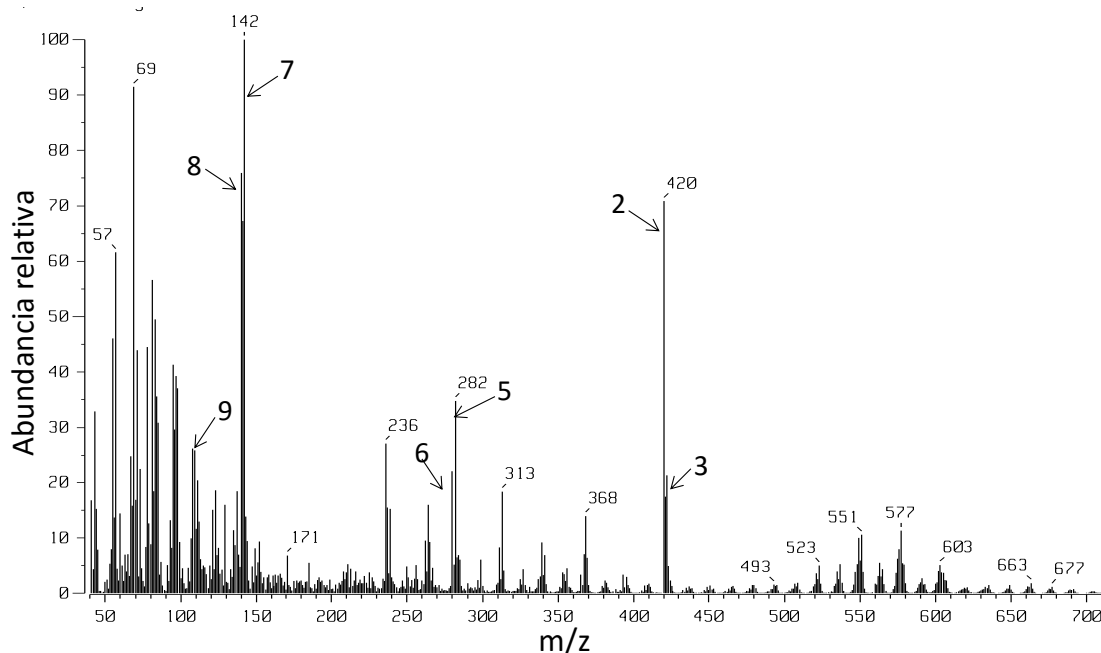


Figura 22. Espectro de masas del producto derivado de 1,4-BDT sintetizado en concentración de solvente media (50% acetona o 60% ACN)

Al igual que con los espectros de los productos sintetizados en bajas concentraciones de solvente, los iones asignados para los productos obtenidos en 50% de acetona y 60% de ACN son similares, al igual que sus abundancias relativas. En este caso el perfil de productos (figura 22) está conformado por trímeros cíclicos y lineales, así como dímeros. Las señales en m/z 422 (9), 313 (7) y 109 (2) corresponden al trímero lineal. Cabe notar que la señal 9 no puede atribuirse exclusivamente a un perfil de isótopos, ya que si así lo fuera tendría que ser menos abundante que el pico en m/z 421; además, la señal 7 (m/z 313) confirma la presencia del trímero lineal en los productos. Este mismo razonamiento se puede hacer para la señal en m/z 282 (6) que indica la presencia de un dímero y no de un isótopo del pico 5 (m/z 280).

Por su parte, la señal en m/z 420 es debida al trímero cíclico exclusivamente pues en este caso no hay una señal que indique la presencia del tetrámero. Los demás picos (m/z 280, 140 y 108) pertenecen a iones de dicho trímero. El hecho que no se observe la formación del tetrámero en medios con mayor proporción de solvente podría explicarse con base en la concentración de radicales en los diferentes medios, ya que en las mezclas con menor

cantidad de solvente la enzima presenta mayor actividad, entonces en estas mezclas habrá una mayor cantidad de radicales tiofenoxilo en un tiempo determinado, lo cual a su vez aumenta su velocidad de acoplamiento haciendo que se forme el tetrámero antes de su precipitación.

En general, las reacciones de oxidación de 1,4-BDT con LCg generan mezclas de productos lineales y cíclicos, siendo estos últimos los que dan lugar a señales con mayor abundancia relativa. Por otra parte, el perfil de productos es dependiente de la concentración de solvente empleada, más que de la naturaleza del mismo, al menos en el caso de la acetona y el ACN.

5.9.2 Análisis de los productos del 1,3-BDT

Los productos de la oxidación del 1,3-BDT se analizaron utilizando la misma metodología de EI⁺-MS ya descrita. En la figura 23 se muestran los principales iones hallados en los espectros de dichos productos.

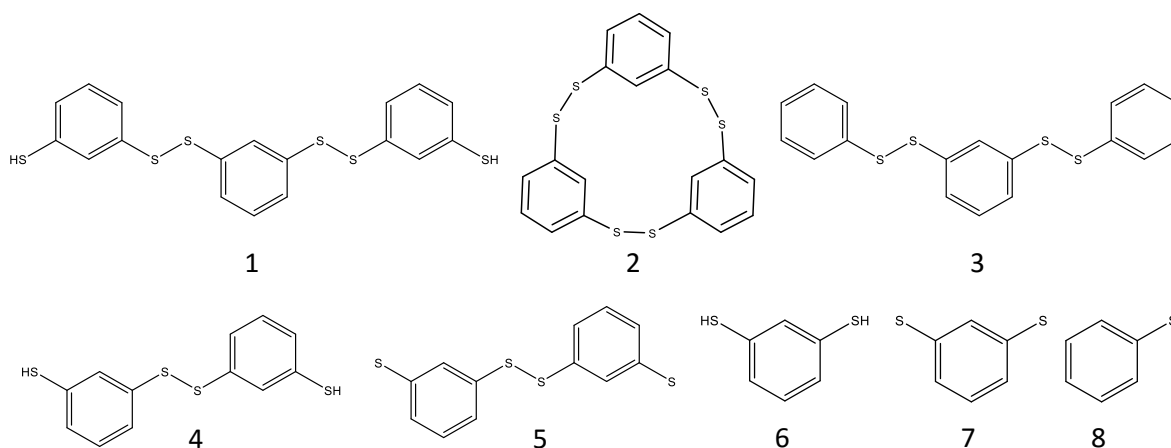


Figura 23. Principales iones encontrados en el perfil de ionización de productos del 1,3-BDT

Los espectros para todos los productos del 1,3-BDT fueron similares, por lo que solo se muestra aquí el espectro para el producto sintetizado en 10% de ACN; los demás espectros se encuentran en la sección de anexos de este trabajo (Anexo 1).

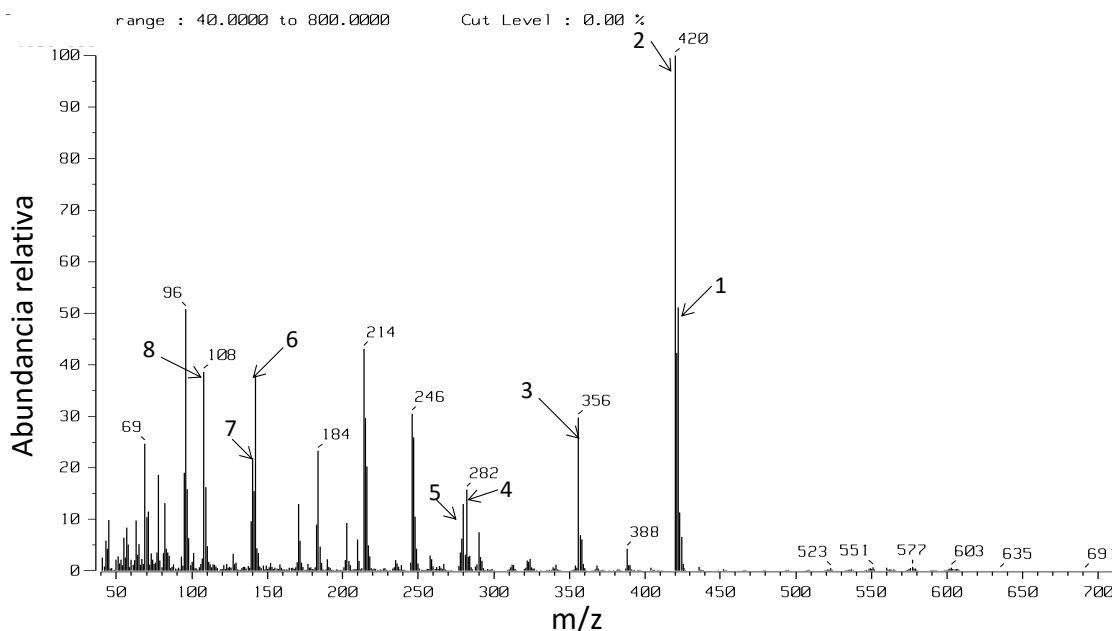


Figura 24. Espectro de masas del producto de 1,3-BDT sintetizado en ACN 10%

A pesar de la señal débil en m/z 282 (5) correspondiente al dímero en los sistemas con bajo contenido de solvente, es notable que el producto principalmente sintetizado al emplear 1,3-BDT como sustrato de la lacasa es el trímero cíclico (m/z 420). Como puede observarse en la figura 24 los picos denotados con los números 2, 3, 5 y 7 corresponden a iones de este ciclo, el cual dada la abundancia del ion molecular parece ser muy estable. Nuevamente el resultado coincide con lo reportado para la síntesis química de disulfuros de fenileno cíclicos con 1,3-BDT⁴⁶, donde el trímero cíclico parece ser la conformación más estable independientemente de la naturaleza (acetona o ACN) y concentración de solvente.

La tendencia de los oligómeros de disulfuros de fenileno a formar ciclos independientemente del método de síntesis empleado se le atribuye a dos factores principalmente: por una parte, la poca interacción de los anillos aromáticos con el medio polar, así como la baja solubilidad del azufre tanto en solventes polares como apolares, hacen que la cadena en crecimiento bajo condiciones diluidas tienda a cerrarse sobre sí misma⁴¹. El otro factor está relacionado con la estabilidad del enlace disulfuro, la cual tiene un relación directa con el ángulo diedro CSSC; estudios teóricos y prácticos han demostrado que ángulos diedros mayores a 100° desestabilizan energéticamente el enlace disulfuro, mientras que

ángulos más pequeños entre 50 a 90° le otorgan mayor estabilidad, siendo el intervalo entre 70 a 90° el más idóneo^{122, 123}. Por tanto, las moléculas con cadenas que contienen disulfuros tienden a tomar conformaciones cíclicas, puesto que permiten cerrar el ángulo a los valores más adecuados para mantener el enlace disulfuro estable. En la tabla 12 se muestran los valores calculados teóricamente del ángulo diedro promedio para los productos lineales y cíclicos.

Tabla 12. Ángulo diedro CSSC de los disulfuros de fenileno lineales y cíclicos

Producto	Derivados del 1,3-BDT		Derivados del 1,4-BDT		
	Trímero lineal	Trímero cíclico	Trímero lineal	Trímero cíclico	Tetrámero cíclico
Ángulo diedro	178	78	180°	47	86

Aunque la conformación cíclica de los productos de derivados del 1,3 y 1,4-BDT no se esperaba, esto no constituye un resultado negativo desde el punto de vista de la obtención de polímeros lineales azufrados de alto peso molecular, puesto que, como se discutirá en los siguientes apartados las moléculas cíclicas pueden ser empleadas ventajosamente como precursores de este tipo de materiales.

La síntesis química de oligómeros cíclicos de disulfuros de fenileno (CAD) ha sido reportada por diversos autores debido al potencial uso de estas moléculas como agentes entrecruzantes¹²⁴, así como precursores para la síntesis de polímeros lineales de alto peso molecular como el sulfuro de poli-fenileno (PPS) o disulfuros de poli-fenileno (PPDS)^{39-42, 125, 126}. El interés en el uso de este tipo de moléculas como precursores se debe a que su viscosidad es menor que la de oligómeros lineales, lo que facilita su procesamiento y también su transporte en el medio de reacción, generando polímeros con un peso molecular mayor, además, no requieren solventes ni catalizadores químicos para iniciar la polimerización y no se generan productos secundarios volátiles durante la misma^{5, 125, 126}. La síntesis de PPDS a partir de los ciclos puede realizarse por medio del proceso denominado *melt Ring Opening Polymerization (mROP)* que se basa en una reacción de radicales iniciada por la termólisis homolítica a temperaturas por encima de la temperatura de fusión del ciclo, reacción que genera un intercambio de disulfuros sin requerimiento de catalizadores químicos^{46, 123}, lo que da lugar a la formación del polímero unido por enlaces disulfuro (figura 25).

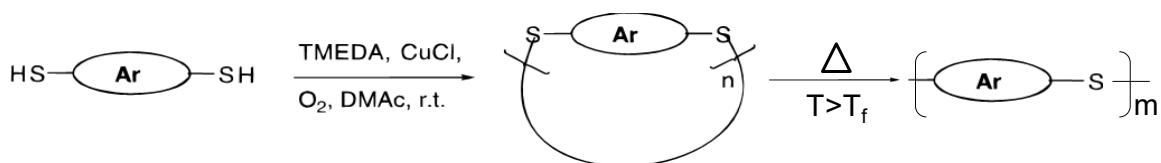


Figura 25. Síntesis de PPDS a partir de mROP de moléculas cíclicas generadas químicamente (adaptada de Ding y Hay, 1996 ⁴⁶)

Como se ilustra en la figura 25, la síntesis química de CAD involucra el uso de diferentes agentes catalizadores como sales de cobre, tetrametilendiamina (TEMED) y flujo continuo de O₂, que presentan desventajas con respecto a la síntesis enzimática propuesta en este trabajo. En el caso de las sales de cobre y el TEMED, forman complejos durante la síntesis, los cuales deben ser removidos en el proceso de purificación de los productos cíclicos, remoción que se realiza generalmente por medio de precipitación con soluciones de ácidos fuertes como HCl ^{42, 46} que no es posible reutilizar.

Por otra parte, para que los ciclos sintetizados enzimáticamente en este trabajo puedan ser empleados como precursores de PPDS de alto peso molecular, deben cumplir con ciertas características térmicas relacionadas con la temperatura de fusión y estabilidad al calor, por lo que se realizó una caracterización térmica de dichos productos.

5.10 El análisis de resonancia magnética nuclear confirma la estructura cíclica de las moléculas sintetizadas enzimáticamente

Los espectros de ¹H-RMN para los productos derivados de ambos sustratos (anexo 2), corroboran la oxidación de los grupos tiol, detectada en Raman, al no observarse las señales características de estos protones en 3.5 y 1.6 ppm ⁴⁶.

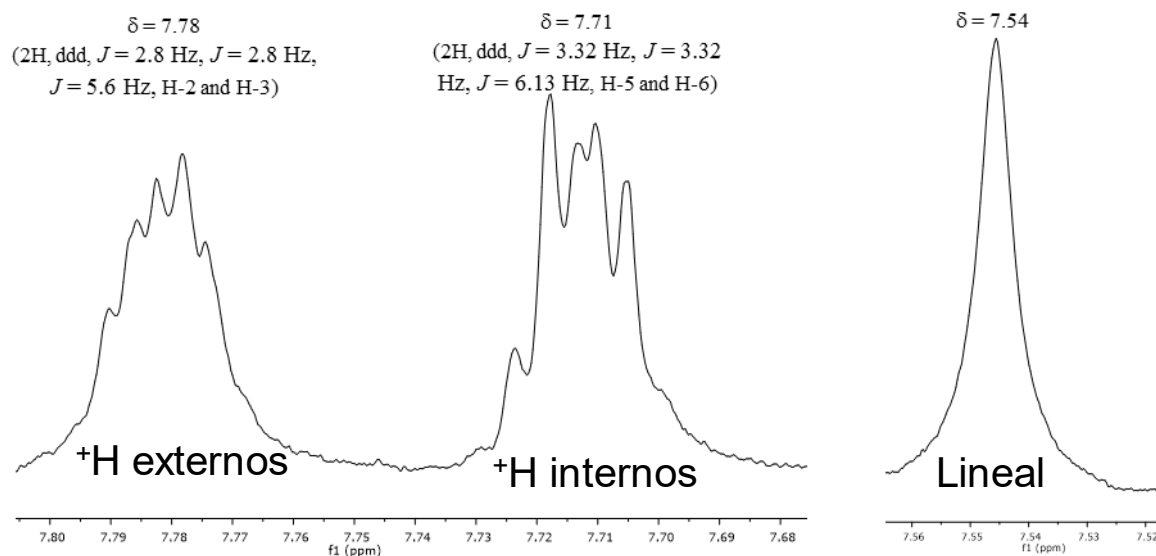


Figura 26. Detalle del espectro de ^1H -RMN de los productos derivados del 1,4-BDT

En el detalle del espectro para los productos derivados del 1,4-BDT (figura 26) se observan 3 señales definidas en la región correspondiente a los compuestos aromáticos: $\delta 7.78$ (2H, ddd, $J = 2.8$ Hz, $J = 2.8$ Hz, $J = 5.6$ Hz, H-2 y H-3) ppm, $\delta 7.71$ (2H, ddd, $J = 3.32$ Hz, $J = 3.32$ Hz, $J = 6.13$ Hz, H-5 y H-6) ppm y $\delta 7.54$ ppm. La presencia y acoplamiento de las dos primeras señales corrobora la conformación cíclica de las moléculas, puesto que para una molécula lineal se esperaría una única señal de tipo singulete debido a la simetría de la molécula, señal que corresponde a la observada en $\delta 7.54$ ppm. Por tanto, las otras dos señales se originan por la diferencia en el ambiente químico de los protones que se encuentran al interior del ciclo con respecto a los que se ubican afuera, en este caso los protones internos están más protegidos por lo que se ubican en campo alto ($\delta 7.78$), mientras que los externos más desprotegidos están en campo bajo ($\delta 7.71$). La integración del área de las señales indica que alrededor del 27% de los productos corresponden a moléculas lineales; el hecho que no se observen señales correspondientes a los enlaces tiol de los extremos de dichas moléculas, podría deberse a que los productos del 1,4-BDT se encuentran muy diluidos (1 mg/mL).

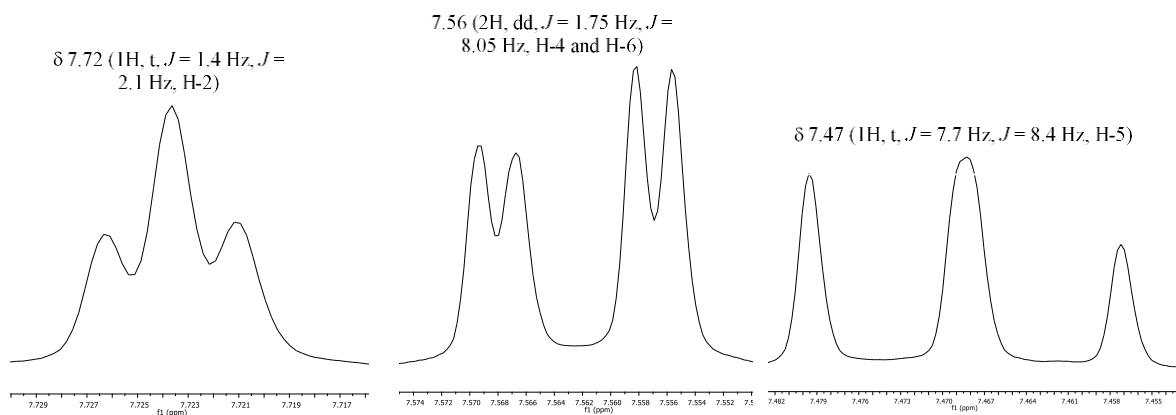


Figura 27. Detalle del espectro de ^1H -RMN de los productos derivados del 1,3-BDT

Por su parte, el espectro de los productos derivados del 1,3-BDT (figura 27) muestra 3 señales principales debido a la simetría de la molécula: $\delta 7.72$ (1H, t, $J = 1.4$ Hz, $J = 2.1$ Hz, H-2); $\delta 7.56$ (2H, dd, $J = 1.75$ Hz, $J = 8.05$ Hz, H-4 y H-6) y $\delta 7.47$ (1H, t, $J = 7.7$ Hz, $J = 8.4$ Hz, H-5). Por tanto, a diferencia del espectro obtenido para los productos *para*-sustituídos, el espectro de ^1H -RMN de los productos del 1,3-BDT no otorga mucha información acerca de la conformación cíclica de estas moléculas.

5.11 Los CAD sintetizados enzimáticamente pueden ser usados como precursores de PPDS: caracterización térmica

Para la determinación de las propiedades térmicas de los CAD sintetizados enzimáticamente se hizo uso de las técnicas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y termogravimetría (TGA). Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 13, las curvas de temperaturas características y estabilidad térmica para cada producto se encuentran en la sección de anexos (anexo 3).

Tabla 13. Propiedades térmicas de los CAD

Sustrato	Medio de reacción	TGA			DSC
		T (°C)	Masa perdida (%)	Masa perdida acumulada (%)	T _m (°C)
1,4-BDT	10% acetonitrilo	25-200	20	20	165
		200-400	18	38	
		400-600	36	74	
	60% acetonitrilo	25-200	15	15	165
		200-400	19	34	
		400-600	47	81	
	10% acetona	25-200	16	16	160
		200-400	17	33	
		400-600	46	79	
50% acetona	25-200	6	6	165	
	200-400	19	25		
	400-600	45	70		
1,3-BDT	10% acetonitrilo	25-300	5	5	163
		300-600	70	75	
	60% acetonitrilo	25-300	3	3	162
		300-600	77	80	
	10% acetona	25-300	4	4	163
		300-600	71	75	
50% acetona	25-300	6	6	161	
	300-600	82	88		

Al comparar los resultados obtenidos en la caracterización térmica de los productos sintetizados enzimáticamente a partir de 1,4-BDT con respecto a lo reportado (5% de pérdida a 380°C)⁴⁶, se tiene que presentan menor estabilidad térmica perdiendo entre el 6 y 20% de su masa a 200°C. La notable diferencia en la estabilidad térmica con respecto a los productos de síntesis química puede deberse al contenido de compuestos lábiles en la mezcla de producto, provenientes probablemente del sustrato que contiene un 3% de impurezas. Este hecho también explicaría los fragmentos pequeños de ionización en los espectros de masas de los productos del 1,4-BDT. Asimismo, la pérdida de masa escalonada indica la presencia de compuestos con diferente sensibilidad al aumento de temperatura. Además de las impurezas, la menor estabilidad térmica de los CAD derivados del 1,4-BDT puede basarse en la presencia de oligómeros lineales (detectados por EI⁺-MS), puesto que éstos tienen menor número de enlaces disulfuro que establezcan un equilibrio entre la conversión de

disulfuros de fenileno en sulfuros de fenileno y la reacción con el azufre liberado para volver a convertirse en disulfuros de fenileno, equilibrio al que se le atribuyen las características de estabilidad térmica de los CAD³⁸.

En lo referente a los productos del 1,3-BDT, las propiedades térmicas son similares para todos, lo que aunado al resultado del análisis de masas corrobora que el perfil de productos obtenido a partir de este sustrato es similar e independiente de la concentración y tipo de solvente. En cuanto a la estabilidad térmica, es considerablemente mayor a la obtenida para los productos del 1,4-BDT y no presenta una curva escalonada, es decir, pareciera que hay un producto sintetizado mayoritariamente. Sin embargo, los productos derivados del 1,3-BDT exhiben un 5% de pérdida de masa a una temperatura 76°C menor que los sintetizados químicamente⁴⁶.

Con respecto a la T_m , su valor por debajo de la temperatura a la cual hay una descomposición considerable de los productos representa una ventaja desde el punto de vista del uso de los ciclos como precursores. De acuerdo a esto, es factible el uso de los ciclos derivados del 1,3 y 1,4-BDT como precursores de PPDS de alto peso molecular.

5.12 Melt Ring Opening Polymerization de los ciclos aromáticos azufrados

En el transcurso de esta investigación se encontró que la oxidación de 1,3 y 1,4-BDT catalizada por la lacasa de *Corioloopsis gallica* generó moléculas cíclicas compuestas de anillos aromáticos unidos por enlaces disulfuro. Por otra parte, la caracterización térmica de los ciclos indicó que podrían ser usados como precursores de polímeros de alto peso molecular, empleando el proceso de mROP para llevar a cabo la polimerización.

Para el mROP de los ciclos se empleó un reactor Parr Instruments® de acero inoxidable (figura 28). La temperatura de polimerización fue de 200°C, esto es, por encima de la temperatura de fusión de los CAD que se encuentra alrededor de 160°C. La exposición a temperaturas mayores de 200°C no se recomienda debido a la formación de ramificaciones, enlaces trisulfuro y degradación de los ciclos durante la polimerización; por su parte, temperaturas menores a 200°C tienen un efecto negativo sobre la velocidad de polimerización⁴⁵. La reacción se dejó proseguir por 2 horas; cabe notar que durante todo el

tiempo hubo flujo constante de nitrógeno en el reactor con el fin de evitar la formación de subproductos de oxidación por la presencia de O_2 .



Figura 28. Reactor empleado en el mROP de los CAD

Los productos obtenidos a partir de los CAD tienen apariencia brillante y lisa, una consistencia dura, así como un color amarillo oscuro (figura 29). Dichos productos, fueron recuperados del recipiente donde se llevó a cabo el proceso de mROP para su posterior caracterización.

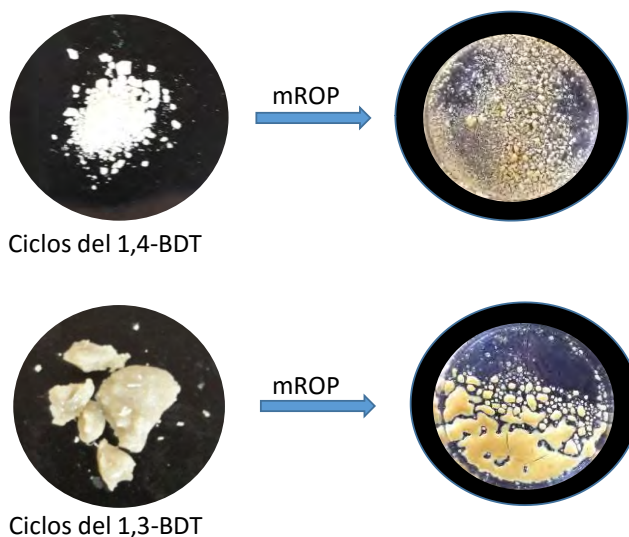


Figura 29. Apariencia de los precursores cíclicos y los productos del proceso de mROP

El cambio en la apariencia de los productos de mROP con respecto a los CAD que se observa en la figura 29, sugiere que sí ocurrió una reacción entre las moléculas cíclicas al exponerlas por 2 horas a una temperatura de 200°C. Análisis posteriores ayudarán a determinar las características estructurales y fisicoquímicas de las posibles estructuras poliméricas.

5.13 Los productos de mROP tienen una estructura de anillos aromáticos unidos por enlaces disulfuro: espectroscopía de infrarrojo y Raman

Al igual que se hizo para los CAD, los productos de polimerización fueron analizados en estado sólido por medio de las técnicas de espectroscopía de infrarrojo (anexo 4) y Raman. En las figuras 30 y 31 se muestran los espectros para los productos derivados de 1,4 y 1,3-BDT respectivamente. Igualmente, y con fines comparativos, en las figuras se superponen los espectros de los precursores cíclicos.

Debido a la consistencia dura y compacta de los productos de polimerización la intensidad de los espectros obtenidos es bastante débil, además de presentar fluorescencia que puede enmascarar la intensidad de las señales; por tanto, se debe comparar la intensidad de las señales con respecto a un pico de referencia con el fin de analizar de manera confiable el espectro en cuestión. En las tablas 14 y 15 se ilustra esta comparación para las señales correspondientes a los tioles (880 y 2540 cm^{-1}) y el enlace disulfuro (450 cm^{-1}); el pico de referencia (Ref) corresponde al modo 8a del anillo aromático a 1550 cm^{-1} .

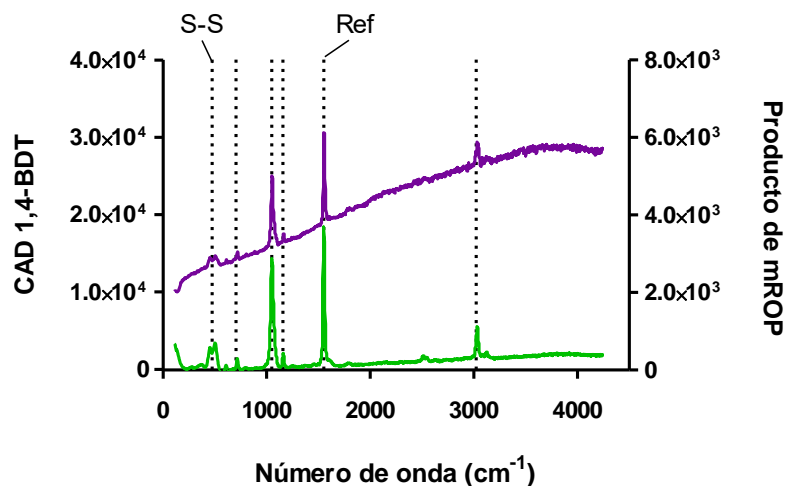


Figura 30. Espectro de dispersión Raman de los CAD (verde) y productos de mROP (morado) derivados del 1,4-BDT

Tabla 14. Relación de intensidad de las señales de los espectros de Raman del 1,4-BDT y sus productos

Compuesto	Referencia	$\beta(S-H)$		$\nu(S-H)$		S-S	
		Señal	Relación	Señal	Relación	Señal	Relación
1,4-BDT	11104	1479	0.13	8458	0.76	0	0.00
CAD	17875	0	0.00	438	0.02	3333	0.19
Polímero	2221	0	0.00	0	0.00	279	0.13

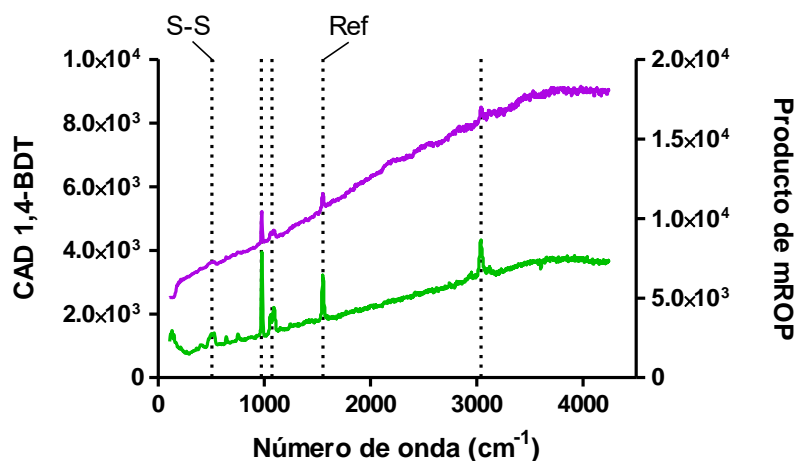


Figura 31. Espectro de dispersión Raman de los CAD (verde) y productos de mROP (morado) derivados del 1,3-BDT

Tabla 15. Relación de intensidad de las señales de los espectros de Raman del 1,3-BDT y sus productos

Compuesto	Referencia	β (S-H)		ν (S-H)		S-S	
		Señal	Relación	Señal	Relación	Señal	Relación
1,3-BDT	3916	1850	0.47	12050	3.08	120	0.03
CAD	1350	0	0.00	0	0.00	350	0.26
Polímero	850	0	0.00	0	0.00	250	0.29

De acuerdo con las figuras 30 y 31, así como las tablas 14 y 15, es posible notar que a pesar de la baja intensidad de los espectros de Raman de los productos de mROP, éstos son similares a los obtenidos para las moléculas cíclicas, por lo que su análisis es equivalente al que se realizó anteriormente para dichas estructuras. Dado que los productos de polimerización en cuestión provienen de las moléculas cíclicas, la falta de señales correspondientes a las vibraciones de los grupos tiol es predecible. Por otra parte, la presencia de la señal correspondiente al enlace disulfuro y la ausencia de señales intensas alrededor de 1130 cm^{-1} que indiquen la presencia de óxidos de azufre como sulfóxidos, sulfonas y/o ácidos sulfónicos¹²⁷ demuestra que efectivamente se llevó a cabo el intercambio de disulfuros durante el mROP y que no hubo sobre-oxidación del azufre gracias al flujo de nitrógeno en el reactor. Para determinar el tamaño de las moléculas sintetizadas durante la polimerización se utilizó cromatografía de permeación en gel como se describe en la siguiente sección.

5.14 La polimerización por mROP genera polímeros de tamaño uniforme

Los productos de mROP de los ciclos de 1,3-BDT se analizaron por cromatografía de permeación en gel (GPC) empleando THF como solvente. Debido a la insolubilidad de los productos del 1,4-BDT en el solvente no fue posible hacer el análisis para estos materiales. En la tabla 16 se resumen los resultados del análisis realizado por duplicado, calculados a partir de la distribución de pesos moleculares obtenida.

Tabla 16. Parámetros característicos de peso molecular* de los productos de mROP derivados de 1,3-BDT

Compuesto	M_n	M_w	M_p	IP (M_w/M_n)
Polímero derivado del 1,3-BDT	9417.5±75	12884±69	12275.5±103	1.37

M_n : peso molecular en número, M_w : peso molecular en masa, M_p : moda, GP: grado de polimerización calculado a partir de M_w , IP: índice de polidispersidad (M_w/M_n).

*Los valores están dados en unidades de Daltones (Da)

De acuerdo a los resultados del análisis, el proceso de mROP dio lugar a la apertura y polimerización de los ciclos de 1,3-BDT alcanzando un grado de polimerización alrededor de 92 unidades. Por otra parte, el índice de polidispersidad es moderado¹²⁸, es decir, los polímeros sintetizados tienen un tamaño relativamente homogéneo alrededor de M_p , que corresponde al valor máximo de la distribución gaussiana (moda) típica en los pesos moleculares de polímeros. Desde el punto de vista de la ingeniería de polímeros, esta uniformidad en el tamaño es deseable más aún cuando también es un indicativo de la linealidad del material¹¹.

Hasta ahora sólo se ha encontrado un reporte en la literatura donde se determinó el grado de polimerización de materiales como los obtenidos en este trabajo (figura 32). En el citado reporte se llevó a cabo la oxidación química de 1,3-BDT obteniendo oligómeros con un grado de polimerización promedio de 6 unidades; estos oligómeros presentaron características semiconductoras luego de ser dopados con ácido clorosulfónico⁴. Por otra parte, Ding y Hay (1997) realizaron mROP de ciclos de 4,4'-isopropiliden-bistiofenol⁴⁵ (figura 33); estos ciclos, como puede observarse en la figura, también poseen anillos aromáticos y enlaces disulfuro en su estructura. El peso molecular promedio determinado por GPC para los polímeros sintetizados bajo las mismas condiciones de mROP que las empleadas en este trabajo, fue de 88 kDa correspondiente a un grado de polimerización de 340. La diferencia en el grado de polimerización de los materiales obtenidos con respecto a los reportados se debe al tamaño de los precursores cíclicos empleados, que en el caso de los ciclos de la figura 33 corresponden a una mezcla de trímeros, tetrámeros, pentámeros, e incluso algunos ciclos más grandes⁴⁵, lo cual deriva en la síntesis de un polímero de mayor peso molecular.

Por otra parte, es importante notar que la solubilidad del material analizado en THF es baja (<1.5 mg/mL), por lo que algunas fracciones de mayor peso molecular podrían no haberse detectado bajo las condiciones que se llevó a cabo el ensayo, donde se reportó la precipitación de una parte del producto durante la preparación de la muestra para el análisis. En este sentido, la realización del análisis de GPC en otros solventes como dimetilacetamida (DMAc) o dimetilformadida (DMF) donde los productos de mROP para ambos monómeros son solubles, permitiría obtener mayor información sobre el tamaño de los mismos.

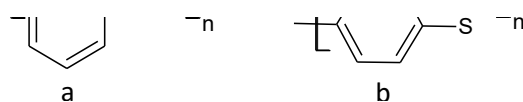


Figura 32. *meta*-polifenilén disulfuro: polímero sintetizado por mROP a partir de ciclos derivados de 1,3-BDT

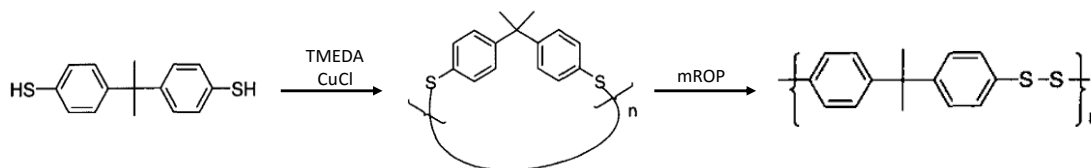


Figura 33. Síntesis de poli-disulfuros usando ciclos de 4,4'-isopropiliden-bistiofenol

Cabe notar que a pesar de no alcanzar un grado de polimerización tan alto como el reportado para materiales similares, los polímeros sintetizados por mROP pueden presentar propiedades interesantes como conductividad y resistencia a altas temperaturas y agentes químicos fuertes, tal como ha sido reportado previamente en la literatura sobre polímeros azufrados^{1, 12}.

5.15 Los ciclos *para*-sustituídos forman cadenas lineales durante el proceso de mROP: ¹H-RMN

La ausencia de ramificaciones y sobre-oxidación de los productos de mROP fue corroborada por ¹H-RMN, asimismo esta técnica permitió determinar la apertura de los ciclos y su polimerización como cadenas lineales. En este sentido, el espectro de los productos de mROP derivados del 1,4-BDT (anexo 5a), fue menos complejo que el de los ciclos, ya que no se observan las señales a $\delta 7.78$ y $\delta 7.71$ ppm y aparece una única señal intensa a 7.57 ppm.

La señal indica una menor interacción entre los protones de los anillos aromáticos debido a la apertura de los ciclos y la polimerización en moléculas lineales más grandes. En el caso del espectro de los productos derivados del 1,3-BDT (anexo 5b), fue muy similar al que se obtuvo para las moléculas cíclicas.

5.16 Los polímeros azufrados sintetizados por mROP son resistentes a altas temperaturas

Los productos de mROP derivados de los ciclos de 1,3 y 1,4-BDT fueron analizados por termogravimetría (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) con el fin de determinar su comportamiento térmico con el aumento de la temperatura, así como sus temperaturas características a partir de las curvas de pérdida de masa y cambio de fase (anexo 6). A diferencia del análisis térmico llevado a cabo para los CAD, en el caso de los polímeros se realizó un doble calentamiento de las muestras: primero de 25 a 280°C con el fin de eliminar impurezas y luego de 25 a 600°C. Los resultados obtenidos para el segundo ciclo de calentamiento se resumen en la tabla 17.

Tabla 17. Comportamiento térmico de los productos de mROP

Compuesto	TGA		DSC
	T (°C)	Masa perdida (%)	T _f (°C)
Polímero 1,3-BDT	25-325	5	413
	235-600	71	
Polímero 1,4-BDT	25-350	5	465
	350-540	45	

Con respecto al análisis de DSC, la temperatura de fusión de ambos productos es relativamente alta al compararla con la reportada para polímeros similares como los derivados de poli-sulfuros de fenileno (PPS), que son considerados materiales resistentes a altas temperaturas y cuya T_m se encuentra alrededor de 290°C^{41, 43}. La mayor T_m de los polímeros con enlaces disulfuro se atribuye al intercambio de disulfuros que ocurre a altas temperaturas¹⁰⁵. Sin embargo, no se han encontrado reportes de T_m para los poli-disulfuros de fenileno. Por otra parte, en el mismo análisis no se observaron señales correspondientes a la temperatura de transición vítrea (T_g) ni temperatura de cristalización (T_c) para los dos

materiales evaluados, lo cual indica que son materiales altamente cristalinos tal como se ha comprobado para poli-disulfuros alifáticos, los cuales presentan T_g y T_c por debajo de los 0°C ⁴⁴. Igualmente, se ha demostrado que las cadenas lineales de polímeros aromáticos azufrados tienden a organizarse rápidamente en estructuras cristalinas debido a la flexibilidad de las mismas^{13, 129}. Este hecho está respaldado, al menos en el caso del 1,3-BDT, por el índice de polidispersidad calculado a partir de los resultados de GPC, puesto que los polímeros ramificados que tienen un IP alto no tienden a formar estructuras cristalinas debido al impedimento estérico.

Con relación al comportamiento térmico de los productos, la estabilidad térmica de los materiales *para*-orientados (sintetizados a partir de 1,4-BDT) es ligeramente mayor, aunque para ambos sustratos la T_m y la estabilidad térmica son mayores con respecto a los precursores cíclicos (tabla 13), lo cual constituye un indicativo de la polimerización de dichas moléculas. Por otra parte, la mayor estabilidad térmica de los materiales *para*-orientados con respecto a los *meta*-orientados puede explicarse con base en la eficiencia de empaquetamiento, puesto que las cadenas *meta*-sustituidas tienen mayor impedimento para empaquetarse debido a su menor flexibilidad. La influencia positiva de la flexibilidad de las cadenas poliméricas y el empaquetamiento en el aumento de la estabilidad térmica de los polímeros azufrados han sido reportados anteriormente^{12, 13, 130}.

A pesar del comportamiento térmico estable de los polímeros sintetizados en el presente estudio, siguen siendo más termolábiles que los materiales derivados del PPS, los cuales presentan alta estabilidad (pérdida de masa alrededor del 5%) a temperaturas por encima de 500°C ^{41, 43}. Por otra parte, el perfil de estabilidad térmica de los PPDS es similar al reportado para el poli-disulfuro de fenileno de la figura 31⁴⁵, hecho que indica una menor estabilidad térmica de los polímeros aromáticos con enlaces disulfuro con respecto a los que presentan un enlace tipo tioeter; lo cual no es sorprendente si se tiene en cuenta que el primero es un enlace más débil. La resistencia a altas temperaturas, junto con otras propiedades como el valor de conductividad, resistencia a agentes químicos fuertes y propiedades ópticas, determinarán los posibles usos que pueden tener esta clase de materiales.

5.17 Los CAD y los polímeros sintetizados por mROP son aislantes

5.17.1 Análisis de conductividad de los CAD

Los productos obtenidos a partir de la oxidación de 1,3 y 1,4-BDT con LCg corresponden a una mezcla de moléculas lineales y cíclicas, principalmente trímeros y tetrameros. Debido a la presencia de anillos aromáticos y la ausencia de ramificaciones, dichas moléculas podrían presentar propiedades semiconductoras, por lo que se llevó a cabo un análisis de conductividad haciendo uso del método de placas planas paralelas¹³¹. Para la obtención de las películas de cada uno de los productos se ensayaron dos solventes seleccionados de acuerdo a lo reportado en la literatura^{46, 124}, estos son la DMF y el disulfuro de carbono (CS₂).

En el caso de la DMF, para los productos del 1,3-BDT se observó disolución completa mientras que los productos del 1,4-BDT formaron una suspensión en el líquido. Con respecto al CS₂, se intentó hacer soluciones a una concentración de 2 mg/mL; cabe notar que al ser un solvente altamente volátil e inflamable no se calentó la mezcla por lo que se mantuvo 24 horas en agitación; sin embargo, no se observó disolución completa para ninguna de las mezclas ensayadas, las cuales posteriormente se centrifugaron y los sobrenadantes se depositaron sobre placas de vidrio. De las películas obtenidas, sólo las correspondientes a los productos de 1,3-BDT en CS₂ son homogéneas (figura 34a); en las demás películas se observó la formación de agregados (figuras 34b-d) por lo que el valor de conductividad, que depende del espesor de la película, no es confiable para dichas placas. Por tanto, sólo se reporta la conductividad determinada para los productos de 1,3-BDT disueltos en CS₂.

Los valores de conductividad calculados a partir de la medición de intensidad de corriente (*i*) entre electrodos de plata pintados sobre las películas se muestran en la tabla 18.

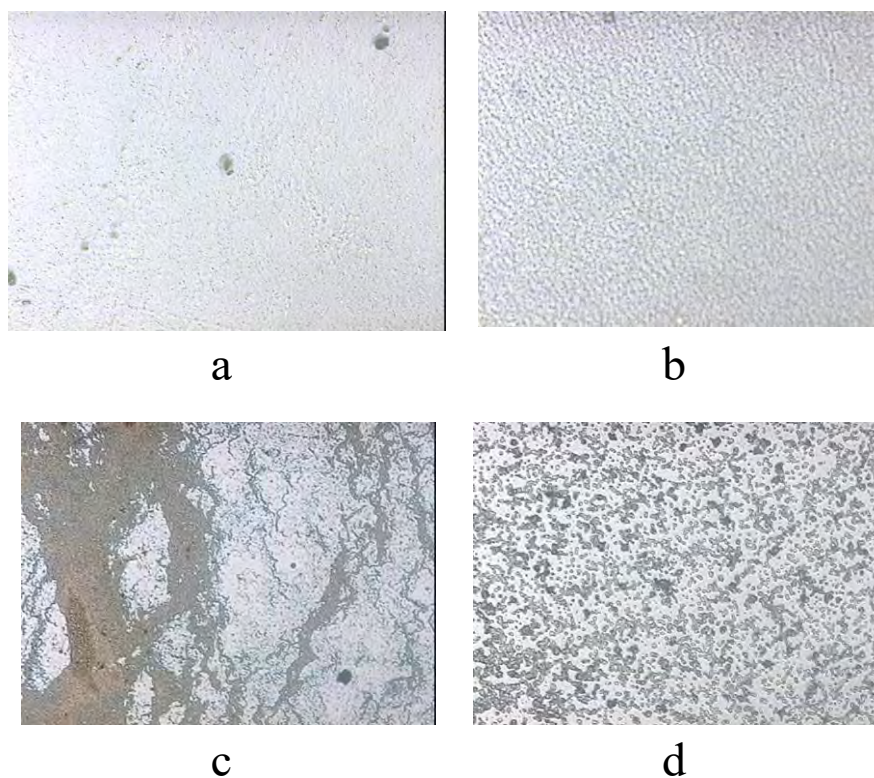


Figura 34. Apariencia de las películas a obtenidas a partir de las diferentes soluciones. Ampliación 10X. a) Productos del 1,3-BDT en CS₂, b) Productos del 1,3-BDT en DMF, c) Productos del 1,4-BDT en DMF, d) Productos del 1,4-BDT en CS₂

Tabla 18. Conductividad de los productos sintetizados a partir de 1,3-BDT

Producto	Conductividad (S/cm)
Acetonitrilo 10%	7.66×10^{-9}
Acetonitrilo 60%	4.18×10^{-9}
Acetona 10%	4.64×10^{-9}
Acetona 50%	2.28×10^{-9}

Los valores de conductividad calculados para los productos sintetizados a partir de 1,3-BDT se encuentran en un orden de magnitud correspondiente a la frontera entre materiales aislantes y semiconductores (figura 36). El hecho que dichos valores sean similares para los productos analizados era de esperarse, puesto que el análisis por espectrometría de masas mostró perfiles de productos muy similares, donde la molécula correspondiente a un trímero cíclico fue la más abundante. En este sentido, es difícil que moléculas con esta conformación y tamaño transporten electrones a través de su estructura

de manera efectiva, excepto cuando se encuentran apiladas formando ensamblajes tubulares, cuya conductividad ya ha sido reportada para el caso de macrociclos de politiofeno¹³². Aunque no parece ser el caso de los ciclos obtenidos a partir de 1,3-BDT, sería interesante estudiar su capacidad de ensamblarse en forma de tubos y evaluar sus propiedades conductivas. Con respecto a los productos sintetizados a partir del 1,4-BDT, el análisis de conductividad, por el método empleado no podrá efectuarse hasta que se encuentre un solvente que permita la obtención de películas homogéneas.

5.17.2 Análisis de conductividad de los productos de mROP

Al igual que con los ciclos, sobre sustratos de vidrio se depositaron películas de cada polímero disuelto en DMF y se determinó la conductividad por el método de placas planas paralelas¹³¹. El experimento se hizo en condiciones de oscuridad y también de exposición directa a la luz, con el fin de averiguar si los materiales en cuestión eran fotoconductores. Como control negativo se empleó una placa de vidrio sobre la que se pintaron electrodos de plata, para así comparar los perfiles de intensidad de corriente con respecto a los obtenidos para los polímeros. En la figura 35a-c y la tabla 19 se muestran los perfiles y valores promedio de conductividad e intensidad de corriente.

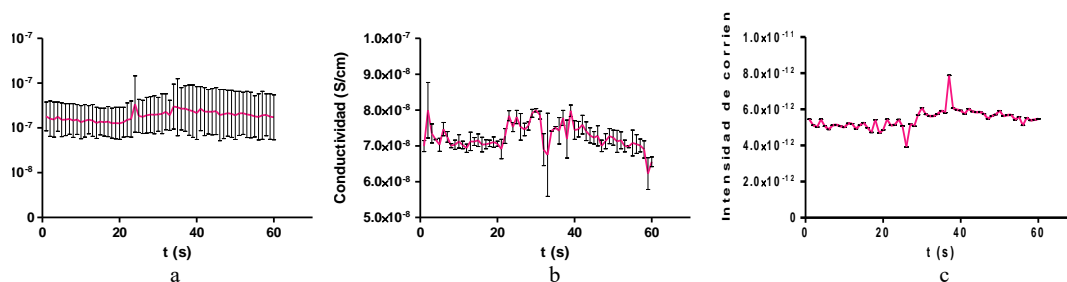


Figura 35. Perfiles de conductividad de los productos poliméricos de a) 1,4-BDT y b) 1,3-BDT. c) Perfil de intensidad de corriente del control.

Tabla 19. Intensidad de corriente y conductividad de los polímeros de 1,4 y 1,3-BDT

Propiedad	Compuesto		
	Polímero 1,4-BDT	Polímero 1,3-BDT	Control
I oscuridad (A)	$1.12 \times 10^{-11} \pm 5 \times 10^{-12}$	$8.65 \times 10^{-12} \pm 5 \times 10^{-13}$	5.37×10^{-12}
I luz (A)	$1.17 \times 10^{-11} \pm 5.2 \times 10^{-12}$	$9.09 \times 10^{-12} \pm 8.3 \times 10^{-13}$	5.59×10^{-12}
σ oscuridad (S/cm)	$1.12 \times 10^{-7} \pm 3 \times 10^{-8}$	$7.13 \times 10^{-8} \pm 2.8 \times 10^{-9}$	
σ luz (S/cm)	$1.16 \times 10^{-7} \pm 3.2 \times 10^{-8}$	$7.48 \times 10^{-8} \pm 4.3 \times 10^{-10}$	

*I: intensidad de corriente, σ : conductividad

Con base en los resultados presentados en la figura 35 y la tabla 19, es claro que los polímeros sintetizados en este trabajo no son fotoconductores, puesto que no hay cambios apreciables en el valor de intensidad de corriente durante el tiempo de exposición a la luz. Más aún, los perfiles de conductividad en el caso de los polímeros y de intensidad de corriente en el control son muy similares, manteniéndose los valores medidos aproximadamente constantes en el tiempo del ensayo (1 minuto), por lo que puede calcularse un valor promedio de estas magnitudes. Además, teniendo en cuenta que la conductividad es un múltiplo escalar de la intensidad de corriente, los perfiles de conductividad e intensidad de corriente son comparables. Los valores de conductividad calculados para ambos polímeros, entre 10^{-8} y 10^{10} S/cm, corresponden a materiales en la frontera entre los aislantes y los semiconductores (figura 36) y son similares a los calculados para los precursores cíclicos.

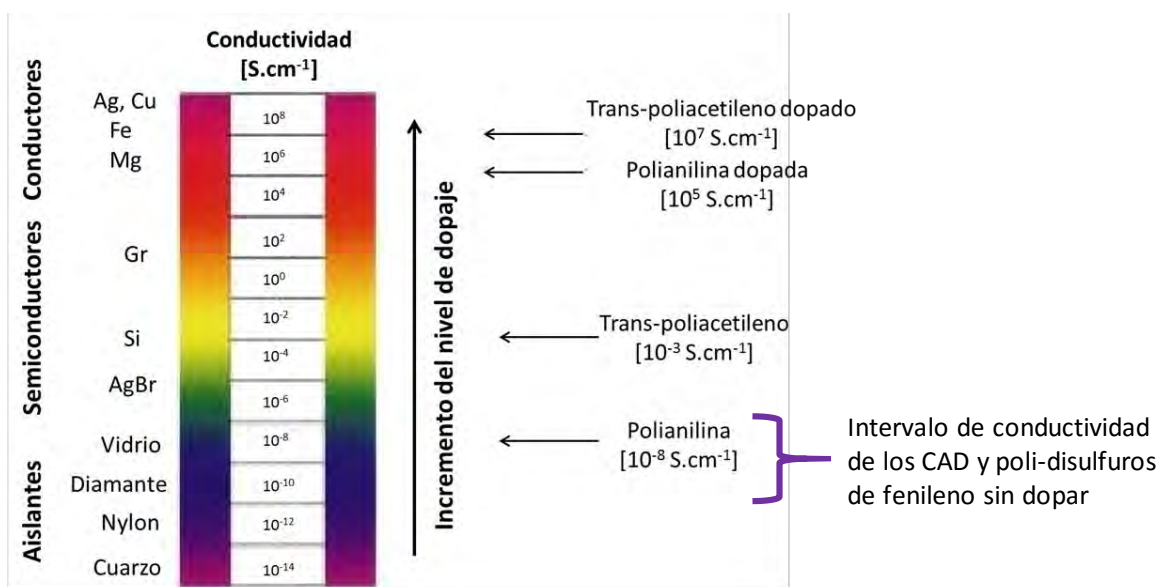


Figura 36. Conductividad de polímeros dopados y no dopados comparada con otros materiales (adaptada de MacDiarmid, 2001¹³³)

El carácter aislante de los polímeros sintetizados en este trabajo no constituye un resultado sorprendente, ya que el enlace disulfuro actúa como un disruptor de la conjugación en la cadena, esto es, interrumpe la secuencia de enlaces dobles y sencillos que permiten el transporte de electrones a través de la estructura polimérica. Asimismo, no parece haber transporte de electrones entre cadenas superpuestas dentro de la estructura cristalina, fenómeno que se ha observado en el caso de politiofenos¹³². Sin embargo, es importante notar

que los valores calculados de conductividad corresponden a compuestos sin dopar. Por tanto, sería interesante realizar el dopaje de los materiales sintetizados con el fin de aumentar su conductividad, tal como sucede con otros polímeros conductores como la PANI que es aislante sin ser dopada y conductora al serlo (figura 36).

Las características aislantes de los poli-disulfuros de fenileno obtenidos en este trabajo, junto con la resistencia a altas temperaturas, los hacen deseables para su uso como partes de equipos involucrados en diversos procesos industriales, de manera similar al empleo que se da de los costosos derivados del PPS. Por otra parte, análisis adicionales para determinar sus propiedades ópticas, adhesivas y de resistencia a químicos fuertes, permitiría ampliar el intervalo de aplicaciones de estos materiales.

6 CONCLUSIONES

- La lacasa del hongo *Corioloopsis gallica* tiene la capacidad de oxidar ditioles aromáticos *meta* y *para* sustituidos con una eficiencia similar a la de oxidación de fenoles en presencia de solvente.
- La oxidación de ditioles aromáticos con la lacasa de *C. gallica* genera moléculas cíclicas de anillos aromáticos unidos por enlaces disulfuro, conformación que se debe a la poca interacción con el medio de reacción, así como la estabilización del enlace disulfuro.
- Por medio del proceso de *melt Ring Opening Polymerization* es posible obtener polímeros aromáticos azufrados de tamaño uniforme, a partir de moléculas cíclicas sintetizadas enzimáticamente.
- Las propiedades aislantes y la alta temperatura de fusión de los polímeros sintetizados en este trabajo, son características de interés industrial similares a las de otros polímeros azufrados de alto valor agregado.

7 PERSPECTIVAS

- Explorar la solubilidad de diferentes monómeros ditiólicos en otros sistemas como los líquidos iónicos. Asimismo, estudiar la estabilidad y actividad de la enzima en este tipo de solventes.
- Analizar la capacidad de las moléculas cíclicas para atrapar moléculas en el interior del ciclo.
- Ensayar reacciones de síntesis enzimática con mezclas de los sustratos reportados en este trabajo y compuestos como polianilinas. Asimismo, evaluar sus propiedades fisicoquímicas.
- Dado que los productos de mROP derivados del 1,4-BDT son solubles en solventes como la dimetilformamida, realizar el análisis de GPC en este solvente para confirmar el carácter polimérico de dichos productos.
- Realizar el dopaje de los polímeros sintetizados con el fin de evaluar su potencial como fotoconductores o semiconductores bajo condiciones ya reportadas.
- Determinar las características ópticas, dureza, flexibilidad y resistencia a agentes químicos fuertes de los materiales poliméricos obtenidos.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Rahate AS, Nemade KR and Waghuley SA, Polyphenylene sulfide (PPS): state of the art and applications. *Reviews in Chemical Engineering* **29**: 471-489 (2013).
2. Tewari A, Kokil A, Ravichandran S, Nagarajan S, Bouldin R, Samuelson LA, Nagarajan R and Kumar J, Soybean Peroxidase Catalyzed Enzymatic Synthesis of Pyrrole/EDOT Copolymers. *Macromolecular Chemistry and Physics* **211**: 1610-1617.
3. Cruz JC, Oxidación de compuestos azufrados volátiles utilizando la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*, in Instituto de Biotecnología. UNAM, Cuernavaca, pp. 108 (2010).
4. Casa CD, Bizzarri PC and Nuzziello S, A new semiconducting polymer: Poly(m-phenylene disulfide) complexed with chlorosulfonic acid. *Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition* **23**: 323-328 (1985).
5. Song LN, Du XS, Xiao M and Meng YZ, Short carbon fiber reinforced aromatic polydisulfide derived from cyclic (4,4'-oxybis(benzene)disulfide) via ring-opening polymerization. *Polymers for Advanced Technologies* **16**: 323-327 (2005).
6. Michael A. Pickard RR, Raunel Tinoco and Rafael Vazquez-Duhalt, Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism by White Rot Fungi and UAMH *Coriolopsis gallica* Oxidation by 8260 Laccase. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 3805-3809 (1999).
7. Gates DP, Svejda SA, Oñate E, Killian CM, Johnson LK, White PS and Brookhart M, Synthesis of Branched Polyethylene Using (α -Diimine)nickel(II) Catalysts: Influence of Temperature, Ethylene Pressure, and Ligand Structure on Polymer Properties. *Macromolecules* **33**: 2320-2334 (2000).
8. Pillai O and Panchagnula R, Polymers in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology* **5**: 447-451 (2001).
9. Hermsem GF, conformational properties of linear polymers at a porous interface. Universiteit Twente, pp. 139 (1972).
10. Galia M, Svec F and Frechet JMJ, Monodisperse polymer beads as packing material for high-performance liquid chromatography: Effect of divinylbenzene content on the porous and chromatographic properties of poly(styrene-co-divinylbenzene) beads prepared in presence of linear polystyrene as a porogen. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **32**: 2169-2175 (1994).
11. Massa DJ, Shriner KA, Turner SR and Voit BI, Novel Blends of Hyperbranched Polyesters and Linear Polymers. *Macromolecules* **28**: 3214-3220 (1995).
12. Soccio M, Finelli L, Lotti N, Siracusa V, Ezquerra TA and Munari A, Novel ethero atoms containing polyesters based on 2,6-naphthalendicarboxylic acid: A comparative study with poly(butylene naphthalate). *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **45**: 1694-1703 (2007).
13. Lotti N, Siracusa V, Finelli L, Marchese P and Munari A, Sulphur-containing polymers: Synthesis and thermal properties of novel polyesters based on dithiotriethylene glycol. *European Polymer Journal* **42**: 3374-3382 (2006).
14. Kausar A, Zulfiqar S and Sarwar MI, Recent developments in sulfur-containing polymers. *Polymer Reviews* **54**: 185-267 (2014).
15. Salgueiro W, Marzocca A, Somoza A, Consolati G, Cervený S, Quasso F and Goyanes S, Dependence of the network structure of cured styrene butadiene rubber on the sulphur content. *Polymer* **45**: 6037-6044 (2004).
16. Gerard M, Chaubey A and Malhotra BD, Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* **17**: 345-359 (2002).

17. Inzelt G, Pineri M, Schultze JW and Vorotyntsev MA, Electron and proton conducting polymers: recent developments and prospects. *Electrochimica Acta* **45**: 2403-2421 (2000).
18. Liu W, Kumar J, Tripathy S, Senecal KJ and Samuelson L, Enzymatically Synthesized Conducting Polyaniline. *Journal of the American Chemical Society* **121**: 71-78 (1998).
19. Gustafsson G, Cao Y, Treacy GM, Klavetter F, Colaneri N and Heeger AJ, Flexible light-emitting diodes made from soluble conducting polymers. *Nature* **357**: 477-479 (1992).
20. Bouldin R, Kokil A, Ravichandran S, Nagarajan S, Kumar J, Samuelson Lynne A, Bruno Ferdinando F and Nagarajan R, Enzymatic Synthesis of Electrically Conducting Polymers, in *Green Polymer Chemistry: Biocatalysis and Biomaterials*. American Chemical Society, pp. 315-341 (2011).
21. Heeger AJ, Kivelson S, Schrieffer JR and Su WP, Solitons in conducting polymers. *Reviews of Modern Physics* **60**: 781-850 (1988).
22. Longoria A, Síntesis Enzimática de Polímeros Intrínsecamente Conductores, in Instituto de Biotecnología. Instituto de Biotecnología - UNAM, Cuernavaca, pp. 91 (2009).
23. Longoria A, Hu H and Vazquez-Duhalt R, Enzymatic Synthesis of Semiconductor Polymers by Chloroperoxidase of *Caldariomyces fumago*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **162**: 927-934.
24. Mikulski CM, Russo PJ, Saran MS, MacDiarmid AG, Garito AF and Heeger AJ, Synthesis and structure of metallic polymeric sulfur nitride, (SN)_x, and its precursor, disulfur dinitride, S₂N₂. *Journal of the American Chemical Society* **97**: 6358-6363 (1975).
25. Roncali J, Conjugated poly(thiophenes): synthesis, functionalization, and applications. *Chemical Reviews* **92**: 711-738 (1992).
26. Groenendaal L, Jonas F, Freitag D, Pielartzik H and Reynolds JR, poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) and its derivatives: past, present, and future. *Advanced Materials* **12**: 481-494 (2000).
27. Brédas JL, Elsenbaumer RL, Chance RR and Silbey R, Electronic properties of sulfur containing conjugated polymers. *Journal of Chemical Physics* **78** (1983).
28. Morley JO, Docherty VJ and Pugh D, Non-linear optical properties of organic molecules. Part 4. Calculations of the hyperpolarisability of sulphur-containing systems. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*: 1361-1363 (1987).
29. Brédas J. L. CRR, Silbey R., Nicolas G., and Durand Ph. , Valence effective Hamiltonian study of the electronic structure of poly(p-phenylene) and poly(p-phenylene sulfide). *Journal of Chemical Physics* **77**: 371-379 (1982).
30. Soci C, Hwang IW, Moses D, Zhu Z, Waller D, Gaudiana R, Brabec CJ and Heeger AJ, Photoconductivity of a Low-Bandgap Conjugated Polymer. *Advanced Functional Materials* **17**: 632-636 (2007).
31. Weiss D, Abkowitz M, Kasap S and Capper P, Organic Photoconductors in Springer Handbook of Electronic and Photonic Materials. Springer US, pp. 953-982 (2007).
32. Wang Y, Photoconductivity of fullerene-doped polymers. *Nature* **356**: 585-587 (1992).
33. Spanggaard H and Krebs FC, A brief history of the development of organic and polymeric photovoltaics. *Solar Energy Materials and Solar Cells* **83**: 125-146 (2004).
34. Myl'nikov VS, Photoconductance of Organic Polymers. *Russian Chemical Reviews* **43**: 862 (1974).
35. Bradley A and Hammes JP, Photoconductivity in Thin Organic Films. *Journal of The Electrochemical Society* **110**: 543-548 (1963).
36. Asano Y, Formation and Properties of Plasma-Polymerized Carbon Disulfide Films. *Japanese Journal of Applied Physics* **22**: 1618-1622 (1983).

37. Jaballah N, Hriz K, Chemli M, Fave J-L and Majdoub M, New Semiconducting Poly(arylene sulfide)s: Synthesis, Characterization, and Optical Properties. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization* **19**: 594-610.
38. Wang ZY and Hay AS, Synthesis of poly(p-phenylene sulfide) by thermolysis of bis(4-halophenyl) disulfides. *Macromolecules* **24**: 333-335 (1991).
39. Ding Y and Hay AS, Novel synthesis of poly (p-phenylene sulfide) from cyclic disulfide oligomers *Macromolecules* **29**: 4811-4812 (1996).
40. Ishida H, Kisanuki A and Endo K, Ring-Opening Polymerization of Aromatic 6-Membered Cyclic Disulfide and Characterization of the Polymer. *Polym J* **41**: 110-117 (2008).
41. Tsuchida E, Miyatake K, Yamamoto K and Hay AS, Cyclic Arylene Sulfides: A Novel Synthesis and Ring-Opening Polymerization. *Macromolecules* **31**: 6469-6475 (1998).
42. Chen K, Liang ZA, Meng YZ and Hay AS, Synthesis and ring-opening polymerization of co-cyclic(aromatic aliphatic disulfide) oligomers. *Polymers for Advanced Technologies* **14**: 719-728 (2003).
43. Ding Y and Hay AS, Preparation of Poly(thioarylene)s from Cyclic Disulfide Oligomers. *Macromolecules* **30**: 2527-2531 (1997).
44. Rosenthal EQ, Puskas JE and Wesdemiotis C, Green Polymer Chemistry: Living Dithiol Polymerization via Cyclic Intermediates. *Biomacromolecules* **13**: 154-164 (2012).
45. Ding Y and Hay AS, Ring-opening polymerization study of cyclic (aromatic disulfide) oligomers derived from 4,4-isopropylidene bithiophenol. *Polymer* **38**: 2239-2244 (1997).
46. Ding Y and Hay AS, Cyclic Aromatic Disulfide Oligomers: Synthesis and Characterization. *Macromolecules* **29**: 6386-6392 (1996).
47. Tsuge Y, Kawaguchi H, Sasaki K and Kondo A, Engineering cell factories for producing building block chemicals for bio-polymer synthesis. *Microbial Cell Factories* **15**: 1-12 (2016).
48. Kobayashi S, Enzymatic polymerization: A new method of polymer synthesis. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **37**: 3041-3056 (1999).
49. Xu F, Oxidation of Phenols, Anilines, and Benzenethiols by Fungal Laccases: Correlation between Activity and Redox Potentials as Well as Halide Inhibition. *Biochemistry* **35**: 7608-7614 (1996).
50. Cooney CL and Hueter J, Enzyme catalysis in the presence of nonaqueous solvents using chloroperoxidase. *Biotechnology and Bioengineering* **16**: 1045-1053 (1974).
51. Morris DR and Hager LP, Chloroperoxidase. *Journal of Biological Chemistry* **241**: 1763-1768 (1966).
52. Ruiz-Dueñas FJ, Martínez AT, Torres E and Ayala M, Structural and Functional Features of Peroxidases with a Potential as Industrial Biocatalysts, in Biocatalysis Based on Heme Peroxidases. Springer Berlin Heidelberg, pp. 37-59 (2010).
53. Kiljunen E and Kanerva LT, Novel applications of chloroperoxidase: enantioselective oxidation of racemic epoxyalcohols. *Tetrahedron: Asymmetry* **10**: 3529-3535 (1999).
54. Dawson JH and Sono M, Cytochrome P-450 and chloroperoxidase: thiolate-ligated heme enzymes. Spectroscopic determination of their active-site structures and mechanistic implications of thiolate ligation. *Chemical Reviews* **87**: 1255-1276 (1987).
55. Hager LP, Morris DR, Brown FS and Eberwein H, Chloroperoxidase. *Journal of Biological Chemistry* **241**: 1769-1777 (1966).
56. Ayala M, Robledo NR, Lopez-Munguia A and Vazquez-Duhalt R, Substrate Specificity and Ionization Potential in Chloroperoxidase-Catalyzed Oxidation of Diesel Fuel. *Environmental Science & Technology* **34**: 2804-2809 (2000).
57. Ayala M and Torres E, Redox Potential of Peroxidases, in Biocatalysis Based on Heme Peroxidases. Springer Berlin Heidelberg, pp. 61-77 (2010).

58. Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S and Sannia G, Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**: 369-385 (2010).
59. Mayer AM and Staples RC, Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* **60**: 551-565 (2002).
60. Shraddha, Shekher R, Sehgal S, Kamthania M and Kumar A, Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. *Enzyme Research* **2011**: 11 (2011).
61. Shraddha, Shekher R, Sehgal S, Kamthania M and Kumar A, Laccase: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme Research* **2011**.
62. Gianfreda L, Sannino F, Filazzola MT and Leonowicz A, Catalytic behavior and detoxifying ability of a laccase from the fungal strain *Cerrena unicolor*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **4** (1998).
63. Streltsov A, Shumakovich G, Morozova O, Gorbacheva M and Yaropolov A, Micellar laccase-catalyzed synthesis of electroconductive polyaniline. *Applied Biochemistry and Microbiology* **44**: 264-270 (2008).
64. Vasil'eva I, Morozova O, Shumakovich G and Yaropolov A, Synthesis of electroconductive polyaniline using immobilized laccase. *Applied Biochemistry and Microbiology* **45**: 27-30 (2009).
65. Aktaş N, Kibarer G and Tanyolaç A, Effects of reaction conditions on laccase-catalyzed α -naphthol polymerization. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **75**: 840-846 (2000).
66. Intra A, Nicotra S, Riva S and Danieli B, Significant and Unexpected Solvent Influence on the Selectivity of Laccase-Catalyzed Coupling of Tetrahydro-2-naphthol Derivatives. *Advanced Synthesis & Catalysis* **347**: 973-977 (2005).
67. Medina F, Aguila S, Baratto MC, Martorana A, Basosi R, Alderete JB and Vazquez-Duhalt R, Prediction model based on decision tree analysis for laccase mediators. *Enzyme and microbial technology* **52**: 68-76 (2013).
68. Michniewicz A, Ullrich R, Ledakowicz S and Hofrichter M, The white-rot fungus *Cerrena unicolor* strain 137 produces two laccase isoforms with different physico-chemical and catalytic properties. *Applied Microbiology and Biotechnology* **69**: 682-688 (2006).
69. Abdel-Mohsen HT, Sudheendran K, Conrad J and Beifuss U, Synthesis of disulfides by laccase-catalyzed oxidative coupling of heterocyclic thiols. *Green Chemistry* **15**: 1490-1495 (2013).
70. Calvo AM, Copa-Patiño JL, Alonso O and González AE, Studies of the production and characterization of laccase activity in the basidiomycete *Coriolopsis gallica*, an efficient decolorizer of alkaline effluents. *Archives of Microbiology* **171**: 31-36 (1998).
71. Vandertol-Vanier HA, Vazquez-Duhalt R, Tinoco R and Pickard MA, Enhanced activity by poly(ethylene glycol) modification of *Coriolopsis gallica* laccase. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **29**: 214-220 (2002).
72. Pickard MA, Roman R, Tinoco R and Vazquez-Duhalt R, Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 3805-3809 (1999).
73. Tinoco R, Pickard MA and Vazquez-Duhalt R, Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Letters in Applied Microbiology* **32**: 331-335 (2001).
74. Daâssi D, Rodríguez-Couto S, Nasri M and Mechichi T, Biodegradation of textile dyes by immobilized laccase from *Coriolopsis gallica* into Ca-alginate beads. *International Biodeterioration and Biodegradation* **90**: 71-78 (2014).

75. Arrocha AA, Diseño de una celda de combustible enzimática, alcohol oxidasa/lacasa, in Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México (2014).
76. Gross RA, Kalra B and Kumar A, Polyester and polycarbonate synthesis by in vitro enzyme catalysis. *Applied Microbiology and Biotechnology* **55**: 655-660 (2001).
77. Chattopadhyay K and Mazumdar S, Structural and Conformational Stability of Horseradish Peroxidase: Effect of Temperature and pH. *Biochemistry* **39**: 263-270 (1999).
78. Azevedo AM, Prazeres DMF, Cabral JMS and Fonseca LP, Stability of free and immobilised peroxidase in aqueous organic solvents mixtures. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **15**: 147-153 (2001).
79. Batra R and Gupta MN, Enhancement of enzyme activity in aqueous-organic solvent mixtures. *Biotechnology Letters* **16**: 1059-1064 (1994).
80. Serdakowski AL and Dordick JS, Enzyme activation for organic solvents made easy. *Trends in Biotechnology* **26**: 48-54 (2008).
81. Gorman LAS and Dordick JS, Organic solvents strip water off enzymes. *Biotechnology and Bioengineering* **39**: 392-397 (1992).
82. Gupta MN and Roy I, Enzymes in organic media. *European Journal of Biochemistry* **271**: 2575-2583 (2004).
83. Loughlin WA and Hawkes DB, Effect of organic solvents on a chloroperoxidase biotransformation. *Bioresource Technology* **71**: 167-172 (2000).
84. Tziaila AA, Kalogeris E, Gournis D, Sanakis Y and Stamatis H, Enhanced catalytic performance and stability of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* in surfactant free ternary water organic solvent systems. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **51**: 24-35 (2008).
85. Ayala M, Hernandez-Lopez EL, Perezgasga L and Vazquez-Duhalt R, Reduced coke formation and aromaticity due to chloroperoxidase-catalyzed transformation of asphaltenes from Maya crude oil. *Fuel* **92**: 245-249.
86. Strey R, Microemulsion microstructure and interfacial curvature. *Colloid and Polymer Science* **272**: 1005-1019 (1994).
87. Lu L, Zhao M, Wang TN, Zhao LY, Du MH, Li TL and Li DB, Characterization and dye decolorization ability of an alkaline resistant and organic solvents tolerant laccase from *Bacillus licheniformis* LS04. *Bioresource Technology* **115**: 35-40 (2012).
88. Rodakiewicz-Nowak J and Jarosz-Wilkolazka A, Catalytic activity of *Cerrena unicolor* laccase in aqueous solutions of water-miscible organic solvents: Experimental and numerical description. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **44**: 53-59 (2007).
89. Manavalan A, Manavalan T, Murugesan K, Kutzner A, Thangavelu KP and Heese K, Characterization of a solvent, surfactant and temperature-tolerant laccase from *Pleurotus* sp. MAK-II and its dye decolorizing property. *Biotechnology Letters* **37**: 2403-2409 (2015).
90. D'Acunzo F, Barreca AM and Galli C, Determination of the activity of laccase, and mediated oxidation of a lignin model compound, in aqueous-organic mixed solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **31**: 25-30 (2004).
91. J. Rodakiewicz-Nowak SMK, B. Dudek, J. Haber, Effect of various water-miscible solvents on enzymatic activity of fungal laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **11**: 1-11 (2000).
92. Ruiz AI, Malavé AJ, Felby C and Griebenow K, Improved activity and stability of an immobilized recombinant laccase in organic solvents. *Biotechnology Letters* **22**: 229-233 (2000).
93. Tavares APM, Rodriguez O and Macedo EA, Ionic liquids as alternative co-solvents for laccase: Study of enzyme activity and stability. *Biotechnology and Bioengineering* **101**: 201-207 (2008).

94. Mohidem NA and Mat HB, The catalytic activity enhancement and biodegradation potential of free laccase and novel sol-gel laccase in non-conventional solvents. *Bioresource Technology* **114**: 472-477 (2012).
95. Bressler DC, Fedorak PM and Pickard MA, Oxidation of carbazole, N-ethylcarbazole, fluorene, and dibenzothiophene by the laccase of *Coriolopsis gallica*. *Biotechnology Letters* **22**: 1119-1125 (2000).
96. Jaimes W, Alvarado-Tenorio G, Martínez-Alonso C, Quevedo-López A, Hu H and Nicho ME, Effect of CdS nanoparticle content on the in-situ polymerization of 3-hexylthiophene-2,5-diyl and the application of P3HT-CdS products in hybrid solar cells. *Materials Science in Semiconductor Processing* **37**: 259-265 (2015).
97. Cortina Marrero HJ, Celdas solares híbridas con poli (3-alkilthiofenos), in Instituto de Energías Renovables. Universidad Nacional Autónoma de México (2013).
98. Klamt A, The COSMO and COSMO-RS solvation models. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* **1**: 699-709 (2011).
99. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Mennucci B, Petersson GA, Nakatsuji H, Caricato M, Li X, Hratchian HP, Izmaylov AF, Bloino J, Zheng G, Sonnenberg JL, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Vreven T, Montgomery Jr. JA, Peralta JE, Ogliaro F, Bearpark MJ, Heyd J, Brothers EN, Kudin KN, Staroverov VN, Kobayashi R, Normand J, Raghavachari K, Rendell AP, Burant JC, Iyengar SS, Tomasi J, Cossi M, Rega N, Millam NJ, Klene M, Knox JE, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Martin RL, Morokuma K, Zakrzewski VG, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Dapprich S, Daniels AD, Farkas Ö, Foresman JB, Ortiz JV, Cioslowski J and Fox DJ, Gaussian 09. Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA (2009).
100. Dordick JS, Marletta MA and Klivanov AM, Polymerization of phenols catalyzed by peroxidase in nonaqueous media. *Biotechnology and Bioengineering* **30**: 31-36 (1987).
101. Asmus KD, Stabilization of oxidized sulfur centers in organic sulfides. Radical cations and odd-electron sulfur-sulfur bonds. *Accounts of Chemical Research* **12**: 436-442 (1979).
102. Hermann R, Naumov S, Mahalaxmi GR and Brede O, Stability of phenol and thiophenol radical cations – interpretation by comparative quantum chemical approaches. *Chemical Physics Letters* **324**: 265-272 (2000).
103. Hioe J and Zipse H, Radical stability and its role in synthesis and catalysis. *Organic & biomolecular chemistry* **8**: 3609-3617 (2010).
104. Lesslie M, Meyer JA, Osburn S, Otun S and Ryzhov V, The formation of resonance-stabilized sulfur-based radical cations and their gas-phase reactivity. *International Journal of Mass Spectrometry* **378**: 312-321 (2015).
105. Dénès F, Pichowicz M, Povie G and Renaud P, Thiyl Radicals in Organic Synthesis. *Chemical Reviews* **114**: 2587-2693 (2014).
106. Snyder L, Classification off the solvent properties of common liquids. *Journal of Chromatographic Science* **16**: 223-234 (1978).
107. Fedorak PM, Semple KM, Vazquez-Duhalt R and Westlake DWS, Chloroperoxidase-mediated modifications of petroporphyrins and asphaltenes. *Enzyme and Microbial Technology* **15**: 429-437 (1993).
108. Brust M, Blass PM and Bard AJ, Self-Assembly of Photoluminescent Copper(I)-Dithiol Multilayer Thin Films and Bulk Materials. *Langmuir* **13**: 5602-5607 (1997).

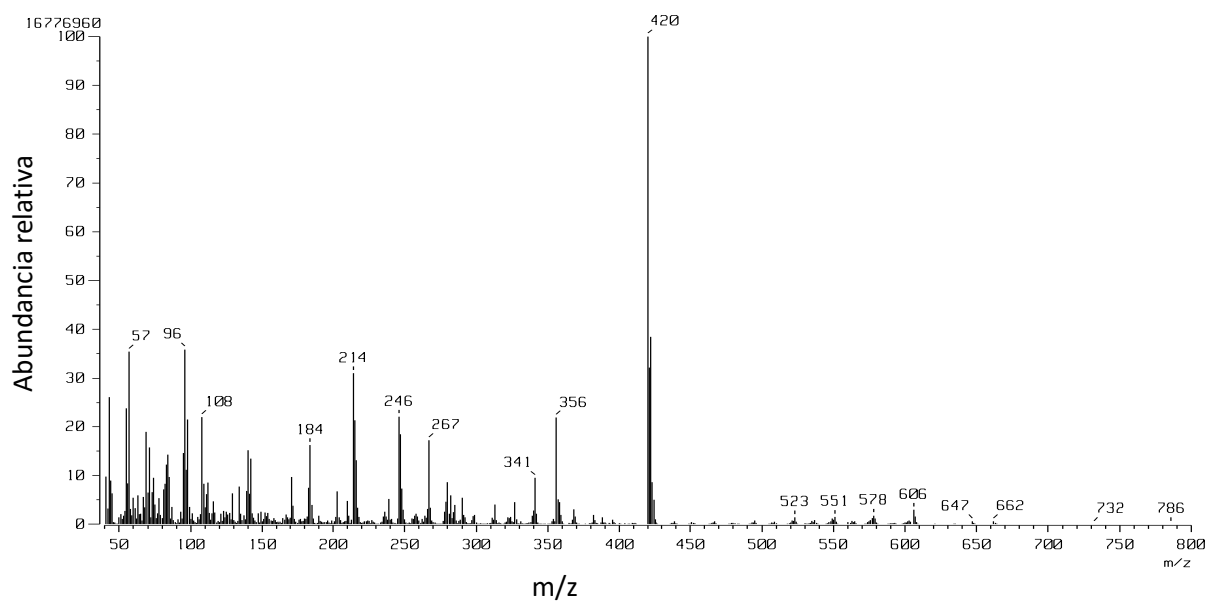
109. de Boer B, Meng H, Perepichka DF, Zheng J, Frank MM, Chabal YJ and Bao Z, Synthesis and Characterization of Conjugated Mono- and Dithiol Oligomers and Characterization of Their Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **19**: 4272-4284 (2003).
110. Zeida A, Babbush R, González Lebrero MC, Trujillo M, Radi R and Estrin DA, Molecular Basis of the Mechanism of Thiol Oxidation by Hydrogen Peroxide in Aqueous Solution: Challenging the SN2 Paradigm. *Chemical Research in Toxicology* **25**: 741-746.
111. Shevelkova AN and Ryabov AD, Irreversible inactivation of Caldariomyces fumago chloroperoxidase by hydrogen peroxide. *IUBMB Life* **39**: 665-670 (1996).
112. Lv Z, Yao Y, Lv Z and Min H, Effect of tetrahydrofuran on enzyme activities in activated sludge. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **70**: 259-265 (2008).
113. Capello C, Fischer U and Hungerbühler K, What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. *Green Chemistry* **9**: 927-934 (2007).
114. Ramirez J, Estudio de la inactivacion de la lacasa de *Corioloopsis gallica* durante la oxidacion de fenoles, in Instituto de Biotecnologia. universidad Nacional Autonoma de Mexico, Cuernavaca, pp. 62 (2014).
115. Kim HS, Cho DH, Won K and Kim YH, Inactivation of Coprinus cinereus peroxidase during the oxidation of various phenolic compounds originated from lignin. *Enzyme and Microbial Technology* **45**: 150-155 (2009).
116. Alcolea Palafox M, Scaling factors for the prediction of vibrational spectra. I. Benzene molecule. *International Journal of Quantum Chemistry* **77**: 661-684 (2000).
117. Cho SH, Han HS, Jang D-J, Kim K and Kim MS, Raman Spectroscopic Study of 1,4-Benzenedithiol Adsorbed on Silver. *The Journal of Physical Chemistry* **99**: 10594-10599 (1995).
118. Varsányi G, Vibrational spectra of benzene derivatives. Elsevier (2012).
119. Bastian Jr EJ and Martin RB, Disulfide vibrational spectra in the sulfur-sulfur and carbon-sulfur stretching region. *The Journal of Physical Chemistry* **77**: 1129-1133 (1973).
120. Hernández B, Pflüger F, López-Tobar E, Garcia-Ramos JV, Sanchez-Cortes S and Ghomi M, Disulfide linkage Raman markers: a reconsideration attempt. *Journal of Raman Spectroscopy* **45**: 657-664.
121. Barnard D, Fabian JM and Koch H, 514. Valence vibration frequencies and hydrogen bond formation of sulphoxide and sulphone groups.(Absorption spectra and structure of organic sulphur compounds. Part V.). *Journal of the Chemical Society (Resumed)*: 2442-2454 (1949).
122. Burns JA and Whitesides GM, Predicting the stability of cyclic disulfides by molecular modeling: effective concentrations in thiol-disulfide interchange and the design of strongly reducing dithiols. *Journal of the American Chemical Society* **112**: 6296-6303 (1990).
123. Fava A, Iliceto A and Camera E, Kinetics of the thiol-disulfide exchange. *Journal of the American Chemical Society* **79**: 833-838 (1957).
124. Wong DT-M and Marvel CS, Aromatic polyethers, polysulfones, and polyketones as laminating resins. VIII. Aryl disulfide units as crosslinking agents. *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition* **14**: 1637-1644 (1976).
125. Zimmerman DA, Koenig JL and Ishida H, Polymerization of poly(p-phenylene sulfide) from a cyclic precursor. *Polymer* **37**: 3111-3116 (1996).
126. Wang Y-F, Chan KP and Hay AS, Free-Radical Ring-Opening Polymerization of Macrocyclic Aryl Ether Thioether Ketone Oligomers. *Macromolecules* **29**: 3717-3726 (1996).
127. Müller A and Krebs B, Sulfur: Its Significance for Chemistry, for the Geo-, Bio-, and Cosmosphere and Technology. Elsevier, pp. 526 (2016).

128. Nobbmann U, Polydispersity – what does it mean for DLS and chromatography? . Malvern: Material Talks (2014).
129. Miyatake K, Yokoi Y, Yamamoto K, Tsuchida E and Hay AS, Selective and efficient synthesis of cyclic hexakis (thio-1,4-phenylene) through oxidative polymerization of diphenyl disulfide. *Macromolecules* **30**: 4502-4503 (1997).
130. Kato M, Toshima K and Matsumura S, Enzyme-Catalyzed Preparation of Aliphatic Polythioester by Direct Polycondensation of Diacid Diester and Dithiol. *Macromolecular Rapid Communications* **27**: 605-610 (2006).
131. Arenas MC, Mendoza N, Cortina H, Nicho ME and Hu H, Influence of poly3-octylthiophene (P3OT) film thickness and preparation method on photovoltaic performance of hybrid ITO/CdS/P3OT/Au solar cells. *Solar Energy Materials and Solar Cells* **94**: 29-33 (2010).
132. Coulembier O, Deshayes, G., Surin, M., De Winter, J., Boon, F., Delcourt, C., Dubois, P. , Macrocyclic regioregular poly (3-hexylthiophene): from controlled synthesis to nanotubular assemblies. *Polymer Chemistry* **4**: 237-241 (2013).
133. MacDiarmid AG, “Synthetic Metals”: A Novel Role for Organic Polymers (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition* **40**: 2581-2590 (2001).

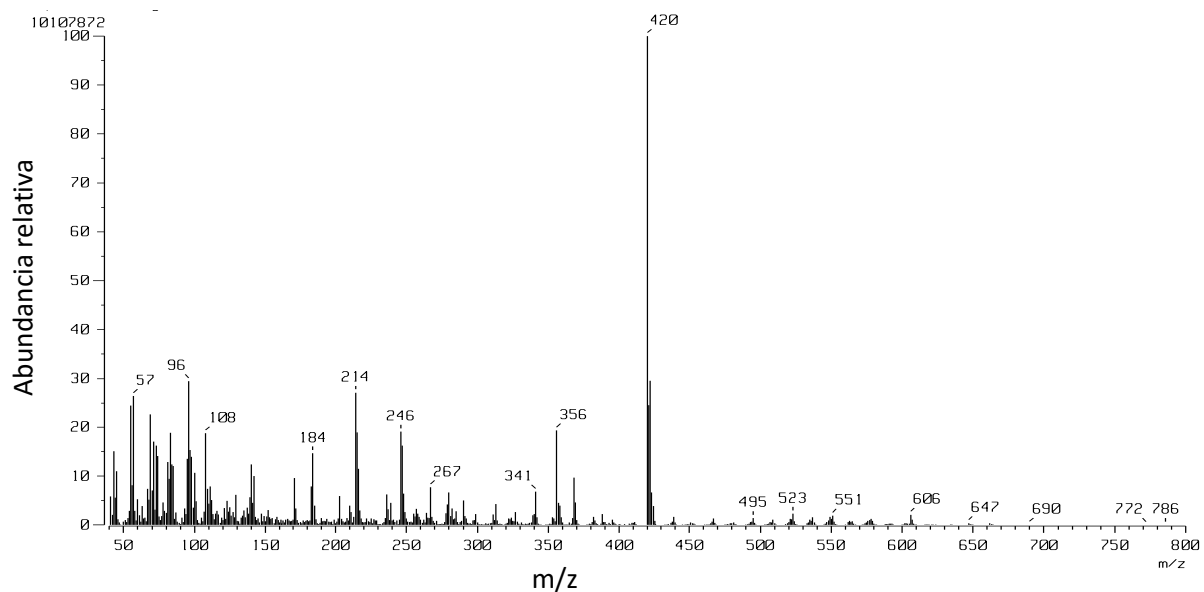
9 ANEXOS

A1. Espectro de masas de los productos CAD sintetizados a partir de 1,3-BDT en diferentes medios

Medio: 60% ACN

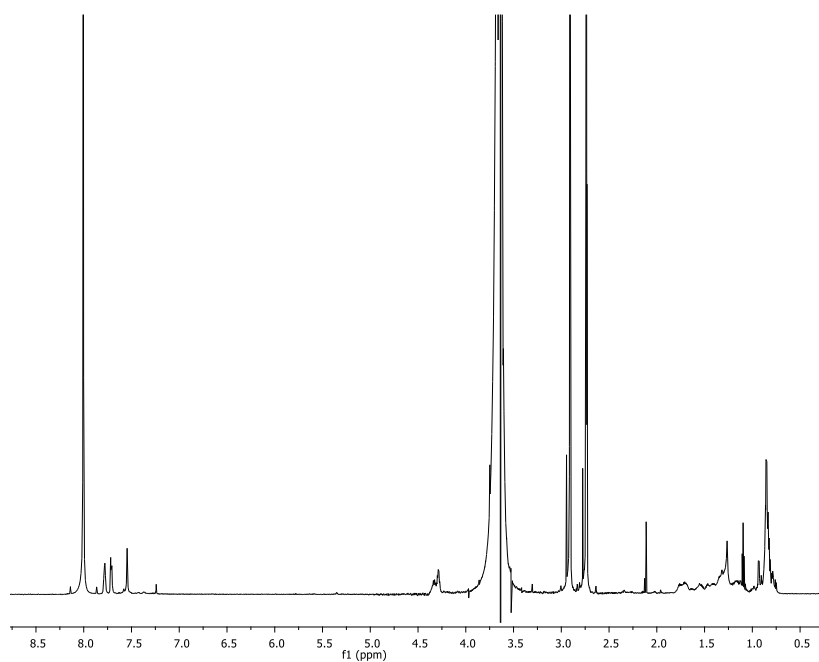


Medio: 50% acetona

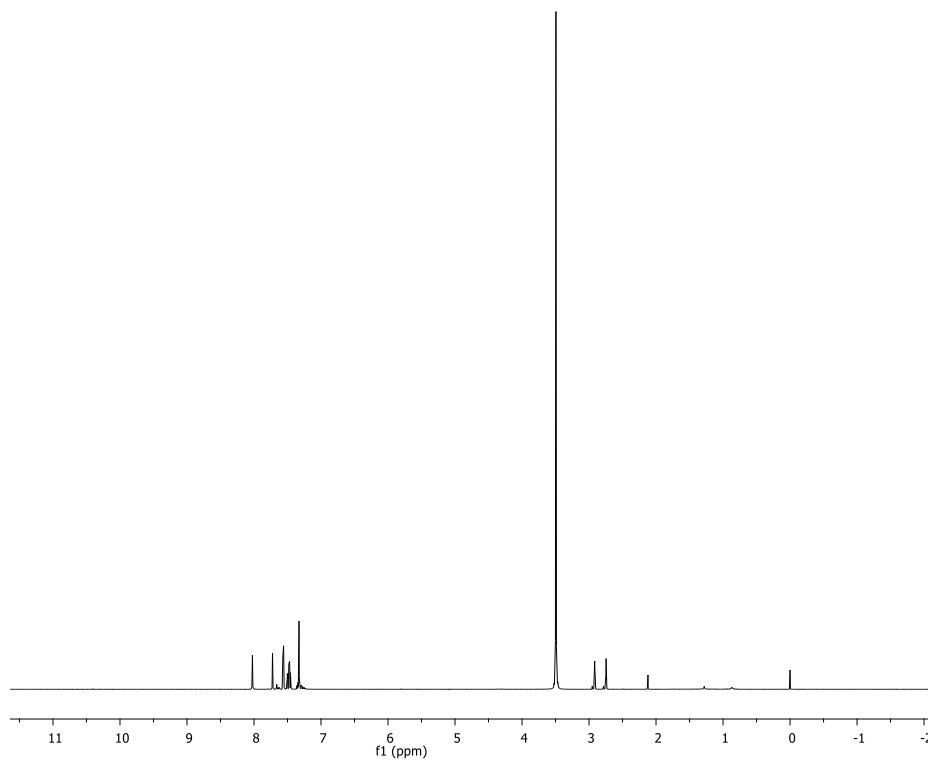


A2. Espectros completos de ^1H -RMN de los CAD

CAD derivados del 1,4-BDT

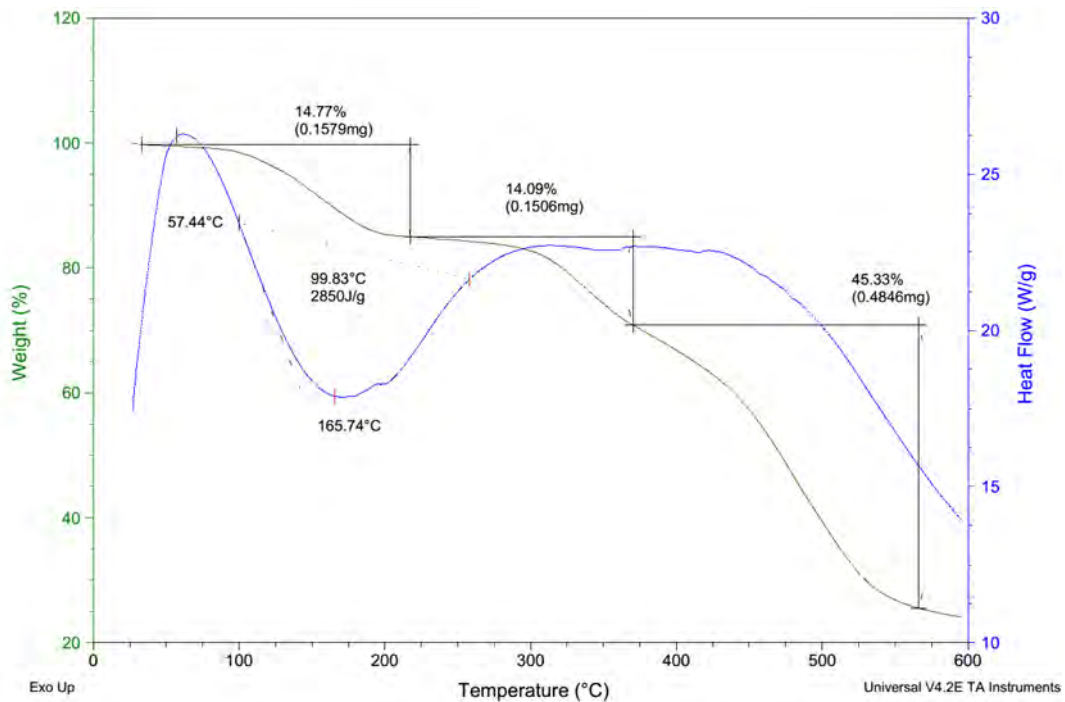


CAD derivados del 1,3-BDT

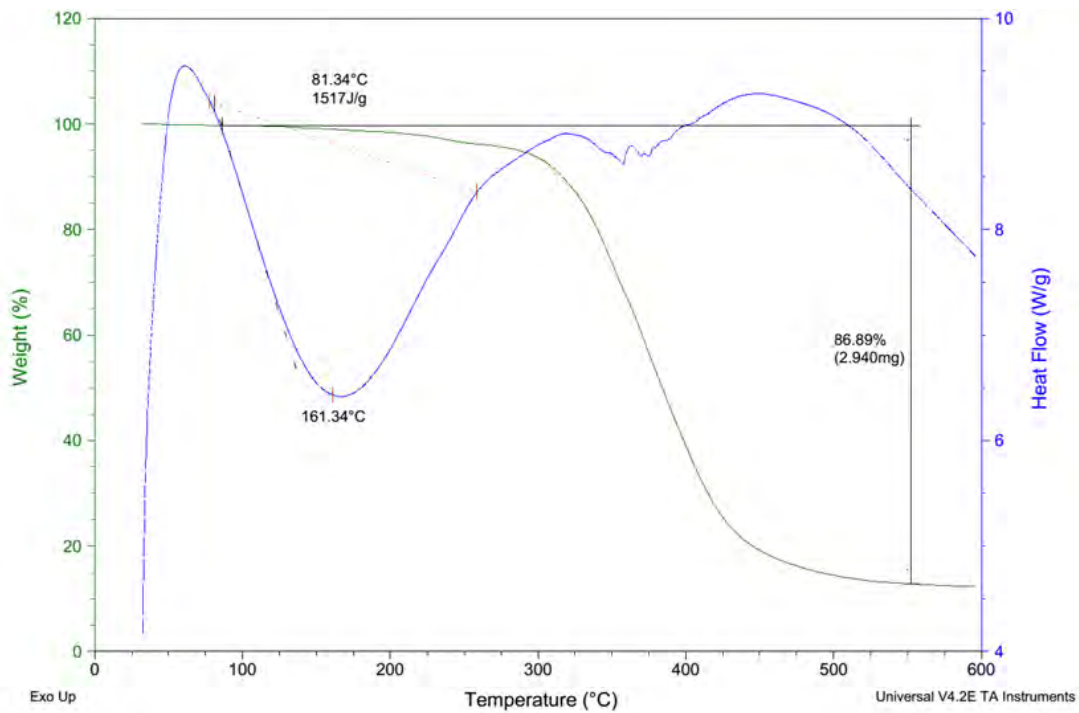


A3. Curvas de DSC (azul) y TGA (verde) de los CAD

CAD derivados del 1,4-BDT

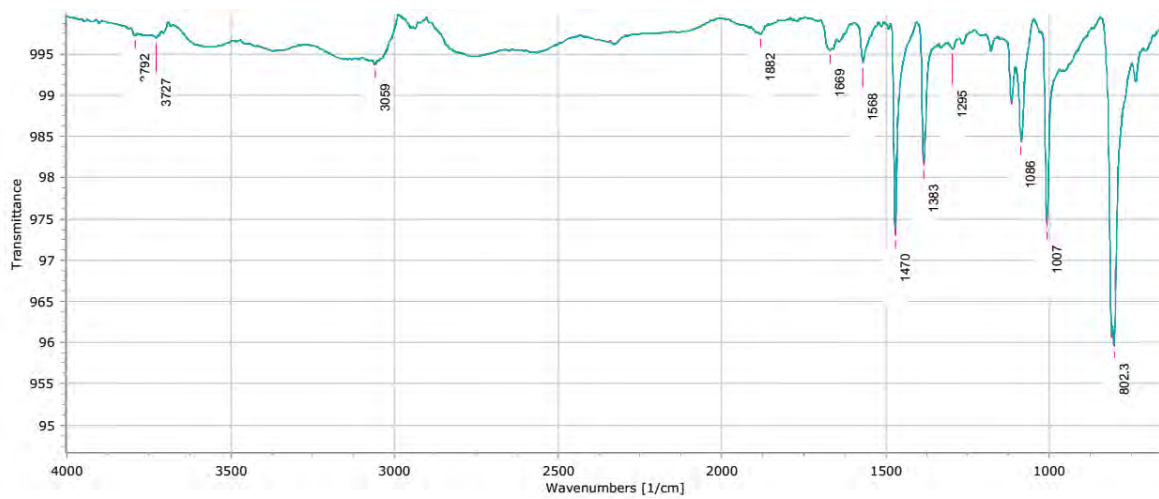


CAD derivados del 1,3-BDT

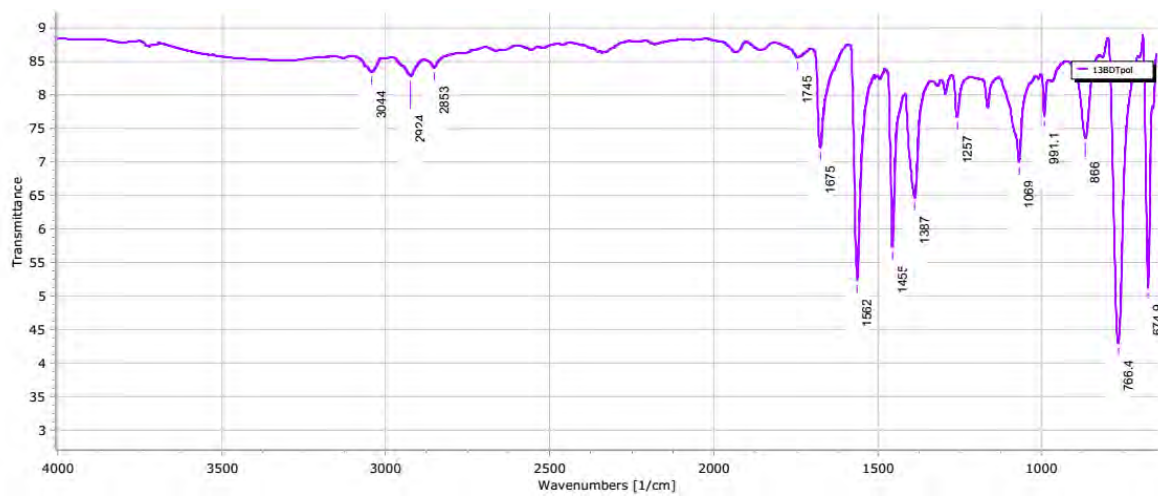


A4. Espectros de infrarrojo de los productos de mROP

Material derivado del 1,4-BDT

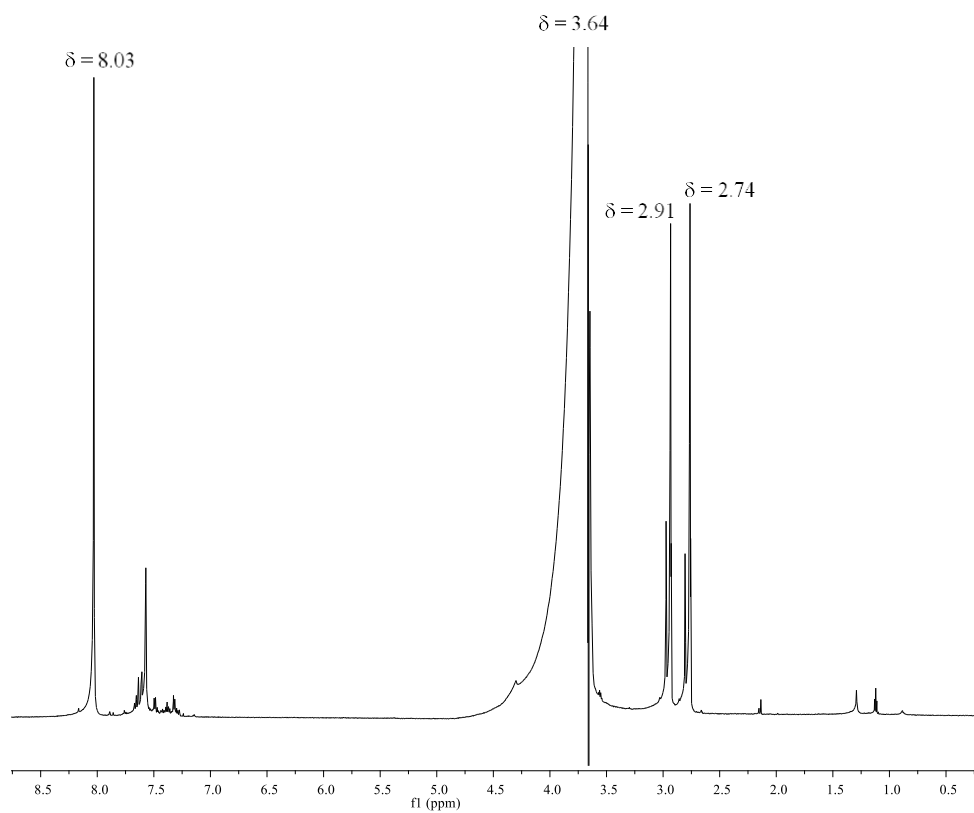


Material derivado del 1,3-BDT

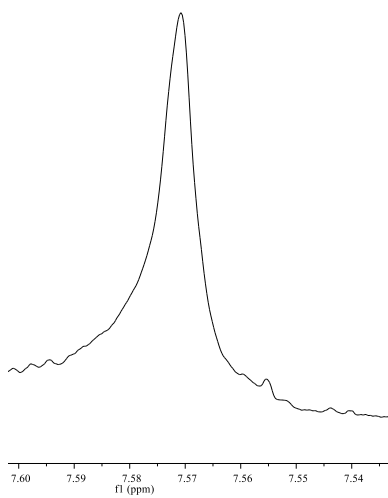


A5. Espectros de ^1H -RMN (completos y detalle) de los productos de mROP

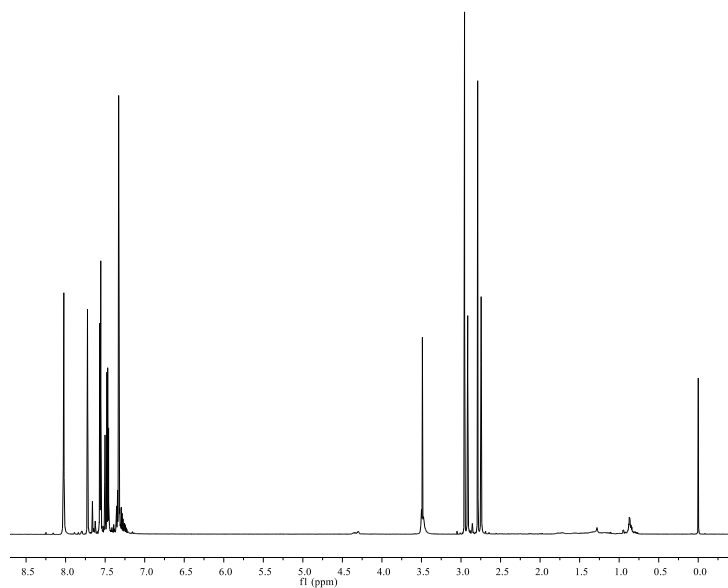
a) Productos derivados de los CAD de 1,4-BDT



δ 7.57 (4H, s)



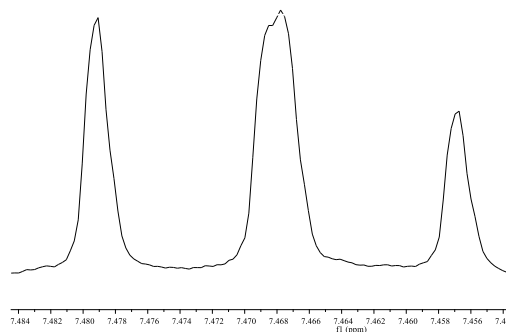
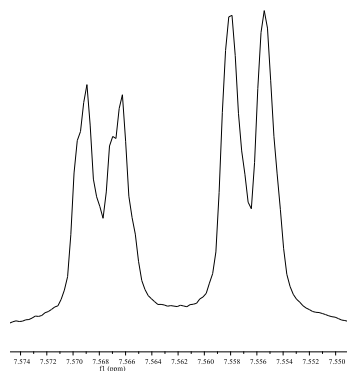
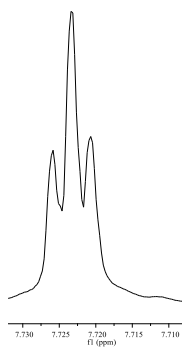
b) *Productos derivados de los CAD de 1,3-BDT*



δ 7.72 (1H, t, $J = 1.4$ Hz, $J = 2.1$ Hz, H-2)

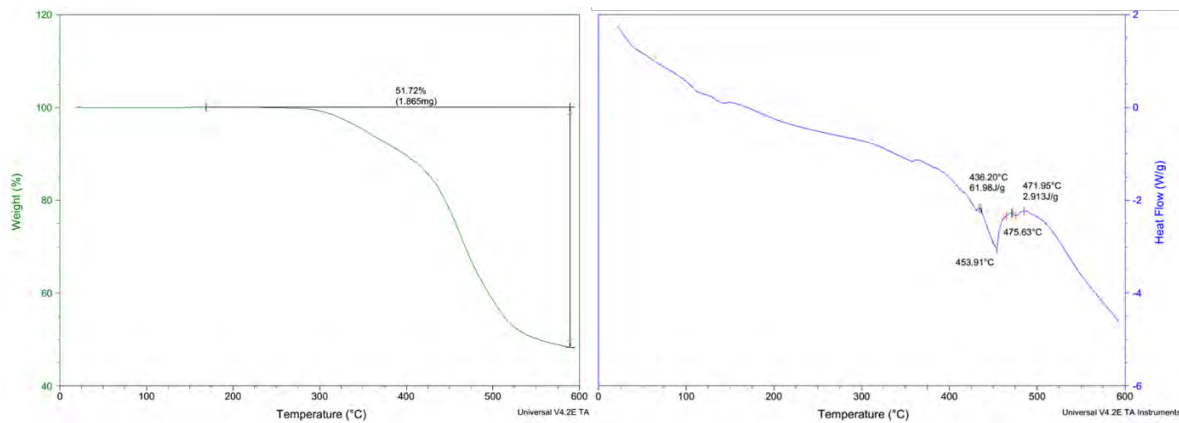
7.56 (2H, dd, $J = 1.75$ Hz, $J = 8.05$ Hz, H-4 and H-6)

δ 7.47 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, $J = 8.4$ Hz, H-5)

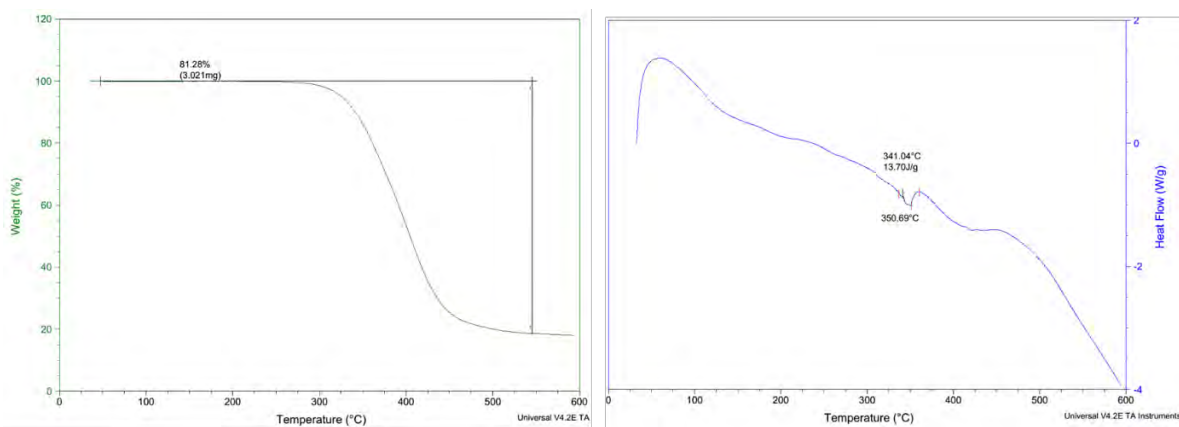


A6. Curvas de DSC (azul) y TGA (verde) de los productos de mROP

Productos derivados del 1,4-BDT



Productos derivados del 1,3-BDT



Chemoenzymatic synthesis of poly(phenylene disulfides) with insulating properties and resistant to high temperatures

Estefanía Sierra,^a Alfonso Miranda-Molina,^a Edmundo Castillo,^a Hailin Hu^b and Marcela Ayala^{a*}

Abstract

BACKGROUND: Cyclic aromatic disulfides (CAD) can be used as cross-linking agents or precursors for the synthesis of high temperature resistant polymers such as poly(phenylene disulfides) (PPD). Chemical synthesis of CAD relies on the use of corrosive agents, detrimental for the environment. This paper reports an environment friendly chemoenzymatic procedure to obtain PPD starting from simple aromatic dithiols.

RESULTS: The enzymatic reaction was carried out in an aqueous mixture with acetonitrile as co-solvent, using 1,4- and 1,3-benzenedithiol as monomers and a fungal laccase (EC 1.10.3.2) as catalyst. The products obtained were identified as mainly cyclic aromatic disulfides. Thermal analysis suggested that the enzymatically-synthesized CAD display thermal stability and are amenable precursors of high molecular weight sulfur-containing polymers through solvent-free, melt ring opening polymerization (mROP). After mROP, polymeric molecules around 12.8 kDa were obtained and identified as PPD. The resultant PPD shows uniform size, resistance to temperatures up to 400 °C and electrical insulating properties.

CONCLUSION: Laccase-catalyzed synthesis of CAD represents a novel reaction, not previously described elsewhere for oxidoreductases. A 100% substrate conversion was achieved under mild reaction conditions and no over-oxidation of CAD was observed, representing an advantage over chemical synthesis. The CAD products precipitated completely from the reaction medium, thus simplifying the purification process.

© 2017 Society of Chemical Industry

Supporting information may be found in the online version of this article.

Keywords: biocatalysis; enzymes; homogeneous catalysis; green chemistry

INTRODUCTION

The synthesis of sulfur-containing oligomers and polymers has been studied by several authors because of their interesting properties such as high melting temperature,^{1,2} thermal stability,³ biodegradability,⁴ optical activity,⁵ conductivity⁶ and photoconductivity.⁷ These properties are due to the high polarizability and high reactivity of sulfur atoms, as well as the flexibility of S–S and C–S bonds.^{8,9} Therefore, sulfur-containing polymers have several industrial applications; for instance, poly(phenylene sulfide) (PPS), a polymer comprised of aromatic rings bonded by sulfur atoms, is considered a super engineering material that shows many of the properties mentioned above.¹⁰ However, high production costs represent an obstacle for the use of this material in a broad range of industries.

Cyclic aromatic disulfides (CAD) are oligomers of aromatic rings joined by disulfide bonds. These molecules have been used as cross-linking agents¹¹ and precursors of high molecular weight polymers which are considered high temperature-resistant materials.^{12,13} The main interest in CAD synthesis lies in their lower melting temperature (T_m) compared with the corresponding linear oligomers and their low melt viscosities which facilitates the process of melt ring opening polymerization (mROP) for

the synthesis of PPD or PPS.^{14–17} Even more, the cycles can undergo ring opening polymerization without generation of any byproduct.¹⁵ The process of mROP involves an exchange reaction between disulfide bonds at temperatures above the T_m . Such a strategy avoids the need for catalysts and the exchange reaction proceeds at temperatures >150 °C.¹⁸ Therefore, it is desirable that the CAD exhibit a T_m above 150 °C to encourage ring opening and formation of high molecular weight polymers.

The synthesis of CAD has been reported using chemical agents as catalysts.^{12–20} Nevertheless, the chemical synthesis involves harsh reaction conditions and the use of strong agents;²¹ copper salts (mainly CuCl) and tetramethylethylenediamine (TEMED) have

* Correspondence to: M Ayala, Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, 62250 Cuernavaca-Morelos, Mexico. Email: maa@ibt.unam.mx

^a Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Cuernavaca-Morelos, México

^b Department of Solar Materials, Institute of Renewable Energies, Morelos, México

been used as catalysts in chemical synthesis of CAD, and the resultant CuCl-TEMED complexes must be removed during the downstream process by strong acids such as HCl solutions,^{15,18} which are difficult to reuse. TEMED is a highly caustic, rotting fish odor compound²² not suitable for industrial level applications.

On the contrary, it has been known for a long time that the use of enzymes as catalysts represents an environmentally friendly alternative since enzyme catalyzed reactions occur under mild conditions such as neutral pH, room temperature, atmospheric pressure and avoid the use of oxidizing agents and heavy metals.²³ Even more, the enzymes afford high selectivity and efficiency in terms of yields and ease of purification due to the absence of undesirable side products.²⁴

Among the most studied enzymes for oligomer and polymer synthesis, peroxidases are an important class of enzymes, and catalyze the oxidation of a substrate by transferring electrons to hydrogen peroxide.²⁵ In particular, peroxidases are able to oxidize a variety of aromatic and aliphatic dithiols.²⁶ However, these enzymes use hydrogen peroxide as electron acceptor which may result in chemical over-oxidation of the dithiol substrates generating sulfonic acids.²⁷ On the other hand, laccases (EC 1.10.3.2) are a group of multicopper oxidases that catalyze the oxidation of several organic compounds, mainly phenols to form phenoxy radicals while reducing oxygen to water.²⁸ Laccases are considered green catalysts, as they work under mild conditions (pH 4.5, 30 °C, aqueous media) and use oxygen as electron acceptor. The use of laccases for polymerization, cross-linking and functionalization of different phenols has been widely studied.^{29,30} However, the laccase-catalyzed oxidation of thiophenols has not been extensively studied. Previously, the oxidation of 1,2-benzenedithiol and 2-methoxybenzenethiol was reported using the *Trametes villosa* laccase, finding that the enzyme was able to oxidize the thiol group; when using 1,2-benzenedithiol as substrate, thiol groups coupled into disulfide bonds.³¹ More recently, the oxidative coupling of heterocyclic thiols, catalyzed by two fungal laccases was reported with yields as high as 95%.³² Thus, laccases are promising catalysts for the synthesis of aromatic disulfides; nevertheless the low water solubility of the aromatic thiols demands the use of organic solvents, which could be a bottleneck due to the loss of enzyme activity in these systems.³³

In this work we report the enzymatic synthesis of CAD using a fungal laccase from *Corioloopsis gallica*, an enzyme that exhibits wide substrate specificity.^{34,35} Laccase-catalyzed synthesis of CAD represents a novel reaction, not previously reported for this enzyme. The kinetic parameters for the enzyme towards dithiolic substrates were determined. We selected suitable water/solvent mixtures to carry out the enzymatic reaction. The reaction proceeded to 100% substrate conversion and no over-oxidation products were observed. The products obtained were recovered and characterized according to their structural and thermal properties, such as molecular weight, chemical structure, thermal decomposition and T_m . These CAD were used for mROP and the structural, thermal and conductive properties of the materials obtained were determined. Our results indicate that the obtained materials are insulating polymers resistant to high temperatures

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals

1,3-benzenedithiol and 1,4-benzenedithiol were purchased from Alfa Aesar and used as received. Syringaldazine was purchased from Sigma-Aldrich Co. Acetone and acetonitrile of HPLC grade

were purchased from JT Baker® and used without further purification. *Corioloopsis gallica* laccase was produced and purified in our laboratory as previously reported.³⁴

Enzymatic assay

Laccase activity was determined by following the appearance of the oxidation product of syringaldazine at 530 nm ($\epsilon = 6.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The reaction mixture (1 mL) contained $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ of the substrate in 60 mmol L^{-1} succinate buffer (pH 4.5) and was initiated by adding the enzyme. One unit of laccase activity was defined as the amount of enzyme necessary to catalyze the generation of $1 \mu\text{mol}$ of product per minute.³⁶ All measurements were performed at least in triplicate.

Kinetic characterization of the enzyme

The catalytic constants of the enzyme during the oxidation of dithiol substrates (1,3- and 1,4-benzenedithiol) were obtained following substrate depletion in a 5 mL-reaction mixture containing thiolsubstrate (0.02 to 1 mmol L^{-1}), 60 mmol L^{-1} succinate buffer (pH 4.5) and 10% acetonitrile. The reactions were performed at 30 °C and were started by adding laccase. $100 \mu\text{L}$ samples were periodically taken, and mixed with $1 \mu\text{L}$ of a HCl solution to lower pH to 2 and stop the reaction. The reaction progress was followed by HPLC (Agilent 1220 Infinity series) equipped with a reverse phase Nucleosil® C-18 Column ($5 \mu\text{m}$ particle size, $L \times \text{I.D.}$ $25 \text{ cm} \times 3.2 \text{ mm}$) and coupled to a diode array detector using 260 nm for dithiols detection. The initial reaction rates (V_i) for each substrate concentration were calculated as the decrease in the area of the peak with time, and the data were adjusted to a Michaelis-Menten equation in order to calculate the k_{cat} and K_M for the dithiol oxidation. Three independent measurements of all experiments were performed.

Enzyme activity in water/solvent mixtures

The effect of solvent concentration on laccase activity was determined for three different solvents, i.e. acetone, acetonitrile and tetrahydrofuran. The enzyme was added to mixtures containing the solvent and succinate buffer (pH 4.5) and the activity was monitored by adding syringaldazine, both immediately and after 1 h incubation.

Synthesis of CAD

The CAD synthesis was carried out in 10% v/v acetonitrile. 450 mL of the mixture were vigorously stirred in a beaker flask while 50 mL of a 10 mmol L^{-1} benzenedithiol solution in the corresponding solvent was added dropwise (final concentration: 1 mmol L^{-1}). The reaction was initiated by adding the enzyme (0.5 – 1 U mL^{-1}) and monitored by HPLC until substrate depletion (30–60 min reaction time). The resulting products of the reaction precipitated out of the solution. When using 1,4-benzenedithiol as substrate, the products were filtered and washed twice with 500 mL of a 10% acetonitrile–water mixture. The recovered solid was dried at 60 °C for 24 h. In the case of the 1,3-benzenedithiol products, they were first concentrated by distillation and then filtered, washed and dried as described above. The reaction was performed at least in triplicate and reported yields were reproducible among different batches. Control reactions were carried out by bubbling O_2 into the reaction media without addition of the enzyme.

Melt ring opening polymerization

Melt ring opening polymerization (mROP) was carried out in a stainless steel 4540 high pressure reactor (Parr Instruments) equipped with a thermocouple and a jacket with an operating temperature up to 500 °C. 100 mg of CAD were deposited on Pyrex® beakers and heated in the reactor at 200 °C for 2 h under nitrogen atmosphere. The materials obtained were recovered for further characterization.

Photoconductivity measurement of PPD

Photoconductivity was measured according to the parallel planar layer method.³⁷ Polymeric films were deposited on Corning glass substrates by spin-coating with a rotational speed of 700 rpm from a solution of 2–6 mg mL⁻¹ of polymer in dimethyl formamide. Photoconductivity was measured as the electric response under 20 V between 2 coplanar Ag electrodes on top of the polymeric films. The electrode length and separating distance were about 5 mm each one. Photoconductivity was calculated from the current–time (I–t) curves, under ambient conditions, in both darkness and under illumination with a tungsten-halogen lamp of 40 mW cm⁻². A negative control experiment was performed by measuring the current between Ag electrodes on the top of a Corning glass without any film. All experiments were carried out in triplicate.

Gel permeation chromatography analysis of PPD

Gel permeation chromatography (GPC) was performed using an Alliance GPC-2695 instrument coupled to a UV–vis Waters 2998 detector at 248 nm. The GPC instrument was equipped with two linear mixed C columns arranged in series with THF as solvent. The apparent molecular weight data was reported according to polystyrene standards.

Infrared and Raman spectroscopy of CAD and PPD

All the products were analyzed, as powders, by FTIR and Raman spectroscopy. FTIR spectra were recorded in a PerkinElmer® RX1 Spectrum equipped with a Miracle Single-Reflection ATR device. The spectra were analyzed using the software Spekwin32 v.1.71.6.1. Raman spectra were obtained with a Raman disperse spectrometer (Almega XR) equipped with an Olympus microscope (BX51). The 50X objective was used to focus the laser on the sample and the scattering light was collected in a 180° lightscattering configuration. The Raman spectra were accumulated over 25 s with a resolution of 4 cm⁻¹ and the excitation source was 532 nm radiation from a Nd:YVO4 laser.

Mass spectrometry of CAD

The products were analyzed by mass spectrometry using a high-resolution mass spectrometer JMS700-JEOL equipped with a probe for direct insertion of solids. The analysis used electroionization with positive ions detection. The conditions were: calibration standard PFK, chamber temperature 250 °C, heating rate 125 °C min⁻¹, ionization potential 70 eV.

Nuclear magnetic resonance analysis

¹H NMR spectra were recorded at 700 MHz (16.45 T) on a Varian VNMRS NMR instrument. Samples were dissolved in *N,N*-Dimethyl-*d*₆-formamide (Sigma-Aldrich). The chemical shifts are listed in parts per million and referenced to the signal at

Table 1. Kinetic constants of laccase from *C. gallica* for the oxidation of aromatic dithiols compared to other substrates. Standard deviation in parentheses

Substrate	k_{cat} (s ⁻¹)	K_{M} (μmol L ⁻¹)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ (M ⁻¹ s ⁻¹)	Reference
1,4-BDT*	13.5 (0.79)	419.2 (73)	3.0×10^4	This work
1,3-BDT*	11.9 (0.78)	257.8 (60)	4.6×10^4	
Sinapic acid**	12.8	30	4.3×10^4	38
Syringaldehyde**	3.8	120	3.2×10^4	
Syringaldazine**	8.8	790	1.1×10^4	

*Measured in the presence of 10% acetonitrile
**Measured in the presence of 10–20% acetonitrile

8.03 ppm (s). CADs and mROP products were analyzed at concentrations of 6.5 mg mL⁻¹ (1,3-BDT-derived materials) and 1 mg mL⁻¹ (1,4-BDT-derived materials). The spectra were edited in MestReNova program version: 6.0.2-5475.

Thermal analysis of CAD and PPD

Thermogravimetric and differential scanning calorimetric analysis were carried out using a DSC-TGA instrument SDT Q600. CAD samples were heated from 25 to 600 °C at a rate of 10 °C min⁻¹ under a nitrogen atmosphere. mROP products were first heated from 25 to 280 °C to remove any residual of CAD, then cooled and heated again from 25 to 600 °C; both heating cycles were performed at a rate of 10 °C min⁻¹ under a nitrogen atmosphere.

RESULTS AND DISCUSSION

Kinetics of laccase-catalyzed oxidation of 1,3 (1,3-BDT) and 1,4-benzenedithiol (1,4-BDT) followed a typical Michaelis-Menten behavior (Fig. 1S in Supplementary material). The catalytic parameters obtained are shown in Table 1. Overall, the catalytic efficiency ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) is in the order of 10⁴ M⁻¹ s⁻¹, which is comparable with the catalytic efficiency of the enzyme during the oxidation of standard, natural-like substrates such as syringaldazine and ABTS and under similar reaction conditions.³⁸ For both substrates, the K_{M} is within the range of the natural substrates of this enzyme³⁶ and lower than K_{M} values reported for various laccase-catalyzed oxidations of analogous phenols and anilines.³¹ Due to the comparatively small size of the substrates, no steric impediments are expected, as has been found for other laccase substrates.³⁹ Efficient catalysis with 100% conversion was observed due to the high redox potential of this enzyme.⁴⁰

In order to improve substrate solubility in the reaction medium, several water–organic solvents were analyzed after its ability to solubilize the substrate as well as preserve enzyme activity. Polar solvents such as acetone, acetonitrile and tetrahydrofuran might represent better choices for favoring the solubility of these substrates. Bearing in mind that organic solvents may decrease the catalytic activity of enzymes,⁴¹ the specific activity and stability of laccase were measured in the presence of different concentrations of organic solvent, both immediately upon mixing the enzyme with the mixture and after 1 h incubation of the enzyme in the same mixture. As shown in Fig. 1(a)–(c) laccase activity decreases as the solvent concentration increases. For THF the enzyme activity dramatically decreased in the presence of 10% of the solvent. Not only is residual activity after 1 h incubation less than 100%,

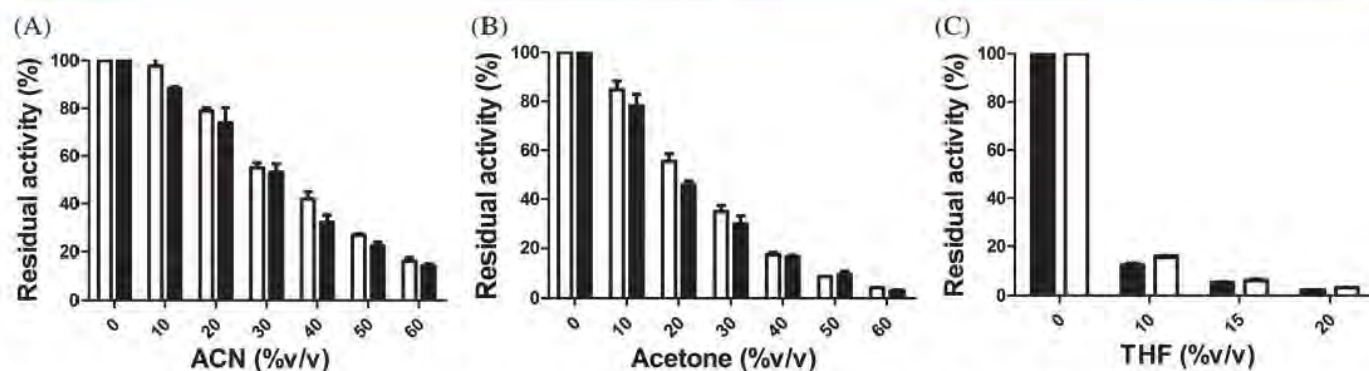


Figure 1. Residual activity of laccase in different solvents, immediately upon mixing with the reaction medium and after 1 h incubation. White bars: initial activity, before incubation, Black bars: activity after 1 h incubation.

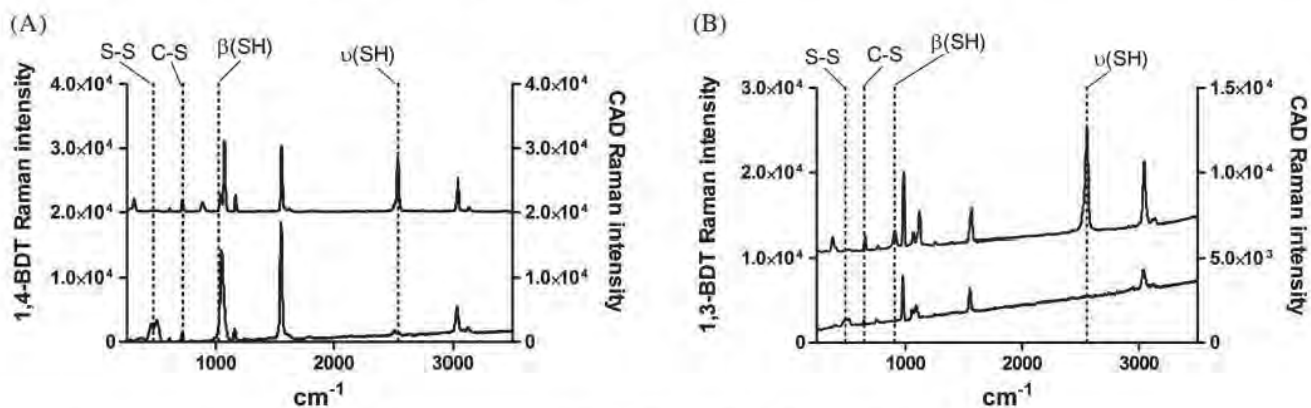


Figure 2. Raman spectra of enzymatically-synthesized CAD from 1,4-BDT (a) and 1,3-BDT (b). Upper line: substrate; lower line: product.

but also the initial activity decreases, even with no previous incubation of the enzyme in the presence of the solvent. This phenomenon might be due to an unfavorable substrate partition from the medium towards the active site of the enzyme, as has been observed for other enzymes working in water–organic solvent mixtures.⁴¹ Based on these results, we selected 10% acetonitrile as co-solvent for the enzymatic oxidation of dithiols because the enzyme retained >90% activity after 1 h in this reaction medium and showed higher residual activity at higher solvent concentrations than acetone-containing media.

The enzymatic reaction was carried out as described in the experimental section at 10% v/v acetonitrile and pH 4.5. For both substrates, products precipitated during the course of the reaction and the end of the reaction was determined by substrate depletion (according to HPLC, approximately 1 h). HPLC analysis of the reaction supernatant indicated no soluble products are present. In all reactions 100% substrate conversion was reached and product purification was simplified due to their insolubility in the reaction medium. Final yields for the purified products were 80% and 26% for reactions with 1,4-BDT and 1,3-BDT as substrates, respectively. Lower recovery yields for the 1,3-BDT-derived products are mainly due to their sticky consistency and difficulty in handling and recovering; for this reason, although the enzymatic reaction proceeded to 100% substrate conversion and no other products (i.e. soluble products) were detected, the recovery yield was significantly lower compared with the 1,4-BDT-derived products. No substrate consumption was detected by HPLC in the control reactions where O₂ was bubbled for 1 h into the reaction media in the absence of enzyme, thus indicating that spontaneous non-catalyzed reaction is absent.

Products were analyzed through FTIR (Fig. 2S in Supplementary material) and Raman spectroscopy in order to confirm the absence of thiol groups (i.e. –SH, 880 and 2550 cm⁻¹) and appearance of disulfide groups (–S–S–, between 450 and 580 cm⁻¹).⁴² For the two substrates, the product spectra showed a signal corresponding to the disulfide bond; meanwhile, an absent or greatly diminished thiol signal was observed, which suggest a cyclic conformation of the products. Typical Raman spectra are shown in Fig. 2 for 1,4-BDT and products (a) and for 1,3-BDT and products (b). 1,3-BDT-derived products were difficult to analyze and the corresponding signals were weak. In order to account for the different intensity of the signals, the results were analyzed in terms of the ratio of disulfide and thiol signals to a reference signal (1560 cm⁻¹, corresponding to an aromatic ring vibrational mode⁴²) as shown in Table 2. From these results it is clear that the enzyme catalyzes the oxidation of thiol moieties and the products are mainly molecules with disulfide bonds. New peaks corresponding to sulfur oxides, which are commonly strong near 1130 cm⁻¹,⁴³ were not detected, indicating that the products were not over-oxidized during enzymatic synthesis.

High resolution mass spectrometry of the solid samples was performed in order to obtain more information on the chemical structure of the products, and the results are shown in Fig. 3. For both substrates, the observed signals correspond to CAD. In the case of 1,3-BDT-derived products, cyclic trimers (420 m/z) were clearly identified (Fig. 3(a)). Signals corresponding to dimers (282 m/z) were also observed but with low relative abundance. On the other hand, for 1,4-BDT-derived products, a small signal corresponding to a cyclic tetramer was observed (560 m/z) (Fig. 3(b)); the cyclic trimer was clearly present and its signal was 103 most abundant

Table 2. Raman spectra signals corresponding to thiol and disulfide bonds from substrates and enzymatically-synthesized CAD			
Substrate	Sample	Thiol (2550 cm^{-1})/ reference (1560 cm^{-1}) signal ratio	Disulfide (520 cm^{-1})/ reference (1560 cm^{-1}) signal ratio
1,4-BDT	1,4-BDT (control)	0.836	0.012
	Products recovered from enzymatic reaction	0.017	0.18
1,3-BDT	1,3-BDT (control)	3.078	0.054
	Products recovered from enzymatic reaction	0	0.397

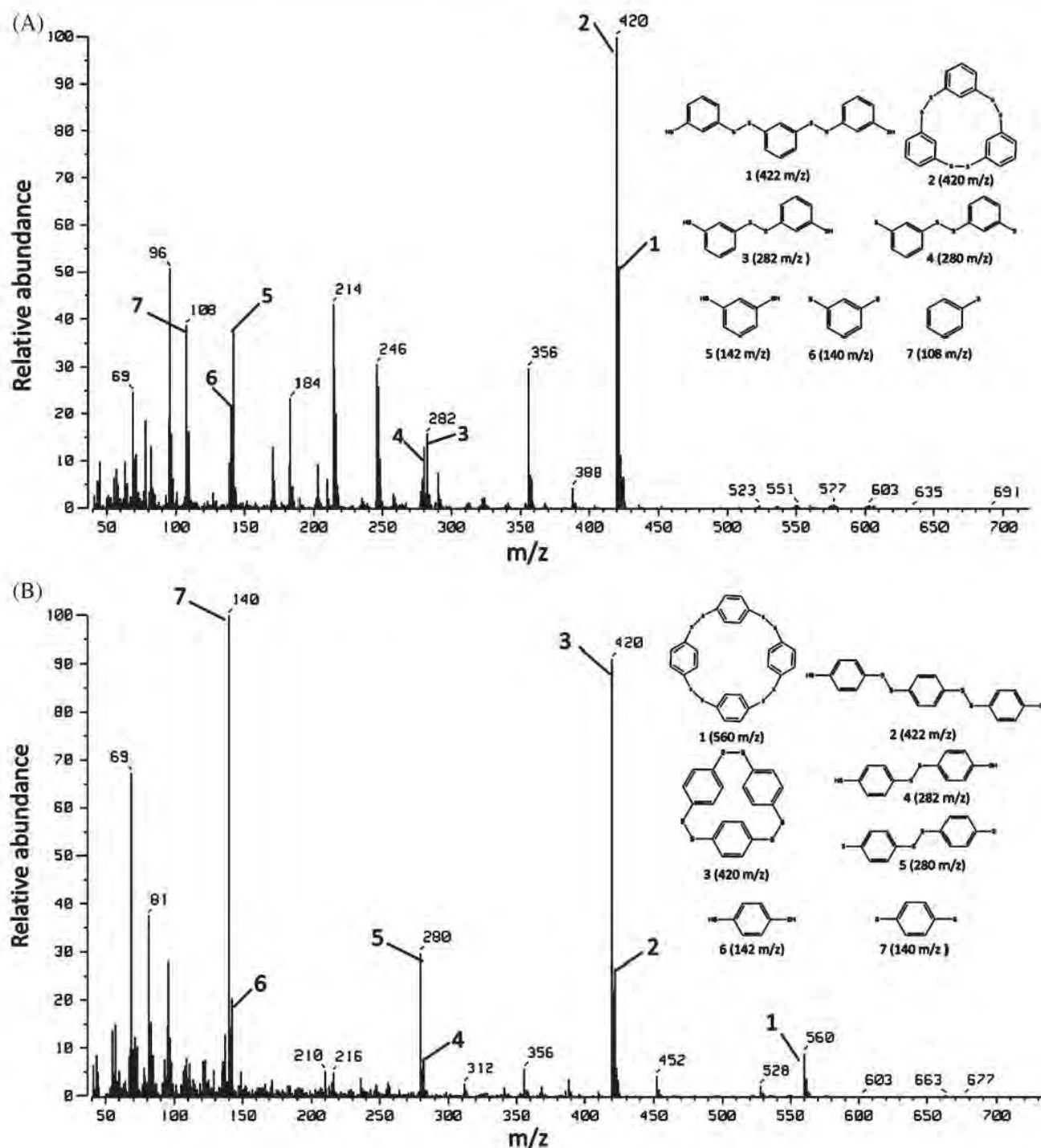


Figure 3. Mass spectra of enzymatically-synthesized CAD derived from (a) 1,3-BDT and (b) 1,4-BDT.

(420 m/z). For both 1,3 and 1,4-BDT derived products, a signal corresponding to lineal trimers (422 m/z) was detected. However, it is a relatively small signal (relative abundance of 51 for 1,3-derived material and relative abundance of 24 for 1,4-derived material) in correspondence with the absence of thiol peaks as observed in Raman spectra.

Higher solvent concentration, 60% acetonitrile or 50% acetone, was also tested in order to favor the synthesis of higher molecular weight products; however, no additional products were detected under such conditions (data not shown). According to these results, the enzymatic conversion of 1,3-BDT and 1,4-BDT produced CAD, independently of the reaction media. It is important to highlight that this is a novel reaction, not previously described for laccases or even other oxidoreductases capable of subtracting electrons from phenols, aromatic amines or thiols, such as peroxidases. It is likely that the medium redox potential of laccase precludes overoxidation of sulfur atoms in the polymer, mainly favoring the production of thyl free radicals that further polymerize upon formation in aqueous solution. These products were not sufficiently soluble in solvents such as acetone, acetonitrile, tetrahydrofuran and chloroform and also non-polar solvents such as toluene and hexane, therefore further characterization such as gel-permeation chromatography could not be performed. Thus, NMR analysis was performed in order to corroborate the absence of free thiols and ramifications in the CAD.

The $^1\text{H-NMR}$ spectra of the CAD derived from 1,3-BDT and 1,4-BDT (Fig. 3S in Supplementary material) clearly show that there is no proton signal due to the SH group at either 3.5 or 1.6 ppm, in accordance with Raman results. As expected, the proton signals on the aromatic ring of CAD are downfield compared with the substrate, due to the higher oxidation number of the sulfur atom in the disulfide group.

Interestingly, the $^1\text{H-NMR}$ spectrum for the 1,4-BDT-derived CAD showed three well defined signals in the aromatic region: those appearing at 7.78 (2H, ddd, $J = 2.8$ Hz, $J = 2.8$ Hz, $J = 5.6$ Hz, H-2 and H-3) ppm and at 7.71 (2H, ddd, $J = 3.32$ Hz, $J = 3.32$ Hz, $J = 6.13$ Hz, H-5 and H-6) ppm (supplementary data) were signals coupled to each other. These values reflect the cyclic nature of the molecule. The peak at 7.54 ppm in the spectrum could correspond to the 1,4-BDT-derived linear backbone. These results reveal that the sample was a mixture of predominantly (67%) 1,4-BDT-cyclic trimer as well as 1,4-BDT linear trimer (determined by $^1\text{H NMR}$), in accordance with the observation of MS. On the other hand, the $^1\text{H-NMR}$ spectrum for the 1,3-BDT-derived CAD indicated the presence of three main signals due the symmetry of the monomer: δ 7.72 (1H, t, $J = 1.4$ Hz, $J = 2.1$ Hz, H-2); 7.56 (2H, dd, $J = 1.75$ Hz, $J = 8.05$ Hz, H-4 and H-6) and δ 7.47 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, $J = 8.4$ Hz, H-5) (Supplementary data), respectively.

Thermal properties of the enzymatically-synthesized CAD were determined through TGA-DSC analysis (Fig. 5S in Supplementary data). The results suggest that the enzymatically-synthesized CAD may serve as precursors for mROP, as T_m is between 160 and 165 °C (Table 3). The mROP of the CAD without adding any catalyst or solvent has to be carried out above their melting point in order to favor the thermolysis reaction which generates high molecular weight polymers.¹⁴ mROP performed at temperatures below 150 °C has been observed to be inefficient¹⁹ while at temperatures above 200 °C trisulfide linkages may occur as well as cross-linking reactions, which result in low molecular weight polymers.¹⁹ According to these restrictions on temperature, T_m of the enzymatically-synthesized CAD is appropriate for mROP.

Table 3. TGA and DSC-derived thermal properties of enzymatically-synthesized CAD

Substrate	TGA		DSC	
	T (°C)	Mass loss (%)	Accumulated mass loss (%)	
1,4-BDT	25–200	20	20	165
	200–400	18	38	
	400–600	36	74	
1,3-BDT	25–200	16	16	160
	200–400	17	33	
	400–600	46	79	

Table 4. Molecular weight parameters of 1,3-BDT derived polymer

Compound	M_n	M_w	M_p	PI (M_w/M_n)
1,3-BDT polymer	9417.5 ± 75	12884 ± 69	12275.5 ± 103	1.37

M_n : number average molecular weight, M_w : weight average molecular weight, M_p : average molecular weight.

Regarding thermal stability of CAD under inert atmosphere (Table 3), 1,3-BDT-derived CAD showed remarkable stability with a mass loss of less than 6% at 300 °C; for comparison, chemically synthesized molecules show a mass loss of 5% at 376 °C.¹⁸ On the other hand, 1,4-BDT-derived CAD showed c. 20% mass loss at temperatures between 25 and 200 °C; compared with chemically-synthesized molecules (mass loss 5% at 380 °C¹⁸) they are less stable. This difference could be attributed to the presence of linear molecules in the sample (as observed by MS), which may lower the apparent stability of the mixture. Enzymatically-synthesized CAD are amenable for mROP since the optimal temperature to carry out this process is 200 °C as mentioned above. At this temperature both, 1,3 and 1,4-BDT-derived products are relatively stable.

In order to obtain polymers from enzymatically synthesized CAD, ring opening polymerization was carried out in the melt, at a higher temperature than the melting point of the CAD. Since 200 °C has been previously reported as an appropriate temperature for mROP of phenylendisulfide cycles,¹⁹ we choose this condition to perform the polymerization of the CAD. After a 2 h reaction, we obtained dark yellow brilliant products from both 1,3- and 1,4-BDT-derived CAD. The gel permeation chromatography (GPC) of the 1,3-BDT-derived polymer shows a product with an average molecular weight of 12 kDa, and a polydispersity index (PI) of 1.37. The value of PI is moderate, i.e. the polymer has a relatively uniform size which is a desirable property from the point of view of polymer engineering. The characteristic weight parameters calculated according to the polymer molecular weight distribution are shown on Table 4. The chemical synthesis of 1,3-BDT derived oligomers has been previously reported,⁴⁴ albeit with a low degree of polymerization (6-units); the polymer obtained in this work has an average degree of polymerization of 91. 1,4-BDT-derived material was not sufficiently soluble in THF and thus GPC could not be performed.

Products derived from mROP were also analyzed through Raman and FT-IR spectroscopy in order to confirm that disulfide bonds are still present in the polymeric chains and to exclude the

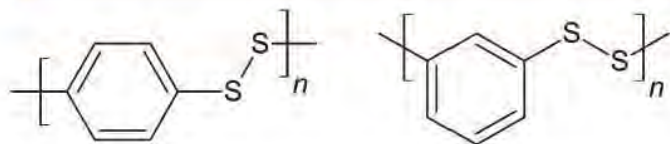


Figure 4. Suggested structure of 1,4-BDT (left) and 1,3-BDT (right) derived PPD.

formation of sulfur oxides during the polymerization procedure. The spectra obtained (Fig. 2S in Supplementary data) showed only signals corresponding to disulfides and the aromatic ring. No sulfur oxides signals around 1130 cm^{-1} were detected, indicating that the products were not oxidized during mROP.

Moreover, NMR analysis supported the formation of poly(phenylendisulfide) after mROP. The absence of both ramifications and oxidation signals were confirmed by $^1\text{H-NMR}$ spectra of both 1,3-BDT and 1,4-BDT-derived materials. The $^1\text{H-NMR}$ spectrum of 1,4-BDT-derived material was less complex than that of CAD, and showed an intense signal at 7.57 ppm. This indicates less interactions between protons on aromatic rings once 1,4-BDT-derived CAD polymerize into larger molecules. No signals at 7.78 ppm and 7.71 ppm were observed. As expected, the $^1\text{H-NMR}$ spectrum for the 1,3-BDT-derived polymer was very similar to that of CAD (Fig. 3S and 5S in Supplementary data). All of this structural information suggests the materials derived from the chemoenzymatic synthesis described in this work have the structure shown in Figure 4.

Regarding thermal properties (Figs. 6S and 7S in Supplementary data), approximately 10% weight loss is observed at $350\text{ }^\circ\text{C}$ for 1,3-BDT-derived polymer and $400\text{ }^\circ\text{C}$ for 1,4-BDT-derived material. The 1,3-BDT-derived poly(phenylendisulfide) is not as stable as PPS which exhibits a 10% weight loss at $520\text{ }^\circ\text{C}$,⁴⁵ but its thermal behavior is very similar to other poly(phenylendisulfides) that lose 10% weight at $390\text{ }^\circ\text{C}$.¹⁹ According to DSC analysis, the T_m for both materials ($337\text{ }^\circ\text{C}$ and $450\text{ }^\circ\text{C}$ for 1,3-BDT and 1,4-BDT derived materials respectively) is higher than the reported for PPS ($280\text{--}290\text{ }^\circ\text{C}$)^{14,45} which is considered a high temperature resistance polymer. Neither glass transition temperature nor crystallization temperature signals were observed, indicating the materials are crystalline. The enhanced thermal behavior of 1,4-BDT derived materials could be explained by the higher packaging efficiency of the *para*-oriented polymer due to less steric effects between its polymeric chains. In fact, the influence of chain flexibility and packaging efficiency on the enhanced thermal behavior of sulfur-containing polymers regarding oxygen-containing materials, has been reported previously.^{8,9}

We also found that the conductive properties of the synthesized materials are in the limit between insulators and semiconductors^{46,47} ($1.12 \times 10^{-7} \pm 3 \times 10^{-8}$ and $7.13 \times 10^{-8} \pm 2.8 \times 10^{-9}$ S/cm for 1,4-BDT- and 1,3-BDT-derived materials, respectively). Moreover, there is not a significant change in the electric response during light exposure, thus we conclude that the polymeric materials are not photoconductive. The electrical insulating properties, along with their resistance to high temperatures, suggests that these materials could be used as coatings for vessels involved in several industrial processes in a similar way to PPS.¹⁰

CONCLUSIONS

We have shown that aromatic dithiols 1,3 and 1,4-benzenedithiol are oxidized by a fungal laccase in the presence of oxygen as

electron acceptor using 10% acetonitrile in pH 4.5 buffer as reaction media. In the product mixture we identified mainly cyclic aromatic disulfides (CAD). To the best of our knowledge, this is the first report on enzymatic synthesis of CAD. The laccase from *C. gallica* was shown to be active in the reaction medium, although a decrease in activity was observed in the presence of high concentrations of organic solvents. The advantages of the enzyme-catalyzed synthesis of CAD are: highly efficient reaction with 100% substrate conversion; simple purification procedure of CAD from reaction medium; no over-oxidation of products was detected and mild reaction conditions were used ($30\text{ }^\circ\text{C}$ and low solvent concentration). According to their thermal properties enzymatically-synthesized CAD can be used as precursors of high molecular weight polymers. After mROP *meta*-substituted polymers in the range of 12 kDa (average molecular weight) that showed good thermal resistance, crystalline packaging and low conductivity were obtained. The properties of the obtained polymers make them promising for a variety of applications. These results highlight the benefits of combining chemical and enzymatic processes, in particular in the production of novel polymers.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge grants CONACyT 179241 and 235420 for financial support. The authors thank Dr Roberto Sato for Raman analysis in the Laboratory of Materials and Nanotechnology at the Center for Applied Sciences and Technological Development of the National Autonomous University of Mexico (CADET-UNAM); Dr. Alfredo Martínez and Dr. Alejandra Vargas from IBT UNAM for access to the reactor to perform mROP; Dra. Patricia Altuzar from IER UNAM; and Biol. Rosa Román from IBT UNAM for technical support.

Supporting Information

Supporting information may be found in the online version of this article.

REFERENCES

- 1 Kato M, Toshima K and Matsumura S, Preparation of aliphatic poly(thioester) by the lipase-catalyzed direct polycondensation of 11-mercaptoundecanoic acid. *Biomacromolecules* **6**:2275–2280 (2005).
- 2 Kato M, Toshima K and Matsumura S, Enzyme-catalyzed preparation of aliphatic polythioester by direct polycondensation of diacid diester and dithiol. *Macromol Rapid Commun* **27**:605–610 (2006).
- 3 Kausar A, Zulfiqar S and Sarwar MI, Recent developments in sulfur-containing polymers. *Polymer Rev* **54**:185–267 (2014).
- 4 Graf TA, Yoo J, Brummett AB, Lin R, Wohlgenannt M, Quinn D *et al.*, New polymers possessing a disulfide bond in a unique environment. *Macromolecules* **45**:8193–8200 (2012).
- 5 ElAkemi E, Jaballah N, Ouada H and Majdoub M, Electrical properties of a new sulfur-containing polymer for optoelectronic application. *Appl Phys A* **119**:1–8 (2015).
- 6 Kricheldorf HR and Schwarz G, Poly(thioester)s. *J Macromol Sci Part A* **44**:625–649 (2007).
- 7 Bobade RS, Polythiophene composites: a review of selected applications. *J Polym Eng* **31**:209–215 (2011).
- 8 Lotti N, Siracusa V, Finelli L, Marchese P and Munari A, Sulphur-containing polymers: synthesis and thermal properties of novel polyesters based on dithiotriethylene glycol. *Eur Polym J* **42**:3374–3382 (2006).
- 9 Soccio M, Finelli L, Lotti N, Siracusa V, Ezquerro TA and Munari A, Novel ethero atoms containing polyesters based on 2,6-naphthalendicarboxylic acid: a comparative study with poly(butylene naphthalate). *J Polym Sci Part B: Polym Phys* **45**:1694–1703 (2007).

- 10 Rahate AS, Nemade KR and Waghuley SA, Polyphenylene sulfide (PPS): state of the art and applications. *Rev Chem Eng* **29**:471–489 (2013).
- 11 Wong DT-M and Marvel CS, Aromatic polyethers, polysulfones, and polyketones as laminating resins. VIII. Aryl disulfide units as crosslinking agents. *J Polym Sci: Polym Chem Edn* **14**:1637–1644 (1976).
- 12 Ishida H, Kisanuki A and Endo K, Ring-opening polymerization of aromatic 6-membered cyclic disulfide and characterization of the polymer. *Polym J* **41**:110–117 (2008).
- 13 Miyatake K, Yokoi Y, Yamamoto K, Tsuchida E and Hay AS, Selective and efficient synthesis of cyclic hexakis (thio-1, 4-phenylene) through oxidative polymerization of diphenyl disulfide. *Macromolecules* **30**:4502–4503 (1997).
- 14 Ding Y and Hay AS, Novel synthesis of poly (p-phenylene sulfide) from cyclic disulfide oligomers. *Macromolecules* **29**:4811–4812 (1996).
- 15 Chen K, Liang ZA, Meng YZ and Hay AS, Synthesis and ring-opening polymerization of co-cyclic(aromatic aliphatic disulfide) oligomers. *Polym Adv Technol* **14**:719–728 (2003).
- 16 Liang Z-A, Chen K, Meng Y-Z and Hay AS, Synthesis and ring-opening polymerization of macrocyclic aromatic sulfide oligomers. *Polym Int* **53**:1845–1850 (2004).
- 17 Tsuchida E, Miyatake K, Yamamoto K and Hay AS, Cyclic arylene sulfides: a novel synthesis and ring-opening polymerization. *Macromolecules* **31**:6469–6475 (1998).
- 18 Ding Y and Hay AS, Cyclic aromatic disulfide oligomers: synthesis and characterization. *Macromolecules* **29**:6386–6392 (1996).
- 19 Ding Y and Hay AS, Ring-opening polymerization study of cyclic (aromatic disulfide) oligomers derived from 4,4-isopropylidene bithiophenol. *Polymer* **38**:2239–2244 (1997).
- 20 Song LN, Du XS, Xiao M and Meng YZ, Short carbon fiber reinforced aromatic polydisulfide derived from cyclic (4,4'-oxybis (benzene)disulfide) via ring-opening polymerization. *Polym Adv Technologies* **16**:323–327 (2005).
- 21 Kadokawa J-i and Kobayashi S, Polymer synthesis by enzymatic catalysis. *Current Opin Chem Biol* **14**:145–153 (2010).
- 22 Simpson RJ, SDS-PAGE of proteins. *Cold Spring Harb Protoc* <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4313> (2006).
- 23 Gross RA, Kumar A and Kalra B, Polymer synthesis by *in vitro* enzyme catalysis. *Chem Rev* **101**:2097–2124 (2001).
- 24 Bouldin R, Kokil A, Ravichandran S, Nagarajan S, Kumar J, Samuelson Lynne A et al., Enzymatic synthesis of electrically conducting polymers, in *Green Polymer Chemistry: Biocatalysis and Biomaterials*. American Chemical Society, 315–341 (2011).
- 25 Nyahhongo GS, Nugroho Prasetyo E, Herrero Acero E and Guebitz GM, Engineering strategies for successful development of functional polymers using oxidative enzymes. *Chem Eng Technol* **35**:1359–1372 (2012).
- 26 Burner U and Obinger C, Transient-state and steady-state kinetics of the oxidation of aliphatic and aromatic thiols by horseradish peroxidase. *FEBS Letters* **411**:269–274 (1997).
- 27 Zeida A, Babbush R, Gonzalez Lebrero MC, Trujillo M, Radí R and Estrin DA, Molecular basis of the mechanism of thiol oxidation by hydrogen peroxide in aqueous solution: challenging the SN2 paradigm. *Chem Res Toxicol* **25**:741–746 (2012).
- 28 Shradhdha, Shekher R, Sehgal S, Kamthania M and Kumar A, Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme Res* **2011**:11 (2011).
- 29 Intra A, Nicotra S, Riva S and Danieli B, Significant and unexpected solvent influence on the selectivity of laccase-catalyzed coupling of tetrahydro-2-naphthol derivatives. *Adv Synth Catal* **347**:973–977 (2005).
- 30 Riva S, Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol* **24**:219–226 (2006).
- 31 Xu F, Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry* **35**:7608–7614 (1996).
- 32 Abdel-Mohsen HT, Sudheendran K, Conrad J and Beifuss U, Synthesis of disulfides by laccase-catalyzed oxidative coupling of heterocyclic thiols. *Green Chem* **15**:1490–1495 (2013).
- 33 Serdakowski AL and Dordick JS, Enzyme activation for organic solvents made easy. *Trends Biotechnol* **26**:48–54 (2008).
- 34 Pickard MA, Roman R, Tinoco R and Vazquez-Duhalt R, Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Corioloopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Appl Environ Microbiol* **65**:3805–3809 (1999).
- 35 Vandertol-Vanier HA, Vazquez-Duhalt R, Tinoco R and Pickard MA, Enhanced activity by poly(ethylene glycol) modification of *Corioloopsis gallica* laccase. *J Indust Microbiol Biotechnol* **29**:214–220 (2002).
- 36 Tinoco R, Pickard MA and Vazquez-Duhalt R, Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Lett Appl Microbiol* **32**:331–335 (2001).
- 37 Jaimes W, Alvarado-Tenorio G, Martínez-Alonso C, Quevedo-López A, Hu H and Nicho ME, Effect of CdS nanoparticle content on the *in situ* polymerization of 3-hexylthiophene-2,5-diyl and the application of P3HT-CdS products in hybrid solar cells. *Mater Sci Semiconduct Process* **37**:259–265 (2015).
- 38 Medina F, Aguila S, Baratto MC, Martorana A, Basosi R, Alderete JB et al., Prediction model based on decision tree analysis for laccase mediators. *Enzyme Microbiol Technol* **52**:68–76 (2013).
- 39 Tadesse MA, D'Annibale A, Galli C, Gentili P and Sergi F, An assessment of the relative contributions of redox and steric issues to laccase specificity towards putative substrates. *Organic Biomolec Chem* **6**:868–878 (2008).
- 40 De la Mora E, Lovett JE, Blanford CF, Garman EF, Valderrama B and Rudino-Pinera E, Structural changes caused by radiation-induced reduction and radiolysis: the effect of X-ray absorbed dose in a fungal multicopper oxidase. *Acta Crystallog D: Biol Crystallog* **68**:564–577 (2012).
- 41 Gupta MN and Roy I, Enzymes in organic media. *Europ J Biochem* **271**:2575–2583 (2004).
- 42 Cho SH, Han HS, Jang D-J, Kim K and Kim MS, Raman spectroscopic study of 1,4-benzenedithiol adsorbed on silver. *J Phys Chem* **99**:10594–10599 (1995).
- 43 Müller A and Krebs B, Sulfur: Its Significance for Chemistry, for the Geo-, Bio-, and Cosmosphere and Technology. *Elsevier* (2016).
- 44 Casa CD, Bizzarri PC and Nuzziello S, A new semiconducting polymer: poly(m-phenylene disulfide) complexed with chlorosulfonic acid. *J Polym Sci: Polym Lett Ed* **23**:323–328 (1985).
- 45 Ding Y and Hay AS, Preparation of poly(thioarylene)s from cyclic disulfide oligomers. *Macromolecules* **30**:2527–2531 (1997).
- 46 Heeger AJ, Semiconducting and metallic polymers: the fourth generation of polymeric materials (Nobel Lecture). *Angew Chemie Int Ed* **40**:2591–2611 (2001).

A8. Carteles presentados en congresos

XXX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Guadalajara, México. Noviembre 2-8, 2014.



Enzymatic synthesis of polyphenylene disulfide-like compounds from aromatic dithiols

Estefanía Sierra Ibarra, Marcela Ayala Aceves
Instituto de Biotecnología - UNAM



Avenida Universidad # 2001. Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos. C.P. 62210. Tel. +52(777)3291619. E-mail: esierrai@ibt.unam.mx

Introduction

Aromatic polymers containing sulfur atoms show interesting characteristics such as a high melting temperature, heat stability and semiconducting properties, when compared to polymers containing oxygen or nitrogen heteroatoms¹. Polyphenylene disulfide is a polymer made up by aromatic rings connected with disulfide bonds. These polymers can be produced by direct oxidation of an aromatic dithiol monomer in order to generate thiophenyl radicals which couple to each other without the occurrence of radicals attack at any of the ring carbon positions, due to the free radical stabilization on sulfur atom². In this work, we study the monomer oxidation catalyzed by a laccase, an enzyme that constitutes a clean and green option due to the use of milder reaction conditions when compared to chemical methods³.

Methodology

The enzymatic synthesis of polyphenylene disulfide-like compounds was carried out by the fungal laccase from *Coriolopsis gallica* (EC. 1.10.3.2) in two different reaction media containing succinate buffer (pH 4.5, 60 mM) and a water miscible solvent: 10% (v/v) acetonitrile or 50% (v/v) acetone. These media allowed the solubilization of the substrate and retained the catalytic activity of the enzyme. The substrate was 1,4-benzenedithiol (1,4-BDT) (figure 1). The initial rate, varying the initial substrate concentration, was determined following substrate consumption by HPLC. The data was adjusted to the Michaelis-Menten model in order to obtain the kinetic constants.

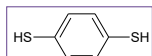


Figure 1. 1,4-benzenedithiol

With the aim to obtain a large amount of product, an enzymatic reaction was performed under the following conditions: T=25 C, initial concentration of substrate =1mM and 0.3 U/mL of *C. gallica* laccase (LCg) (Figure 2). During the course of the reaction a white powder precipitated from the medium; these reaction products were concentrated, washed and dried for further analysis.

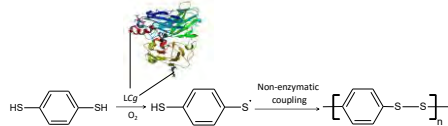


Figure 2. Enzymatic reaction for synthesis of polyphenylene disulfides

The analysis of the reaction products was performed by FT-IR and Raman spectroscopy, as well as mass spectrometry of the whole solid.

Results

Kinetic constants

The kinetic constants obtained for LCg using 1,4-BDT as substrate are shown in table 1. The values for these constants are in good agreement with the reported values for LCg with syringaldazine and syringaldehyde, which are typical substrates of this laccase⁴; therefore 1,4-BDT is efficiently transformed by the enzyme. Even more, the small value of K_M reflects the high affinity of the enzyme for the dithiol.

Table 1. Kinetic constants for the reaction of LCg and 1,4-BDT

K_M (μ M)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$)
45 ± 9	252 ± 13	5600

FTIR and Raman spectra of the reaction products

Figures 3 and 4 show the FT-IR and Raman spectra, respectively, for the products of the reactions in 10% acetonitrile and 50% acetone. Both spectra are very similar. In the FT-IR spectra, the peaks due to stretching (ν , 2559 cm^{-1}) and bending (β , 900 cm^{-1}) vibrations of S-H disappeared, as expected due to disulfide formation; the same was observed in the Raman spectrum for these vibrations at 2540 and 880 cm^{-1} . In the Raman spectra, the double peak at 448 cm^{-1} corresponds to the S-S bond. The rest of the peaks in both spectra corresponds to different vibrational modes of the aromatic ring, the intensity of these peaks changed with the formation of new bonds. According to these results, disulfide bond are present in the insoluble products; peaks corresponding to other functional groups were not observed

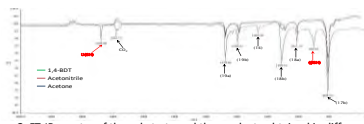


Figure 3. FT-IR spectra of the substrate and the products obtained in different media

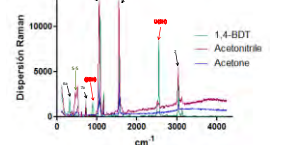


Figure 4. Raman spectra of the substrate and the products obtained in different media

Mass spectrometry of the reaction products

The mass spectrum of the product obtained in the presence of acetonitrile is shown in figure 5. The spectral ion at m/z 560(8) corresponds to a cyclic tetramer, while the signal at m/z 120(86) may be due to either a cyclic trimer or a fragment resulting from tetramer ionization. The peaks at m/z 280(33) and m/z 140(100) are due to further fragmentation of the cyclic compounds.

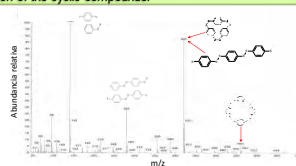


Figure 5. Mass spectra of the product obtained in 10% acetonitrile

The low relative abundance of the tetramer molecular ion could be due to its instability; this lack of stability would explain the high relative abundances of the peaks at 420 and 140 (base peak). It is also possible that the product is a mixture of cyclic trimer and cyclic tetramer. Further studies are being carried out in order to accurately establish the structure of the products obtained in the 10% acetonitrile medium.

The mass spectrum of the product obtained in the presence of acetone is shown in figure 6; it can be observed a strong signal corresponding to a dimer $m/z=262(65)$ and there is also a weak signal corresponding to a cyclic trimer. It is possible that larger oligomers (i.e. >700 g/mol) could not be observed due to the mass spectrometry technique used in this work.

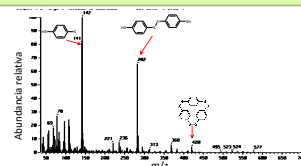


Figure 6. Mass spectra of the product obtained in 50% acetone

Conclusion

Our results demonstrate that oxidation of 1,4-benzenedithiol catalyzed by laccase from *Coriolopsis gallica* generates dimers, trimers and tetramers of aromatic rings connected by disulfide bonds. Furthermore, the nature and amount of solvent contained in the reaction media influences the size and conformation of the products.

References

- Rahate, A. S., Nemade, K. R., y Waghuley, S. A., Polyphenylene sulfide (PPS): state of the art and applications. *Reviews in Chemical Engineering* 2013, 29, (6), 471-489.
- Hioe, J., y Zipse, H., Radical stability and its role in synthesis and catalysis. *Organic & biomolecular chemistry* 2010, 8, (16), 3609-3617.
- Boudkin, B.; Kokil, A.; Ravichandran, S.; Nagarajan, S.; Kumar, J.; Samuelson Lynne, A.; Bruno Fernando y F.; Nagarajan, R., Enzymatic Synthesis of Electrically Conducting Polymers. *Green Polymer Chemistry: Biocatalysis and Biomaterials* 2011; 1043, 315-341.
- Medina, F., Aguilu, S., Baratto, M. C., Martorana, A., Basosi, R., Alderete, J. B., & Vazquez-Duhalt, R., Prediction model based on decision tree analysis for laccase mediators. *Enzyme and microbial technology* 2013, 52, (1), 68-76.

Acknowledgments: authors thank the computing resources provided by Supercomputer Miztli UNAM SC14-1-S-93. We also thank financial support from CONACyT, Grant 179241.

XVII Congreso Nacional de la sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería.
Guadalajara, México. Junio 21-26, 2015



SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE DISULFUROS DE FENILENO A PARTIR DE TIOFENOLES

Estefanía Sierra Ibarra, Marcela Ayala Aceves
 Instituto de Biotecnología - UNAM



Avenida Universidad # 2001. Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos. C.P. 62210. Tel. +52(777)3291619. E-mail: esierrai@ibt.unam.mx

Introducción

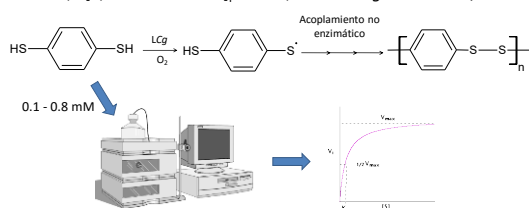
Los disulfuros de poli-fenileno están conformados por anillos aromáticos unidos por enlaces disulfuro, los cuales presentan propiedades conductivas (1). Una estrategia que proponemos para la obtención de estos materiales es la oxidación de tiofenoles catalizada por enzimas, generando así radicales tiolo, los cuales posteriormente se acoplarán en enlaces disulfuro. Las enzimas constituyen una opción amigable con el medio ambiente debido a las condiciones suaves de reacción requeridas por este tipo de catalizadores. En ese trabajo se pretende estudiar las condiciones de síntesis y la caracterización de disulfuros de fenileno, empleando ditioles aromáticos y una lacasa como catalizador.



Metodología

Síntesis y constantes cinéticas

Medio: 10% acetonitrilo en amortiguador succinatos pH 4.5, 60 mM T=30°C, [1,4-Bencenoditiol]=1 mM, Lacasa *C. gallica*=0.3 U/mL



Caracterización

Estructural \rightarrow Raman, E⁺-MS

Conductividad (2) \rightarrow $\sigma = \frac{i \cdot L}{V \cdot w \cdot d}$

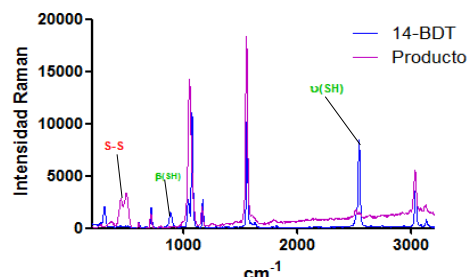
Resultados

Constantes cinéticas

K_M (μ M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($s^{-1}mM^{-1}$)
45 \pm 1	4.2 \pm 0.2	93

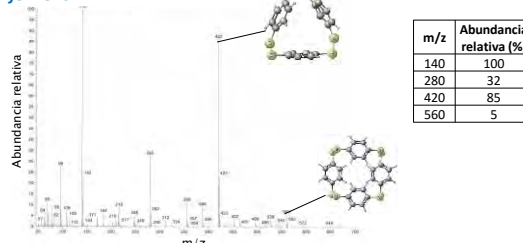
A pesar de que la oxidación enzimática de tioles es menos eficiente que la de fenoles, las constantes cinéticas para el 1,4-BDT se encuentran en el mismo orden de magnitud que las obtenidas con otros sustratos típicos como la siringaldazina (3). Además el valor bajo de K_M indica que la enzima tiene gran afinidad por el 1,4-BDT.

Espectroscopía Raman: acoplamiento en enlaces disulfuro

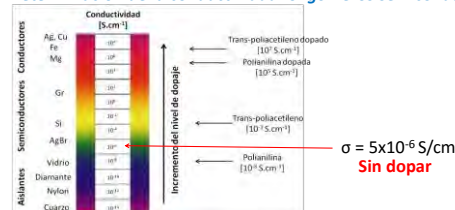


La desaparición de los modos vibracionales β (SH) y ν (SH), correspondientes al grupo tiol en el espectro de Raman del producto, así como la aparición de la señal asignada al disulfuro (S-S), indican que la enzima está oxidando completamente el sustrato y los radicales generados se están acoplando en el enlace esperado (4). No se observan señales correspondientes a la aparición de otros grupos funcionales.

Espectrometría de masas: conformación cíclica de los disulfuros de fenileno



Determinación de la conductividad: oligómeros semiconductores (5)



Conclusión

La oxidación de 1,4-BDT con LCg en un medio con bajo contenido de solvente orgánico genera oligómeros de disulfuro de fenileno, los cuales son cíclicos y semiconductores.

Agradecimiento. Los autores agradecen el apoyo 179241 concedido por el CONACyT. Igualmente agradecen la ayuda brindada por el Dr. Roberto Sato (CCADET-UNAM) con el análisis de Raman, y el Dr. Hugo Cortina (IER-UNAM) con las pruebas de conductividad.

Bibliografía

- Della-Casa C., Costa P., Nuzziello S. (1985). *J. Polym. Sci.* 23 (6): 323-328.
- Cortina H., Pineda E., Hu H. (2012). *Sol. Energy* 86 (4): 1004-1009.
- Medina F., Aguilá S., Baratto M.C., Martorana A., Bassoli R., Alderete, J.B., Vazquez-Duhalt R. (2013). *Enzyme Microb. Technol.* 52 (1): 68-76.
- Cho, S. H., Han, H. S., Jang, D.-J., Kim, K., Kim, M. S. (1995). *J. Phys. Chem.* 99(26): 10594-10599.
- Gerard M., Chaubey A., Malhotra B.D. (2012). *Biosens. Bioelectron.* 17 (5): 345-359



ENZYMATIC SYNTHESIS OF CYCLIC AROMATIC DISULFIDE OLIGOMERS

Estefanía Sierra Ibarra, Marcela Ayala Aceves



Institute of Biotechnology - National Autonomous University of Mexico
62210. Cuernavaca, México. E-mail: esierrai@ibt.unam.mx

Introduction

The chemical synthesis of cyclic aromatic disulfide oligomers has been reported by different authors due to their use as cross linking agents [1] and precursors of high molecular weight polymers [2]. The use of enzymes as catalysts for the synthesis of these molecules constitutes a better alternative than chemical methods owing to the mild reaction conditions and the absence of by-products generation [3]. In this work we studied the synthesis of cyclic aromatic disulfides in two different reaction media containing organic solvent, using the laccase from *Coriopsis gallica* (LCg) for the oxidation of the substrates 1,3 and 1,4-benzenedithiol. The obtained products were characterized according to their structure and thermal properties with the aim of determining their possible use as precursors of high molecular weight sulfur-containing polymers.

Methodology

1. Laccase activity in water/solvent media

LCg (EC. 1.10.3.2)

- Incubation time: 60 min
- T = 30°C
- Aqueous phase: succinate buffer pH 4.5, 60 mM

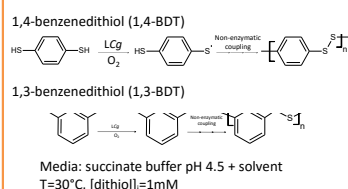
Reaction media:
ACN 0-60%
Acetone 0-60%

900 μ L aliquot

100 μ L syringaldazine

Syringaldazine activity assay

2. Synthesis



3. Characterization

- Thiol and disulfide detection
- Molecular weight and structural features
- Thermal analysis
- Raman Spectroscopy
- Electron ionization mass spectrometry (EI-MS)
- Thermogravimetric analysis (TGA)
- Differential scanning calorimetry (DSC)

Conclusions

Enzymatic oxidation of benzenedithiols generates cyclic phenylene disulfides which size depends on the substrate and concentration of solvent in the reaction media.

The obtained cycles exhibit thermal characteristics that may allow their use as precursors of high molecular weight polymers.

References

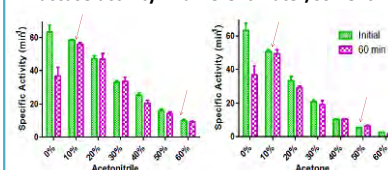
- [1] Chen, K.; Liang, Z. A.; Meng, Y. Z.; Hay, A. S. Synthesis and ring-opening polymerization of co-cyclic aromatic aliphatic disulfide oligomers. *Polymers for Advanced Technologies* 2003, 14, (10), 719-728.
- [2] Wong, D.T. and Marvel, C.S. Aromatic polyethers, polysulfones, and polyketones as laminating resins. VIII. Aryl disulfide units as crosslinking agents. *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition*, 1976, 14, 1637-1644.
- [3] Kadokawa, J. and Kobayashi, S. Polymer synthesis by enzymatic catalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2010, 14:145-153.
- [4] Cho, S. H., Han, H. S., Jang, D.-I., Kim, K., Kim, M. S. Raman Spectroscopic Study of 1,4-Benzenedithiol Adsorbed on Silver. *J. Phys. Chem.* 1995, 99(26): 10594-10599.
- [5] Ding, Y. and Hay, A.S. Cyclic aromatic disulfide oligomers: synthesis and characterization. *Macromolecules*, 1996, 29, 6386-6392.

Acknowledgments

Authors thank the support provided by Dr. Roberto Sato (CCADET-UNAM) with Raman analysis. We also thank the financial support from CONACYT, Grant 179241

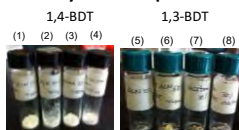
Results

1. Laccase activity in different water/solvent media



The laccase activity is lower for high solvent concentrations, however, activity loss after 1 h incubation is not observed. Because we detected laccase activity at relatively high concentrations of acetone (50%) and acetonitrile (60%), we chose a low and a high solvent concentration as reaction media for further characterization of the enzymatic synthesis of cyclic disulfides.

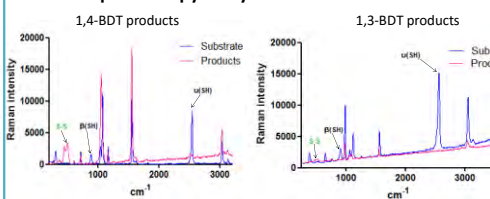
2. Product yield after purification



# product	Substrate	Solvent	Yield (%)
1	1,4-BDT	ACN 10%	80
2		ACN 60%	86
3		Acetone 10%	75
4		Acetone 50%	79
5	1,3-BDT	ACN 10%	26
6		ACN 60%	27
7		Acetone 10%	22
8		Acetone 50%	29

Although substrate conversion was high (>90%), yields were higher for 1,4-BDT products than 1,3-BDT due to material's ease of manipulation and differences in the purification steps.

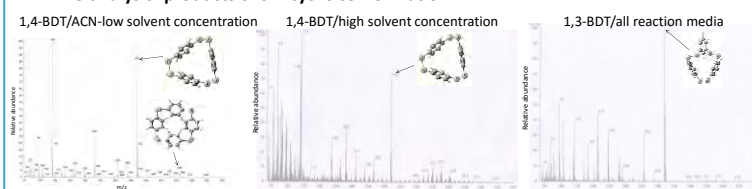
3. Raman spectroscopy analysis: thiol oxidation and disulfide bond formation



Reaction media	Peak ratio of products (5-5 peak 470 cm ⁻¹ /reference peak 1550 cm ⁻¹)
1,3-BDT (control)	0.054
1,3-BDT/ACN 10%	0.397
1,3-BDT/ACN 60%	0.369
1,3-BDT/Acetone 10%	0.346
1,3-BDT/Acetone 50%	0.398

The lack of the thiol signals vibrations at 880 and 2540 cm⁻¹ is due to oxidation of the functional group. The double peak at 510 cm⁻¹ corresponds to the disulfide bond [4].

4. EI-MS analysis: products show cyclic conformation



5. TGA-DSC thermal analysis: obtained cycles can be used as precursors

Reaction media	Substrate	Product	TGA		DSC
			T (°C)	Weight loss (%)	
ACN 10%	1,4-BDT	Cyclic trimer and tetramer	250	21.6	165
			213	14.7	165
		Cyclic trimer and tetramer	260	17.4	160
			225	5.4	165
Acetone 50%	Cyclic trimer	300	5	163	
		312	5	162	
ACN 60%	1,3-BDT	Cyclic trimer	305	5	163
			300	5	161

In order to carry out a melt ring opening polymerization of the cyclic molecules, i.e. to use them as precursors, their melting temperature should be above 150°C and they have to be stable at this temperature [5]. According to the thermal analysis results, the obtained oligomers fulfill these conditions.



CHEMOENZYMATIC SYNTHESIS OF SULFUR-CONTAINING AROMATIC POLYMERS



Estefanía Sierra Ibarra, Marcela Ayala Aceves

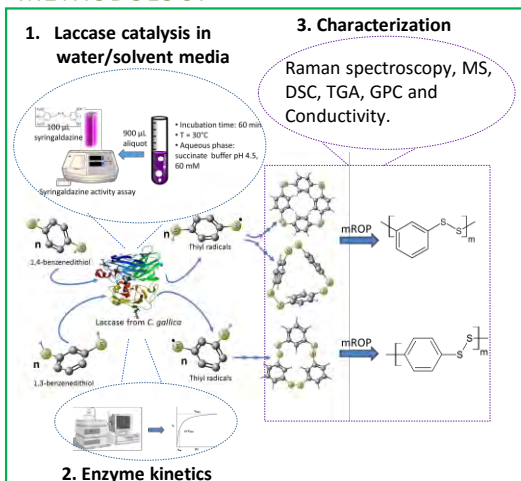
Institute of Biotechnology – Universidad Nacional Autónoma de México

62210. Cuernavaca, México. E-mail: esierrai@ibt.unam.mx

INTRODUCTION

Aryl poly-disulfides are materials composed by aromatic rings joined by disulfide bonds. These molecules have important industrial applications due to their interesting properties such as high melting temperature, resistance to strong chemical agents and dielectric characteristics. However, the most common method of aryl polydisulfides synthesis, *i.e.* the chemical one, is expensive and non-environmental friendly as it involves the use of strong oxidants and harsh conditions of temperature and pressure [1, 2]. On the other hand, enzymes are considered “green catalysts” owing to their mild reaction conditions and avoidance of undesirable sub-products generation [3]. In this work we studied the chemoenzymatic synthesis of poly(phenylenedisulfides) in two steps: enzymatic synthesis of cyclic aromatic disulfides (CAD) using the laccase from *Corioliopsis gallica* (LCg) and 1,3- or 1,4-benzenedithiol (1,3- and 1,4-BDT) as monomers. The disulfides were characterized according to their structure and thermal properties. The second step consisted in ring opening polymerization of the cycles which was performed in the melt, generating polymeric molecules which were also characterized according to their physicochemical properties.

METHODOLOGY



CONCLUSIONS

- We have shown that aromatic dithiols 1,3 and 1,4-benzenedithiol are oxidized by a fungal laccase in the presence of oxygen as electron acceptor.
- 100% conversions were obtained in a reaction carried out at ambient temperature (30°C) and in the presence of low to medium solvent concentration (acetone and acetonitrile).
- MS analysis of the products confirmed the synthesis of CAD and, in some cases, a low amount of linear molecules.
- Thermal characterization showed that CAD are amenable to be used as precursors of high molecular weight polymers.
- After mROP of CAD, polymers in the range of 13 kDa and showing good thermal resistance, crystalline packaging and low conductivity were obtained. The products are novel materials according to a search in SciFinder.
- These results highlight the potential of including enzymatic, environmental friendly steps in the production of thermoplastic polymers.

REFERENCES

- Chen, K.; Liang, Z. A.; Meng, Y. Z.; Hay, A. S. Synthesis and ring-opening polymerization of cyclic(aromatic aliphatic disulfide) oligomers. *Polymers for Advanced Technologies* 2003, 14, (10), 719-728.
- Ding, Y. and Hay, A.S. Cyclic aromatic disulfide oligomers: synthesis and characterization. *Macromolecules*, 1996, 29, 6386-6392.
- Kadokawa, J. and Kobayashi, S. Polymer synthesis by enzymatic catalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2010, 14:145-153.
- Cho, S. H., Han, H. S., Jang, D.-J., Kim, K., Kim, M. S. Raman Spectroscopic Study of 1,4-Benzenedithiol Adsorbed on Silver. *J. Phys. Chem.*, 1995, 99(26):10594-10599.
- Sierra E, Castillo E, Han H, Ayala M. *Biomacromolecules*. Under revision.

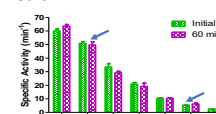
ACKNOWLEDGMENTS

Authors thank the support provided by Dr. Roberto Sato (CADET-UNAM) with Raman analysis, Dr. Alfredo Martínez (IBT-UNAM) with mROP and Biol Rosa Román (IBT-UNAM) for technical assistance. We also thank the financial support from CONACYT Grant 179241

RESULTS

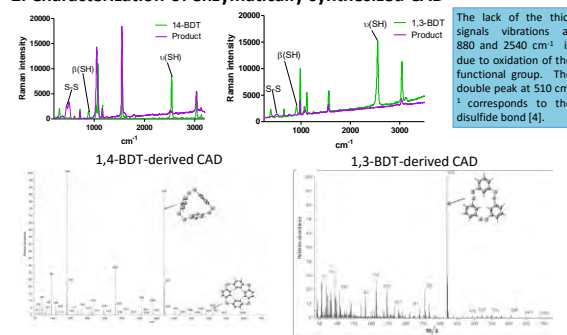
1. Laccase catalysis in water/solvent media

- Laccase activity is lower for high solvent concentrations.
- However, activity loss after 1 h incubation is not observed. We selected acetone and acetonitrile as suitable solvents
- We chose a low and a high solvent concentration as reaction media for enzymatic synthesis of CAD.
- 100% conversion was achieved for both monomers; products precipitated out of the solution simplifying their purification.

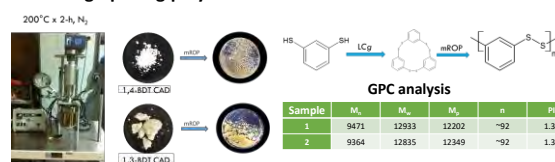


Substrate	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (μM)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)
1,3-BDT	11.9 ± 0.78	257.8 ± 60	9.3 × 10 ⁴
1,4-BDT	13.8 ± 0.89	457 ± 87	4.6 × 10 ⁴

2. Characterization of enzymatically synthesized CAD



3. Melt ring opening polymerization of CAD



4. Polymer characterization: thermal and conductivity properties

