



Saltillo, Coahuila a 21 de diciembre de 2021

Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

Coordinación de Posgrado
Presente

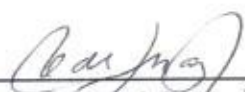
Por este conducto nos permitimos informar a esta coordinación que, el documento de tesis preparado por **PAOLA JIMÉNEZ CÁRDENAS** titulado Síntesis de Polianilina Catalizada por Nanoflores de Peroxidasas el cual fue presentado el día 15 de diciembre de 2021, ha sido modificado de acuerdo a las observaciones, comentarios y sugerencias, realizadas por el Comité Evaluador asignado. Por tal motivo, avalamos que el documento adjunto corresponde a la versión final del documento de tesis.

Atentamente,

SINODALES



Dra. Ifeana Vera Reyes
Presidente



Dra. Graciela Morales
Secretario



Dra. Abril Fonseca García
Vocal

ASESORES



Dr. Antonio Serguei Ledezma Pérez



Dr. Arxel de León Santillán



TESIS CON CARACTER ABIERTO

PROGRAMA: MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

AUTOR: PAOLA JIMÉNEZ CÁRDENAS FIRMA *Paola Jiménez Cárdenas*

TITULO: “Síntesis de Polianilina Catalizada por Nanoflores de Peroxidasas”

ASESORES: Dr. Antonio Serguei Ledezma Pérez

FIRMA *Antonio Ledezma P*

Dr. Arxel de León Santillán

FIRMA *Arxel de León*

El Centro de Investigación en Química Aplicada clasifica el presente documento de tesis como ABIERTO.

Un documento clasificado como Abierto se expone en los estantes del Centro de Información para su consulta. Dicho documento no puede ser copiado en ninguna modalidad sin autorización por escrito del Titular del Centro de Información o del Director General del CIQA.

Saltillo, Coahuila, a 15 de Diciembre de 2021

Sello de la Institución



Dr. Oliverio Santiago Rodríguez Fernández
Director General del CIQA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

TESIS

Síntesis de Polianilina Catalizada por Nanoflores de Peroxidasas

Presentada por:

PAOLA JIMÉNEZ CÁRDENAS


Para obtener el grado de:

Maestro en Tecnología de Polímeros


Asesorada por:

Dr. Antonio Serguei Ledezma Pérez
Dr. Arxel de León Santillán

SINODALES



Dra. Itéana Vera Reyes
Presidente



Dra. Graciela Morales
Secretario



Dra. Abril Fonseca García
Vocal



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

TESIS

Síntesis de Polianilina Catalizada por Nanoflores de Peroxidasas

Presentada por:

PAOLA JIMÉNEZ CÁRDENAS

Para obtener el grado de:

Maestro en Tecnología de Polímeros

Asesorada por:

Dr. Antonio Serguei Ledezma Pérez
Dr. Arxel de León Santillán

Saltillo, Coahuila. México.

Diciembre, 2021

DECLARACIÓN

Declaro que la información contenida en la Parte Experimental así como en la Parte de Resultados y Discusiones de este documento y que forman parte de las actividades de investigación y desarrollo realizadas durante el período que se me asignó para llevar a cabo mi trabajo de tesis, será propiedad del Centro de Investigación en Química Aplicada.

Saltillo, Coahuila a 15 de diciembre de 2021

Paola Jiménez Cárdenas
PAOLA JIMÉNEZ CARDENAS

Nombre y Firma

Centro de Investigación en Química Aplicada

Maestría en Tecnología de Polímeros



Tesis:

“Síntesis de polianilina catalizada por nanoflores de peroxidasas”

Presentada por:

Ing. Paola Jiménez Cárdenas

Para obtener el grado de:

Maestra en Tecnología de Polímeros

Asesorada por:

Dr. Jorge Romero García (†)

Dr. Antonio S. Ledezma Pérez

Dr. Arxel De León Santillán

Saltillo, Coahuila | 15 Diciembre 2021

Dedicatoria

En memoria del Dr. Jorge Romero García.

“Hay quienes traen al mundo una luz tan grande... que incluso después de haberse ido esa luz permanece.” -Autor desconocido

Agradecimientos

Gracias al Dr. Antonio S. Ledezma Pérez por haber asumido el rol de único asesor y responsable la mayor parte del proyecto, por acompañarme y guiarme en todo momento, por brindarme toda su comprensión y cariño, por dar todo de sí y un poquito más. Le doy las gracias porque siempre que lo necesité estuvo disponible, sin importar la hora, el día ni los estados de ánimo de los dos, porque junto conmigo no se rindió y sacamos adelante el proyecto. Lo quiero mucho.

Al Dr. Jorge Romero García, por motivarme a realizar este posgrado, por aceptarme desde el primer día en su grupo de trabajo, por mandarme a mi primer congreso internacional, por involucrarme en sus planes personales y familiares, por las enseñanzas, las bromas, las risas y todos los momentos que jamás olvidaré. Nos faltó tiempo, pero agradezco a Dios haber coincidido con usted en mi camino como profesional. Desarrollar el proyecto sin usted fue extremadamente difícil para todos, se nos fue el experto y además tuvimos que lidiar con su ausencia y su partida. Sé que desde donde quiera que esté, está orgulloso de mí. Lo extrañamos siempre.

Al Dr. Arxel De León Santillán por su constante apoyo y asesoría durante la ausencia del Dr. Jorge, gracias por involucrarse y estar presente cuando lo necesité.

A Naty por tu amistad estos años, por ser mi compañera de viaje, de comidas y de baile, por ser mi fotógrafa y mi confidente, por enseñarme tanto en el laboratorio, por los desayunos y pláticas que compartimos, por echarme porras cuando quise rendirme, por dejarme llorar contigo. Voy a extrañarte, pero me quedo con un millón de momentos bonitos y carcajadas que compartimos. Te quiero mil.

A Tiffany por hacer que mis últimos meses en CIQA fueran mejores y más divertidos, por ayudarme en mis experimentos, por tus consejos, por regalarme tu amistad junto con un millón de risas, por lo que hemos vivido y lo que nos falta vivir juntas. Te quiero.

A mis amigos Gaby, Jimena, Ilse, Dafne, Luis, Álvaro, Dani, Sergio, Marco y Tony, por su apoyo y amistad. ¡Que sigan los éxitos para todos!

Agradezco a los cuervos negros de micro por su amistad, por los desayunos y festejos, por las risas y lágrimas que compartimos. Gracias por aceptarme y hacerme sentir querida.

Agradezco al CONACyT por la beca otorgada, los fondos del proyecto CB-287954 y al CIQA por permitirme ser parte del programa de posgrado y realizar a cabo el proyecto en las instalaciones.

A mis sinodales, la Dra. Graciela Morales, la Dra. Abril Fonseca y la Dra. Ileana Vera por las críticas constructivas para el mejoramiento de esta tesis y el soporte en el mejoramiento de la discusión en técnicas de caracterización.

A los miembros del laboratorio y grupo de investigación, en especial a la Q.F.B Carmen Natividad Alvarado Canché, por el apoyo, los consejos, la asesoría y la orientación en el desarrollo del proyecto, permitiéndome crecer personal y profesionalmente.

Gracias especiales a la Dra. Esmeralda Monserrat Saucedo Salazar, Q.F.B. Jesús Ángel Cepeda Garza, Q.F.B. Myriam Lozano Estrada y Dr. Enrique Díaz Barriga Castro del departamento de Microscopía por la disponibilidad y ayuda en la caracterización de microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM), parte fundamental del proyecto.

A la Dra. Ileana Vera Reyes por su tutoría en la parte enzimática, por permitirme utilizar su espacio de trabajo, materiales, reactivos y equipos para el ensayo de actividad enzimática.

Al M.C. Gilberto Francisco Hurtado López por las mediciones de conductividad.

A Manuel Eduardo Martínez Cartagena por estar ahí apoyándome cuando parecía que nada salía bien, por compartirme tu conocimiento y tu tiempo, gracias por ayudarme a encontrar las condiciones que me llevaron a cumplir los objetivos propuestos.

Gracias a mi familia, a Chuy y a mis amigos por ser soporte moral y emocional a lo largo de esta etapa que tuvo altos y muchos bajos, por impulsarme a terminar y a seguir esforzándome, aunque en ocasiones no hubiera motivación.

Gracias a todas y cada una de las personas que me acompañaron en esta etapa de mi vida, por no dejarme tirar la toalla a pesar de las adversidades y obstáculos que se presentaron, sin ustedes no hubiera sido posible este logro.

Contenido

| | |
|---|------|
| Dedicatoria..... | i |
| Agradecimientos..... | ii |
| Contenido..... | v |
| Abreviaturas..... | viii |
| Resumen | ix |
| 1. Introducción..... | 1 |
| 2. Antecedentes..... | 3 |
| 2.1 Evolución polimérica..... | 3 |
| 2.2 Polímeros conductores..... | 3 |
| 2.3 Polianilina | 5 |
| 2.3.1 Síntesis de polianilina | 7 |
| 2.3.1.1 Polimerización oxidativa de anilina..... | 9 |
| 2.3.1.2 Polimerización enzimática y biomimética de anilina..... | 10 |
| 2.3.2 Estados de oxidación de la polianilina | 11 |
| 2.3.2.1 Emeraldina | 12 |
| 2.3.2.2 Dopaje de PANI | 15 |
| 2.4 Enzimas..... | 16 |
| 2.4.1 Catálisis enzimática | 18 |
| 2.4.2 Polimerización enzimática | 18 |
| 2.4.3 Inmovilización de enzimas..... | 19 |
| 2.5 Peroxidasas | 20 |
| 2.5.1 Peroxidasa de rábano picante | 21 |
| 2.5.2 Peroxidasa de soya..... | 22 |
| 2.6 Biocatálisis enzimática..... | 22 |
| 2.7 Nanobiocatálisis | 23 |
| 2.8 Materiales nanoestructurados..... | 23 |
| 2.8.1 Nanoflores híbridas orgánico-inorgánico | 24 |
| 2.8.1.1 Método de coprecipitación | 27 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.8.1.2 | Iones metálicos..... | 28 |
| 2.9 | Estado del arte: Polimerización de anilina..... | 29 |
| 3. | Hipótesis..... | 31 |
| 4. | Objetivo general | 32 |
| 4.1 | Objetivos específicos..... | 32 |
| 5. | Justificación | 33 |
| 6. | Metodología | 34 |
| 6.1 | Materiales y reactivos..... | 34 |
| 6.2 | Síntesis de nanoflores híbridas orgánico-inorgánico (hNF) | 35 |
| 6.2.1 | Determinación de contenido de proteína | 36 |
| 6.2.2 | Pruebas preliminares de síntesis de nanoflores híbridas..... | 36 |
| 6.3 | Caracterización de nanoflores híbridas | 38 |
| 6.3.1 | Determinación del contenido de proteína encapsulada..... | 39 |
| 6.3.2 | Determinación de actividad enzimática..... | 39 |
| 6.3.3 | Caracterización morfológica de los productos de reacción | 39 |
| 6.4 | Síntesis de Polianilina..... | 40 |
| 6.4.1 | Síntesis de Polianilina catalizada por Hematina libre | 41 |
| 6.4.2 | Síntesis de Polianilina catalizada por SBP libre..... | 43 |
| 6.4.3 | Síntesis de Polianilina catalizada por nanoflores híbridas (hNF/SBP-Cu)..... | 43 |
| 6.5 | Caracterización de Polianilina | 44 |
| 6.5.1 | Caracterización mediante espectroscopía ultravioleta visible (UV-vis)..... | 44 |
| 6.5.2 | Determinación de parámetros de conductividad eléctrica | 44 |
| 7. | Resultados y discusiones | 45 |
| 7.1 | Mecanismo de formación de nanoflores..... | 45 |
| 7.2 | Síntesis de nanoflores híbridas orgánico-inorgánico (hNF) | 47 |
| 7.2.1 | Determinación de contenido de proteína | 48 |
| 7.2.2 | Pruebas preliminares de síntesis de nanoflores híbridas..... | 49 |
| 7.3 | Caracterización de nanoflores híbridas | 50 |
| 7.3.1 | Caracterización morfológica..... | 51 |
| 7.3.2 | Estudios de actividad enzimática | 59 |
| 7.4 | Síntesis de Polianilina..... | 64 |

| | | |
|-------|--|----|
| 7.4.1 | Síntesis de Polianilina catalizada por hematina libre | 65 |
| 7.4.2 | Síntesis de Polianilina catalizada por SBP libre..... | 66 |
| 7.4.3 | Síntesis de Polianilina catalizada por nanoflores híbridas de peroxidasa (hNF/SBP-Cu)..... | 67 |
| 7.5 | Caracterización de Polianilina | 70 |
| 7.5.1 | Espectroscopía ultravioleta visible (UV-vis) | 70 |
| 7.5.1 | Conductividad eléctrica | 72 |
| 8. | Conclusiones | 74 |
| 9. | Referencias | 75 |

Abreviaturas

| | |
|-----------------------------------|---|
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| H₂O₂ | Peróxido de hidrógeno |
| Hem | Hematina |
| hNF | Nanoflores híbridas |
| hNF/BSA-Cu | Nanoflores híbridas de albúmina de suero bovino con iones Cu |
| hNF/BSA-Cu-Hem | Nanoflores híbridas de albúmina de suero bovino con iones Cu y Hematina |
| hNF/HRP-Fe | Nanoflores híbridas de peroxidasa de rábano picante con iones Fe |
| hNF/SBP-Cu | Nanoflores híbridas de peroxidasa de soya con iones Cu |
| hNF/SBP-Cu-Fe | Nanoflores híbridas de peroxidasa de soya con iones Cu y Fe |
| hNF/SBP-Cu-Hem | Nanoflores híbridas de peroxidasa de soya con iones Cu y Hematina |
| hNF/SBP-Fe | Nanoflores híbridas de peroxidasa de soya con iones Fe |
| HRP | Peroxidasa de rábano picante |
| ICPs | Polímeros intrínsecamente conductores |
| NMP | N-metil pirrolidona |
| PANI | Polianilina |
| PBS | Solución salina amortiguada por fosfatos |
| PTSA | Ácido p-toluensulfónico |
| SBP | Peroxidasa de soya |
| SEM | Microscopía Electrónica de Barrido |
| TEM | Microscopía Electrónica de Transmisión |
| UV vis | Espectroscopía Ultravioleta visible |

Resumen

En este trabajo se llevó a cabo la síntesis de nanoflores híbridas mediante un método de coprecipitación y autoensamblaje de componentes orgánicos e inorgánicos. Los componentes orgánicos utilizados fueron albúmina de suero bovino (BSA), peroxidasa de rábano picante (HRP) y peroxidasa de soya (SBP), y los inorgánicos Cu, Fe y Hem.

Para esto se optimizaron las condiciones de síntesis de nanoflores, entre ellas: PBS (formulación, concentración y pH), proteína (elección y concentración) e incubación (temperatura y tiempo). De las varias combinaciones de componentes utilizados, se eligió el sistema obtenido a base de peroxidasa de soya y cobre debido a que las peroxidasas son un conocido catalizador enzimático de compuestos aromáticos, entre ellos la anilina.

La síntesis múltiple del sistema nanobiocatalizador hNF/SBP-Cu fue exitosa y se corroboró la morfología tipo flor mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), el diámetro promedio de las nanoflores obtenidas fue de $4.22 \pm 1.642 \mu\text{m}$. Además, mediante espectroscopía ultravioleta visible (UV-vis) se determinó el porcentaje de encapsulación de proteína en el sistema (17 %) y la actividad de SBP libre y SBP inmovilizada en el sistema híbrido (3303.04 y 4862.71 UI/mg respectivamente). La actividad de SBP inmovilizada en el sistema híbrido nanoestructurado tipo flor fue de 1.45 veces mayor a la que presentó la SBP en forma libre.

La síntesis de polianilina (PANI) en su forma conductora se realizó por biomimética libre, enzimática libre y nanobiocatálisis. La caracterización mediante UV-vis confirmó la estructura electrónica de la sal y la base de emeraldina. Además, se determinó la conductividad eléctrica por el método de dos puntas en volumen, donde la conductividad de la PANI obtenida por nanobiocatálisis enzimática fue dos órdenes de magnitud mayor que la obtenida por catálisis enzimática libre ($1.16\text{E-}03$ y $4.06\text{E-}05$ S/cm respectivamente), lo que se atribuye a una mayor estabilidad de la peroxidasa inmovilizada dentro de las nanoflores y la protección que esta nanoestructura brinda

ante las condiciones ácidas requeridas en la síntesis, las cuales favorecen el acoplamiento cabeza-cola que resulta en un polímero con mayor conductividad.

1. Introducción

Las enzimas son biocatalizadores exquisitos que median en todos y cada uno de los procesos biológicos que ocurren en los seres vivos. Este conocimiento ha sido utilizado como fuente de inspiración por diferentes grupos de investigación para imitar la arquitectura y función de estas increíbles moléculas, resultado de ello son los incontables usos y aplicaciones que han surgido de su enorme potencial catalítico para desempeñarse en múltiples áreas. Este conocimiento también se ha reflejado en la síntesis polimérica, así como con diferentes tipos de enzimas que catalizan la síntesis de polímeros con arquitecturas diversas, por ejemplo, los poliésteres, poliamidas y polifenoles; inclusive polímeros altamente conjugados, como los intrínsecamente conductores. La polianilina es miembro importante de esta familia, este polímero junto con el polipirrol y los politiofenos forman parte de una de las principales líneas de investigación del grupo de Biopolímeros del CIQA.

La síntesis enzimática representa una alternativa a la síntesis química de polímeros, sin embargo, a pesar de las diversas ventajas que las enzimas presentan sobre los catalizadores químicos convencionales, existe una desventaja importante; la desnaturalización bajo ciertas condiciones de pH y temperatura. Los métodos tradicionales de inmovilización de enzimas, con los cuales se ha trabajado previamente en el grupo de trabajo, brindan una posibilidad de contrarrestar la desnaturalización que sufren las enzimas, permitiendo así su uso en condiciones de operación más drásticas, las cuales son características en la síntesis química de polímeros conjugados electroconductores.

La inmovilización de enzimas en sistemas nanoestructurados surge como una alternativa a los métodos tradicionales, en los cuales además de mejorar la estabilidad, se aumenta la actividad enzimática. Un ejemplo de ello es el sistema híbrido (orgánico-inorgánico) conocido como ensamblaje tipo nanoflor.

Las nanoflores son una clase de partículas micrométricas desarrolladas recientemente, las cuales muestran similitud estructural a las flores de las plantas, con diámetros entre 3-10 μm . Estas estructuras permiten la inmovilización de biomoléculas vía coprecipitación por simple auto ensamblaje, razón por la cual en los últimos años ha recibido gran atención. Este método de inmovilización se ha considerado como prospecto brillante para aumentar la estabilidad, actividad e inclusive la selectividad de las biomoléculas, al ser comparado con otros métodos convencionales de inmovilización. La síntesis de nanoflores híbridas orgánicas-inorgánicas es relativamente sencilla, donde las biomoléculas usadas como componente orgánico simplemente se mezclan con iones metálicos específicos, los cuales actúan como componentes inorgánicos para formar los nanocompuestos híbridos tipo flor.

Trabajos publicados por el grupo de Biopolímeros del Departamento de Materiales Avanzados han demostrado que la peroxidasa de rábano picante y la de soya (HRP y SBP por sus siglas en inglés respectivamente) son capaces de catalizar la síntesis de polianilina con características ópticas y de conductividad eléctrica similares a las obtenidas mediante síntesis química. Sin embargo, una de las principales limitaciones para igualar las condiciones de la síntesis química es el poder llevar a cabo la reacción a pH ácido ($\text{pH} < 3$), para garantizar la obtención de la forma conductora de la polianilina, ya que a este pH algunas peroxidasas se desactivan, perdiendo su capacidad catalítica. En este proyecto se propuso estudiar el potencial de las nanoflores de peroxidasas como catalizador en la síntesis enzimática de la polianilina con el fin de maximizar el acoplamiento cabeza-cola, dando lugar a un polímero sin subproductos no deseados, con menos defectos estructurales y con conductividad eléctrica.

2. Antecedentes

2.1 Evolución polimérica

La hipótesis de cadenas largas del profesor H. Staudinger, por la cual obtuvo el premio Nobel en 1953, marcó el inicio de la ciencia polimérica moderna^[1]. Inicialmente los polímeros naturales eran modificados químicamente, pero en el siglo XIX comenzó la producción de sustancias completamente sintéticas, que hoy en día conocemos como polímeros^[2]. Las últimas décadas del siglo XX fueron testigos de la conversión de la ciencia polimérica en un enfoque totalmente reconocido en diversas universidades alrededor del mundo, donde los nuevos descubrimientos iban desde arquitecturas moleculares controladas y auto ensambladas, hasta dispositivos electrónicos a base de polímeros. Además, se reconoció que el desempeño del polímero estaba relacionado con su estructura fisicoquímica y que, a su vez, la estructura era un reflejo del historial de procesamiento, lo que permitió el desarrollo de procesos y productos basados en principios científicos y no solo en métodos empíricos.

La síntesis de polímeros a lo largo de los últimos años ha evolucionado, haciendo énfasis en sistemas catalíticos más eficientes y en el impacto ambiental de los procesos^[1]. Actualmente existe un conocimiento significativo en la síntesis y comportamiento de macromoléculas, por lo que es posible diseñar y sintetizar un sistema macromolecular capaz de desempeñar una función específica^[3].

2.2 Polímeros conductores

Los materiales poliméricos habían sido considerados aislantes por décadas^[4]. Alan J. Heeger, Alan G. MacDiarmid y Hideki Shirakawa desempeñaron un papel importante en el descubrimiento de una nueva clase de polímeros que poseían alta conductividad electrónica en estado parcialmente oxidado^[5]. Estos investigadores recibieron el premio Nobel en el año 2000 por “el descubrimiento y desarrollo de polímeros electrónicamente

conductores”. Shirakawa se refiere al evento como un “error fortuito”, el cual, por acuerdo general se establece que ocurrió en octubre de 1967^[6].

Dentro de la categoría de polímeros conductores de electrones, se pueden distinguir dos clases basadas en el modo de transporte de electrones: los redox y los electrónica o intrínsecamente conductores (ICPs por sus siglas en inglés). Una simple distinción entre los polímeros redox y los ICPs es que en estado seco los ICPs son conductores, a diferencia de los redox^[5]. Los polímeros intrínsecamente conductores generalmente se consideran “metales sintéticos” porque poseen propiedades eléctricas, ópticas y magnéticas típicas de metales y semiconductores. Dichas propiedades surgen de la conjugación de la estructura del polímero (secuencia regular de enlaces sencillos y dobles), esta configuración provoca la formación de orbitales de alta energía en los cuales los electrones se encuentran débilmente enlazados a su átomo correspondiente, resultando en cadenas con una deslocalización considerable de electrones^[7]. Después de más de 40 años de investigación, se asume que el transporte de electrones ocurre por una reacción de intercambio de electrones entre sitios redox vecinos, conocido como “electron hopping”, y por el movimiento de dichos electrones deslocalizados a lo largo del sistema conjugado^[5]. Se considera un polímero conjugado a una macromolécula cuya estructura presenta enlaces σ y π alternados^[8].

Los estudios de algunos polímeros conductores han demostrado que poseen propiedades semiconductoras dependientes del nivel de dopaje y protonación. El concepto de dopaje es lo que caracteriza a estos polímeros de los demás, pueden ser dopados de dos maneras: por reacción redox o protonación; la última solo aplica para la polianilina. Los polímeros conjugados en su forma desdopada son semiconductores/aislantes, posterior al dopaje hay un incremento de varios órdenes de magnitud en la conductividad eléctrica^[7]. Además, estos polímeros pueden existir en diferentes estados de oxidación ya que responden a estímulos externos cambiando algunas características como por ejemplo su color, sin embargo, su característica más importante es la facilidad con la que estos materiales pueden cambiar entre formas aislantes y conductoras de manera reversible^[5,9]. Dentro de los polímeros conductores

más investigados y utilizados se encuentran el polipirrol, politiofeno y polianilina. De los cuales, la polianilina exhibe menor conductividad como puede observarse en la Figura 1^[4].

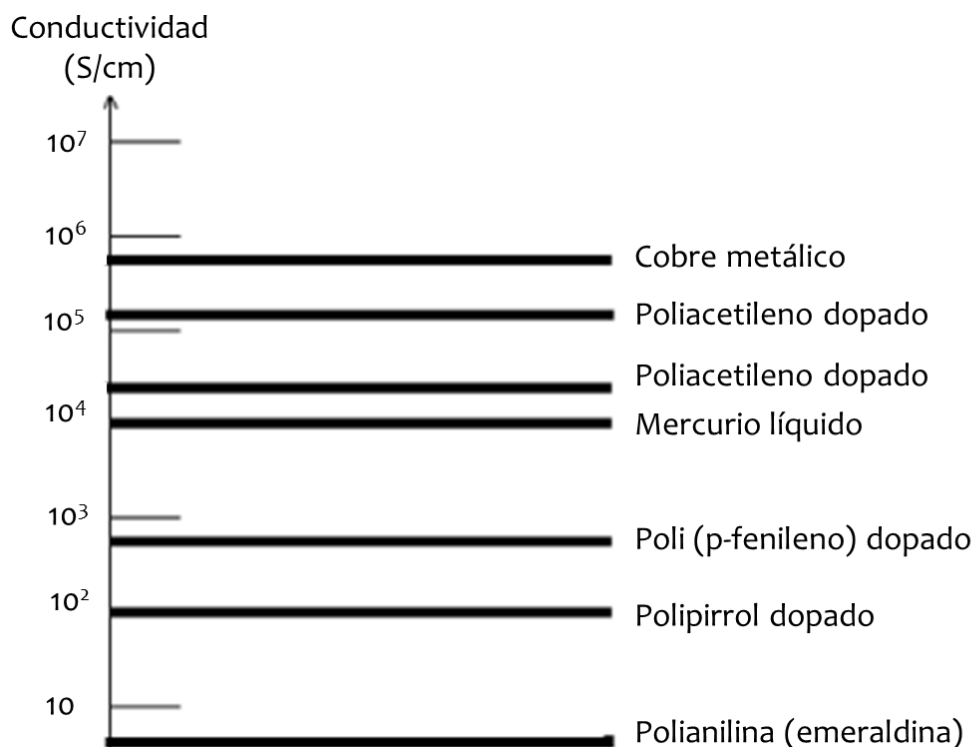


Figura1 Conductividades de distintos materiales

Los polímeros conductores pueden utilizarse exitosamente en materiales avanzados de diversos tipos, por ejemplo, fotovoltaicos, optoelectrónicos y sensoriales^[10].

2.3 Polianilina

La anilina fue descubierta en Europa las primeras décadas de 1800 por varios químicos quienes aislaron aceite a partir de la destilación del índigo y el alquitrán. En 1840 Carl Julius Fritzsche trató el índigo, lo destiló y purificó obteniendo un aceite incoloro al cual llamó “anilina” por el sinónimo de índigo, añil. También dedujo que bajo un tratamiento correcto con ácido se producía un material verde-azul, pero no fue sino hasta 1843 que mezcló una solución de anilina con clorato de potasio en ácido hidroclicórico y obtuvo un

precipitado azul, el cual se volvió verde al ser lavado con alcohol y verde oscuro al secarse por completo. 17 años después Crace-Calvert, Clift y Lowe desarrollaron y patentaron colorantes verdes y azules para algodón derivados de la oxidación de anilina que resultaron en el descubrimiento de la emeraldina. A pesar de que existían diversos productos derivados de la anilina en el mercado, fue hasta principios de 1900 que se empezó a reportar la estructura e identidad de estos materiales, en 1907-1911 Willstätter publicó su trabajo de investigación y concluyó que la anilina podía existir en distintos grados de oxidación. A la par en 1910, Green y Woodhead desarrollaban un modelo de estructuras de varios estados de oxidación, las cuales difieren en la conjugación como se observa en la Figura 2^[2]. Fueron ellos los primeros en representar el polímero como una cadena de moléculas de anilina con acoplamiento cabeza-cola^[11].

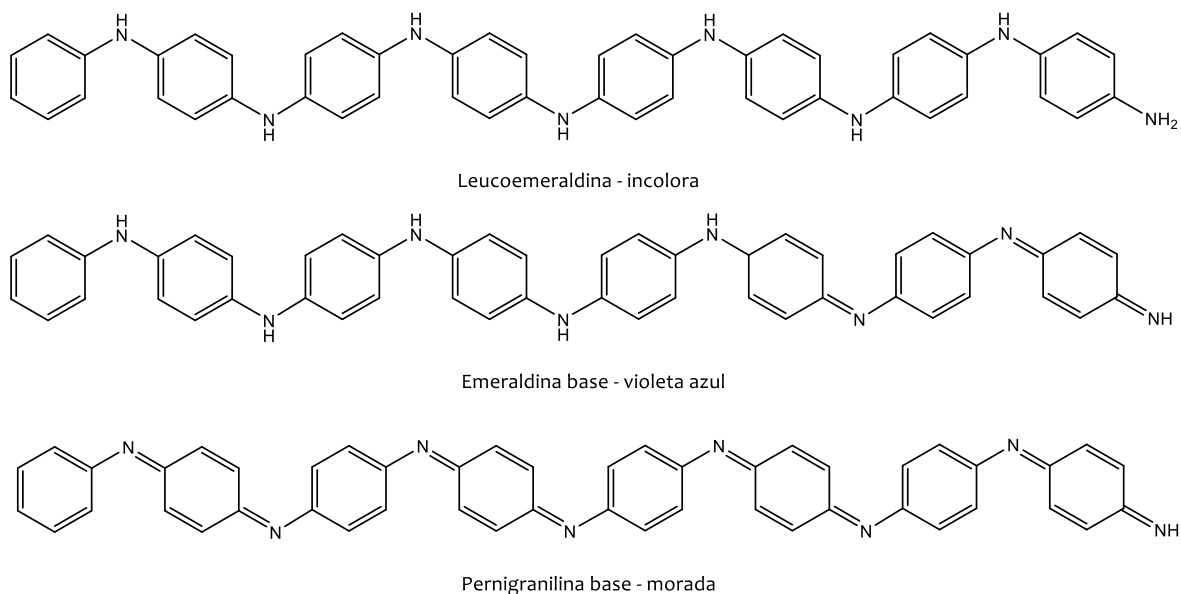


Figura 2 Estructuras de las principales formas de la anilina propuestas por Green y Woodhead.

La protonación y desprotonación, junto con varias propiedades fisicoquímicas de la polianilina (PANI) se deben a la presencia del grupo flexible -NH, el cual se encuentra flanqueado de fenilos. Dicho grupo es el responsable del cambio de color y

conductividad eléctrica del polímero, ya que la diferencia en la composición de los segmentos amina e imina genera los distintos estados de oxidación de este material^[11].

En todos los polímeros conductores, al momento de introducir un agente oxidante o reductor se forman portadores de carga en la cadena principal que son compensados con contraiones, la remoción de dichos contraiones provoca un cambio en el estado de oxidación y la desaparición del polarón. En la polianilina no necesariamente se cambia el estado de oxidación, sino que el anillo de benceno adyacente a un átomo de nitrógeno acepta una fracción de una carga positiva, transformándose así la unidad bencenoide a una quinoide. Las propiedades son otorgadas por la regularidad de su estructura, en la cual >95% de las unidades monoméricas se encuentran acopladas de manera cabeza-cola^[9].

PANI es un polímero con facilidad de síntesis y procesamiento, estabilidad a exposición ambiental, no tóxico, con alta estabilidad térmica y bajo costo de manufactura, posicionándose como uno de los polímeros conductores más importantes hasta el día de hoy^[9,12]. Algunas de las posibles aplicaciones para este polímero conductor son: baterías, celdas solares, sensores bioquímicos, diodos, electroluminiscencia y membranas^[10].

2.3.1 Síntesis de polianilina

La polianilina se sintetiza por polimerización oxidativa de la anilina, esta síntesis representa un tipo de polimerización no reconocido en la historia temprana de las macromoléculas. Todos los polímeros sintéticos que existían hasta ese momento son ejemplos de materiales hoy conocidos como “polímeros de adición”, una de las dos designaciones generales de clases de polímeros introducida por Carothers en 1929. La polimerización de anilina revolucionó la síntesis de polímeros sintéticos ya que se genera vía mecanismo por etapas, pero por un proceso de polimerización oxidativa. Cada etapa en el crecimiento del polímero involucra oxidación, acoplamiento y desprotonación^[2,9]. La polimerización y el dopaje ocurren al mismo tiempo, lo cual se puede lograr electroquímica o químicamente. La síntesis de PANI por oxidación química implica el uso

de un ácido en presencia de un agente oxidante, cuya función principal es retirar un protón de la molécula de anilina sin formar un enlace fuerte de coordinación, es importante no excederse en la cantidad de oxidante ya que puede provocar la degradación oxidativa del polímero. La síntesis química requiere 3 reactivos: anilina, un medio ácido (acuoso u orgánico) y un oxidante. Los ácidos más comúnmente utilizados son ácido clorhídrico y ácido sulfúrico, mientras que los oxidantes recomendables, por mencionar algunos, son persulfato de amonio y peróxido de hidrógeno. La temperatura de la solución se mantiene fría con la finalidad de limitar reacciones secundarias, algunos ejemplos se presentan en la Figura 3, las cuales introducen elementos no deseables a la cadena polimérica y se consideran defectos. La duración de la reacción varía desde 30 minutos hasta 24 horas^[11,13,14].

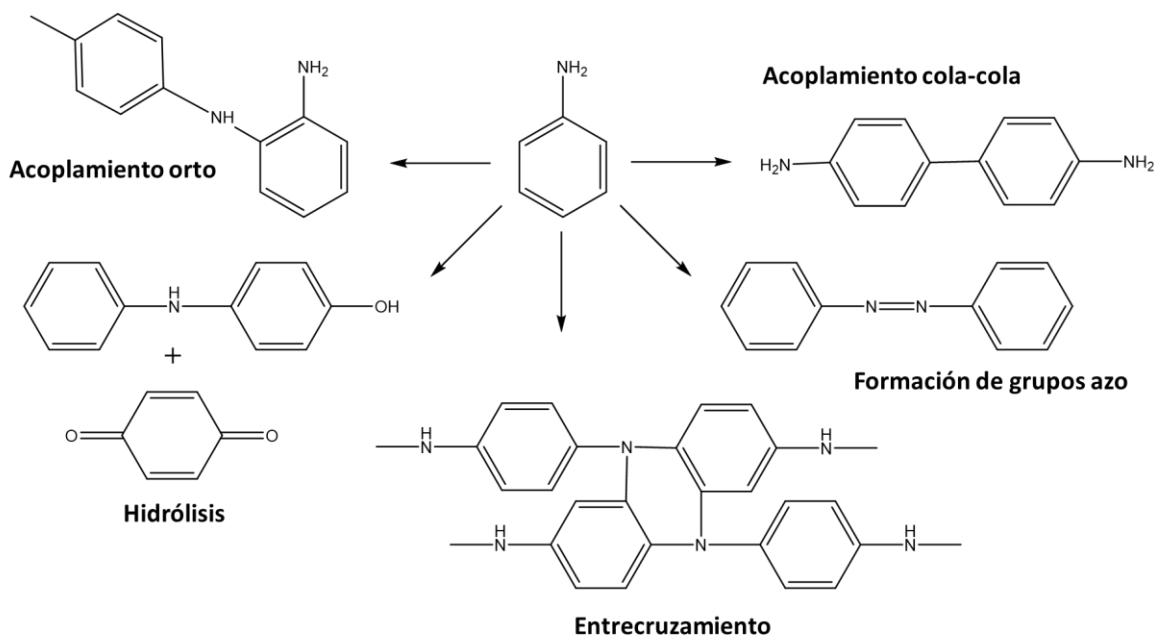


Figura 3 Posibles reacciones secundarias durante la síntesis de PANI

En las últimas décadas se han desarrollado múltiples reacciones de polimerización enzimática, dando lugar a una variedad de polímeros nuevos. Para el caso específico de la polimerización oxidativa de la anilina esta ruta alternativa también es viable esta utiliza

un sistema de peroxidasas/H₂O₂ para la oxidación de las moléculas de monómero. Además, existen compuestos denominados catalizadores biomiméticos, los cuales imitan los mecanismos naturales de las enzimas. La hematina es un ejemplo de este tipo de compuestos, es de origen natural y gracias a que en su estructura se encuentra el mismo grupo prostético que algunas peroxidasas posee actividad tipo peroxidasa, permitiéndole llevar a cabo la catálisis de la polimerización de anilina y otros monómeros^[10,16-19].

2.3.1.1 Polimerización oxidativa de anilina

La polimerización oxidativa es utilizada para la síntesis de productos de diversas clases de monómeros, entre ellas aminas aromáticas. Dichos monómeros se caracterizan por sus propiedades donadoras de electrones y su alta tendencia a la oxidación, debido a la presencia de un sustituyente con carácter donador de electrones en el heterociclo. Técnicamente, esta polimerización se considera como la formación de un enlace covalente entre moléculas de monómero a expensas de la sustracción de dos protones, dando lugar a varios posibles tipos de acoplamiento entre unidades monoméricas tales como: acoplamiento cabeza-cabeza, cabeza-cola y cola-cola para el caso específico de la anilina.

El mecanismo de crecimiento de la cadena polimérica de la anilina ocurre por sustitución electrofílica, representada en la Figura 4. La estructura con átomos de nitrógeno oxidado actúa como sitio activo de polimerización, este grupo terminal activo ataca el fenilo de otra molécula de anilina, sustituyendo un protón del anillo. Posteriormente ambos pierden un protón y se enlazan, siguiendo el mecanismo de polimerización en cadena.

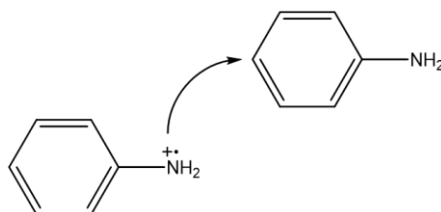


Figura4 Reacción de sustitución electrofílica de la anilina

El acoplamiento cabeza-cola se atribuye a la oxidación del heteroátomo de carácter donador en el monómero, sin embargo, aunque la cadena crezca de esta manera, pueden ocurrir otro tipo de sustituciones como resultado del ataque electrofílico en diferentes átomos del fenilo, obteniendo una estructura heterogénea. Dado a que la anilina posee un átomo de nitrógeno en el anillo la probabilidad de formar estructuras meta- es baja, dicho sustituyente donador de electrones crea un exceso de carga negativa en los átomos de carbono orto- y para-, direccionando ahí el ataque electrofílico.

La reacción de polimerización se puede realizar en un amplio rango de pH, obteniendo distintos productos de oxidación con diferentes propiedades y conductividades desde 10^{-10} hasta 10^2 S/cm. Todas las estructuras nitrogenadas se protonan a diferentes valores de pH, a $\text{pH} > 3.5$ la anilina principalmente existe como una molécula neutra y al bajar el pH se protona adquiriendo una carga positiva. Cuando la polimerización se lleva a cabo en medios básicos, neutros o muy poco ácidos, se obtiene un producto café de baja conductividad, mientras que la polimerización de anilina en medio ácido da lugar a un producto verde oscuro con alta conductividad. Este proceso es complejo y dinámico, por lo que el valor de pH en el cual el proceso de reacción comienza es de suma importancia^[9].

2.3.1.2 Polimerización enzimática y biomimética de anilina

Las polimerizaciones enzimáticas contribuyen a la sustentabilidad global, ya que utilizan componentes renovables y no tóxicos como catalizadores. Una de las ventajas es que las reacciones se llevan a cabo bajo condiciones no drásticas de temperatura, presión y pH, a diferencia de las polimerizaciones catalizadas químicamente^[20]. A pesar de las numerosas ventajas que poseen las enzimas su uso representa un alto costo, por lo que surgen los catalizadores biomiméticos como alternativa estable y amigable con el medio ambiente.

Los compuestos biomiméticos son moléculas que asemejan el sitio activo de algunas enzimas, un ejemplo de ello son las denominadas metaloporfirinas, las cuales consisten en un átomo metálico coordinado dentro de un macrociclo de 4 anillos pirrólicos. Las que contienen Fe^{2+} son consideradas catalizadores efectivos, ya que presentan actividad catalítica tipo peroxidasa, siendo capaces de catalizar la polimerización oxidativa de fenoles, anilinas y derivados en presencia de peróxido de hidrógeno^[21-23]. En décadas recientes se han desarrollado vías enzimáticas y biomiméticas para la síntesis de polianilina y otros ICPs, con la ventaja de que en estas reacciones el sistema [peroxidasa o tipo peroxidasa/ H_2O_2] otorga un mejor control en la velocidad de oxidación y reduce los subproductos a agua^[24-25]. En contraste con la polimerización química, este tipo de polimerización por catálisis enzimática y biomimética representa una alternativa para la producción de ICPs solubles^[16]. La actividad de las peroxidasas es óptima a pH neutro, lo que favorece la sustitución en las posiciones orto- y meta- del anillo, esta es la razón por la cual los primeros intentos de síntesis de polianilina resultaron en polímeros con ramificaciones y entrecruzamiento. En cambio, el acoplamiento para- se propicia a pH ácido, en el cual suceden situaciones indeseables tales como la pérdida de actividad de peroxidasas, degradación del grupo hemo e insolubilidad de compuestos biomiméticos como la hematina. En la literatura se encuentran reportadas diversas síntesis con soportes a fin de evitar dicha inactivación enzimática y funcionalizar compuestos que contienen el grupo hemo para promover el acoplamiento cabeza-cola de las moléculas de anilina^[16,18,24-27]. Por el contrario, existen muy pocos trabajos reportados acerca de polimerizaciones enzimáticas y biomiméticas libres de soportes.

2.3.2 Estados de oxidación de la polianilina

La estructura general de la polianilina, tal como se muestra en la Figura 5, está compuesta por unidades bencenoides o bloques reducidos (y) y unidades quinoides o bloques oxidados ($1-y$), donde “ y ” toma valores entre 0 y 1. Este valor determina el estado de oxidación del polímero, cuando $y=0.5$ la polianilina existe en forma emeraldina, $y=0$ corresponde a la forma completamente oxidada pernigranilina, mientras que $y=1$

corresponde a la forma completamente reducida leucoemeraldina. La pernigranilina y emeraldina pueden existir como sal o base^[12,19].

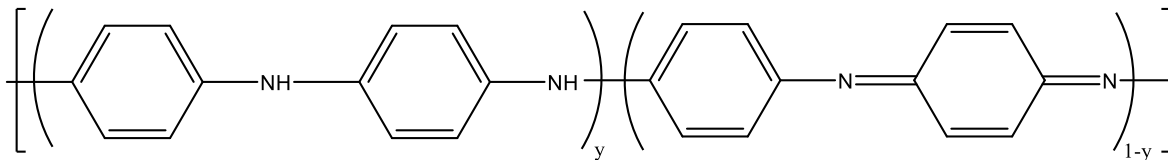


Figura5 Estructura general de la polianilina con bloques reducidos y oxidados

La diferente conformación estructural de la polianilina difiere en color, estabilidad y conductividad como se puede apreciar en la Tabla 1^[4,19].

Tabla1 Formas de PANI

| Nombre | Estado de oxidación | Color | Conductividad eléctrica |
|---------------------|-----------------------------------|----------------------|---------------------------------|
| Leucoemeraldina | Totalmente reducido | Incoloro-amarillento | Aislante 10^{-12} S/cm |
| Emeraldina base | Parcialmente oxidado no protonado | Azul | Aislante 10^{-12} S/cm |
| Emeraldina sal | Parcialmente oxidado protonado | Verde | Conductor $10^{-4} - 10^2$ S/cm |
| Pernigranilina base | Totalmente oxidado no protonado | Morado | Aislante 10^{-12} S/cm |
| Pernigranilina sal | Totalmente oxidado protonado | Morado | Aislante 10^{-12} S/cm |

Como es posible observar en la tabla, solamente la emeraldina protonada presenta conductividad, la cual se ubica en un nivel semiconductor muchos órdenes de magnitud mayor que aquella en los polímeros comunes ($<10^{-9}$ S/cm) pero menor que la de metales típicos ($>10^4$ S/cm)^[11].

2.3.2.1 Emeraldina

La forma más estable de la polianilina es la denominada emeraldina, la cual puede existir en base y sal^[9]. La emeraldina base es un aislante eléctrico que consiste en dos átomos de nitrógeno amina seguidos de dos átomos de nitrógeno imina, ésta puede convertirse

en sal (forma conductora) por dos procesos: dopaje con ácido protónico o dopaje oxidativo, en el primero no existe un intercambio de electrones y en el segundo sí^[11].

La Figura 6, describe el mecanismo de formación de la especie reactiva en el proceso de síntesis de la forma sal de emeraldina en medio ácido. El primer paso se ilustra en la Figura 6 a), el cual corresponde a la oxidación de la molécula de anilina y la formación del catión radical. Dicha especie reactiva existe en varias formas de resonancia, las cuales están representadas en la Figura 6 b), donde la forma resonante (2) es la más reactiva^[9,11].

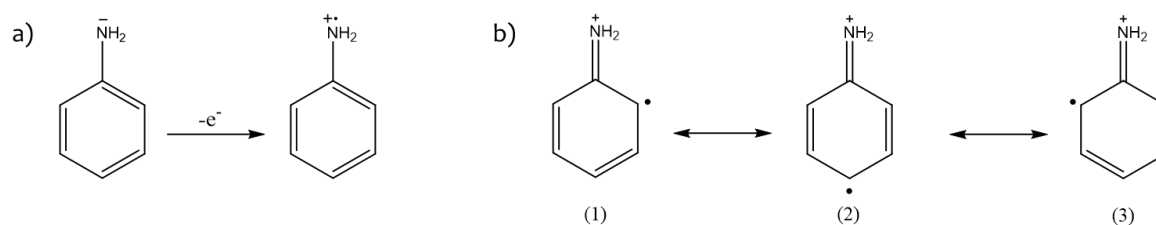


Figura 6a) Formación de catión radical por oxidación de anilina y b) Estructuras de resonancia del catión radical

En la Figura 7 y 8 se muestra la secuencia de reacciones que conducen a la polimerización de la anilina para dar lugar a la PANI. En esta secuencia, el radical catión de anilina en su forma más reactiva reacciona con el catión radical inicial para dar lugar a un dímero con acoplamiento cabeza-cola, el cual se favorece en medio ácido. Posteriormente, el dímero se oxida formando un nuevo catión radical que sigue reaccionando, formando trímeros, tetrámeros y así sucesivamente hasta formar el polímero^[4,11].

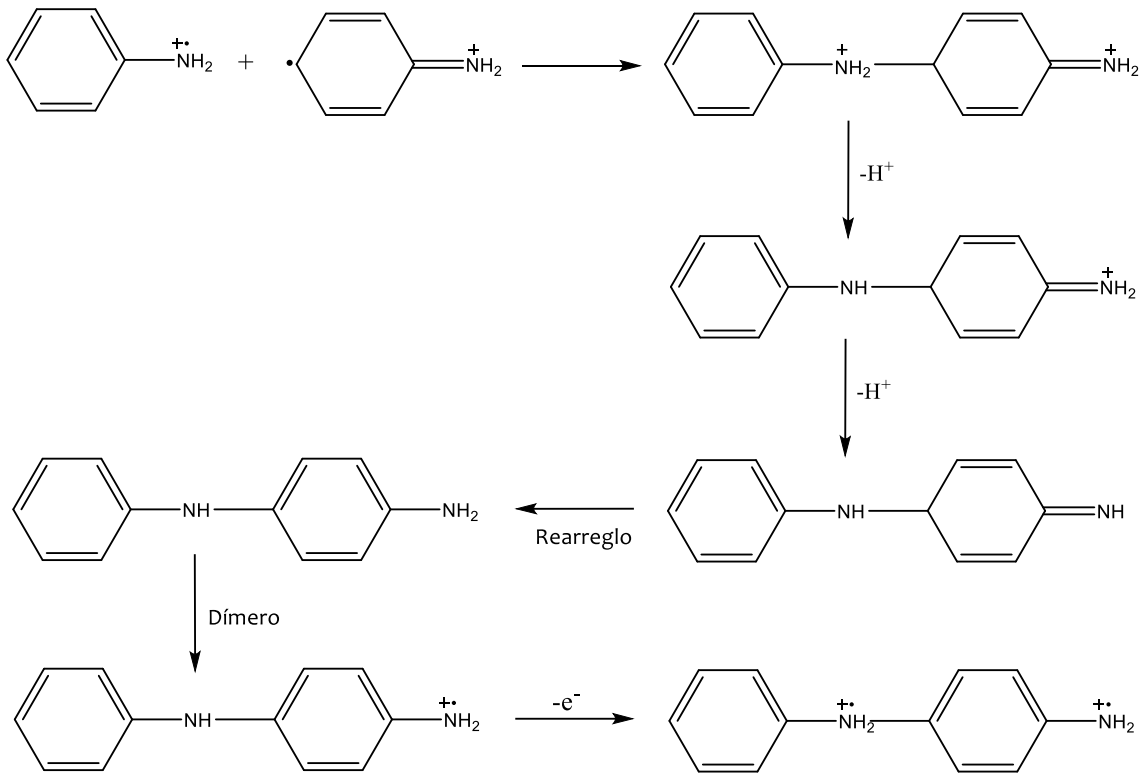


Figura 7 Reacción que da lugar a la formación de un dímero con acoplamiento cabeza a cabeza.

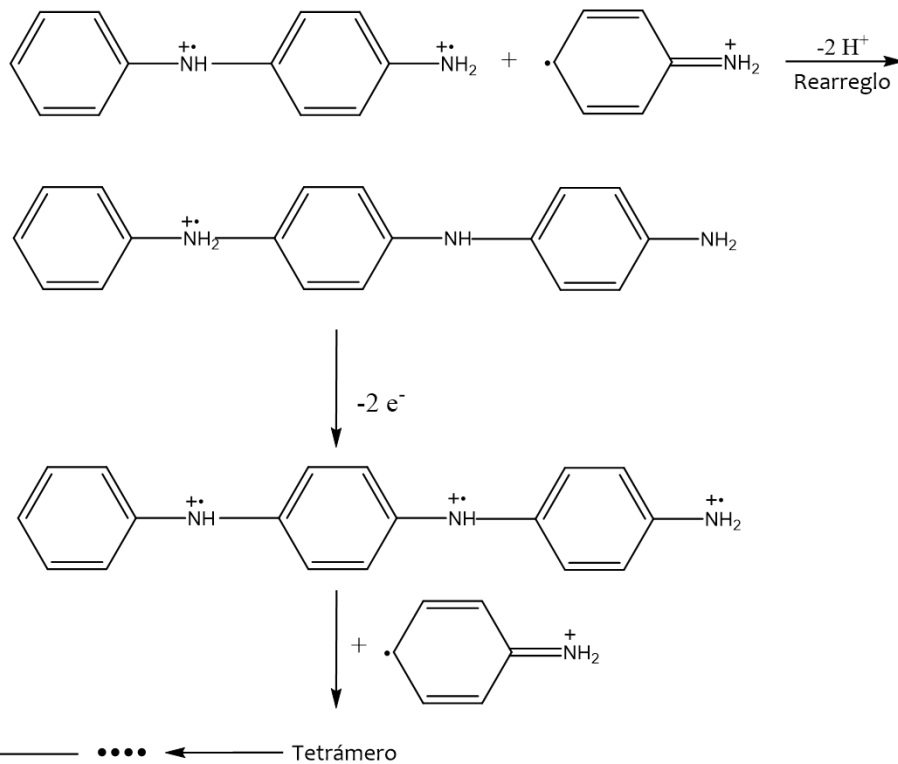


Figura 8 Continuación del esquema de polimerización que da lugar a polianilina.

2.3.2.2 Dopaje de PANI

A fin de que la PANI se asocie a los polímeros electrónicamente conductores, debe doparse. La polianilina es un polímero conductor específico ya que su mecanismo de conducción se puede inducir por oxidación de la leucoemeraldina base, o bien, por la protonación de la emeraldina base^[11]. Cuando PANI en la forma de emeraldina base se trata con ácidos, se lleva a cabo un proceso de dopaje no redox o tipo-p que no involucra la adición o remoción de electrones de la estructura del polímero^[12,28], sino que los átomos de nitrógeno imina se protonan dando lugar a la forma polarónica, donde los cationes radicales aparecen y se deslocalizan sobre cierta longitud conjugada, otorgándole la conductividad electrónica al polímero. Este proceso de dopaje se muestra en la Figura 9. Por otra parte, es importante destacar que este proceso es reversible al tratar la sal de emeraldina con una base^[11-12,19].

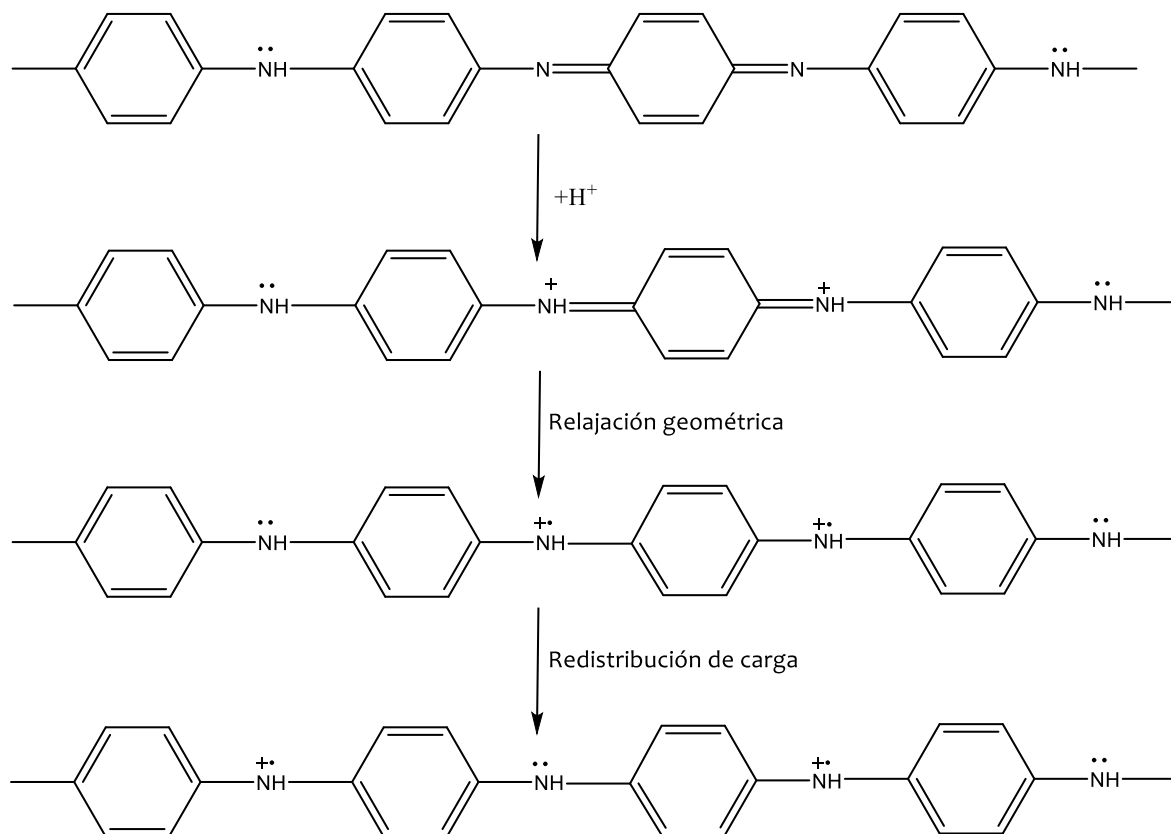


Figura 9 Dopaje de PANI con ácido protónico

Las cadenas de la forma conductora de PANI tienen una estructura ordenada la cual, junto con los pares de electrones libres del nitrógeno, le proporcionan una policonjugación, provocando que las cadenas poliméricas se acomoden en un solo plano formando un zigzag donde las nubes de electrones π se superponen por encima y por debajo. El sistema policonjugado es una vía de transporte, la cual brinda movilidad a los portadores de carga introducidos por los ácidos fuertes (también conocidos como “agentes dopantes”) impartiendo conductividad al polímero^[9].

2.4 Enzimas

Las proteínas representan un sistema complejo, en el cual la estructura tiene un efecto directo en la eficiencia y estabilidad. Las metaloproteínas son proteínas que contienen un ion metálico, representando casi la mitad de las proteínas presentes en la naturaleza, las cuales son responsables de la catálisis de procesos biológicos de suma importancia tales como la fotosíntesis, respiración, oxidación de agua, reducción de O_2 y fijación de N_2 , entre otras^[29]. Algunas de las características importantes y que hacen atractivo el uso y aplicación de las enzimas se basan en que las enzimas son proteínas que poseen actividad catalítica, son reciclables, amigables con el medio ambiente y no tóxicas, ya que se producen a partir de cualquier organismo vivo^[30-31], son biocatalizadores que catalizan todas las reacciones metabólicas responsables de mantener la vida^[16]. Generalmente son catalíticamente activas solamente en presencia de coenzimas y/o grupos prostéticos (componentes no aminoacídicos que están unidos fuertemente a la molécula, pueden ser metales o pequeñas moléculas orgánicas)^[30-31].

De manera general, los diferentes tipos de enzimas se dividen en seis clases dependiendo del tipo de sustrato sobre el cual actúan o catalizan^[32]:

- i. Oxidorreductasas: catalizan reacciones redox por transferencia de electrones.
- ii. Transferasas: catalizan la transferencia de un grupo funcional de un compuesto a otro.
- iii. Hidrolasas: catalizan la hidrólisis de varios enlaces.

- iv. Liasas: catalizan el rompimiento de los enlaces C-C, C-O, C-N de manera alterna a la hidrólisis u oxidación.
- v. Isomerasas: catalizan la racemización o epimerización de centros quirales, esta clase se subdivide de acuerdo con sus sustratos.
- vi. Ligasas.

Hoy en día existen miles de enzimas disponibles comercialmente e incluso algunas modificadas para aplicaciones industriales^[16]. Las enzimas son catalizadores naturales capaces de catalizar un sinnúmero de síntesis de estructuras biomoleculares^[33], de manera general, las oxidorreductasas, hidrolasas e isomerasas son relativamente estables y pueden desempeñar dicha función^[16,20]. A continuación, en la Tabla 2 se enlistan algunos ejemplos.

Tabla 2 Clases de enzimas y ejemplos

| Enzimas | Ejemplos | Polímeros sintetizados |
|------------------|--|--|
| Oxidorreductasas | Peroxidasa, lacasa, tirosinasa, glucosa oxidasa | Polifenoles, polianilinas, polímeros vinílicos |
| Transferasas | Fosforilasa glucosiltransferasa, aciltransferasa | Polisacáridos, oligosacáridos cíclicos, poliésteres |
| Hidrolasas | Glucosidasa (celulasa, amilasa, quitinasa, hialuronidasa), lipasa, peptidasa, proteasa | Polisacáridos, poliésteres, policarbonatos, policarbonatos, poliamidas, polifosfatos, polioésteres |
| Liasas | Decarboxilasa, aldolasa, dehidratasa | |
| Isomerasas | Racemasa, epimerasa, isomerasa | |
| Ligasas | Ligasa, sintasa, acil-CoA sintetasa | |

Ventajas tales como alta especificidad, actividad en condiciones no drásticas y biodegradabilidad, son contrarrestadas por la evidente desventaja de su inestabilidad intrínseca, la cual es característica de su compleja estructura. Durante el procesamiento, almacenamiento y aplicación, las enzimas sufren una variedad de reacciones de desnaturalización, proceso en el cual se despliega la estructura terciaria, dejando a los residuos desalineados impidiendo que sean partícipes de interacciones que estabilicen la estructura. El desplegamiento puede ser reversible si se retira el factor que lo ocasiona, aunque algunas veces la enzima puede sufrir cambios químicos que resultan en la

inactivación irreversible^[34]. Dentro de los avances tecnológicos, ha habido un creciente interés en el desarrollo de bioprocesos que involucran enzimas, su selectividad y especificidad, junto con su actividad catalítica las vuelven biocatalizadores prometedores en diversas aplicaciones, incluida la biocatálisis^[35].

2.4.1 Catálisis enzimática

La sustancia que desempeña el rol clave en una reacción sin consumirse se conoce como catalizador^[33]. Históricamente se han utilizado ácidos, bases, radicales, metales de transición y de tierras raras para la catálisis. El uso de enzimas como catalizadores surge hace 3 décadas como un nuevo enfoque en la síntesis polimérica, otorgando la posibilidad de llevar a cabo una química de polímeros ecológica^[16]. Todos los polímeros naturales producidos *in vivo* son catalizados por enzimas, la síntesis *in vitro* trajo consigo nuevas estrategias para producir polímeros naturales y sintéticos que contribúan a la sustentabilidad global al reducir el uso de materiales fósiles^[36]. En comparación con la catálisis química, la catálisis enzimática es altamente específica y poderosa. Tal es la naturaleza de la enzima, que una simple sustitución o rotación de una fracción química hace la diferencia entre una enzima activa e inactiva^[37].

2.4.2 Polimerización enzimática

Las polimerizaciones enzimáticas representan una ruta alternativa para la síntesis química de polímeros, las cuales se llevan a cabo en condiciones extremas y con una alta cantidad de agente oxidante, lo que resulta en sales indeseadas como subproducto y en un polímero con trazas de contaminantes^[26]. La ruta enzimática reduce los subproductos innecesarios gracias a reacciones selectivas y el uso de materiales con propiedades benignas al medio ambiente^[20], hoy en día representa una alternativa efectiva para los procesos convencionales catalizados químicamente, ofreciendo ventajas significativas, las cuales se resumen en condiciones leves de reacción (en términos de temperatura y toxicidad) y alta selectividad de las enzimas, lo que resulta en un mejor desempeño y calidad del producto. La eficiencia del proceso biocatalítico está relacionado con parámetros importantes de proceso, por ejemplo, tipo de enzima y monómero, temperatura y tiempo de reacción, técnica de polimerización y remoción de

subproductos. Una característica digna de destacar es que las enzimas son funcionales en un amplio rango de ambientes, sin embargo, a pesar de las múltiples ventajas que representan las polimerizaciones catalizadas por enzimas, a condiciones extremas de operación características de los procesos industriales (presión y temperatura elevada, pH muy ácido o básico y factores oxidantes) tienden a tener problemas de estabilidad y se obtienen polímeros de peso molecular relativamente bajo. Es ese motivo el que da lugar a la búsqueda, investigación y optimización de catalizadores más estables por diferentes métodos, entre ellos la inmovilización^[32-33,38].

2.4.3 Inmovilización de enzimas

La aplicación industrial deseada generalmente es difícil de lograr utilizando la enzima en su forma libre^[39]. Las aplicaciones de las enzimas en la industria, o en condiciones similares, son factibles solo si se estabilizan contra temperatura, pH y presencia de sales, alcalinos y surfactantes^[34]. Es común que para ciertos procesos biocatalíticos las enzimas no cumplan con los requerimientos necesarios para aplicaciones a gran escala, por lo que sus propiedades necesitan ser optimizadas. Se considera que las enzimas son sensibles e inestables a temperaturas elevadas y que requieren un medio acuoso para funcionar; estas características no son ideales para un catalizador y, en la mayoría de los casos, son indeseables en la síntesis. Una manera sencilla de superar dichos inconvenientes es inmovilizando las enzimas, esta técnica ha demostrado ser valiosa durante más de 40 años, mejorando la estabilidad. Sin embargo, también se presentan algunas desventajas ya que los procesos de inmovilización alteran de manera inevitable el ambiente molecular natural de las enzimas afectando la actividad catalítica a través de distintos mecanismos, por ejemplo, provocando menor accesibilidad del sustrato hacia el centro catalítico activo, desactivación parcial por solventes orgánicos, pérdida de propiedades dinámicas, cambios conformacionales, posible desnaturalización y limitaciones de transferencia de masa. Es por eso por lo que el sistema de inmovilización (soporte, condiciones y método) debe ser diseñado para optimizar la característica deseada^[31,38-41]. Un reciente interés en la nanotecnología ha ofrecido una variedad de nano andamios (nanoscaffolds) para la inmovilización de enzimas, a lo largo de los años se han

implementado diversos tipos de soportes y tecnologías para mejorar el proceso, cuya finalidad es maximizar la carga de enzima, actividad y estabilidad, reduciendo así el costo de biocatalizadores enzimáticos. Un requisito importante para la inmovilización de proteínas es que la matriz debe brindar un ambiente biocompatible e inerte, o sea, no debe interferir con la estructura nativa de la proteína, lo cual puede comprometer su actividad biológica^[42]. Se han reportado varios andamios/soportes de tamaño nanométrico porque disminuyen las limitaciones de difusión y maximizan el área superficial funcional para incrementar la carga de enzima. La inmovilización es quizás la estrategia más utilizada para mejorar la estabilidad operacional de los biocatalizadores, tener mejor control de operación y recuperar el producto de manera fácil sin contaminar el catalizador. Los cuatro métodos principales de inmovilización son: 1) adsorción, 2) unión covalente, 3) atrapamiento y 4) confinamiento en membrana^[34]. Es reconocido que la inmovilización de enzimas es capaz de proteger y/o estabilizar las enzimas contra ataques químicos y ambientales, permitiendo su recuperación y reutilización. El desarrollo de técnicas para la inmovilización, así como de materiales que fungen como soportes (polímeros naturales o sintéticos, materiales inorgánicos) ha sido estudiado de manera extensa durante los últimos años^[35]. Cualquier técnica que inmovilice la enzima dentro de un sólido poroso le brinda estabilidad operacional, aun cuando la estructura nativa no se vea afectada. Cabe mencionar que la inmovilización puede producir algún tipo de distorsión en la estructura de la enzima, particularmente en la región del sitio activo. El nanoambiente brinda condiciones óptimas de reacción de pH, fuerza iónica y temperatura para la enzima inmovilizada, lo que resulta en el incremento de la actividad y estabilidad^[39].

2.5 Peroxidasas

La familia de las peroxidasas incluye las de origen animal, la cual a su vez se divide en 3 clases: clase I) enzimas intracelulares, clase II) peroxidasas secretadas codificadas únicamente por hongos y clase III) peroxidasas secretadas de plantas. A pesar de las diferencias entre las subfamilias, todas conservan la estructura 3D plegada^[43]. La mayoría de las peroxidasas son hemoproteínas que catalizan la oxidación de múltiples

moléculas en presencia de peróxido de hidrógeno. De manera más específica, catalizan la oxidación de sustratos orgánicos, descomponiendo el H_2O_2 en agua y oxígeno^[44]. Siendo las más estudiadas las que contienen un grupo prostético ferriprotoporfirina IX en su sitio activo, entre ellas la peroxidasa de rábano picante y la peroxidasa de soya. Ambas peroxidasas son utilizadas para la polimerización oxidativa de compuestos aromáticos^[45-46]. Su mecanismo de reacción involucra 3 estados de oxidación del Fe, seguido de su reacción con el H_2O_2 y con el sustrato aromático vía acoplamiento oxidativo con los radicales^[16].

En la Tabla 3, se enlistan algunas propiedades bioquímicas y estructurales de la HRP y SBP.

Tabla 2 Comparación entre propiedades de peroxidasas HRP^[45] y SBP

| Propiedad | HRP | SBP |
|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Número de aminoácidos | 306 | 306 |
| Clasificación enzimática | 1.11.1.7 Peroxidasa/hemoproteína | 1.11.1.7 Peroxidasa/hemoproteína |
| Peso molecular | 44,100 Da | 40,660 Da |
| Grupo prostético | Grupo hemo | Grupo hemo |
| Intervalo de pH con actividad | 4-8 | 2-10 |

Ambas peroxidasas cuentan con 306 aminoácidos, pertenecen a la misma clasificación y poseen el grupo prostético hemo, lo que hace que compartan cerca del 60% de su secuencia homóloga. Sin embargo, cabe recalcar la diferencia en el rango de pH en las cuales presentan actividad^[45,47-48]. A continuación, en los apartados 2.5.1 y 2.5.2 se detalla más a fondo cada una.

2.5.1 Peroxidasa de rábano picante

La peroxidasa de rábano picante es probablemente la más estudiada de la familia de peroxidasas de plantas^[49-50]. Es una proteína que contiene porfirina y hierro en su

estructura y que cataliza la oxidación de la anilina y derivados de fenol en presencia de H_2O_2 ^[36,51], sin embargo, no es la peroxidasa óptima para la polimerización de anilina, ya que para obtener la forma conductora la reacción debe llevarse a cabo a pH bajo, en el cual la HRP se desactiva rápidamente^[25]. Existen dificultades relacionadas con la producción y purificación de esta enzima, las cuales enfatizan la importancia de su inmovilización en nanoestructuras^[38].

2.5.2 Peroxidasa de soya

La peroxidasa de soya representa una alternativa más económica a la HRP, ya que puede obtenerse de la cáscara de semilla de soya, siendo esta una materia prima de abundante disponibilidad puesto que es un subproducto de la industria alimenticia^[52-53]. La peroxidasa de soya presenta estabilidad y propiedades catalíticas extraordinarias, es capaz de oxidar sustratos orgánicos e inorgánicos en presencia de peróxido de hidrógeno^[50]. Es un biocatalizador atractivo debido a su estabilidad en un amplio intervalo de pH y temperatura^[47,51], presenta mayor estabilidad térmica y conformacional, y mejor actividad catalítica en condiciones ácidas que la HRP a pesar de tener un alto porcentaje de similitud^[26,50,54].

2.6 Biocatálisis enzimática

La biocatálisis está definida por el uso de biomoléculas como catalizadores en la síntesis de nuevos materiales, donde se realza la velocidad de reacción sin afectar las propiedades termodinámicas^[39]. La ventaja del uso de enzimas como biocatalizadores es que promueven los procesos amigables con el medio ambiente puesto que se implica un menor consumo de químicos y la ausencia de subproductos tóxicos, por el contrario, una gran desventaja es su área limitada de operación por inhibición y vulnerabilidad, así como el elevado costo operacional debido a la baja estabilidad y reutilización en procesos escalados^[35,39]. Al año 2012, se tenía conocimiento de más de 500 productos comerciales fabricados utilizando enzimas. Si bien se sabe que las enzimas exhiben un pobre desempeño bajo condiciones industriales, la inmovilización expandió el campo de aplicaciones^[55].

2.7 Nanobiocatálisis

La nanobiocatálisis se considera la fusión entre la biocatálisis y la nanotecnología. El rápido crecimiento de la nanotecnología ofrece la posibilidad de combinar exitosamente enzimas con materiales nanoestructurados, dando lugar a biocatalizadores enzima-nanoestructura, o bien, nanobiocatalizadores^[35,56-57]. Los enfoques nanobiocatalíticos han evolucionado desde estrategias simples de inmovilización, hasta toda una ciencia en la cual se han sintetizado enzimas sintéticas y con nuevas formas, las cuales contribuyen a un menor consumo de energía y mayor tiempo de vida de los sistemas catalíticos. Dado que las enzimas son extremadamente específicas en su régimen de reacción y la menor variación de condiciones puede desestabilizarlas, el principal objetivo de la nanobiocatálisis es precisamente estabilizarlas y aumentar la actividad catalítica. El confinamiento de biocatalizadores brinda un ambiente con estabilidad excepcional frente a pH, temperatura, presencia de solventes orgánicos y almacenamiento^[33]. En comparación con las enzimas inmovilizadas en soportes micrométricos, los nanobiocatalizadores, al tener la enzima dentro o sobre materiales nanoestructurados, pueden alcanzar una mayor capacidad de carga enzimática y una mejor eficiencia de transferencia de masa debido a la alta proporción superficie/volumen que optimiza la exposición del biocatalizador al medio de reacción a medida que el tamaño del nanosoporte disminuye. El desarrollo de nanobiocatalizadores incluye la optimización de las estructuras moleculares de proteínas y la manipulación de ambientes nanométricos de las enzimas^[42,55,58], prometiendo ventajas para mejorar la actividad enzimática, estabilidad y desempeño en bioprocesos. La preparación, eficiencia catalítica y potencial aplicación de los nanobiocatalizadores es significativamente diferente a las enzimas inmovilizadas convencionales^[35].

2.8 Materiales nanoestructurados

La Organización Internacional de Normalización (ISO por sus siglas en inglés) define un material nanoestructurado como un material “con cualquier estructura externa, interna o superficial en la nanoescala”. Los nanomateriales y nanoestructuras están formados de carbono, metal, óxidos o materiales orgánicos e inorgánicos y se clasifican de acuerdo

con su forma, tamaño, composición, origen y dimensión^[59]. Gracias a la gran disponibilidad de materiales nanoestructurados y su tamaño comparable con las biomacromoléculas, se ha impulsado su uso como soporte para inmovilización enzimática, dando lugar a nanobiocatalizadores^[31,35,56]. Varios materiales nanoestructurados a base de especies orgánicas e inorgánicas combinadas, entre ellas las nanoflores híbridas, han recibido atención debido a su gran área superficial y propiedades fisicoquímicas, la gran área superficial y el tamaño de poro controlado típicamente resultan en una mejor carga de enzima, lo cual incrementa la actividad enzimática por unidad de masa o volumen en comparación con los materiales convencionales. Los materiales nanoestructurados con la habilidad de controlar el tamaño de poro y la forma permiten una mejor interacción con la enzima, incrementan la eficiencia de la inmovilización y optimizan el almacenamiento a largo plazo y la estabilidad de reciclado de la enzima^[39]. El combinar peroxidasas o sistemas tipo peroxidasa con dichas nanoestructuras es una estrategia para mejorar la actividad catalítica ^[38].

2.8.1 Nanoflores híbridas orgánico-inorgánico

A principios de los 2000 comenzó a popularizarse el estudio y desarrollo de nuevos nanomateriales con morfologías atractivas. Los nanobiomateriales, también conocidos como nanomateriales híbridos orgánico-inorgánico, son materiales en los cuales los componentes inorgánicos están unidos a los orgánicos. Dentro de los métodos de preparación se encuentran la inmovilización, conjugación, entrecruzamiento y autoensamblaje^[60], tal como se describe en la Figura 10, la cual relaciona el método utilizado con las estructuras que se pueden obtener. La inmovilización de proteínas en nanomateriales por auto ensamblaje con componentes inorgánicos es un método de preparación que no involucra reacciones químicas desfavorables para la estabilización de la proteína.

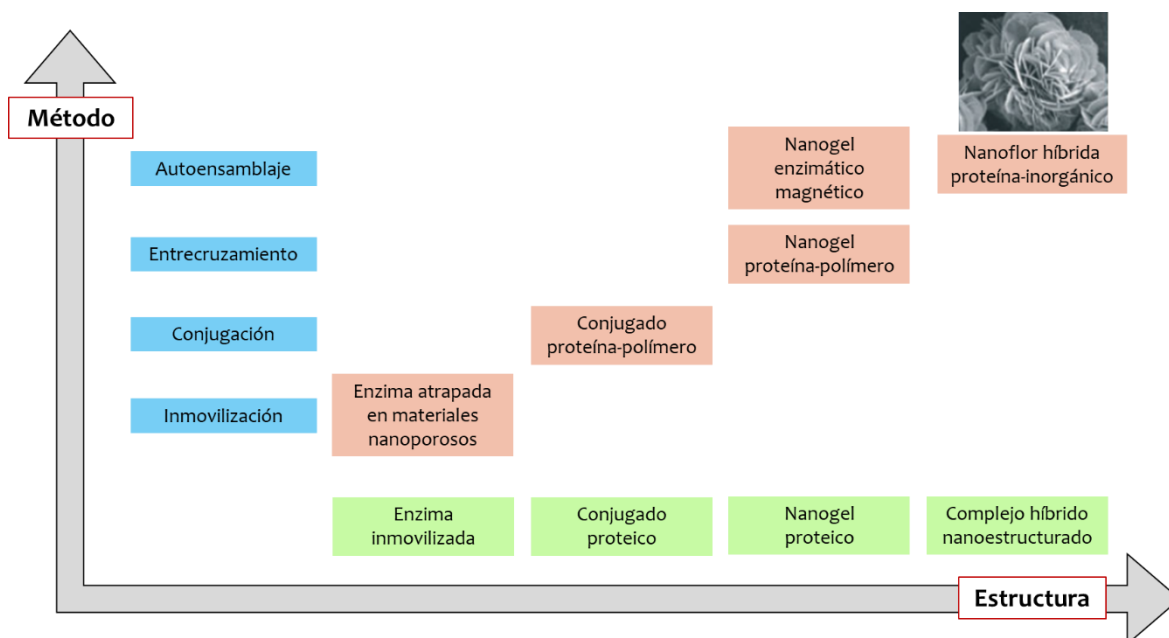


Figura 10 Métodos de preparación y estructuras de bionanomateriales

Las nanoflores son una categoría especial de materiales nanoestructurados que se obtienen por autoensamblaje de una combinación de elementos, dando lugar a un producto cuya estructura a nivel microscópico asemeja flores^[59]. Este tipo de estructuras fueron descubiertas accidentalmente por Zare *et al.* en 2012 cuando se adicionó CuSO₄ al 0.8 mM a PBS con 0.1 mg BSA/mL y después de 3 días apareció un precipitado, el cual exhibía estructuras tipo flor. El mecanismo de formación que propusieron consiste en 3 etapas: 1) combinación de iones metálicos y materia orgánica, 2) formación de pétalos y 3) crecimiento de nanoflores^[61-62].

La Figura 11, corresponde a la representación ilustrada del mecanismo de formación de nanoflores. En la primera etapa, los iones metálicos se enlazan a los grupos fosfatos negativos a través de interacciones electrostáticas formando cristales primarios de fosfato metálico, al mismo tiempo las moléculas orgánicas forman complejos con los iones metálicos por coordinación con los grupos amida presentes en la estructura de la proteína. En la segunda etapa, los cristales de fosfato metálico se agregan formando

pétalos y comienza el auto ensamblaje. Por último, en la tercera etapa, el crecimiento anisotrópico conduce a la formación completa de la estructura tipo flor^[60,63].

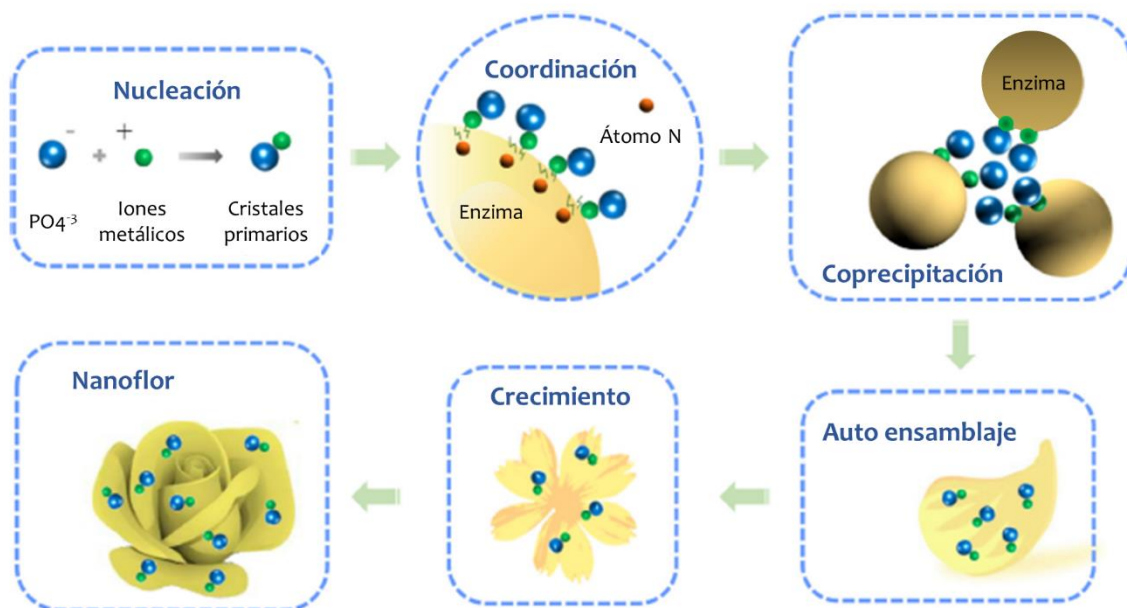


Figura 11 Proceso de formación de nanoflores

Las nanoestructuras híbridas constituidas por fosfato metálico y enzima se sintetizan mediante el método de coprecipitación y autoensamblaje, en el que simplemente se añade proteína a una solución amortiguadora con iones metálicos, sin la presencia de elementos tóxicos ni condiciones extremas. El autoensamblaje integra de manera espontánea distintos componentes, dando lugar a materiales híbridos^[58,60,64]. La combinación de funcionalidades de proteínas y materiales inorgánicos dentro de este sistema nanoestructurado mejora la actividad y estabilidad de la enzima en comparación con su forma libre, lo cual se atribuye al confinamiento de la proteína en el centro de la nanoflor, haciéndolas candidatas para aplicaciones como biosensores y biocatalizadores industriales soportando las condiciones de operación^[35]. Debido a que la primera síntesis de nanoflores híbridas consistió en proteína y iones Cu^{2+} , son la especie que más intensivamente se ha estudiado, resultando en una amplia variedad de trabajos que utilizan diversos componentes orgánicos con cobre. Sin embargo, también existen

trabajos reportados de proteína con otros iones tales como Mn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , por mencionar algunos ejemplos^[53,60].

A la fecha, existen muy pocas publicaciones acerca de reacciones catalizadas por nanoflores híbridas; Yanyan Huang *et al.* reportaron el uso de nanoflores compuestas por BSA-Cu y GOx-Cu en la catálisis de glucosa para la obtención de ácido glucónico^[64], Ismail Ocsoy *et al.* polimerizaron guayacol y derivados fenólicos con nanoflores de HRP-Cu^[65-66].

2.8.1.1 Método de coprecipitación

La precipitación es un método ampliamente utilizado para la preparación de catalizadores heterogéneos combinados o de un solo componente, el método consiste en un proceso donde se forma una fase sólida a partir de una solución en la cual la concentración de un componente excede su solubilidad. La coprecipitación es la precipitación simultánea de más sustancias de una solución, con la cual es posible preparar catalizadores de dos o más componentes^[67]. Dentro de las sustancias más utilizadas para la coprecipitación se encuentran los cloruros, hidróxidos, carbonatos y sulfatos, en donde precipitan el ion deseado y otros iones existentes en la solución^[68]. En un solo proceso, por aglomeración controlada de unidades primarias y secundarias, se forman la estructura porosa, el tamaño y la forma de partícula. Estas características son fuertemente dependientes de las condiciones de proceso, tales como la manera de dosificar los reactivos, su mezclado e incorporación. Si la solución se agita débilmente, la coprecipitación será selectiva y heterogénea, mientras que un buen mezclado resulta en un producto más homogéneo^[67-68]. El proceso consiste en 3 etapas: 1) mezclado líquido, 2) nucleación y crecimiento de cristales para formar las unidades primarias y 3) agregación, generalmente la nucleación y crecimiento de cristales ocurren simultáneamente.

Las variables principales son concentración de soluto en la solución, temperatura, presión, pH y tiempo de envejecimiento del precipitado. El pH debe ajustarse cuidadosamente y mantenerse constante durante el proceso^[69]. Se escoge agua porque

la mayoría de las sales metálicas son más solubles que en solventes orgánicos y las soluciones se encuentran en niveles altos de sobresaturación, los cuales promueven la nucleación por encima del crecimiento de cristales y favorecen la precipitación de materiales altamente dispersos. Las primeras fases de la coprecipitación resultan en materiales amorfo que con el paso del tiempo se convierten en estructuras más ordenadas. La agregación es importante, es la responsable de la formación de menos partículas, pero más grandes y porosas. La porosidad se determina por la manera en la que las unidades primarias se apilan ya que los espacios entre ellas son los poros. Una desventaja de la coprecipitación es la formación de grandes cantidades de sales y la necesidad de separar el producto^[70].

2.8.1.2 Iones metálicos

Algunas enzimas necesitan iones metálicos para maximizar su actividad catalítica ya que actúan como cofactores, favoreciendo la conformación adecuada del sitio activo, protegiendo la estructura de una posible desnaturalización térmica brindándole estabilidad a la proteína^[71], además tienen un efecto sobre la velocidad de reacción cuando se unen a dicho sitio activo^[72]. Poseen la habilidad de reaccionar con los grupos fosfato y con la enzima, en el caso de las nanoflores híbridas, los iones metálicos actúan como precursor de la nucleación de cristales de fosfato metálico, además, se ha comprobado que una alta concentración de iones contribuye al incremento de actividad enzimática^[63] debido a la protección que le brindan a la estructura de una posible desnaturalización a través de la formación de puentes de iones o sales entre dos residuos de aminoácidos^[71]. Los nanobiocatalizadores a base de metaloenzimas son los más populares^[35], para todos los casos de nanoflores híbridas (enzima-inorgánico) reportados, la actividad optimizada solamente se da en casos de metaloenzimas que precipitan con los iones metálicos adecuados. La elección es crucial en la preparación ya que los iones metálicos pueden tener efectos en la activación o inactivación de las enzimas, dependiendo de las propiedades de ambos^[73].

2.9 Estado del arte: Polimerización de anilina

La síntesis de polianilina involucra la polimerización oxidativa del monómero en medio ácido^[11,25] a pesar de que existen procedimientos de síntesis química (adoptada como el método tradicional que resulta en un mayor rendimiento) o electroquímica bien establecidos, la urgente necesidad actual es desarrollar métodos de polimerización basados en química verde que utilicen fuentes renovables en la producción de polímeros^[11,74-77].

En la literatura se encuentran reportados diversos trabajos acerca de polimerizaciones de anilina catalizadas de diferente manera a lo largo de los últimos años.

En 1999, Samuelson *et al.* reportaron su trabajo de polimerización enzimática de anilina mediante HRP en presencia de un polielectrolito aniónico para promover el acoplamiento cabeza-cola de las unidades monoméricas^[78]. En 2005, Ledezma-Pérez *et al.* sintetizaron polianilina mediante catálisis enzimática con peroxidasas libres de soportes en medio acuoso parcialmente orgánico^[26]. En 2006, Cruz-Silva *et al.* reportaron la síntesis mediante SBP en presencia de polímeros solubles en agua como estabilizadores estéricos^[24] y la catálisis biomimética libre de plantillas utilizando hematina disuelta en ácido acético^[75]. En el 2010, Romero-García *et al.* trabajaron con nanotubos de halloysita funcionalizados con hematina en la síntesis biomimética de polianilina^[18]. En 2016, Pardo *et al.* reportaron la síntesis enzimática mediante lacasa y distintos surfactantes aniónicos como dopantes^[80]. En 2017, N. German *et al.* reportaron la síntesis de nanopartículas de polianilina a partir de una solución de ácido acético en presencia de glucosa oxidasa y anilina^[74]. En el año 2021, Kurisu *et al.* publicaron una reacción enzimática en cadena utilizando glucosa oxidasa, D-glucosa, O₂ y HRP en presencia de vesículas unilamerales como soporte para la obtención de la forma conductora de PANI^[76].

Gracias al conocimiento con el que cuenta el grupo de investigación acerca de polímeros conductores, específicamente de polianilina y su síntesis mediante distintos tipos de catálisis, este trabajo de tesis se planteó para mejorar la polimerización enzimática utilizando un sistema nanobiocatalizador conformado por nanoflores híbridas, las cuales a su vez están constituidas por peroxidasa y iones metálicos.

Este tipo de catálisis enzimática representa una alternativa innovadora que resulta en un polímero con las propiedades deseadas, comparables con las obtenidas anteriormente por catálisis enzimática y biomimética de manera soportada. Además, la inmovilización enzimática no tradicional realizada dentro del sistema nanoestructurado tipo flor brindará a la peroxidasa una mayor estabilidad y actividad catalítica, lo que hará posible la catálisis de la síntesis de polianilina en condiciones de pH ácido.

3. Hipótesis

La inmovilización de peroxidasa en un sistema híbrido nanoestructurado tipo flor mejorará la estabilidad de la peroxidasa y contrarrestará la disminución de actividad, lo cual sucede generalmente con los métodos de inmovilización tradicionales, esto hará posible catalizar la síntesis de la forma conductora de la polianilina bajo condiciones de pH ácidas.

4. Objetivo general

Sintetizar la forma conductora de la polianilina mediante nanobiotatálisis enzimática, utilizando un sistema nanoestructurado tipo flor constituido por nanoflores híbridas a base de peroxidasa y iones metálicos como catalizador para obtener el polímero con una mayor proporción de acoplamiento cabeza-cola y con propiedades de conducción.

4.1 Objetivos específicos

- 1) Obtener nanoflores híbridas a partir de enzimas/iones inorgánicos utilizando un método de coprecipitación.
- 2) Caracterización morfológica y enzimática de las nanoflores híbridas.
- 3) Determinación y comparación de actividad de SBP libre y nanoflores híbridas utilizadas como nanobiotatálisis en la síntesis de polianilina.
- 4) Caracterización química y determinación de parámetros de conductividad de PANI sintetizada utilizando 3 métodos distintos de catálisis.

5. Justificación

La polimerización enzimática presenta ventajas sobre la polimerización química, sin embargo, la inestabilidad de las enzimas bajo algunas condiciones de reacción representa una gran limitante. Es por eso por lo que, a lo largo de los años se han desarrollado diferentes métodos de inmovilización de enzimas cuyo objetivo es brindarles una mayor estabilidad, permitiéndoles ser funcionales en un intervalo más amplio de condiciones de temperatura y pH. A pesar de que los métodos de inmovilización tradicionales resultan en una mayor estabilidad enzimática, generalmente van acompañados de la pérdida de actividad catalítica.

En el grupo de investigación se ha trabajado previamente en la síntesis de polianilina mediante catálisis por peroxidasas en forma libre y soportada, así como por compuestos biomiméticos. Este tipo de catálisis exhibe rendimientos similares a los de la polianilina obtenida por síntesis química, pero sin subproductos de reacción indeseados.

Lo que se propone hacer en este trabajo es inmovilizar peroxidasa en un sistema nanoestructurado tipo flor junto con iones inorgánicos, para dar lugar a un sistema nanobiocatalítico conformado por nanoflores híbridas que desempeñe la catálisis de la polimerización enzimática de anilina. El uso de este tipo de sistema no ha sido reportado en la síntesis de PANI.

El método adecuado de inmovilización de peroxidasa resultará en una mejor estabilidad y actividad enzimática. Esto permitirá que se lleve a cabo la polimerización de anilina en condiciones de reacción bajo las cuales la peroxidasa en forma libre perdería su actividad. El desarrollo de este sistema va dirigido a la obtención de un material con características estructurales relacionadas a una proporción mayor de acoplamiento cabeza-cola de las unidades monoméricas y propiedades de conductividad mejores a las obtenidas por síntesis enzimática convencional.

6. Metodología

6.1 Materiales y reactivos

En la Tabla 4, se enlistan los reactivos utilizados para el desarrollo de este trabajo:

Tabla 3 Reactivos utilizados para la síntesis de nanoflores híbridas y de polianilina

| Nombre | Proveedor | Especificaciones |
|---|----------------------|-----------------------------|
| Sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | Analytika | - |
| Sulfato cúprico pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) | Sigma Aldrich | $\geq 98\%$ |
| Peroxidasa de rábano picante | Sigma Aldrich | Tipo II |
| Peroxidasa de soya | Organic Technologies | Crude dry solid |
| Albúmina de suero bovino | Sigma Aldrich | $\geq 98.0\%$ |
| Hidróxido de sodio (NaOH) | J.T. Baker | 95.0-100.5% pellets |
| Hematina porcina ($\text{C}_{34}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_5\text{Fe}$) | Sigma Aldrich | - |
| Anilina ($\text{C}_6\text{H}_7\text{N}$) | Sigma Aldrich | $\geq 99.5\%$ |
| Ácido paratoluensulfónico monohidratado ($\text{C}_7\text{H}_8\text{SO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) | Sigma Aldrich | - |
| Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) | Sigma Aldrich | 30% en H_2O |
| PBS Dulbecco con MgCl_2 y CaCl_2 | Sigma Aldrich | 1X y 10X |
| N-metil-2-pirrolidona ($\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}$) | Sigma Aldrich | - |
| Guayacol ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$) | Sigma Aldrich | 98% |
| Ácido clorhídrico (HCl) | J.T. Baker | 36-38% |
| Agente colorante | Bio Rad | Protein assay |

6.2 Síntesis de nanoflores híbridas orgánico-inorgánico (hNF)

La síntesis del sistema catalítico hNF/orgánico-inorgánico se lleva a cabo siguiendo el método reportado en la literatura por Richard Zare *et al.*^[61-62] e Ismail Ocsoy *et al.*^[79,81] con algunas modificaciones. Se realizan pruebas utilizando varios componentes orgánicos e inorgánicos, entre ellos HRP, BSA y SBP, y Fe, Cu y Hem respectivamente, con la finalidad de optimizar las condiciones de síntesis homogénea de nanoflores, garantizando la reproducibilidad del sistema.

La preparación de las soluciones de los componentes inorgánicos se lleva a cabo al momento de la síntesis, para esto se prepararon 10 mL de solución FeSO_4 al 120 mM pesando 333.6 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y aforando con agua ultrapura, posteriormente se burbujeó con N_2 para evitar la oxidación por reacción con el O_2 atmosférico^[82]. De igual manera, se prepararon 10 mL de CuSO_4 al 120 mM pesando 299.6 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, dicha solución se mantuvo en agitación a condiciones ambientales. En la Figura 12, se muestra gráficamente el proceso de preparación.

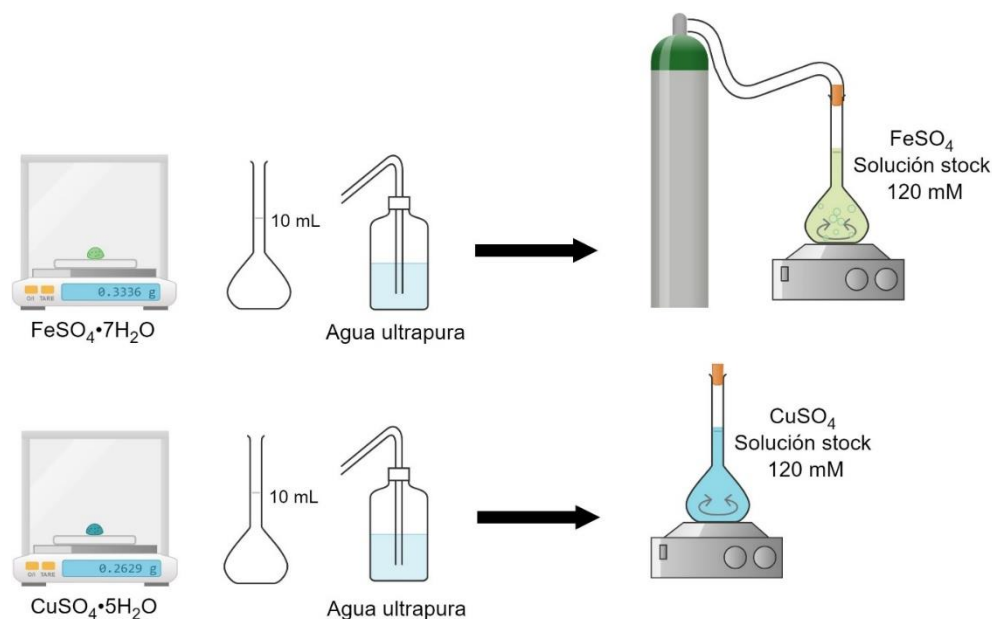


Figura 12 Preparación de soluciones stock de componentes inorgánicos al 120 mM

En la Figura 13, se muestran las soluciones stock de las enzimas BSA, HRP y SBP, las cuales se prepararon a una concentración de 10 mg sólido/mL y posteriormente se les determinó el contenido de proteína mediante el método de Bio Rad.

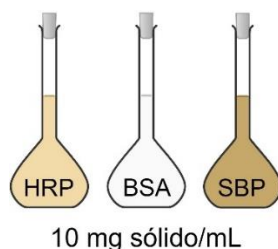


Figura 13 Soluciones stock de peroxidasa de rábano (HRP), albúmina de suero bovino (BSA) y peroxidasa de soja (SBP).

6.2.1 Determinación de contenido de proteína

El análisis para la determinación del contenido de proteína en las soluciones stock de enzimas se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro marca Shimadzu modelo UV-2401PC en el modo de absorbancia. La preparación de las curvas de calibración se realizó siguiendo el ensayo de Bio Rad, basado en el método de Bradford. El principio de este método es la fijación de proteína con el colorante Coomassie azul G-20 y el cambio de color como respuesta a la concentración de proteína. El ensayo consiste en preparar de 3 a 5 diluciones de la proteína estándar, tomar 800 μ L de la dilución y adicionar 200 μ L del agente colorante. Una vez que se tienen ambos componentes se agitan vigorosamente para incorporarlos. La lectura de absorbancia se hace a 595 nm y se grafican los valores, obteniendo la curva con ecuación y coeficiente de determinación. Las curvas de calibración se elaboraron utilizando la proteína BSA como proteína estándar, dicha enzima se disuelve en agua ultrapura y en PBS Dulbecco 1X pH 7.4.

6.2.2 Pruebas preliminares de síntesis de nanoflores híbridas

Los volúmenes totales de reacción se ajustan a 9 mL con PBS Dulbecco 1X pH 7.4. El orden de adición es el siguiente: 1) PBS, 2) componente inorgánico, agitación vigorosa durante

30 segundos en vórtex, 3) componente orgánico, agitación vigorosa durante 30 segundos en vórtex. El procedimiento desarrollado para llevar a cabo la síntesis de nanoflores híbridas se encuentra ilustrado en la Figura 14. En la Tabla 5, se enlistan las diferentes condiciones de los experimentos establecidos como pruebas preliminares de síntesis de nanoflores híbridas. Bajo estas pruebas, los parámetros que se evaluaron fueron el tipo de proteína, concentración de proteína, así como el tipo de componente inorgánico (Fe, Cu y Hem) en la reacción de síntesis.

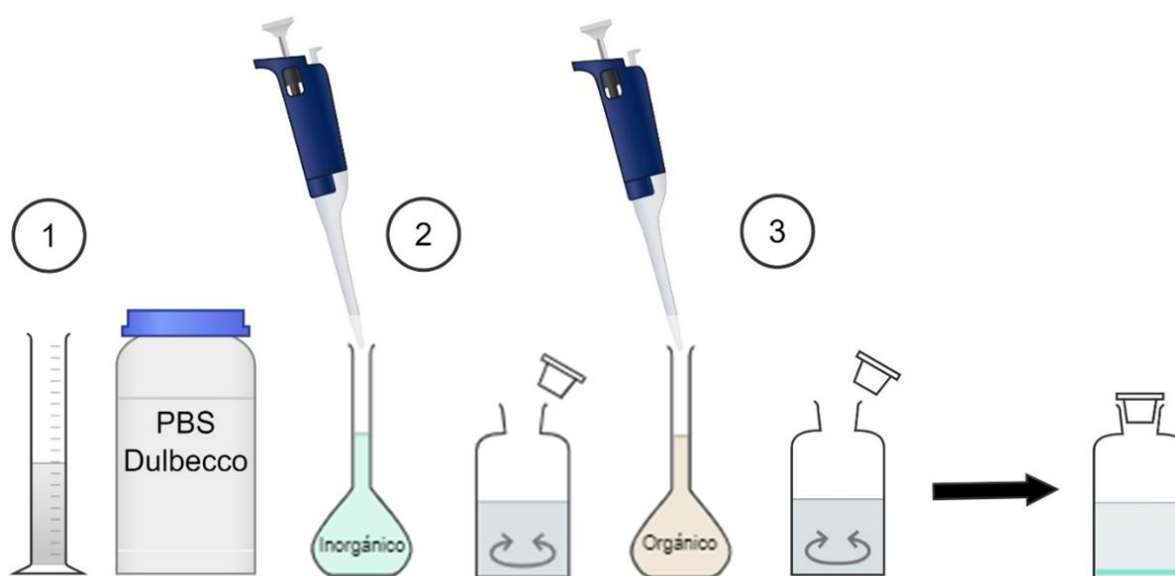


Figura 14 Metodología de síntesis de nanoflores híbridas

Tabla 4 Condiciones establecidas en las pruebas preliminares de síntesis de nanoflores

| Nombre | Componente orgánico | Componente inorgánico | Concentración de proteína |
|------------|---------------------|-----------------------|---------------------------|
| hNF/HRP-Fe | HRP | Fe | - |
| | 253 μ L | 100 μ L | 0.05 mg/mL |
| | 505 μ L | 100 μ L | 0.1 mg/mL |

| | | | |
|----------------|-------------|--------------------------|-----------|
| hNF/BSA-Cu | BSA | Cu | 0.1 mg/mL |
| | 335 μ L | 100 μ L | |
| hNF/BSA-Cu-Hem | BSA | Cu y Hem | 0.1 mg/mL |
| | 335 μ L | 100 μ L y 20 μ L | |
| hNF/SBP-Fe | SBP | Fe | 0.1 mg/mL |
| | 440 μ L | 60 μ L | |
| hNF/SBP-Cu | SBP | Cu | 0.1 mg/mL |
| | 440 μ L | 100 μ L | |
| hNF/SBP-Cu-Fe | SBP | Cu y Fe | 0.1 mg/mL |
| | 440 μ L | 30 μ L y 30 μ L | |
| hNF/SBP-Cu-Hem | SBP | Cu y Hem | 0.1 mg/mL |
| | 400 μ L | 100 μ L y 20 μ L | |

Posterior a la agitación, las reacciones se mantuvieron en incubación estática por 3 días a 4 °C. Los precipitados obtenidos se recuperaron de la siguiente manera: el volumen de reacción obtenido se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min a 23 °C, el sobrenadante inicial se almacenó para la determinación de contenido de proteína post incubación y precipitación, posteriormente se redispersó el precipitado en agua ultrapura para remover los componentes que no reaccionan y se centrifugó de nuevo. Este procedimiento de lavado se repitió tres veces y se obtuvo de esta manera el precipitado del producto final.

6.3 Caracterización de nanoflores híbridas

La caracterización del sistema catalítico se llevó a cabo para poder establecer las características de los productos nanoestructurados obtenidos en las diferentes reacciones desarrolladas y de esta forma conocer la morfología, actividad enzimática, así como el porcentaje de encapsulación de proteína.

6.3.1 Determinación del contenido de proteína encapsulada

Haciendo uso de la metodología aplicada para la determinación del contenido de proteína en las soluciones stock de enzimas, para el caso de la determinación del porcentaje de encapsulación de proteína en las nanoflores se tomó una alícuota de 800 μL del producto de reacción inmediatamente después de la incorporación de todos los componentes pre incubación y post incubación. Para estas lecturas de absorbancia se utilizó PBS Dulbecco 1X pH 7.4 como blanco.

6.3.2 Determinación de actividad enzimática

Se cuantificó la actividad enzimática siguiendo la oxidación del guayacol en presencia de H_2O_2 a 470 nm de acuerdo con Pütter 1974^[98]. Para esto, se utilizó un lector multi-modal de microplacas marca Biotek modelo Synergy H1/8535632, por lo que el volumen de reacción fue de 250 μL . La concentración de los reactivos en el volumen final corresponden a 100 mM de PBS pH 7.4, 3 mM de H_2O_2 y 15 mM de guayacol. La actividad de POD es definida como la cantidad necesaria para oxidar un μmol de guayacol por minuto ($\epsilon=26$ mm). Para iniciar la reacción de oxidación del guayacol al producto rojizo, se adicionó el H_2O_2 inmediatamente antes de meter la placa al lector. Se realizaron lecturas de absorbancia cada 10 segundos por 4 minutos.

6.3.3 Caracterización morfológica de los productos de reacción

El análisis morfológico de los productos de reacción obtenidos de la síntesis de nanoestructuras tipo flor se llevó a cabo mediante Microscopía Electrónica de Barrido, utilizando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo marca JEOL modelo JSM 7401F, las micrografías son generadas aplicando un voltaje de 5 kV. Para la preparación de las muestras se utilizaron rejillas de soporte de malla 200 Formvar.

El análisis mediante Microscopía Electrónica de Transmisión se llevó a cabo en un microscopio electrónico de transmisión marca FEI modelo FEI-TITAN 2080. Durante la preparación de las muestras con esta técnica se utilizaron rejillas de soporte de malla 300 Lacey Carbon.

De manera general, para la preparación de las muestras a analizar, la rejilla se sumerge en el producto redispersado en agua previo a la última centrifugación y se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 horas. Este procedimiento, representado en la Figura 15, se llevó a cabo para ambas técnicas.

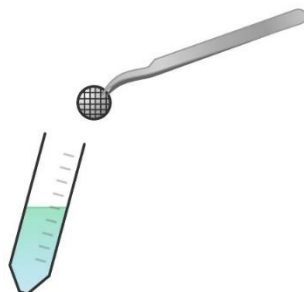


Figura 15 Preparación de rejillas para Microscopía Electrónica de Transmisión y Microscopía Electrónica de Barrido por sumersión en nanoflores redispersas en agua.

6.4 Síntesis de Polianilina

La síntesis de PANI se realizó tomando como base el procedimiento previamente reportado por el grupo de trabajo del departamento de Materiales Avanzados del CIQA^[18,26]. En la Figura 16, se encuentra representado el sistema utilizado en las síntesis mediante varios tipos de catálisis (biomimética libre, enzimática libre y nanoflores híbridas).

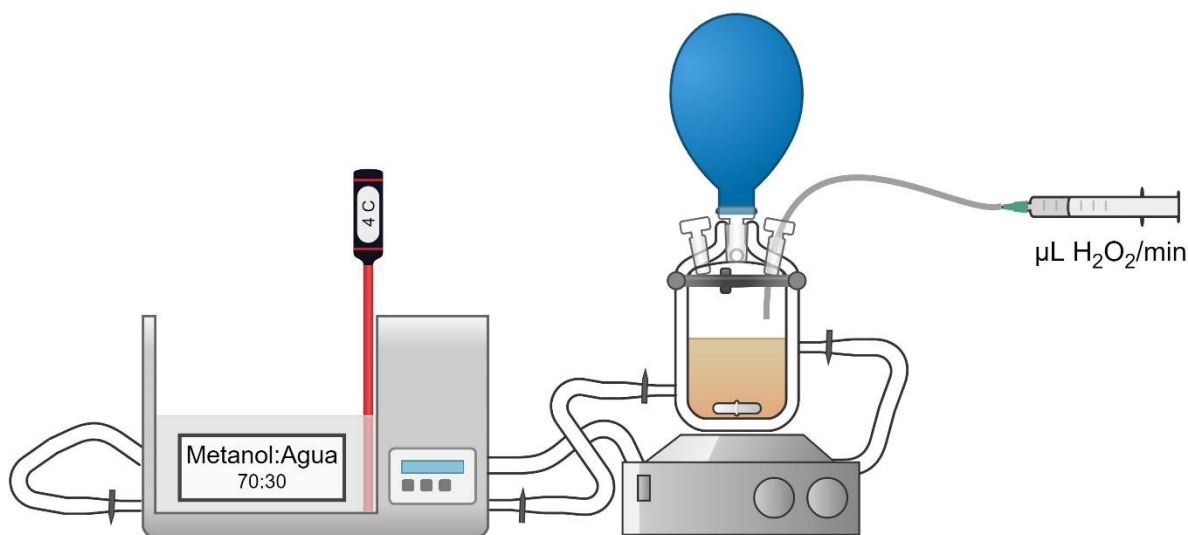


Figura 16 Representación esquemática del sistema de síntesis de polianilina.

El sistema consistió en un baño de recirculación refrigerado con temperatura controlada, un reactor enchaquetado, una bomba dosificadora y una parrilla de agitación. El baño mantuvo la temperatura de reacción constante a 4°C y la bomba dosificadora se utilizó para la adición controlada del H₂O₂.

6.4.1 Síntesis de Polianilina catalizada por Hematina libre

La polimerización de anilina catalizada por Hem soportada en nanotubos de halloysita había sido reportada previamente por el grupo de trabajo^[18]. La hematina hasta la fecha se había utilizado de esta manera debido a su insolubilidad en pH básico, condición contraria a la necesaria en la síntesis de PANI. Recientemente, Cartagena *et al.* desarrollaron un método alternativo para utilizar la hematina sin ser soportada^[84]. Sin embargo, no existen trabajos reportados de polimerización de anilina catalizada biomiméticamente con hematina libre de soportes.

Para la síntesis se prepararon las siguientes soluciones: (Figura 17)

- a) 100 mL de PTSA al 1M pH 1.48: 19.022 g de PTSA aforados con agua ultrapura
- b) 10 mL de Hem al 35 mM: 222 mg de Hem solubilizados en PBS Dulbecco 1X pH 7.4 con NaOH al 4M, el pH se ajusta con HCl a 7.3.

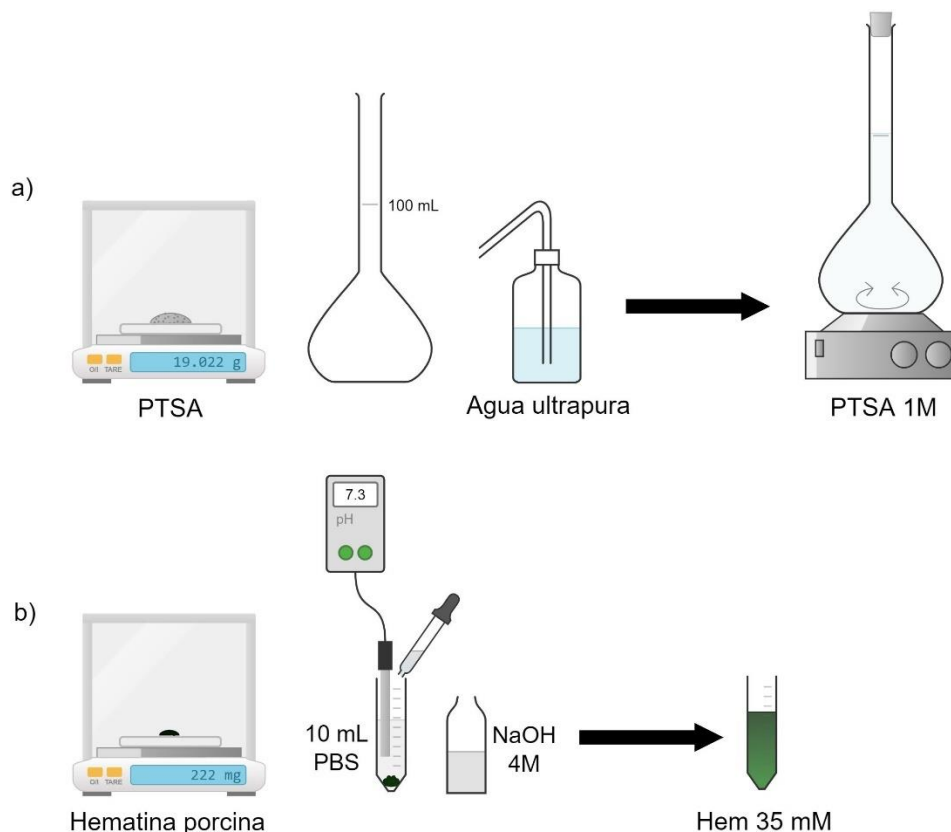


Figura 17 Preparación de PTSA a concentración 1M y Hematina a concentración 35 mM.

Dicha síntesis se realizó en un reactor enchaquetado de 50 mL con un baño de recirculación refrigerado marca Polystat modelo 12101-50, para esto se adicionaron 200 μL de anilina a 50 mL de PTSA al 1M, la reacción se mantuvo en agitación durante 30 min y se le adicionaron 60 μL de Hem al 35 mM. La reacción se agitó durante 1 hora para la incorporación de los reactivos, el pH se ajustó a 2.7 con la misma solución ácida PTSA. La reacción se mantuvo a 4 $^{\circ}\text{C}$ con el baño de recirculación mediante una mezcla de metanol-agua en relación 70:30. Posteriormente se dosifican 440 μL de H_2O_2 al 30% utilizando una bomba dosificadora Cole-Parmer con un flujo de 7.33 $\mu\text{L}/\text{min}$. Una vez finalizada la adición del peróxido, la reacción se mantuvo en agitación durante 8 horas bajo atmósfera de N_2 y 12 horas en reposo antes de la recuperación del producto.

El producto de reacción obtenido se centrifugó, descartando el sobrenadante inicial, posteriormente se realizaron dos lavados con metanol y uno final con solución ácida

PTSA al 1M pH 1.4 ± 0.1 para asegurar la obtención de la polianilina dopada (condiciones de centrifugación 15 min, 13,000 rpm, 23°C). Finalmente, el producto se congeló y liofilizó para su posterior caracterización.

6.4.2 Síntesis de Polianilina catalizada por SBP libre

Para esta síntesis se tomó como referencia la metodología reportada por el grupo de trabajo previamente^[25]. Se solubilizaron 360 mg de SBP cruda liofilizada equivalentes a 20 mg de proteína en 50 mL de agua ultrapura con ayuda de ligera agitación durante 1 hora, posteriormente se adicionaron 200 μL de anilina pura y se continuó con la agitación durante 1 hora más. Se midió el pH de la reacción y se ajustó a 2.6 ± 0.1 con aproximadamente 50 gotas de PTSA al 1M. Una vez ajustado el pH se inicia la dosificación de 440 μL de H_2O_2 con un flujo de 7.33 $\mu\text{L}/\text{min}$. La reacción se mantuvo 8 horas en agitación a 4°C con un baño de circulación refrigerado bajo atmósfera de N_2 y 12 horas en reposo previo a la recuperación del producto. Cabe mencionar que la mayoría de las síntesis de polímeros conjugados catalizados por enzimas/biocatalizadores se realizan con soportes para propiciar el crecimiento lineal de la cadena^[8], por lo que este tipo de síntesis libre de soportes es novedoso.

6.4.3 Síntesis de Polianilina catalizada por nanoflores híbridas (hNF/SBP-Cu)

La síntesis de polianilina catalizada por nanoflores de peroxidasa se realizó con el producto de 40 reacciones de síntesis de nanoflores hNF/SBP-Cu, equivalentes a 6.3 mg de proteína. El producto de tonalidad azul, indicativo de la formación de las nanoflores con Cu, se recuperó y se dispersó en 15.75 mL de agua ultrapura, se le adicionaron 63 μL de anilina y se mantuvo en agitación durante 1 hora para la incorporación y homogenización del medio de reacción. Se midió el pH y se ajustó a 2.6 ± 0.1 con solución ácida PTSA al 1M, una vez ajustado el pH se dosificaron 140 μL de H_2O_2 al 30% en un lapso de 35 min, con un flujo de 4 $\mu\text{L}/\text{min}$. El producto de reacción se recuperó siguiendo las condiciones anteriormente mencionadas.

6.5 Caracterización de Polianilina

Las caracterizaciones de polianilina sintetizada mediante catálisis enzimática de SBP libre y encapsulada en un sistema nanoestructurado tipo flor se realizaron para establecer las características elementales, propiedades estructurales, electrónicas y conductoras del polímero.

6.5.1 Caracterización mediante espectroscopía ultravioleta visible (UV-vis)

Para llevar a cabo la caracterización, se utilizó un espectrofotómetro marca Shimadzu, modelo UV-2401PC. Para el análisis de la forma no conductora de PANI, la base de emeraldina color azul, se dispersaron 3 mg de PANI liofilizada en 5 mL de NMP para observar el espectro desdopado. Para la forma conductora, la sal de emeraldina color verde, se dispersaron 3 mg en 5 mL de HCl para observar el espectro dopado. Los productos en medio ácido y básico se sometieron a un tratamiento en baño ultrasónico durante 20 minutos para dispersar lo mejor posible el material. Las lecturas de absorbancia se realizaron utilizando celdas de cuarzo con tapa en un rango espectral de 200-1000 nm.

6.5.2 Determinación de parámetros de conductividad eléctrica

La medición de conductividad y resistencia volumétrica de los polímeros sintetizados se realizó utilizando una fuente de poder 2400 marca Keithley, usando el método de resistencia eléctrica a 2 puntas y basándose en la norma ASTM D4496 y el método de CABOT. La determinación de la conductividad eléctrica se realizó utilizando las siguientes fórmulas:

$$R e s i s t i v i d a d = \frac{R e s i s t e n c i a \text{ del electrodo}}{D i s t a n t a \text{ entre electrodos}} \quad [\equiv] \quad \Omega c m$$

$$C o n d u c t i v i d a d = \frac{1}{R e s i s t i v i d a d \text{ volumétrica}} \quad [\equiv] \quad \frac{S}{c m}$$

7. Resultados y discusiones

7.1 Mecanismo de formación de nanoflores

Se optimizaron y estandarizaron las condiciones para la síntesis de nanoflores incluyendo: PBS (formulación, pH y concentración), componentes orgánico e inorgánico (elección, concentración y orden de adición) e incubación (temperatura, tiempo y tipo). La solución amortiguadora fue de suma importancia en la obtención de las nanoestructuras con morfología tipo flor deseada, ya que la formación y crecimiento de las nanoflores típicamente sucede entre 7.0 y 7.4^[85].

La morfología del producto de la primera síntesis de nanoflores híbridas con HRP como componente orgánico, Fe^{2+} como componente inorgánico y PBS a una concentración 10 mM (formulado con $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ y Na_2HPO_4 , pH 7.4) Como se puede apreciar en la micrografía (Figura 18), bajo las condiciones establecidas para esta síntesis no se observa la formación de productos con la morfología tipo flor, sino la formación de un producto de nanopartículas predominantemente de forma esférica. La ausencia de estructuras tipo flor posiblemente se deba a la ausencia de iones Cl^- en el PBS^[60,62]. Zare *et al.* establecen la importancia de la presencia de iones Cl^- en el PBS, los cuales previenen la precipitación del metal en forma de fosfato metálico, manteniéndolo disponible en su forma iónica para la formación de nanoflores a través de complejos solubles $M^{2+}-Cl^-$ ^[85].

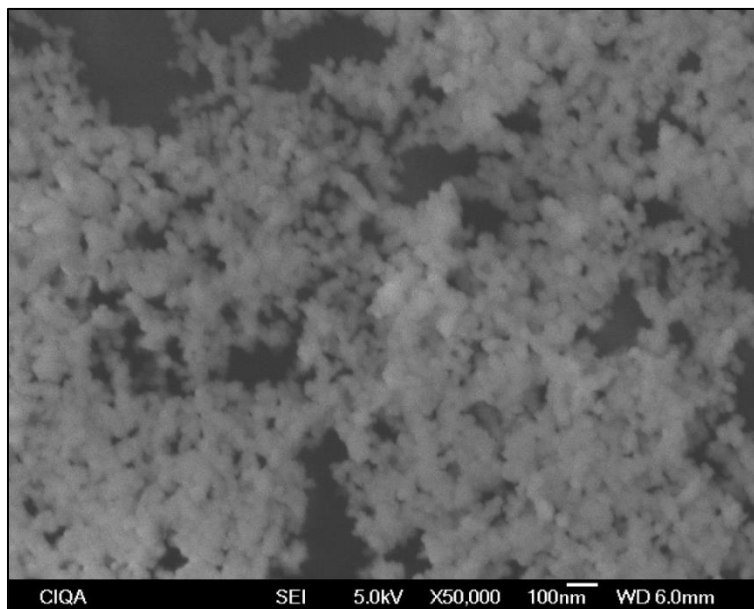


Figura 18 Micrografía del producto de síntesis realizado a base de H_2PO_4^- y NaH_2PO_4 a concentración 10 mM, pH 7.4 sin iones Cl⁻

En el caso del blanco de reacción sin proteína con PBS Dulbecco 1X pH 7.4 (formulación de 6 sales con iones Cl⁻) se observa un comportamiento similar con la reacción efectuada utilizando un PBS con ausencia de iones Cl⁻, encontrando la formación de nanopartículas con una morfología predominantemente esférica, tal como se muestra en la Figura 19. Esto se corrobora con lo reportado en la literatura, la cual indica que la proteína induce la nucleación de los cristales de fosfato metálico para dar lugar a los primeros pétalos y que además propicia su unión^[60,62].

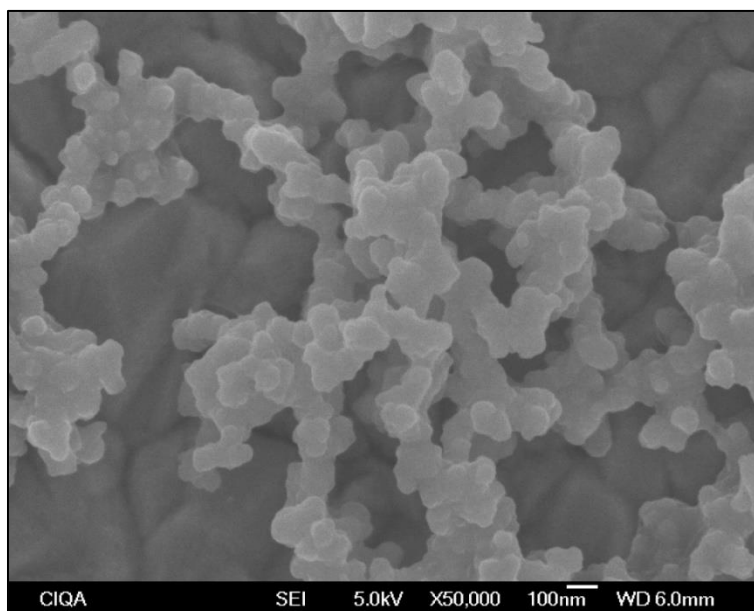


Figura 19 Micrografía del producto obtenido del blanco de síntesis, a base de CuSO_4 en PBS Dilbecco 1X pH 7.4 sin enzima.

7.2 Síntesis de nanoflores híbridas orgánico-inorgánico (hNF)

Estudios reportados demuestran que algunos compuestos a base de cobre y hierro pueden catalizar sustratos en medio ácido en presencia de H_2O_2 , dando lugar a una coloración característica de la oxidación de dichos productos^[64]. Las soluciones stock FeSO_4 y CuSO_4 con una concentración 120 mM preparadas al momento de utilizarse se muestran en la Figura 20, donde es posible apreciar la coloración característica a cada solución de componente inorgánico; azul para el cobre y amarillo para el hierro. Una vez preparada la solución de FeSO_4 se mantuvo sellada con un septum posterior al burbujeo con N_2 para evitar su oxidación. Inicialmente se seleccionó el Fe como componente inorgánico para el desarrollo de este trabajo, sin embargo, a medida que se trabajó con este reactivo, se tomó la decisión de sustituirlo por el Cu debido a que este último posee un valor mayor de potencial oxidativo que Fe(II)/Fe(III) ^[82].



Figura 2. Imagen de soluciones de componente inorgánico a una concentración 120 mM.

7.2.1 Determinación de contenido de proteína

La determinación de contenido de proteína de las soluciones stock de enzima fue fundamental para ajustar la concentración final de la síntesis de nanoflores. En la Tabla 6, se presentan las concentraciones en mg de sólido y mg de proteína por mL para cada una de las soluciones de proteína preparadas para el desarrollo de las reacciones de síntesis.

Tabla 5. Concentraciones de proteína de soluciones stock de enzimas

| Enzima | Sólido (mg) | Volumen (mL) | mg sólido/mL | mg proteína/mL |
|--------|-------------|--------------|--------------|----------------|
| HRP | 250 | 25 | 10 | 1.78 |
| BSA | 100 | 10 | 10 | 2.68 |
| SBP | 250 | 25 | 10 | 2.04 |

El contenido de proteína por gramo de sólido de cada una de las enzimas utilizadas y listadas previamente correspondió a un valor de 178 mg, 268 mg y 204 mg

respectivamente. Posicionándose la HRP en el último lugar en cuanto al contenido de proteína, lo que podría afectar en el mecanismo de formación de nanoflores, así como en la morfología del producto final.

7.2.2 Pruebas preliminares de síntesis de nanoflores híbridas

A continuación, se exponen las pruebas preliminares de síntesis de nanoflores híbridas con distintos componentes orgánicos e inorgánicos al momento de adicionarse e incorporarse en el PBS Dulbecco 1X pH 7.4 mediante agitación con vórtex. Es posible observar en la Figura 21 que, previo a la incubación, las reacciones son incoloras, levemente turbias y con ausencia de un precipitado.

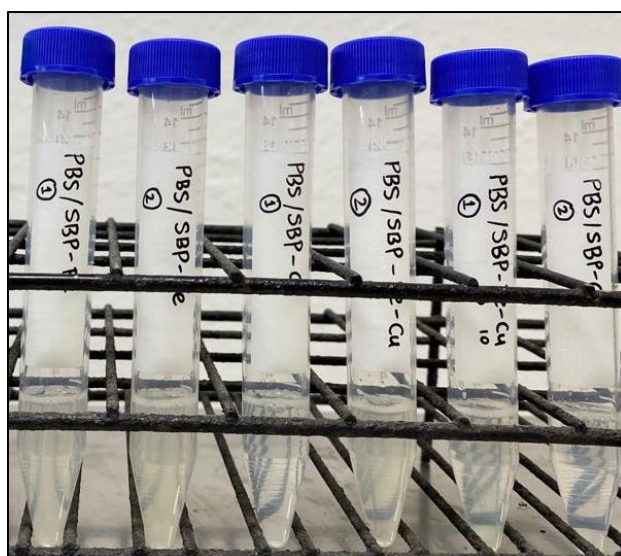


Figura 21 Imagen de reacciones de síntesis de nanoflores híbridas a base de SBP y distintos componentes inorgánicos, previo a la incubación sin precipitado.

Posterior a los días de incubación, estas reacciones comenzaron a evidenciar la formación de precipitados con los colores característicos de las soluciones stock de los componentes inorgánicos; amarillento para Fe(II) y azul para Cu(II). En las imágenes de la Figura 22, se observan los diferentes colores del precipitado de cada una de las reacciones desarrolladas, los cuales podrían ser indicativos de la obtención del producto con morfología nanoestructurada tipo flor deseada. El precipitado amarillento de la Figura 22 a) corresponde a las síntesis que involucran Fe, en la Figura 22 b) se observa el

precipitado azul característico de las reacciones con Cu y la Figura 22 c) corresponde al precipitado obtenido de la síntesis que se realizó con ambos componentes, el cual presenta una coloración verde azulada. La coloración es atribuida a la incorporación de los iones metálicos^[86-88]. La influencia del tiempo de incubación en la morfología es obvia, si se deja poco tiempo solo hay formación de nanoplacas y pétalos, o sea, complejos de cristales de fosfato metálico-enzima. Conforme aumenta el tiempo de precipitación, el autoensamblaje da lugar a las nanoflores^[63].

Una vez concluidas las reacciones, los precipitados se recuperaron para llevar a cabo su caracterización y corroborar la obtención de la morfología de nanoflores deseada. En este punto es importante resaltar que, si se excede en el tiempo de precipitación, se puede llegar a deteriorar la actividad de la enzima^[63].

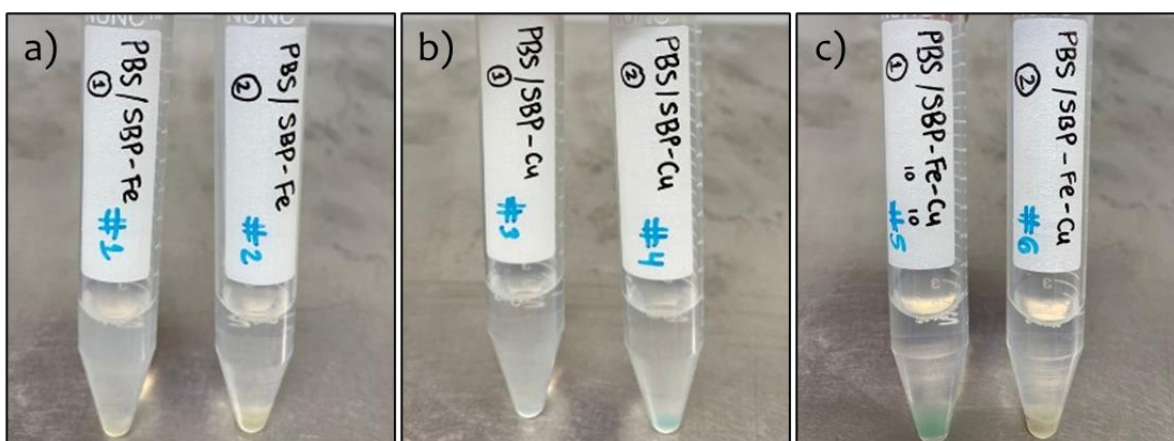


Figura 22 imágenes de reacciones de síntesis de nanoflores híbridas a base de SBP y diferentes componentes inorgánicos a) Fe-SBP, b) SBP-Cu y c) SBP-Fe-Cu post incubación con preipitado.

7.3 Caracterización de nanoflores híbridas

La caracterización morfológica de los productos de reacción obtenidos se realizó con el fin de corroborar la nanoestructura tipo flor, la cual es necesaria para proteger a la enzima inmovilizada. Además, se analizaron parámetros importantes dentro del desarrollo del sistema tales como el contenido de proteína y el porcentaje de encapsulación.

7.3.1 Caracterización morfológica

La caracterización del producto obtenido de las síntesis de nanoflores híbridas se llevó a cabo mediante Microscopía Electrónica de Barrido para observar la morfología y dimensiones de los precipitados de las síntesis.

Las Figuras 23 y 24, muestran las micrográficas e histogramas correspondientes a la síntesis de nanoflores con HRP y Fe^{2+} realizadas a diferentes concentraciones de proteína.

En la Figura 23 a), se muestran las micrográficas del producto de la síntesis que se llevó a cabo con HRP como componente orgánico a una concentración de [0.05 mg/mL] y Fe como componente inorgánico. La morfología tipo flor de las nanoestructuras obtenidas no fue homogénea ni se encontraron de manera abundante en la rejilla de la muestra. En el histograma que se muestra en la Figura 23 b), se puede apreciar que la mayor población de las nanoflores ubicadas presentó diámetros entre 0.8-0.9 μm y entre 1.2-1.4 μm , con un diámetro promedio de $1.11 \pm 0.21 \mu m$.

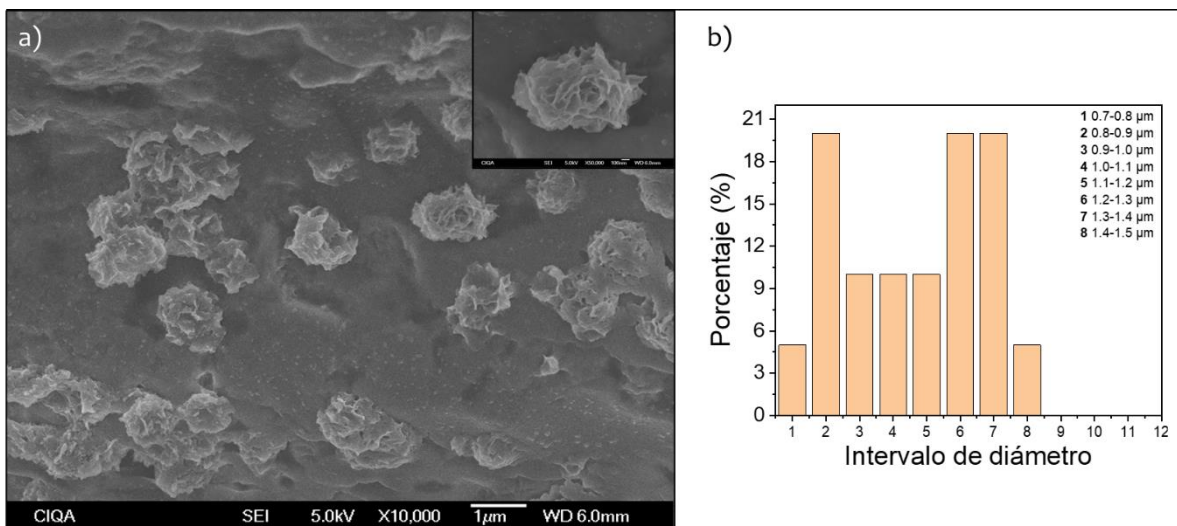


Figura 23 a) Micrográficas de las nanoestructuras obtenidas con Fe [50.01RP mg/mL], b) Histograma de diámetros correspondientes a dichas nanoestructuras.

En las micrográficas de la Figura 24 a), se puede apreciar otro tipo de morfología del producto obtenido de la síntesis llevada a cabo con los mismos componentes HRP y Fe a

una concentración mayor de proteína ([0.1 mg/mL]). De igual manera, las nanoestructuras con morfología tipo flor no fueron abundantes en la rejilla. En el histograma de la Figura 24 b), es posible observar que la mayor población presentó diámetros entre 0.8-0.9 μm . El diámetro promedio que estas presentaron fue de 0.99 $\mu\text{m} \pm 0.26 \mu\text{m}$, ligeramente menor a las obtenidas cuando se utilizó una concentración más baja de proteína.

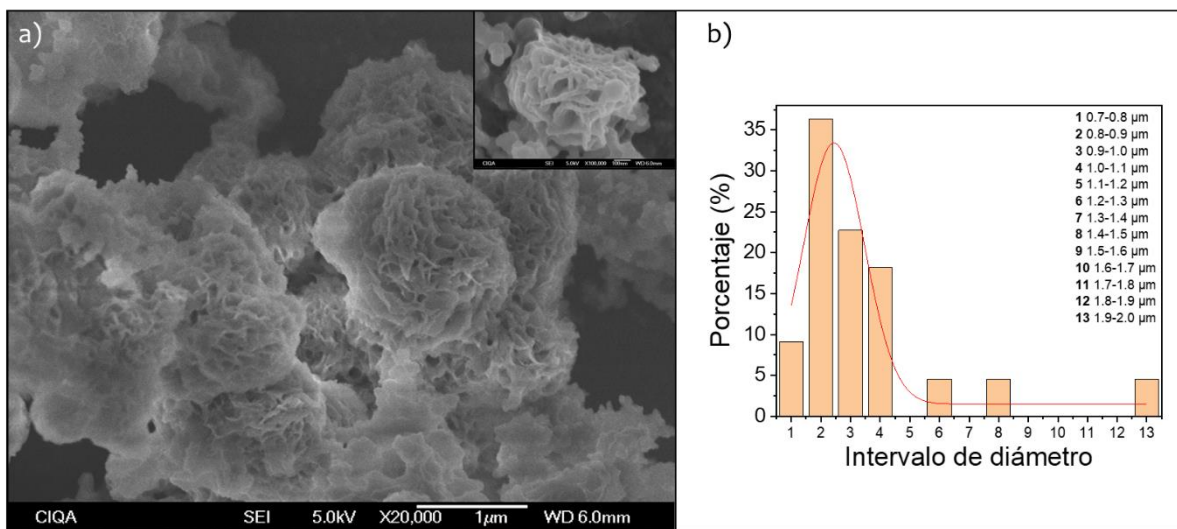


Figura 24 a) Micrografías de las nanoestructuras obtenidas con $[\text{P} = 0.1 \text{ mg/mL}]$, b) Histograma de diámetros correspondientes a dichas nanoestructuras.

La variación en los diámetros de los productos obtenidos de la síntesis que se realizó utilizando los mismos componentes orgánico e inorgánico está directamente relacionada con la concentración de proteína, ya que, a mayor concentración de proteína las nanoflores exhiben un menor tamaño y diámetro, lo cual se atribuye a la presencia de más sitios de nucleación. Cabe recalcar que la concentración de enzima es de suma importancia en las 3 etapas del mecanismo para la formación de nanoflores^[60-64,89].

Al no ser reproducible la síntesis con dichos componentes, se repitió la metodología de la síntesis accidental realizada por Zare *et al.*^[61-62] con BSA y Cu^{2+} para asegurar la obtención de la morfología tipo flor y verificar la efectividad de condiciones de reacción y reactivos. El tiempo de incubación permaneció constante, mientras que el parámetro

de temperatura se modificó de temperatura ambiente a 4 °C, debido a que los pétalos se vuelven más compactos a medida que disminuye la temperatura^[89].

Las micrografías que se presentan en la Figura 25 a), exhiben la morfología del producto obtenido de la réplica de la primera síntesis de nanoflores reportada en la literatura^[62], la cual está constituida por BSA como componente orgánico y Cu como componente inorgánico. En esta figura se puede apreciar que, bajo las condiciones de reacción evaluadas fue posible establecer la obtención de la morfología deseada tipo flor utilizando el PBS Dulbecco 1X pH 7.4 y la solución stock de CuSO₄ al 120 mM. Con base a estos resultados, se tomó la decisión de hacer variaciones en los componentes orgánicos e inorgánicos, pues el problema se atribuye a la HRP y el Fe²⁺ y no a la solución amortiguadora ni las condiciones de tiempo y temperatura de incubación. En el histograma de la Figura 25 b), se muestran los diámetros de las nanoestructuras obtenidas, el diámetro promedio de las nanoflores sintetizadas a partir de estos componentes fue de 5.73 μm ± 1.61 μm. El porcentaje mayor de la población se ubicó dentro del intervalo de diámetros 6.5-7.0 μm. Las nanoestructuras tipo flor obtenidas fueron homogéneas en la rejilla de la muestra preparada y presentaron la misma morfología que las sintetizadas por Zare *et al.*^[62].

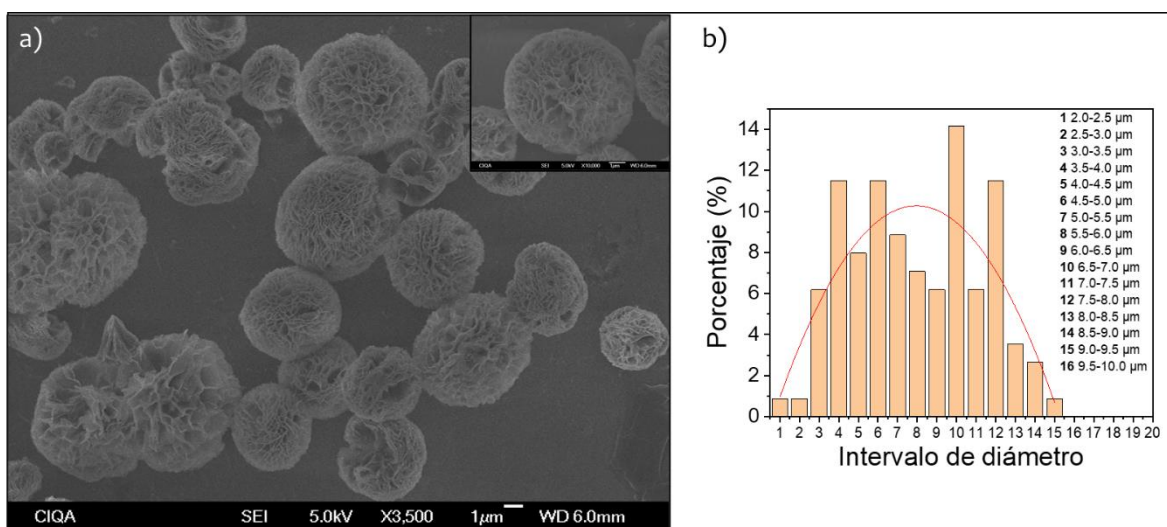


Figura 25 a) Micrografías de las nanoestructuras sintetizadas con base BSA [0.1 mg/mL], b) Histograma de diámetros correspondientes a dichas nanoestructuras.

Las Figuras 26-30 presentan las micrográficas e histogramas de los productos de las pruebas preliminares de síntesis de nanoflores híbridas, las cuales se realizaron con diferentes componentes orgánicos e inorgánicos. Los resultados se encuentran concentrados más adelante en la Tabla 7.

La Figura 26 a), corresponde a las micrográficas del producto obtenido de la síntesis de nanoflores híbridas llevada a cabo con BSA como componente orgánico y una combinación de componentes inorgánicos a base de Cu y Hem. La hematina es un catalizador reconocido para la polimerización de anilina, por lo cual se intentó incorporarlo en el posible sistema nanobiocatalítico. En la Figura 26 b), se muestra el histograma de las nanoestructuras obtenidas, en donde el mayor porcentaje de la población presentó diámetros dentro del intervalo 4.0-4.5 μm . Esta síntesis resultó en una abundancia de nanoestructuras homogéneas con diámetro promedio de $5.50 \mu\text{m} \pm 2.17 \mu\text{m}$.

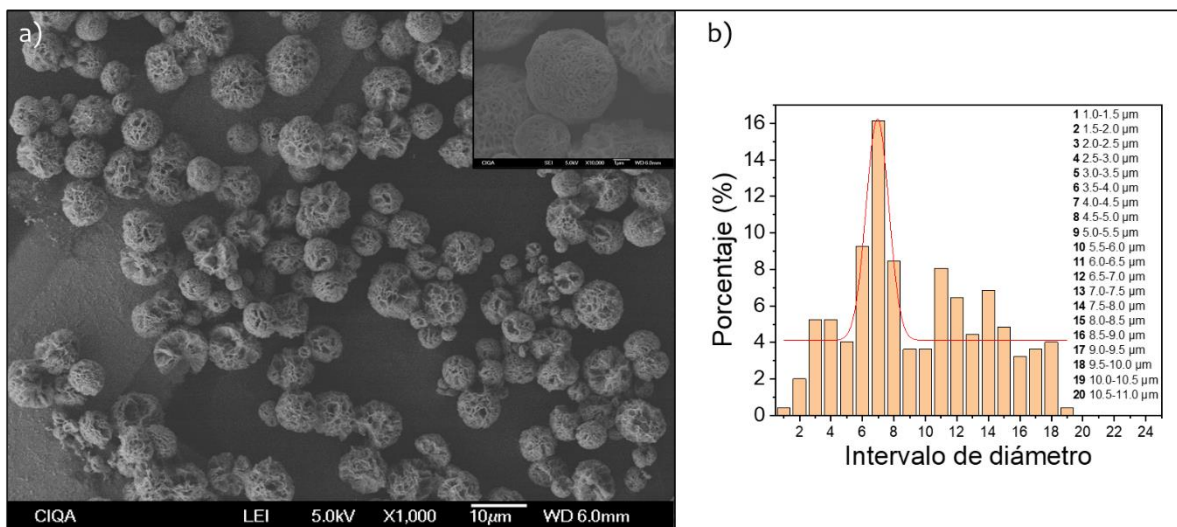


Figura 26 a) Micrográficas de las nanoestructuras obtenidas con Cu-Hem [0.1 mg/mL], b) Histograma de diámetros correspondientes a dichas nanoestructuras.

El producto de la síntesis realizada con SBP y componente inorgánico Fe se muestra en las micrográficas de la Figura 27 a), en donde es posible observar la formación de nanopartículas predominantemente esféricas. En la Figura 27 b), se muestra el

histograma de las nanopartículas, en el cual se observa que la población más abundante presentó diámetros dentro del intervalo 40-45 nm, siendo el diámetro promedio de $47.27 \text{ nm} \pm 7.54 \text{ nm}$.

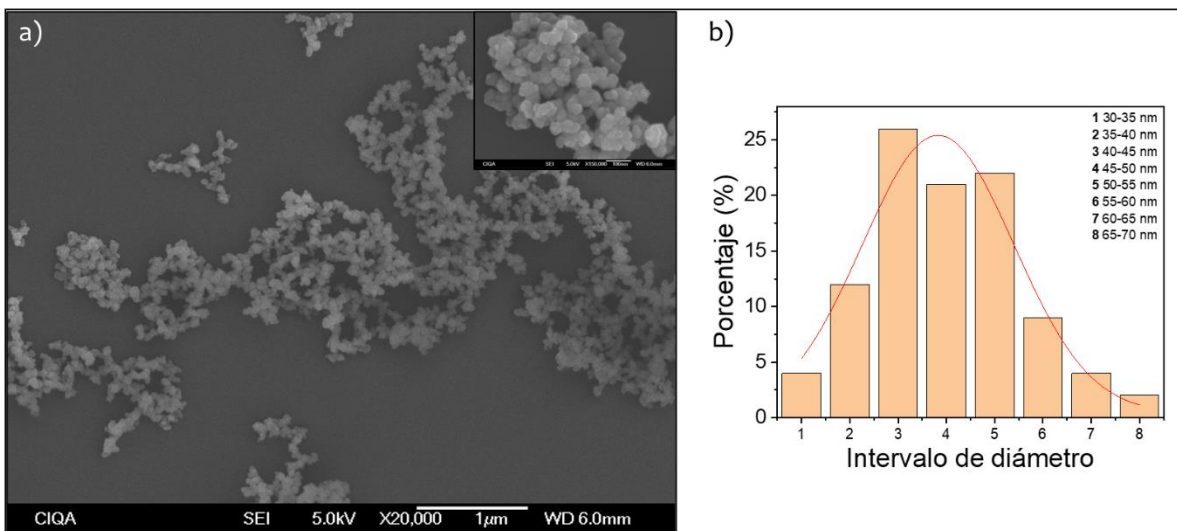


Figura 27 a) Micrografía de las nanoestructuras obtenidas con base [SBP mg/mL], b) Histograma de diámetros correspondientes a dichas nanoestructuras.

En la Figura 28 a), se presentan las micrográficas del producto de la síntesis realizada con SBP y Cu, la cual presentó formación de nanoestructuras tipo flor de manera abundante. El histograma de la Figura 28 b), corresponde a los diámetros que presentaron las nanoflores. El 37% presentó diámetros entre 3.0-3.5 µm, sin embargo, el diámetro promedio fue de $4.22 \mu\text{m} \pm 1.64 \mu\text{m}$.

La síntesis de nanoflores híbridas a base de estos componentes se llevó a cabo en incubación estática a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, ya que se encuentra reportado en la literatura que a bajas temperaturas se obtienen pétalos más compactos y nanoflores más homogéneas^[88-89]. En 2015, Yi Yu *et al.*^[53] sintetizaron nanoflores híbridas a partir de la incubación a temperatura ambiente de estos mismos componentes para purificar e inmovilizar la peroxidasa de soya.

Se toma esta combinación de nanoflores híbridas para reproducirse y utilizarse como nanobiocatalizador en la reacción de polimerización de anilina debido a que la SBP está

ampliamente reportada en polimerizaciones enzimáticas de compuestos aromáticos, entre ellos la anilina, y además porque dicha combinación de componentes resultó en reproducibilidad y tamaños homogéneos.

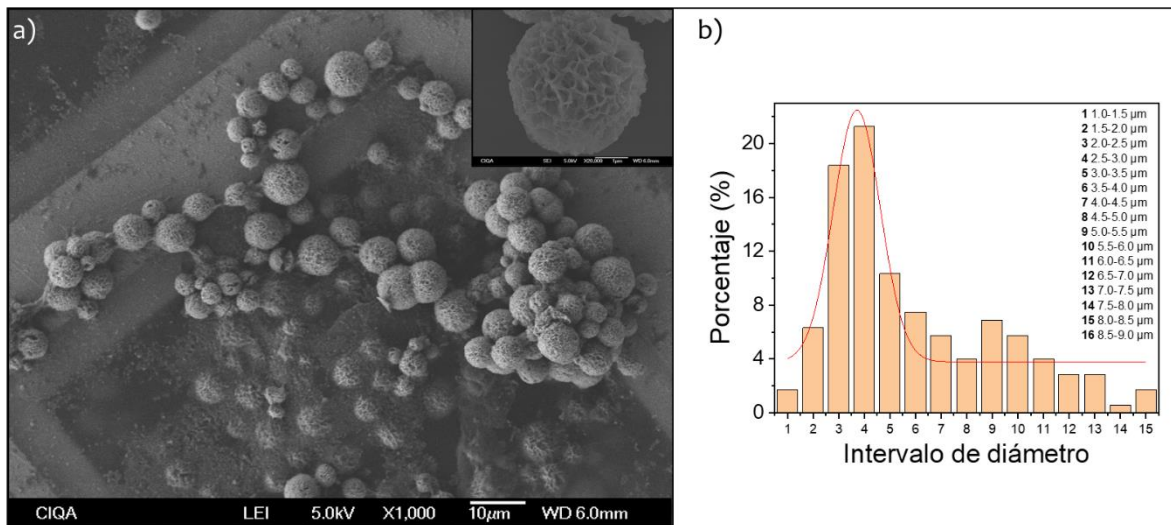


Figura 28 a) Micrografías de las nanoestructuras obtenidas con base [SBP], b) Histograma de diámetros correspondientes a dichas nanoestructuras.

En la Figura 29 a), se muestran las micrografías del producto de la síntesis realizada con BSA y una combinación de componentes inorgánicos diferente a la anterior a base de Cu y Fe. La morfología que estas abundantes nanoestructuras presentaron fue la deseada tipo flor, sin embargo, también se aprecia la presencia de producto sin una morfología definida la cual puede ser atribuida a la presencia de Fe en la síntesis que limita la formación de nanoflores. En el histograma de la Figura 29 b), se puede apreciar que el 43% de las nanoestructuras obtenidas presentaron un diámetro entre 4.5-5.0 μm. Cabe resaltar que la formación se atribuye al componente inorgánico Cu, ya que, cuando se trabajó únicamente con el Fe el producto no presentó morfología tipo flor, sino que se obtuvieron nanopartículas esféricas. Además, el diámetro promedio de las nanoflores obtenidas con base SBP-Cu fue de $4.22 \mu\text{m} \pm 1.64 \mu\text{m}$ y el de las nanoflores con base SBP-Cu-Fe fue de $4.41 \mu\text{m} \pm 0.64 \mu\text{m}$, habiendo una diferencia de $0.19 \mu\text{m}$.

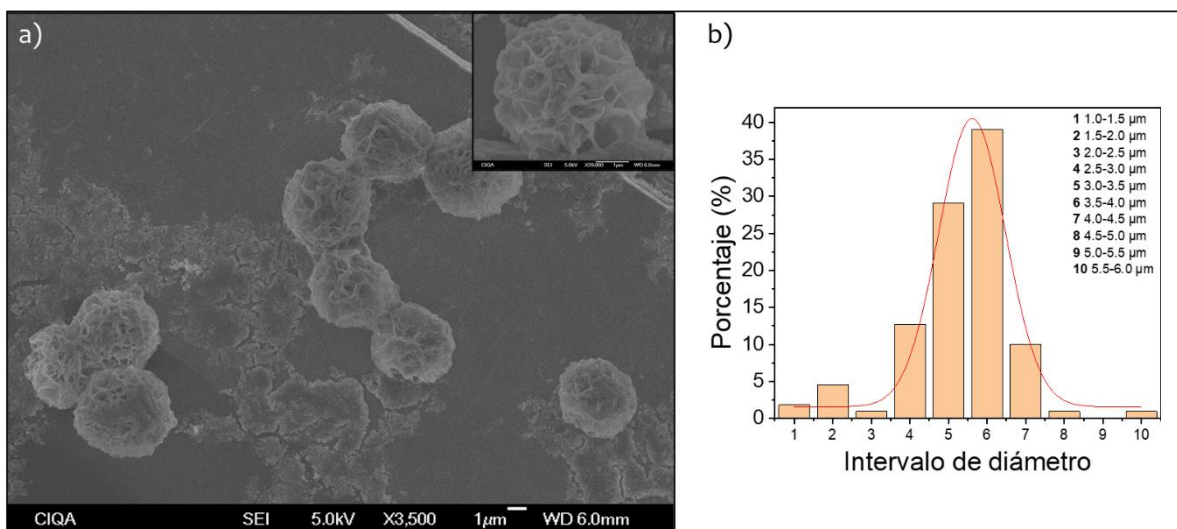


Figura 29 a) Micrografías de las nanoestructuras obtenidas con base [SBP mg/mL] b) Histograma de diámetros correspondientes a dichas nanoestructuras

La Figura 30 a), muestra las micrografías del producto obtenido de la síntesis de nanoflores híbridas con base SBP como componente orgánico y una tercera combinación de componentes inorgánicos a base de Cu y Hem. La morfología que presentó dicho producto fue tipo flor, a pesar de encontrarse aglomeradas en la región que se observa de la rejilla, es posible observar la morfología bien definida y homogénea. La Figura 30 b), corresponde al histograma de las nanoflores obtenidas en esta síntesis. La mitad de la población de nanoflores presentó diámetros entre 4.0-4.5 μm, igual a los dos casos anteriores donde se utilizó SBP con componentes inorgánicos Cu y Cu-Fe respectivamente. El diámetro promedio de esta combinación de componentes fue de 4.55 μm ± 1.55 μm, tan solo 0.33 μm mayor que el diámetro promedio de las nanoflores constituidas por SBP-Cu. La combinación de componentes inorgánicos Fe con SBP-Cu y Hem con SBP-Cu parece no tener un efecto significativo en la morfología de las nanoflores.

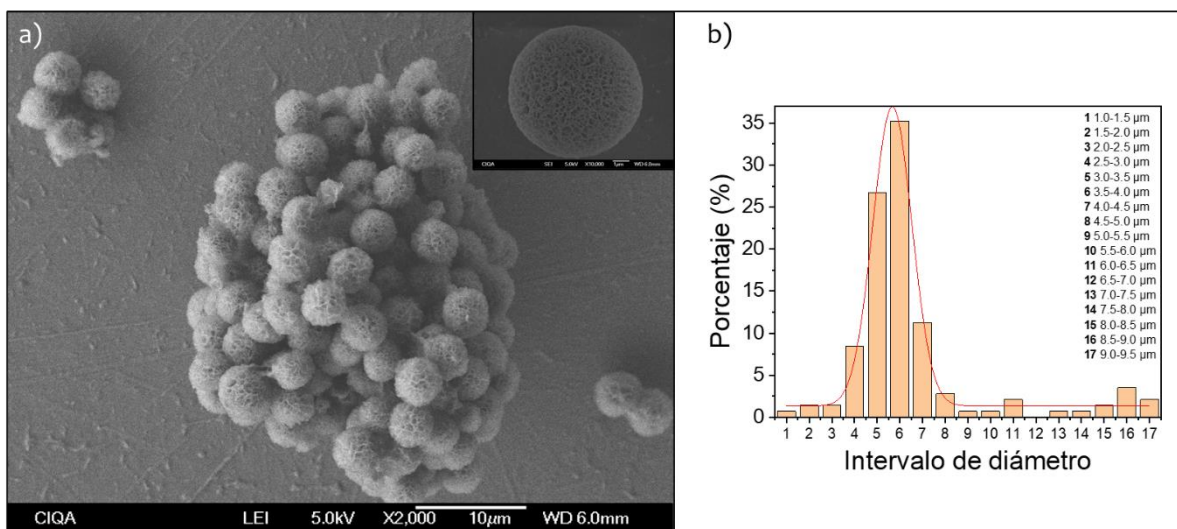


Figura 3: a) Micrografías de las nanoestructuras obtenidas con $[0.1 \text{ mg/mL}]$, b) Histograma de diámetros correspondientes a dichas nanoestructuras.

La Tabla 7, que se muestra a continuación, engloba los resultados de las pruebas preliminares de la síntesis de nanoflores híbridas con varios componentes orgánicos e inorgánicos. Las combinaciones de componentes que resultan en nanoflores híbridas sintetizadas exitosamente se encuentran sombreadas. Es importante resaltar la similitud en los diámetros promedio de las nanoflores obtenidas de la síntesis con SBP con distintas combinaciones de componentes inorgánicos, las cuales se ubican en las últimas 3 filas de la tabla.

Tabla 6 Morfología de síntesis de nanoflores híbridas con varios componentes

| Nombre | Reproducibile | Morfología | Diámetro promedio |
|----------------|---------------|-------------------------------|---|
| hNF/HRP-Fe | No | Nanopartículas/ Nanoflores | [0.05 mg/mL] 1.11 µm ± 0.216 µm [0.1 mg/mL] 0.99 µm ± 0.261 µm |
| hNF/BSA-Cu | Sí | Nanoflores | 5.73 µm ± 1.619 µm |
| hNF/BSA-Cu-Hem | Sí | Nanoflores | 5.50 µm ± 2.178 µm |
| hNF/SBP-Fe | No | Nanopartículas | 47.27 nm ± 7.548 nm |

| | | | |
|----------------|----|------------|--|
| hNF/SBP-Cu | Sí | Nanoflores | 4.22 $\mu\text{m} \pm 1.642 \mu\text{m}$ |
| hNF/SBP-Cu-Fe | Sí | Nanoflores | 4.41 $\mu\text{m} \pm 0.649 \mu\text{m}$ |
| hNF/SBP-Cu-Hem | Sí | Nanoflores | 4.55 $\mu\text{m} \pm 1.554 \mu\text{m}$ |

A pesar de que el tamaño y forma de las nanoflores depende de varios factores, entre ellos la elección y concentración de proteína, en la literatura se encuentran reportadas nanoflores de diversos componentes con diámetros entre 1-30 μm , simulando flores redondas con ligeras variaciones^[60,63,88]. Los diámetros promedio de nanoflores híbridas sintetizadas exitosamente en este trabajo se encuentran dentro del rango de 4-6 μm , a excepción de las síntesis a base de componentes HRP y Fe^{2+} , las cuales no fueron reproducibles y presentaron formación de nanopartículas esféricas en su mayoría.

7.3.2 Estudios de actividad enzimática

Se analizó la cinética de oxidación del guayacol en presencia de H_2O_2 con la peroxidasa de soya libre y con las nanoflores sintetizadas a partir de dicha peroxidasa junto con iones divalentes de cobre (hNF/SBP-Cu). En la Figura 31, se muestra la microplaca con los controles o blancos de reacción en la fila A y las reacciones de oxidación del guayacol en presencia de H_2O_2 con SBP y hNF/SBP-Cu a diferentes concentraciones en la fila B.

Es posible apreciar las diferentes intensidades de color del producto de la oxidación del guayacol, las cuales están directamente relacionadas con la cinética que se muestra a continuación. Los pocillos B1-B5 corresponden a la reacción de oxidación en presencia de H_2O_2 y SBP libre y los pocillos B6-B9 corresponden a la reacción de oxidación que se llevó a cabo en presencia de hNF/SBP-Cu, los cuales presentaron la mayor concentración de producto^[90].

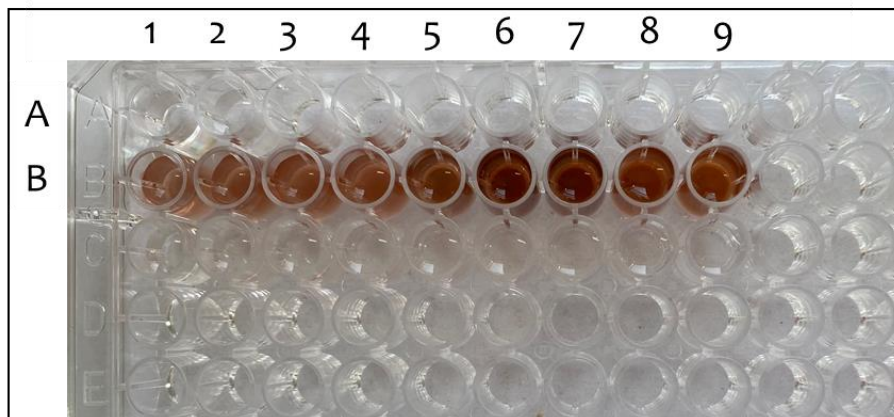


Figura 31 Imagen de la microplaca con varias reacciones de oxidación de guayacol con SBP libre y hNF/SBP.

La Figura 32, muestra la cinética de la reacción de oxidación del guayacol en presencia de H_2O_2 y SBP libre en color negro, y en presencia de H_2O_2 y hNF/SBP-Cu en color rojo.

La absorbancia máxima de la reacción catalizada por la SBP libre se alcanzó a 130 segundos, sin embargo, la cinética de oxidación del guayacol en presencia del sistema hNF/SBP-Cu presentó valores considerablemente más altos desde el tiempo cero, lo cual indica una mayor concentración del producto de oxidación.

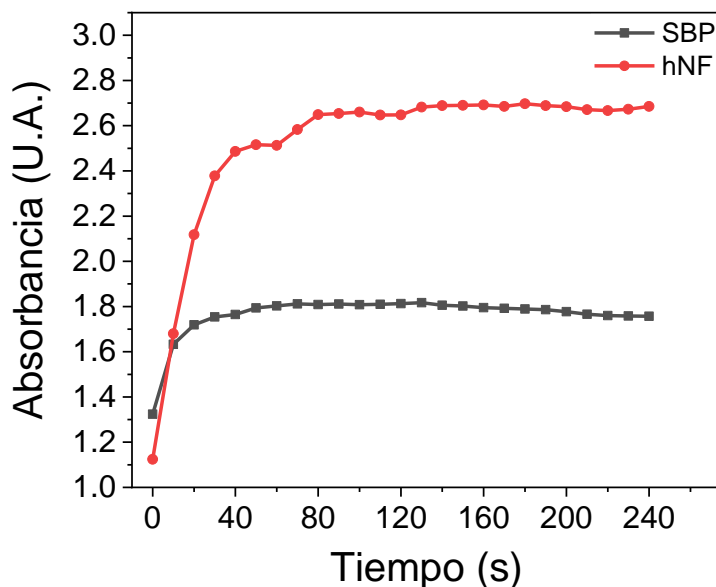


Figura 3 Cinética de oxidación de guayacol catalizada por SBP libre (línea negra) y hNF/SBP-Cu (línea roja).

En la Tabla 8, se encuentran listadas las absorbancias de ambas cinéticas de oxidación del guayacol tomadas en un lapso de 4 min en intervalos de 10 segundos. Se resalta en amarillo la absorbancia mayor y su tiempo correspondiente.

Tabla 7 Cinética de oxidación de guayacol por SBP libre y SBP inmovilizada en nanoflores

| SBP libre | | Nanoflores híbridas SBP-Cu | |
|------------|-------------|----------------------------|-------------|
| Tiempo (s) | Absorbancia | Tiempo (s) | Absorbancia |
| 0 | 1.324 | 0 | 1.124 |
| 10 | 1.633 | 10 | 1.68 |
| 20 | 1.719 | 20 | 2.118 |
| 30 | 1.754 | 30 | 2.378 |
| 40 | 1.765 | 40 | 2.486 |
| 50 | 1.794 | 50 | 2.516 |
| 60 (1 min) | 1.803 | 60 (1 min) | 2.513 |

| | | | |
|-------------|-------|-------------|-------|
| 70 | 1.812 | 70 | 2.583 |
| 80 | 1.809 | 80 | 2.649 |
| 90 | 1.811 | 90 | 2.654 |
| 100 | 1.808 | 100 | 2.66 |
| 110 | 1.81 | 110 | 2.647 |
| 120 (2 min) | 1.813 | 120 (2 min) | 2.648 |
| 130 | 1.817 | 130 | 2.682 |
| 140 | 1.806 | 140 | 2.689 |
| 150 | 1.802 | 150 | 2.69 |
| 160 | 1.795 | 160 | 2.692 |
| 170 | 1.792 | 170 | 2.685 |
| 180 (3 min) | 1.789 | 180 (3 min) | 2.697 |
| 190 | 1.786 | 190 | 2.689 |
| 200 | 1.777 | 200 | 2.684 |
| 210 | 1.766 | 210 | 2.671 |
| 220 | 1.76 | 220 | 2.667 |
| 230 | 1.758 | 230 | 2.673 |
| 240 (4 min) | 1.757 | 240 (4 min) | 2.685 |

Las absorbancias a 130 segundos, tiempo en el cual la cinética catalizada por SBP libre alcanzó la absorbancia máxima, se utilizaron para el cálculo de actividad volumétrica y específica haciendo uso de las fórmulas que se encuentran en el apartado 6.3.2.

A continuación, en la Tabla 9 se presentan los parámetros utilizados y en la Tabla 10, los cálculos para la obtención de la actividad específica de SBP libre y hNF/SBP-Cu.

Tabla 8 Parámetros para cálculos de actividad específica a partir de absorbancia

| Parámetro | Valor |
|-------------------------------|----------|
| Concentración de proteína SBP | 23 µg/mL |

| | |
|---|------------------------|
| Concentración de proteína hNF | 36 µg/mL |
| Coefficiente de extinción de guayacol (ε) | 26 mM cm ⁻¹ |
| Paso óptico (b) | 1.44 cm |
| Longitud de onda (λ) | 470 nm |
| Volumen total de ensayo | 0.00025 L |
| Volumen de catalizador utilizado | 0.02 mL |
| A _i SBP | 1.324 |
| A _f SBP | 1.817 |
| Δ _A SBP | 0.493 |
| A _i hNF | 1.124 |
| A _f hNF | 2.682 |
| Δ _A hNF | 1.558 |
| Tiempo de absorbancia máxima SBP | 2.166 min |
| Tiempo de absorbancia máxima hNF | 2.166 min |

Tabla 9 Cálculos de actividad específica de SBP libre y hNF

| SBP libre | hNF/SBP-Cu |
|--|---|
| $\Delta c = \frac{A_f - A_i}{\epsilon b} [\equiv] M$ | |
| $\Delta c = \frac{1.817 - 1.324}{(2.6)(1.44)} = 0.013168$ | $\Delta c = \frac{2.682 - 1.124}{(2.6)(1.44)} = 0.041613$ |
| $c = \frac{(\Delta c * V_{Trx})_h}{t A f} [\equiv] \frac{mol}{min}$ | |
| $c = \frac{(0.013168 * 0.00025)}{2.166} = 1.51E-06$ | $c = \frac{(0.041613 * 0.00025)}{3} = 3.46E-06$ |
| $Activa \text{ específica} = \frac{c}{V_{enzima}} * 1.0E+06 [\equiv] \frac{UI}{mL} \quad UI \leftrightarrow \frac{\mu mol}{min}$ | |
| $A.V. = \frac{1.51E-06}{0.02} * 1.0E+06 = 75.7$ | $A.V. = \frac{3.46E-06}{0.02} * 1.0E+06 = 173.88$ |

| | |
|--|---|
| $A c t i v e d p i c a = \frac{A c t i v i d a d t m r i c a}{C o n c e n t r a c i o n a} \left[\frac{U I}{m g} \right]$ | |
| $A. E. = \frac{757}{0.023} = 33084 \frac{U I}{m g}$ | $A. E. = \frac{17388}{0.036} = 48134 \frac{U I}{m g}$ |

La actividad de la SBP inmovilizada en el sistema nanoestructurado tipo flor presenta un incremento tal como se esperaba, 1.45 veces mayor que la actividad de la enzima libre. La clave para mejorar la actividad enzimática radica en la selección correcta de los componentes orgánico e inorgánico y su buena incorporación^[63]. En el trabajo reportado por Yi Yu *et al.*, en el cual se sintetizaron nanoflores híbridas a partir de SBP cruda y CuSO₄, la actividad enzimática de SBP cruda libre es de 541 UI/mg, mientras que la actividad más alta alcanzada por inmovilización en el sistema tipo flor es de 2550 ± 9 UI/mg^[53]. En el presente trabajo la actividad obtenida por inmovilización es de 4816.34 UI/mg, casi el doble de la síntesis reportada utilizando los mismos componentes orgánico e inorgánico. Este estudio confirma la efectividad del sistema de inmovilización, en el cual la enzima presenta una actividad mayor, lo que hace factible su uso como catalizador para la reacción de polimerización de anilina.

7.4 Síntesis de Polianilina

El sistema que se utilizó para realizar las reacciones de polimerización consistió en un baño de circulación refrigerado, un reactor enchaquetado de 50 mL, una parrilla de agitación y una bomba dosificadora como se muestra en las imágenes de la Figura 33 y 34.



Figura33 Imágenes del baño de circulación refrigerante utilizado para la síntesis de PANI



Figura34 Imagen de la bomba dosificadora, parrilla de agitación y reactor encaquetado utilizado para la síntesis de PANI

7.4.1 Síntesis de Polianilina catalizada por hematina libre

En la Figura 35, se muestran las imágenes de la secuencia registrada durante la reacción de síntesis, donde es posible apreciar el cambio de color en la reacción a medida que aumenta la concentración de H_2O_2 ; de café a verde/azul en distintas tonalidades e intensidades, característico de la polimerización de la anilina. Dicho cambio de color es

indicativo de la síntesis polimérica exitosa utilizando un componente biomimético libre de soportes como catalizador.

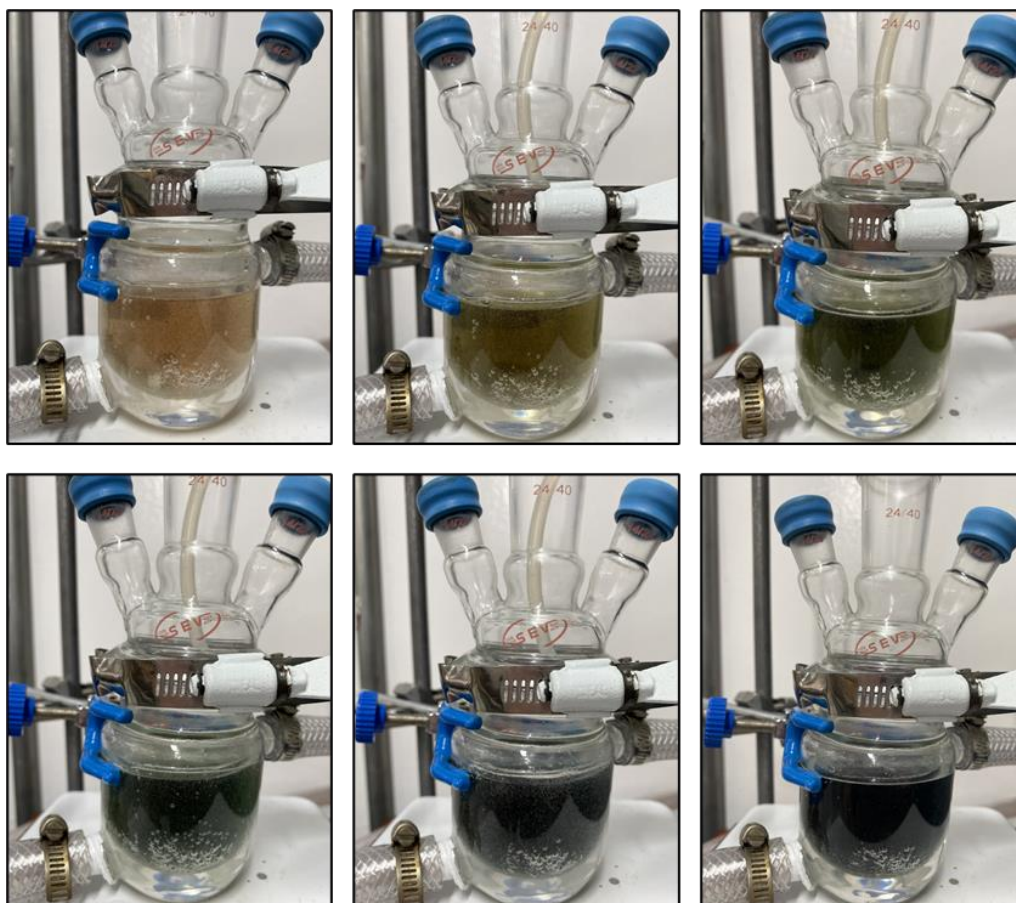


Figura 35 Imágenes de la reacción de polimerización de anilina catalizada por Hem libre a diferentes tiempos de adición de H₂O₂.

7.4.2 Síntesis de Polianilina catalizada por SBP libre

La reacción se realizó de manera estequiométrica de acuerdo con el contenido de proteína y no de sólido. Previos cálculos de determinación de contenido de proteína utilizando el método de Bio Rad arrojaron que cada gramo de sólido de SBP cruda cuenta con 55.55 mg de proteína. A continuación, en las imágenes de la Figura 36, se muestra el sistema de reacción a diferentes tiempos de dosificación de H₂O₂, donde es posible observar el mismo cambio de color que se muestra en las imágenes de la Figura 35, el

cual inicia con la primera gota de peróxido, indicativo de la obtención del polímero en la forma deseada.



Figura 36 Imágenes de reacción de polimerización de anilina catalizada por SBP libre a diferentes tiempos de adición: 0, 20 y 40 H

7.4.3 Síntesis de Polianilina catalizada por nanoflores híbridas de peroxidasa (hNF/SBP-Cu)

En la Figura 37, se muestran algunos viales de reacción de síntesis de nanoflores híbridas con componente orgánico SBP e inorgánico Cu posterior al tiempo de incubación, en los cuales es posible apreciar el precipitado azul, el cual se recuperó para desempeñar la función de nanobiocatalizador en la polimerización de anilina.

En conjunto, de los 360 mL de reacción totales, se obtuvieron 26 mL de producto. La medición del contenido de proteína en los 334 mL de sobrenadante se realizó empleando las curvas de calibración y se obtuvo un valor de 92.93 $\mu\text{g/mL}$, lo que significó una encapsulación del 17% de proteína por cada vial de reacción. Dicho porcentaje fue equivalente a 6.3 mg de proteína, valor con el cual la reacción de polimerización se llevó de manera estequiométrica. A pesar de que el porcentaje de encapsulación fue menor al 20%, no se modificó la concentración de proteína utilizada en la síntesis, sino que se mantuvo constante el parámetro ya que la encapsulación disminuye cuando se adiciona un exceso de proteína a un peso constante de componente inorgánico en la síntesis^[60].



Figura 37 Imagen de 8 viales de los 40 utilizados para la síntesis de nanoflores híbridas SBPCu post incubación con precipitado.

Previo a la polimerización, se analizó el producto de las reacciones conjuntas mediante SEM y TEM para corroborar la morfología deseada. Es posible apreciar que la abundancia de las nanoestructuras tipo flor en la rejilla es representativa de la cantidad acumulada de producto. En la Figura 38, se presentan micrografías SEM y TEM de las nanoflores híbridas utilizadas para la polimerización de anilina. En la esquina superior izquierda se capta la porosidad de la nanoestructura conformada por múltiples “pétalos” y en la esquina superior derecha una nanoflor individual de 4.71 μm de diámetro.

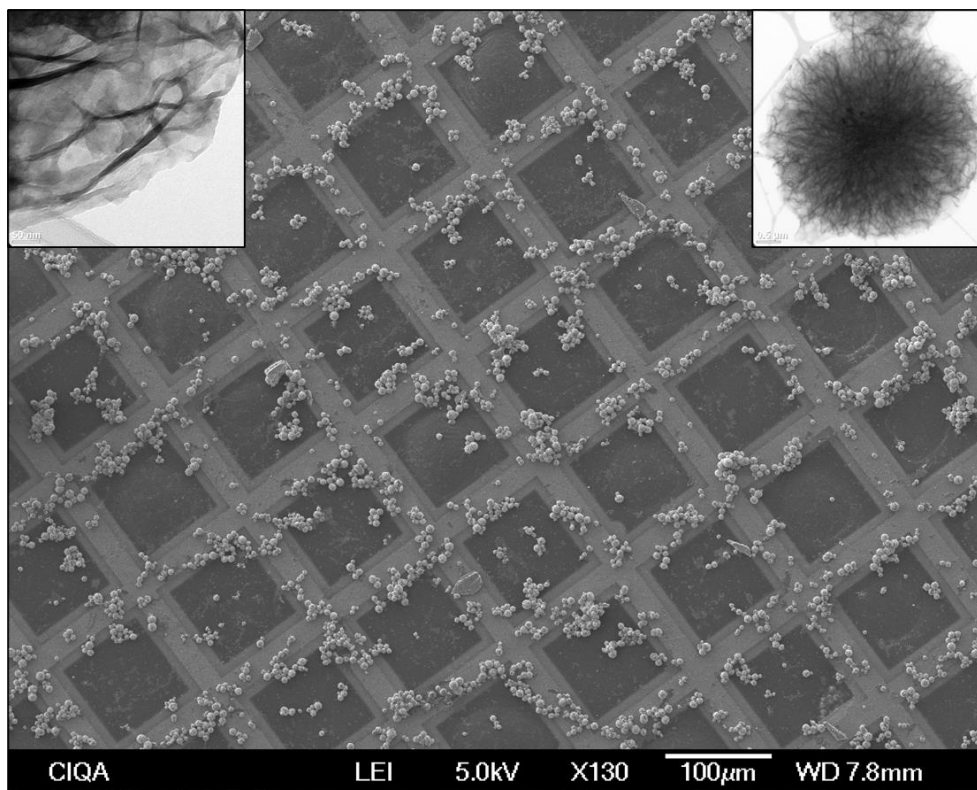


Figura 38 Micrografías SEM y TEM del producto de síntesis de CuNPs/SBPas como catalizador para la polimerización de anilina.

El precipitado obtenido del producto de las síntesis de nanoflores con SBP y Cu inicialmente presentó una tonalidad azul cómo es posible apreciar en los viales de la Figura 37, sin embargo, al momento de acidificar la solución y llevar el medio de reacción al pH deseado ocurrió un cambio de color. El producto pasó de color azul a verdoso, el cual se puede observar en la primera imagen de la Figura 39. Este cambio de color puede ser atribuido a la oxidación del cobre en medio ácido, lo que permite descartar algún tipo de efecto sobre la enzima inmovilizada, ya que, de haber estado expuesta hubiera sufrido una posible desnaturalización haciendo imposible la polimerización que se llevó a cabo de manera exitosa.

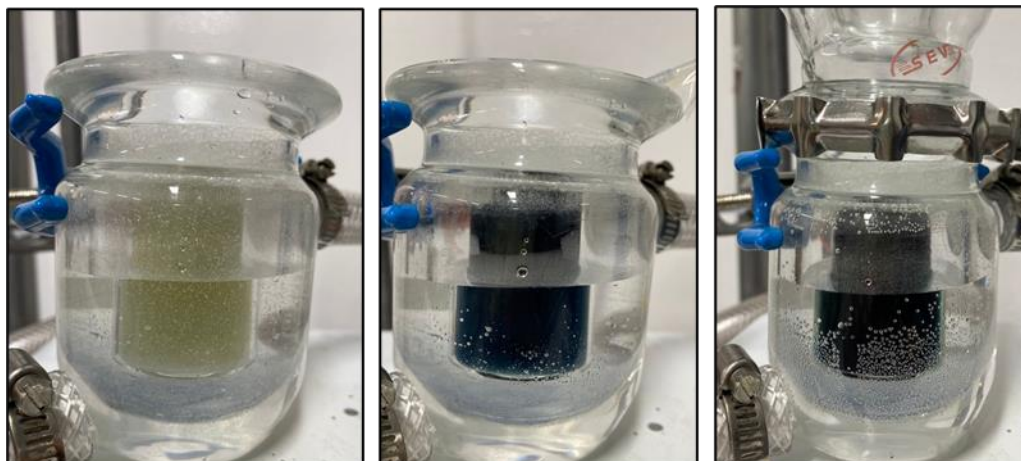


Figura 39. Imágenes de reacción de polimerización de anilina catalizada por nanoflores híbridashNF/SB₂O₃ en diferentes tiempos de adición de H₂O₂.

Al cabo de 6 minutos comenzó a hacerse visible el virre de color, indicativo de la polimerización exitosa de la anilina.

7.5 Caracterización de Polianilina

Las siguientes caracterizaciones se realizan para confirmar la obtención de la sal de emeraldina, única forma conductora de la polianilina.

7.5.1 Espectroscopía ultravioleta visible (UV-vis)

Los espectros de absorción de los polímeros conductores se realizaron en forma conductora y aislante, al dispersarse en medio ácido resulta una solución verde, mientras que en medio básico se torna azul, dichos colores se pueden observar en la Figura 40, estos colores son característicos de las formas sal y base de emeraldina respectivamente.

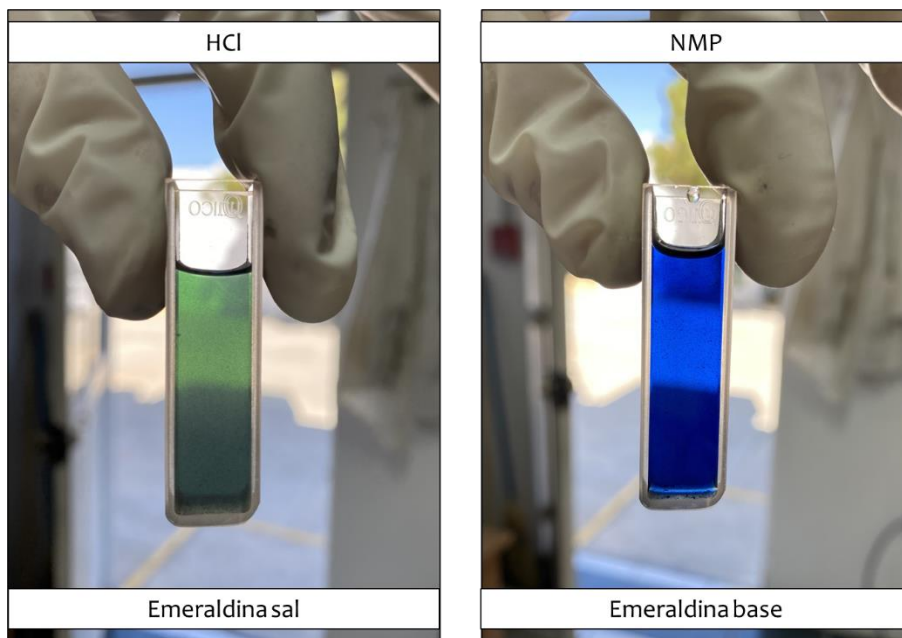


Figura 40. Dispersión de PANI en medio ácido (verde) y en medio alcalino (azul)

La emeraldina base se dopa en presencia de ácidos, se protona y se convierte en sal de emeraldina, dicho proceso origina la formación de la estructura polarónica/bipolarónica. Además del notorio cambio de color entre sal y base, las formas difieren en propiedades de absorción de luz^[8]. Cabe resaltar que los electrones π deslocalizados, los cuales son característicos de los ICPS, otorgan una estructura polimérica rígida la cual resulta en baja solubilidad^[91].

En la Figura 41 a), se muestran los espectros de absorción del polímero catalizado por Hem libre, SBP libre y hNF/SBP-Cu respectivamente. Los 3 espectros presentan el mismo comportamiento, las bandas características del polímero desdopado. El espectro de PANI desdopada en NMP exhibe una banda con máximo en 324 nm atribuida a la transición π - π^* de los grupos bencenoides y otra en 604 nm atribuida a la transición excitónica de los grupos quinoides^[92]. La diferencia en la relación de intensidades indica que en el polímero se favorecen las estructuras bencenoides, mientras que los espectros de absorción de PANI obtenida mediante catálisis por SBP libre y nanoflores híbridas muestran un desplazamiento batocrómico a 639 nm, atribuido a una mayor conjugación

y a la presencia de agregados propios de la mala solubilidad del sistema atribuida a las interacciones entre los sistemas conjugados π de las cadenas poliméricas^[93].

En los espectros de absorción de PANI dopada en HCl que se presentan en la Figura 41 b), las bandas muestran un desplazamiento batocrómico respecto al polímero desdopado. Una banda prolongada traslapa la banda en 320 nm atribuida a la transición $\pi-\pi^*$, además presenta una banda en 450 nm atribuida a la transición polarón- π^* y otra que se extiende desde los 600 nm hacia el rojo. Dichas bandas representan evidencia de la formación del polarón que confirma la formación de PANI en su forma emeraldina protonada^[93-95].

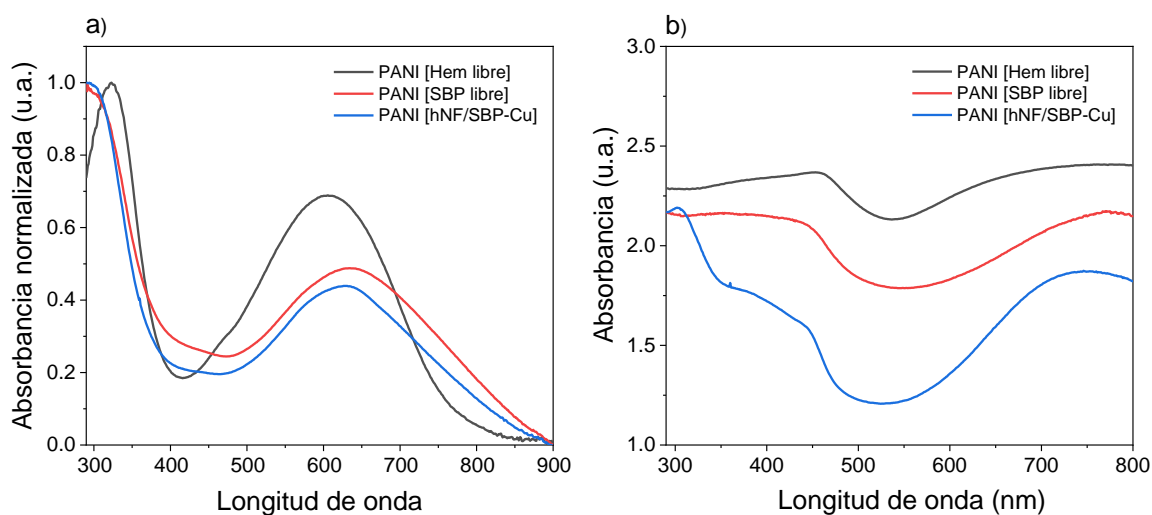


Figura 41a) Espectro de absorción de PANI catalizada por hematina libre (línea negra), SBP libre (línea roja) y hNF/SBP (línea azul) en forma desdopada, b) Espectro de absorción de PANI catalizada por hematina libre (línea negra), SBP libre (línea roja) y hNF/SBP-Cu (línea azul) en forma dopada

7.5.1 Conductividad eléctrica

A continuación, en la Tabla 11, se presenta una comparación de los parámetros de conductividad de PANI catalizada de diferente manera.

La síntesis de PANI obtenida mediante catálisis biomimética libre de soportes permitió la obtención de un polímero con propiedades de semiconducción. A pesar de que dicha PANI presenta la mayor conductividad de los productos obtenidos por distintos tipos de

catálisis, el alcance de este proyecto es la mejora de las propiedades de conductividad eléctrica entre la polianilina catalizada por peroxidasa en forma libre y peroxidasa inmovilizada en un sistema híbrido nanoestructurado. La polianilina obtenida mediante catálisis con nanoflores híbridas a base de SBP y iones Cu presentó una conductividad de dos órdenes de magnitud mayor que la catalizada por SBP libre. El aumento en la conductividad del polímero se atribuye al favorecimiento del acoplamiento cabeza-cola bajo las condiciones de reacción más ácidas, al haber menos defectos estructurales, aumenta la conductividad^[26,96-97]. Cuando se lleva a cabo la polimerización de anilina a pH>3 se obtiene un bajo rendimiento, se favorecen los acoplamientos orto, la formación de ramificaciones y el entrecruzamiento^[26]. El rendimiento y la conductividad es notoriamente mayor cuando se aumenta el tiempo y se disminuye la temperatura de reacción^[14].

Tabla 10 Parámetros de conductividad PANI sintetizada mediante distintos tipos de catálisis (Hem libre, SBP libre y hNF/SBP)

| Muestra | Resistencia (Ω) | Distancia entre electrodos (cm) | Área de electrodo (cm ²) | Resistividad de volumen (Ω.cm) | Conductividad (S/cm) |
|-------------------------------|-----------------|---------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|----------------------|
| PANI-Hem 1.5 horas | 6.20E+00 | 0.0900 | 0.0228 | 1.57E+00 | 6.37E-01 |
| PANI-SBP 1.5 horas | 2.29E+05 | 0.0610 | 0.0260 | 9.76E+04 | 1.02E-05 |
| PANI-SBP 20 horas | 8.00E+04 | 0.13 | 0.04 | 2.46E+04 | 4.06E-05 |
| PANI-hNF 20 horas | 2.80E+03 | 0.13 | 0.04 | 8.62E+02 | 1.16E-03 |

8. Conclusiones

En este trabajo se sintetizaron nanoflores híbridas a partir de la combinación de distintos componentes orgánicos e inorgánicos, para esto se determinó que el orden de adición de dichos componentes y la formulación del PBS utilizado como medio para su coprecipitación son clave para la obtención de las nanoestructuras con morfología tipo flor. Las síntesis realizadas a base de cobre como componente inorgánico en conjunto con BSA y SBP resultaron en la obtención de morfologías homogéneas de nanoflores con diámetros entre 4-6 μm . Se eligió como nanobiocatalizador el sistema sintetizado a partir de SBP y Cu (hNF/SBP-Cu) debido a su reproducibilidad y con la finalidad de hacer un comparativo de la síntesis de polianilina catalizada por peroxidasa tanto en forma libre como inmovilizada. Los estudios de actividad llevados a cabo mediante la cinética de oxidación del guayacol, muestran una actividad de SBP inmovilizada en el sistema nanoestructurado tipo flor 1.45 veces mayor que SBP libre.

La polimerización de anilina realizada bajo condiciones de pH ácidas y mediante distintos tipos de catálisis resultó en la obtención del polímero en forma conductora. Es importante mencionar que la PANI obtenida mediante los 3 tipos de catálisis (biomimética libre y enzimática libre e inmovilizada) se sitúa dentro de la clasificación de semiconductores, en donde la conductividad de PANI catalizada por nanoflores híbridas fue 2 órdenes de magnitud mayor que la PANI catalizada por SBP libre. El incremento en la conductividad se atribuye a la protección que brinda el nanoambiente a la peroxidasa inmovilizada dentro del sistema híbrido nanoestructurado, resultando en una mayor estabilidad y actividad ante las condiciones de acidez del medio necesarias para la síntesis de la forma conductora de la polianilina.

La catálisis biomimética y enzimática representan una ruta alternativa a la catálisis química con la ventaja de la ausencia de subproductos tóxicos y contribuyen a una transición a la química verde en la síntesis de polímeros conductores.

9. Referencias

-
- [1] Jaffe, M. (2000). The future of applied polymer science. In (pp. 591-633).
- [2] Rasmussen, S. C. (2018). Revisiting the Early History of Synthetic Polymers: Critiques and New Insights. *Ambix*, 65(4), 356-372. doi:10.1080/00026980.2018.1512775
- [3] Gillies, E. R. (2020). Reflections on the Evolution of Smart Polymers. 60(1-2), 75-85. doi:<https://doi.org/10.1002/ijch.201900075>
- [4] Rami, S. (2015). *Synthesis, Characterization, and Electrochemical Properties of Polyaniline Thin Films*.
- [5] Inzelt, G. (2017). Conducting polymers: past, present, future. *Journal of Electrochemical Science Engineering*, 8, 3-37.
- [6] Rasmussen, S. (2021). New Insight into the “Fortuitous Error” that Led to the 2000 Nobel Prize in Chemistry. 5, 91-97. doi:10.13128/Substantia-973
- [7] Li, Y., Lu, D., & Wong, C. P. (2010). Intrinsically Conducting Polymers (ICPs). In *Electrical Conductive Adhesives with Nanotechnologies* (pp. 361-424). Boston, MA: Springer US.
- [8] Romero-García, J., Ledezma-Pérez, A., Martínez-Cartagena, M., Alvarado-Canché, C., Jiménez-Cárdenas, P., De-León, A., & Gallardo-Vega, C. (2019). Chapter Twelve - Radical addition polymerization: Enzymatic template-free synthesis of conjugated polymers and their nanostructure fabrication. In N. Bruns & K. Loos (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 627, pp. 321-337): Academic Press.
- [9] Sapurina, I., & Shishov, M. (2012). Oxidative Polymerization of Aniline: Molecular Synthesis of Polyaniline and the Formation of Supramolecular Structures. In (pp. 251-312).
- [10] Mazzeu, M., Faria, L. K., Baldan, M., Rezende, M. C., & Gonçalves, E. (2018). Influence of reaction time on the structure of polyaniline synthesized on a pre-pilot scale. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 35, 123-130. doi:10.1590/0104-6632.20180351515201602
- [11] Bavane, G. (2014). Chapter 3 Synthesis of Polyaniline. *Synthesis and Characterization of Thin Films of Conducting Polymers for Gas Sensing Applications*.
- [12] Shimano, J. Y., & MacDiarmid, A. G. (2001). Polyaniline, a dynamic block copolymer: key to attaining its intrinsic conductivity? *Synthetic Metals*, 123(2), 251-262. doi:[https://doi.org/10.1016/S0379-6779\(01\)00293-4](https://doi.org/10.1016/S0379-6779(01)00293-4)
- [13] Yilmaz, F., & Küçükyavuz, Z. (2009). The influence of polymerization temperature on structure and properties of polyaniline. *e-Polymers*, 9. doi:10.1515/epoly.2009.9.1.48
- [14] Maity, P. a. K., M. (2016). Synthesis Time and Temperature Effect on Polyaniline Morphology and Conductivity. *American Journal of Materials Synthesis and Processing*, 1, 37-42. doi:doi: 10.11648/j.ajmsp.20160104.11

- [15] Bienkowski, K. (2006). Polyaniline and its derivatives doped with Lewis acids- synthesis and spectroscopic properties. *Other*.
- [16] Kobayashi, S., & Makino, A. (2009). Enzymatic Polymer Synthesis: An Opportunity for Green Polymer Chemistry. *Chemical Reviews*, 109(11), 5288-5353. doi:10.1021/cr900165z
- [17] Marchetti, L., & Levine, M. (2011). Biomimetic Catalysis. *ACS Catalysis*, 1, 1090–1118. doi:10.1021/cs200171u
- [18] Tierrablanca, E., Romero-García, J., Roman, P., & Cruz-Silva, R. (2010). Biomimetic polymerization of aniline using hematin supported on halloysite nanotubes. *Applied Catalysis A: General*, 381(1), 267-273. doi:<https://doi.org/10.1016/j.apcata.2010.04.021>
- [19] Boeva, Z., & Sergeev, V. (2014). Polyaniline: Synthesis, Properties, and Application. *Polymer Science Series C*, 56. doi:10.1134/S1811238214010032
- [20] Kobayashi, S., Uyama, H., & Kimura, S. (2001). Enzymatic Polymerization. *Chemical Reviews*, 101(12), 3793-3818. doi:10.1021/cr990121l
- [21] Hu, X., Tang, K., Liu, S.-G., Zhang, Y., & Zou, G.-L. (2005). Hemoglobin-biocatalysts synthesis of a conducting polyaniline. *Reactive & Functional Polymers - REACT FUNCT POLYM*, 65, 239-248. doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2005.06.007
- [22] Nabid, M. R., Sedghi, R., Jamaat, P. R., Safari, N., & Entezami, A. A. (2007). Catalytic oxidative polymerization of aniline by using transition-metal tetrasulfonated phthalocyanine. *Applied Catalysis A: General*, 328(1), 52-57. doi:<https://doi.org/10.1016/j.apcata.2007.05.017>
- [23] Bruno, F., Nagarajan, R., Roy, S., Kumar, J., & Samuelson, L. (2003). Biomimetic Synthesis of Water Soluble Conductive Polypyrrole and Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene). *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 40, 1327-1333. doi:10.1081/MA-120025312
- [24] Cruz-Silva, R., Arizmendi, L., Del Ángel, M., & Romero, J. (2007). pH- and Thermosensitive Polyaniline Colloidal Particles Prepared by Enzymatic Polymerization †. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 23, 8-12. doi:10.1021/la0618418
- [25] Cruz-Silva, R., Roman, P., & Romero, J. (2010). Enzymatic Synthesis of Polyaniline and Other Electrically Conductive Polymers. In (pp. 187-210).
- [26] Cruz-Silva, R., Romero-García, J., Angulo-Sánchez, J. L., Ledezma-Pérez, A., Arias-Marín, E., Moggio, I., & Flores-Loyola, E. (2005). Template-free enzymatic synthesis of electrically conducting polyaniline using soybean peroxidase. *European Polymer Journal*, 41(5), 1129-1135. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2004.11.012>
- [27] Cruz-Silva, R., Escamilla, A., Nicho, M. E., Padron, G., Ledezma-Perez, A., Arias-Marín, E., . . . Romero-García, J. (2007). Enzymatic synthesis of pH-responsive polyaniline colloids by using chitosan as steric stabilizer. *European Polymer Journal*, 43(8), 3471-3479. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2007.05.027>
- [28] Kim, J., & Park, N. (2007). *Preparation of Conductive Materials for Smart Clothing: Doping and Composite of Conducting Polymer*, Berlin, Heidelberg.

- [29] Lu, Y., Yeung, N., Sieracki, N., & Marshall, N. M. (2009). Design of functional metalloproteins. *Nature*, 460(7257), 855-862. doi:10.1038/nature08304
- [30] Cantone, S., Ferrario, V., Corici, L., Ebert, C., Fattor, D., Spizzo, P., & Gardossi, L. (2013). Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: Criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. *Chemical Society reviews*, 42. doi:10.1039/c3cs35464d
- [31] Secundo, F. (2013). Conformational changes of enzymes upon immobilisation. *Chemical Society reviews*, 42. doi:10.1039/c3cs35495d
- [32] Douka, A., Vouyiouka, S., Papaspyridi, L.-M., & Papaspyrides, C. D. (2018). A review on enzymatic polymerization to produce polycondensation polymers: The case of aliphatic polyesters, polyamides and polyesteramides. *Progress in Polymer Science*, 79, 1-25. doi:<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2017.10.001>
- [33] Dev, A., Srivastava, A. K., & Karmakar, S. (2018). Chapter 12 - New Generation Hybrid Nanobiocatalysts: The Catalysis Redefined. In C. Mustansar Hussain (Ed.), *Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications* (pp. 217-231): Elsevier.
- [34] Iyer, P. V., & Ananthanarayan, L. (2008). Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*, 43(10), 1019-1032. doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.06.004>
- [35] Misson, M., Zhang, H., & Jin, B. (2015). Nanobiocatalyst advancements and bioprocessing applications. *Journal of the Royal Society, Interface*, 12(102), 20140891-20140891. doi:10.1098/rsif.2014.0891
- [36] Kadokawa, J.-i., & Kobayashi, S. (2010). Polymer synthesis by enzymatic catalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14(2), 145-153. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.11.020>
- [37] Grahame, D. A. S., Bryksa, B. C., & Yada, R. Y. (2015). 2 - Factors affecting enzyme activity. In R. Y. Yada (Ed.), *Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality* (pp. 11-55): Woodhead Publishing.
- [38] Carmona-Ribeiro, A. M., Prieto, T., & Nantes, I. L. (2015). Nanostructures for peroxidases. *Frontiers in molecular biosciences*, 2, 50-50. doi:10.3389/fmolb.2015.00050
- [39] Singh, R. K., Tiwari, M. K., Singh, R., & Lee, J.-K. (2013). From protein engineering to immobilization: promising strategies for the upgrade of industrial enzymes. *International journal of molecular sciences*, 14(1), 1232-1277. doi:10.3390/ijms14011232
- [40] Clark, D. S. (1994). Can immobilization be exploited to modify enzyme activity? *Trends Biotechnol*, 12(11), 439-443. doi:10.1016/0167-7799(94)90018-3
- [41] Cipolatti, E., Valério, A., Henriques, R., Moritz, D., Ninow, J., Freire, D., . . . Oliveira, D. (2016). Nanomaterials for biocatalyst immobilization – state of the art and future trends. *RSC Adv.*, 6. doi:10.1039/C6RA22047A
- [42] Ansari, S. A., & Husain, Q. (2012). Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnology Advances*, 30(3), 512-523. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.005>

- [43] Bernardes, A., Textor, L. C., Santos, J. C., Cuadrado, N. H., Kostetsky, E. Y., Roig, M. G., . . . Polikarpov, I. (2015). Crystal structure analysis of peroxidase from the palm tree *Chamaerops excelsa*. *Biochimie*, 111, 58-69. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.01.014>
- [44] Poulos, T. L. (1993). Peroxidases. *Curr Opin Biotechnol*, 4(4), 484-489. doi:10.1016/0958-1669(93)90016-p
- [45] Ryan, B. J., Carolan, N., & Ó’Fágáin, C. (2006). Horseradish and soybean peroxidases: comparable tools for alternative niches? *Trends Biotechnol*, 24(8), 355-363. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.06.007>
- [46] Kobayashi, S. (1999). Enzymatic polymerization: A new method of polymer synthesis. 37(16), 3041-3056. doi:[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0518\(19990815\)37:16<3041::AID-POLA1>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0518(19990815)37:16<3041::AID-POLA1>3.0.CO;2-V)
- [47] Kamal, J. K., & Behere, D. V. (2003). Activity, stability and conformational flexibility of seed coat soybean peroxidase. *J Inorg Biochem*, 94(3), 236-242. doi:10.1016/s0162-0134(03)00004-7
- [48] Yang, H., Bever, C. S., Zhang, H., Mari, G. M., Li, H., Zhang, X., . . . Wang, Z. (2019). Comparison of soybean peroxidase with horseradish peroxidase and alkaline phosphatase used in immunoassays. *Analytical Biochemistry*, 581, 113336. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.06.007>
- [49] Gajhede, M., Schuller, D. J., Henriksen, A., Smith, A. T., & Poulos, T. L. (1997). Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nature Structural Biology*, 4(12), 1032-1038. doi:10.1038/nsb1297-1032
- [50] Henriksen, A., Mirza, O., Indiani, C., Teilum, K., Smulevich, G., Welinder, K. G., & Gajhede, M. (2001). Structure of soybean seed coat peroxidase: A plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions. *Protein Science*, 10(1), 108-115. doi:10.1110/ps.37301
- [51] Xu, P., Singh, A., & Kaplan, D. (2005). Enzymatic Catalysis in the Synthesis of Polyanilines and Derivatives of Polyanilines. In (Vol. 194, pp. 69-94).
- [52] Bódalo, A., Bastida, J., Máximo, M. F., Montiel, M. C., Gómez, M., & Murcia, M. D. (2008). A comparative study of free and immobilized soybean and horseradish peroxidases for 4-chlorophenol removal: protective effects of immobilization. *Bioprocess Biosyst Eng*, 31(6), 587-593. doi:10.1007/s00449-008-0207-7
- [53] Yu, Y., Fei, X., Tian, J., Xu, L., Wang, X., & Wang, Y. (2015). Self-assembled enzyme-inorganic hybrid nanoflowers and their application to enzyme purification. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 130, 299-304. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.04.033
- [54] Frasconi, M., Favero, G., Tortolini, C., & Mazzei, F. (2009). Bioelectrochemical Characterization of Horseradish and Soybean Peroxidases. 21(21), 2378-2386. doi:<https://doi.org/10.1002/elan.200900208>
- [55] Illanes, A., Cauherff, A., Wilson, L., & Castro, G. R. (2012). Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresource Technology*, 115, 48-57. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.050>

- [56] An, J., Li, G. L., Zhang, Y., Zhang, T., Liu, X., Gao, F., . . . Fan, H. M. (2020). Recent Advances in Enzyme-Nanostructure Biocatalysts with Enhanced Activity. *Catalysts*, 10, 338. doi:10.3390/catal10030338
- [57] Kim, J., Grate, J. W., & Wang, P. (2008). Nanobiocatalysis and its potential applications. *Trends Biotechnol*, 26(11), 639-646. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.07.009>
- [58] Wang, L.-B., Wang, Y., He, R., Zhuang, A., Wang, X., Zeng, J., & Hou, J. (2013). A New Nanobiocatalytic System Based on Allosteric Effect with Dramatically Enhanced Enzymatic Performance. *Journal of the American Chemical Society*, 135. doi:10.1021/ja3120136
- [59] Nasrollahzadeh, M., Issaabadi, Z., Sajjadi, M., Sajadi, S. M., & Atarod, M. (2019). Chapter 2 - Types of Nanostructures. In M. Nasrollahzadeh, S. M. Sajadi, M. Sajjadi, Z. Issaabadi, & M. Atarod (Eds.), *Interface Science and Technology* (Vol. 28, pp. 29-80): Elsevier.
- [60] Lee, S., Cheon, S., Kim, M. I., & Park, T. J. (2015). Organic-inorganic hybrid nanoflowers: Types, characteristics, and future prospects. *Journal of nanobiotechnology*, 13, 54. doi:10.1186/s12951-015-0118-0
- [61] Wang, R., Zhang, Y., Lu, D., Ge, J., Zare, R., & Liu, Z. (2013). Functional protein-organic/inorganic hybrid nanomaterials. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, 5. doi:10.1002/wnan.1210
- [62] Ge, J., Lei, J., & Zare, R. (2012). Protein-inorganic hybrid nanoflowers. *Nature nanotechnology*, 7, 428-432. doi:10.1038/nnano.2012.80
- [63] Li, Y., Wu, H., & Su, Z. (2020). Enzyme-based hybrid nanoflowers with high performances for biocatalytic, biomedical, and environmental applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 416, 213342. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213342>
- [64] Huang, Y., Ran, X., Lin, Y., Ren, J., & Qu, X. (2015). Self assembly of organic-inorganic hybrid nanoflower as an efficient biomimetic catalyst for self-activated tandem reaction. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 51. doi:10.1039/c5cc00040h
- [65] Göktürk, E., Ocoy, I., Turac, E., & Sahmetlioglu, E. (2020). Horseradish peroxidase-based hybrid nanoflowers with enhanced catalytical activities for polymerization reactions of phenol derivatives. *Polymers for Advanced Technologies*, 31. doi:10.1002/pat.4956
- [66] Göktürk, E. (2020). Flowerlike hybrid horseradish peroxidase nanobiocatalyst for the polymerization of guaiacol. *Turkish journal of chemistry*, 44, 1285-1292. doi:10.3906/kim-2005-32
- [67] Bellardita, M., Di Paola, A., Yurdakal, S., & Palmisano, L. (2019). Chapter 2 - Preparation of Catalysts and Photocatalysts Used for Similar Processes. In G. Marci & L. Palmisano (Eds.), *Heterogeneous Photocatalysis* (pp. 25-56): Elsevier.
- [68] Singh, A. K. (2016). Chapter 2 - Structure, Synthesis, and Application of Nanoparticles. In A. K. Singh (Ed.), *Engineered Nanoparticles* (pp. 19-76). Boston: Academic Press.

- [69] Hutchings, G., & Védrine, J. (2004). Heterogeneous Catalyst Preparation. In (Vol. 75, pp. 215-258).
- [70] Lok, M. (2009). Coprecipitation. In *Synthesis of Solid Catalysts* (pp. 135-151).
- [71] Altinkaynak, C., Gulmez, C., Atakisi, O., & Özdemir, N. (2020). Evaluation of organic-inorganic hybrid nanoflower's enzymatic activity in the presence of different metal ions and organic solvents. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 162-171. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.118>
- [72] Hanif, E., Ul Qader, s. A., & Zohra, R. (2018). Role of Metal Ions, Surfactants and Solvents on Enzymatic Activity of Partial Purified Glucoamylase from *Aspergillus niger* ER05. *Journal of Basic & Applied Sciences*, 14, 141-146. doi:10.6000/1927-5129.2018.14.21
- [73] Zhang, Y., Ge, J., & Liu, Z. (2015). Enhanced Activity of Immobilized or Chemically Modified Enzymes. *ACS Catalysis*, 5(8), 4503-4513. doi:10.1021/acscatal.5b00996
- [74] German, N., Popov, A., & Ramanaviciene, A. (2017). Evaluation of enzymatic formation of polyaniline nanoparticles. *Polymer*, 115. doi:10.1016/j.polymer.2017.03.028
- [75] Eleazar, I., Cortez, M., Romero, J., Arias, E., Moggio, I., González, V., & Cruz-Silva, R. (2006). Síntesis biomimética de polianilina utilizando hematina en un sistema libre de plantillas. *Superficies y Vacío*, 19, 25-29.
- [76] Kurisu, M., Kissner, R., Imai, M., & Walde, P. (2021). Application of an enzymatic cascade reaction for the synthesis of the emeraldine salt form of polyaniline. *Chemical Papers*, 75(10), 5071-5085. doi:10.1007/s11696-021-01620-z
- [77] Chauhan, N. P. S., & Mozafari, M. (2019). Synthetic route of PANI (II): Enzymatic method. In (pp. 43-65).
- [78] Liu, W., Kumar, J., Tripathy, S., Senecal, K. J., & Samuelson, L. (1999). Enzymatically Synthesized Conducting Polyaniline. *Journal of the American Chemical Society*, 121(1), 71-78. doi:10.1021/ja982270b
- [79] Altinkaynak, C., Tavlasoglu, S., Özdemir, N., & Ocsoy, I. (2016). A new generation approach in enzyme immobilization: Organic-inorganic hybrid nanoflowers with enhanced catalytic activity and stability. *Enzyme and Microbial Technology*, 93-94, 105-112. doi:<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.06.011>
- [80] Salas, F., Pardo, I., Salavagione, H., Aza, P., Amougi, E., Vind, J., . . . Camarero, S. (2016). Advanced Synthesis of Conductive Polyaniline Using Laccase as Biocatalyst. *PLOS ONE*, 11. doi:10.1371/journal.pone.0164958
- [81] Ocsoy, I., Dogru, E., & Usta, S. (2015). A new generation of flowerlike horseradish peroxides as a nanobiocatalyst for superior enzymatic activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 75-76, 25-29. doi:<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.04.010>
- [82] Ilbert, M., & Bonnefoy, V. (2013). Insight into the evolution of the iron oxidation pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827(2), 161-175. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.10.001>

- [83] de Oliveira, F. K., Santos, L. O., & Buffon, J. G. (2021). Mechanism of action, sources, and application of peroxidases. *Food Research International*, 143, 110266. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110266>
- [84] Martínez-Cartagena, M., Bernal-Martínez, J., Aranda-Sánchez, C., Banda-Villanueva, A., Gonzalez-Zapata, J., Ledezma-Pérez, A., Aguilar-Elguezabal, A. and Romero-García, J. (2021). Biomimetic Synthesized Conductive Copolymer EDOT-Pyrrole Electrodes for Electrocardiogram Recording in Humans. *Journal of Materials Science and Chemical Engineering*, 9, 19-40. doi:10.4236/msce.2021.910003.
- [85] Ringuette, M. (2013). US Patent No. Google Patents.
- [86] Bilal, M., Asgher, M., Shah, S. Z. H., & Iqbal, H. M. N. (2019). Engineering enzyme-coupled hybrid nanoflowers: The quest for optimum performance to meet biocatalytic challenges and opportunities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 677-690. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.206>
- [87] Ocsoy, I., Somturk, B., Hancer, M., & Özdemir, N. (2015). Synthesis of Copper Ion Incorporated Horseradish Peroxidase-Based Hybrid Nanoflower for Enhanced Catalytic Activity and Stability. *Dalton Transactions*, 0, 0. doi:10.1039/C5DT01250C.
- [88] Sharma, N., Parhizkar, M., Cong, W., Mateti, S., Kirkland, M., Puri, M., & Sutti, A. (2017). Metal ion type significantly affects the morphology but not the activity of lipase-metal-phosphate nanoflowers. *RSC Adv.*, 7, 25437-25443. doi:10.1039/C7RA00302A
- [89] Li, Y., Fei, X., Liang, L., Tian, J., Xu, L., Wang, X., & Wang, Y. (2016). The influence of synthesis conditions on enzymatic activity of enzyme-inorganic hybrid nanoflowers. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 133, 92-97. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.08.001>
- [90] Wenz, T. (2021). Beer's Law.
- [91] Shea, J. J. (1999). Handbook of Conducting Polymers, 2nd Edition. *Electrical Insulation Magazine, IEEE*, 15, 37-37. doi:10.1109/MEI.1999.744595
- [92] Romero-García, J., Cruz-Silva, R., Ruiz-Flores, C., Arias-Marín, E., Ledezma-Pérez, A., Moggio, I., & Flores-Loyola, E. J. R. M. d. I. Q. (2003). Síntesis enzimática de polianilina utilizando estabilizadores estéricos. 2(3), 173-181.
- [93] German, N., Popov, A., Ramanaviciene, A., & Ramanavicius, A. (2019). Enzymatic Formation of Polyaniline, Polypyrrole, and Polythiophene Nanoparticles with Embedded Glucose Oxidase. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 9(5), 806. doi:10.3390/nano9050806
- [94] Salem, A., & Grgur, B. (2017). Corrosion of Mild Steel with Composite Alkyd Polyaniline-benzoate Coating. *International journal of electrochemical science*, 12, 8683-8694. doi:10.20964/2017.09.57
- [95] Jin, E., Lu, X., Bian, X., Kong, L., Zhang, W., & Wang, C. (2010). Unique tetragonal starlike polyaniline microstructure and its application in electrochemical biosensing. *Journal of Materials Chemistry*, 20(15), 3079-3083. doi:10.1039/B925753E

- [96] Navarchian, A., Hasanzadeh, Z., & Joulazadeh, M. (2013). Effect of Polymerization Conditions on Reaction Yield, Conductivity, and Ammonia Sensing of Polyaniline. *Advances in Polymer Technology*, 32. doi:10.1002/adv.21356
- [97] Zhou, Q., Wang, J., Ma, Y., Cong, C., & Wang, F. (2007). The relationship of conductivity to the morphology and crystallinity of polyaniline controlled by water content via reverse microemulsion. *Colloid and Polymer Science*, 285, 405-411. doi:10.1007/s00396-006-1572-x
- [98] Pütter, J. (1974). Peroxidases. In *Methods of enzymatic analysis* (pp. 685-690). Academic Press.