

Diss. ETH No. 21579

**AOT Vesicles as Templates for Polymerization Reactions Catalyzed  
by Oxidative Enzymes**

A dissertation submitted to

ETH ZÜRICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

Katja Junker

Master of Science UZH in Chemie

born November 30<sup>th</sup>, 1984

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Peter Walde, examiner

Prof. Dr. Dieter Schlüter, co-examiner

Prof. Dr. Wendelin Stark, co-examiner

Prof. Dr. Nico Bruns, co-examiner

Zürich 2013

---

## Abstract

---

Enzymatic polymerizations under mild conditions in aqueous solution are an attractive alternative to chemical polymerizations. Particularly challenging is the use of oxidative enzymes which only oxidize the monomers without direct influence on the actual polymerization, leading to the formation of ill-defined products. To nevertheless exert some control on the selectivity of the non-enzymatic coupling reactions, the presence of dispersed soft interfaces as templates, e.g. polymers, micelles or vesicles, is often extremely useful.

By using sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT) vesicles during the polymerization of aniline with isoenzyme C of the oxidative enzyme horseradish peroxidase (HRPC) and  $\text{H}_2\text{O}_2$  as oxidant in aqueous solution, the green emeraldine salt form of polyaniline (PANI-ES) in its polaron state was obtained as a stable suspension. In clear contrast, without vesicles or with di-*n*-butylsulfosuccinate which neither forms vesicles nor micelles, a brown product precipitated.

The main aim of the work presented was the detailed investigation of the role of the AOT vesicles as template. Therefore, several analytical methods were exploited. UV/Vis/NIR spectroscopy was used to monitor the reaction progress and product quality, and for quantification of aniline,  $\text{H}_2\text{O}_2$  and enzyme activity during the polymerization. To locate aniline and HRPC, static  $^2\text{H}$ -NMR with 2,3,4,5,6-pentadeuteroaniline and fluorescence spectroscopy on a dye-labeled HRPC were applied; the location of the formed PANI was determined by cryo-TEM and SANS measurements. Finally,  $^2\text{H}$ -MAS-NMR with synthesized 4-deuteroaniline and 2,6-dideuteroaniline and EPR measurements of the PANI product were used to determine the extent of *para*-coupling and the amount of unpaired electrons, respectively.

Based on the obtained information, a mechanism for the HRPC/ $\text{H}_2\text{O}_2$  catalyzed polymerization of aniline in presence of AOT vesicles could be proposed. The AOT vesicles as structure-controlling templates have four distinct functions: (i) prearrangement of aniline monomers at the vesicle surface (promotion of *para*-coupling); (ii) localization of HRPC in close proximity to the

monomers (fast aniline oxidation); (iii) solubilization of the formed PANI by interaction with the bilayer; and (iv) AOT acted as a dopant for PANI-ES.

Due to its high colloidal stability, the obtained PANI-ES vesicle suspension could be used directly as ink to print with a conventional inkjet printer.

Isolated reaction products were analyzed by FTIR spectroscopy and showed the characteristic bands expected for PANI-ES. Elemental analysis confirmed that even after thorough purification small amounts of AOT remained, which explains the low bulk conductivity measured. The major drawback was the enzyme inactivation by reaction (by)products. Trials to stabilize HRPC with a linear dendritic block copolymer were unsuccessful.

Replacing HRPC/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with other oxidative enzymes (soybean peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HRP isoenzyme A2/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and *Trametes versicolor* laccase (TvL)/O<sub>2</sub>) led to much slower reactions with the formation of overoxidized products since the enzymes were inactivated before complete oxidation of aniline could be achieved.

TvL, however, was shown to be an excellent catalyst for the polymerization of 4-aminodiphenylamine (PADPA) with O<sub>2</sub> in presence of the vesicles: (i) significantly less TvL was needed compared to the polymerization of aniline with TvL/O<sub>2</sub>; and (ii) *soluble* intermediate products were formed, which could be analyzed by ESI-MS. This opens up new ways to obtain more information about chemical structures of (early) reaction intermediates. Lastly, in a first set of experiment, the general template concept was applied successfully for the polymerization of pyrrole with TvL/O<sub>2</sub>.

---

## Zusammenfassung

---

Enzymatische Polymerisationen unter milden Bedingungen in wässriger Lösung sind eine attraktive Alternative zu chemischen Polymerisationen. Eine besondere Herausforderung stellt dabei die Verwendung von oxidativen Enzyme dar, die Monomere oxidieren ohne direkten Einfluss auf die eigentliche Polymerisation zu nehmen, was zur Bildung von schlecht definierten Produkten führen kann. Um dennoch eine gewisse Kontrolle auf die eigentliche Polymerisation ausüben zu können, hat sich die Verwendung von dispergierten weichen Grenzflächen als Template z.B. Polymere, Mizellen oder Vesikel, oft als äusserst nützlich erwiesen.

Wird Anilin mit dem Isoenzym C des oxidativen Enzyms Meerrettichperoxidase (HRPC) und  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Oxidationsmittel in wässriger Lösung in der Gegenwart von Natrium-bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinat (AOT) Vesikel polymerisiert, wird die grüne Emeraldinsalzform von Polyanilin (PANI-ES) in seiner Polaron Form als stabile Suspension erhalten. Im Gegensatz dazu, fällt ein braunes Produkt aus wenn die Reaktion ohne Vesikel oder mit Di-*n*-butylsulfosuccinat, das weder Vesikel noch Mizellen bildet, durchgeführt wird.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war eine detaillierte Untersuchung der Rolle der Vesikel als Template. Dazu wurden verschiedenste analytische Methoden genutzt. UV/Vis/NIR Spektroskopie wurde eingesetzt um den Reaktionsverlauf und die Produktqualität zu kontrollieren und um sowohl die Anilin und  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentrationen als auch die Enzymaktivität während der Polymerisation zu überwachen. Statische  $^2\text{H}$ -NMR Messungen mit 2,3,4,5,6-Pentadeuteroanilin und Fluoreszenz Spektroskopie von Farbstoff markierter HRPC wurden durchgeführt um herauszufinden wo sich Anilin und HRPC im Reaktionssystem befinden, die Lokalisation des gebildeten PANI wurde mittels Cryo-TEM und SANS Messungen bestimmt.  $^2\text{H}$ -MAS-NMR Messungen mit synthetisiertem 4-Deuteroanilin und 2,6-Dideuteroanilin gaben Aufschluss über das Ausmass von *para*-Kopplungen, ESR Messungen wurden genutzt um die Konzentration von ungepaarten Elektronen im gebildeten PANI zu bestimmen.

Mit diesen gewonnenen Informationen konnte ein Mechanismus für die HRPC/ $\text{H}_2\text{O}_2$  katalysierte Polymerisation von Anilin in Anwesenheit der AOT

Vesikel vorgeschlagen werden. Die Vesikel als Struktur kontrollierende Template haben dabei vier verschiedene Aufgaben: (i) die Vororientierung der Anilin Monomere an der Vesikeloberfläche (Förderung von *para*-Kopplungen), (ii) die Lokalisierung von HRPC in der Nähe der Monomere (schnelle Anilin Oxidation), (iii) die Solubilisierung des gebildeten PANI, und (iv) AOT übernimmt die Rolle als Dotiersubstanz für PANI-ES.

Wegen der hohen kolloidalen Stabilität der erhaltenen PANI-Vesikel Suspension, konnte diese direkt als Tinte für einen konventionellen Tintenstrahldrucker benutzt werden.

Isolierte Reaktionsprodukte wurden mittels FTIR Spektroskopie untersucht und zeigten die erwarteten Banden für PANI-ES. Elementaranalyse bestätigte dass, trotz sorgfältiger Reinigung, noch AOT Rückstände im Produkt vorhanden waren, was die niedrige gemessene Leitfähigkeit erklärt. Der grosse Nachteil des Reaktionssystems war die Inaktivierung der Enzyme während der Polymerisation; Versuche HRPC mit einem linear dendritischen Block-Copolymer zu stabilisieren waren nicht erfolgreich.

Ersetzen von HRPC durch andere oxidative Enzyme (Sojabohnenperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HRP Isoenzym A2/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *Trametes versicolor* Laccase (TvL)/O<sub>2</sub>) führte zu langsameren Reaktionen. Die Enzyme wurden inaktiviert bevor der Grossteil der Anilin Monomere oxidiert werden konnte, was zur Bildung von überoxidierten Produkten führte.

TvL stellte sich allerdings als ein ausgezeichnete Katalysator für die Polymerisation von 4-Aminodiphenylamin (PADPA) mit O<sub>2</sub> in Gegenwart der Vesikel heraus: (i) erheblich weniger TvL war nötig, verglichen mit der TvL/O<sub>2</sub> katalysierten Polymerisation von Anilin; (ii) lösliche Zwischenprodukte, welche durch ESI-MS analysiert werden konnten, wurden gebildet. Dies eröffnet neue Möglichkeiten, um mehr Informationen über die chemischen Strukturen der (frühen) Reaktionsprodukte zu erhalten, was bisher nicht realisiert werden konnte. Abschliessend wurde in einem ersten Versuch das Templat-Konzept für die Polymerisation von Pyrrol mit TvL/O<sub>2</sub> angewendet.