

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ ESCUELA DE
POSGRADO



**Diseño, síntesis y caracterización de una poliaspartamida carboxi-
hidroxilada como componente polimérico de un conjugado hidrosoluble
con el potencial agente antitumoral oxovanadio (IV)**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGISTER EN
QUÍMICA**

AUTOR

William Andrés Medroa del Pino

ASESOR:

Carla Ximena María Galli Rigo-Righi

Agosto, 2017

Resumen

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en el mundo. Actualmente, existen diversos tipos de tratamientos contra esta enfermedad, siendo la quimioterapia una de las más resaltantes. En este contexto, los compuestos de vanadio unidos a ligandos moleculares han demostrado ser una interesante opción para tratar diferentes tipos de cáncer que las medicinas convencionales no pueden curar; sin embargo, estos conjugados metálicos presentan complicaciones como una alta insolubilidad y una rápida eliminación del organismo. El uso de la técnica polímero-droga surge como una opción para superar estos impedimentos gracias al alto peso molecular inherente de los ligandos poliméricos que aumenta el tiempo de permanencia de la droga y, si es que el conjugado resulta hidrosoluble, favorece una eficiente biodistribución del mismo en el organismo con la consecuente reducción de la dosis necesaria. La literatura exhibe pocas investigaciones en dónde se ha logrado sintetizar conjugados poliméricos de vanadio hidrosolubles; adicionalmente, estos poseen un muy bajo porcentaje del metal (0.18-0.36%) lo que reduce la efectividad de los mismos para ser evaluados como posibles agentes terapéuticos. Esta investigación presenta el diseño y la síntesis de un nuevo complejo de oxovanadio (IV) completamente hidrosoluble, el poli-(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-(carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]-co-[(2-hidroxi)etil]-aspartamida])-oxovanadio(IV), usando una copoliaspartamida derivatizada, no reportada previamente en la literatura, con un contenido de vanadio del 3%. La variación en la proporción de las cadenas laterales de los ligandos poliméricos, así como en las condiciones de reacción (porcentaje de vanadio añadido, proporción de cadenas laterales y concentración de substratos) han demostrado ser factores clave en la hidrosolubilidad y el rendimiento del presente conjugado polimérico de vanadio. La caracterización de los polímeros y macro-complejos se ha realizado mediante las técnicas de RMN, IR y UV-Vis que demuestran una alta pureza y reproducibilidad de los mismos; el porcentaje de vanadio ha sido determinado por AAS.

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a mis padres Sonia y Willy por haberme dado su comprensión y apoyo incondicional durante esta difícil, pero muy fructuosa etapa. Asimismo, a mi hermana, abuela, tíos/as y primos/as que supieron entender mi ausencia y aun de lejos estuvieron siempre pensando en mí y dándome ánimos.

En segundo lugar a Lorena, cuyo amor, fuerza y alegría me permitieron seguir adelante, aun en los momentos más difíciles, sin ella este logro no habría sido posible.

También quisiera agradecer a mi asesora, Carla Galli, cuya guía fue indispensable para mejorar mis habilidades como investigador, así como volverme una mejor persona.

CIENCIA ACTIVA DE CONCYTEC. Programas de Maestría en Universidades Peruanas. Convenio 035-2015 FONDECYT, por haber financiado sus estudios en el programa de Maestría en Química de la PUCP.

Agradezco a todos los profesores de la Maestría en Química de la PUCP, en especial a la Dra. Patricia Morales Bueno, cuyo duro trabajo y apoyo abrió distintas oportunidades a lo largo de este periodo de tiempo. A su vez, al profesor Luis Ortega por aceptar mis consultas espontáneas y su ayuda durante la determinación del contenido de vanadio de mis compuestos.

Asimismo, quisiera agradecer la colaboración del Dr. Juan Lopez, el Ing. José Ugaz y el Ing. Miguel Pinto en la caracterización por RMN de mis ligandos poliméricos. A Milka Cajahuanca por su ayuda en el uso de los equipos de IR, AAS y UV-Vis. A Gilmer Barrantes, Javier Huamán, Nicolas Astoquillca y Humberto Martinez por el mantenimiento de equipos, la buena disposición a resolver problemas respecto a ellos y su buen humor.

Finalmente, agradezco a mis compañeros Said Neme, Carlos Sernaqué, José Carlos Curihuamán y Juan Dionicio, por su invaluable amistad, apoyo en la investigación y los gratos momentos vividos durante estos dos años.

Índice general

1. Introducción	1
2. Marco teórico	
2.1. Cáncer	
2.1.1. Introducción	4
2.1.2. Patología y tratamiento	6
2.2. Vanadio	
2.2.1. Aspectos generales, propiedades químicas y biológicas	11
2.2.2. Vanadio como agente terapéutico	
2.2.2.1. Vanadio, diabetes y otras aplicaciones	14
2.2.2.2. Vanadio y el cáncer	16
2.2.2.3. Mecanismo de la acción antitumoral del vanadio.....	19
2.3. Sistemas poliméricos de transporte y liberación Controlada de metales	
2.3.1. Introducción y propiedades	21
2.3.2. Conjugados polímero-metal como agentes terapéuticos	28
2.4. Diseño y síntesis del conjugado poliaspartamida-vanadilo	
2.4.1. Diseño	33
2.4.2. Síntesis y caracterización	
2.4.2.1. Síntesis del polímero precursor, polisuccinimida (PSI)	38
2.4.2.2. Determinación del peso molecular de la polisuccinimida por el método de viscosimetría capilar	38
2.4.2.3. Síntesis del polímero intermedio, poli-(α,β -D,L-[N-(3-aminopropil)-aspartamida]-co-[2-(hidroxietil)-aspartamida-] (PASP-MA-MH)	39

2.4.2.4.	Síntesis del polímero ligando, poli-(α,β - D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]- co-[N-(3-(carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]-co- [(2-hidroxietil)-aspartamida]) (PASP-DC-MC-MH)	41
2.4.2.5.	Síntesis del complejo polimérico, poli-(α,β - D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]- co-[N-(3-(carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]-co- [(2-hidroxietil)-aspartamida]-oxovanadio(IV) (PASP-DC-MC-MH-VO)	42
2.4.2.6.	Determinación de la hidrosolubilidad de los compuestos poliméricos sintetizados	43
3.	Problema e hipótesis de investigación	44
4.	Objetivos	
4.1.	Objetivo principal	47
4.2.	Objetivos específicos	47
5.	Parte experimental	
5.1.	Equipos, materiales y reactivos	
5.1.1.	Equipos	48
5.1.2.	Materiales	49
5.1.3.	Reactivos y solventes	
5.1.3.1.	Reactivos	49
5.1.3.2.	Solventes	50
5.2.	Metodología	
5.2.1.	Polisuccinimida (PSI), el polímero inicial	
5.2.1.1.	Síntesis	51
5.2.1.2.	Determinación del peso molecular por el método de viscosimetría capilar	51
5.2.2.	Poli-(α,β -D,L-[N-(3-aminopropil)-aspartamida])-co-[2- (hidroxietil)-aspartamida-] (PASP-MA-MH), el polímero intermedio	

5.2.2.1.	Síntesis del Poli- α,β -D,L-[N-(3-aminopropil)-aspartamida] (PASP-MA)	53
5.2.2.2.	Síntesis de Poli- α,β -D,L-[2-(hidroxietil)-aspartamida-] (PASP-MH)	54
5.2.2.3.	Síntesis del Poli-(α,β -D,L-[N-(3-aminopropil)-aspartamida]-co-[2-(hidroxietil)-aspartamida-] (PASP-MA-MH)	54
5.2.3.	Poli-(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-(carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]-co-[(2-hidroxietil)-aspartamida]) (PASP-DC-MC-MH), el polímero ligando	
5.2.3.1.	Síntesis del Poli-(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-(carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]) (PASP-DC-MC)	56
5.2.3.2.	Síntesis del Poli-(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-(carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]-co-[(2hHidroxietil)-aspartamida]) (PASP-DC-MC-MH).....	57
5.2.3.3.	Determinación del contenido de bromo por el método de fluorescencia de rayos X)	58
5.2.4.	Determinación de la cantidad de agua de hidratación en la sal de oxovanadio (IV) por calcinación)	58
5.2.5.	Poli-(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-(carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]-co-[(2-Hidroxietil)-aspartamida])-oxovanadio(IV) (PASP-DC-MC-MH-VO), el complejo	
5.2.5.1.	Síntesis del poli-(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-(carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]-co-[(2-Hidroxietil)-aspartamida])-oxovanadio(IV)	59
5.2.5.2.	Pruebas de hidrosolubilidad de los complejos poliméricos	60
5.2.5.3.	Determinación del contenido de vanadio en los complejos por espectroscopía de absorción atómica en llama (AAS)	60

6. Presentación y discusión de resultados	
6.1. Polisuccinimida (PSI)	
6.1.1. Análisis de la síntesis	61
6.1.2. Caracterización	63
6.1.3. Determinación del peso molecular por Viscosimetría capilar	65
6.2. Poli-(α,β -D,L-[N-(3-aminopropil)-aspartamida])-co- [2-(hidroxietil)-aspartamida-] (PASP-MA-MH)	
6.2.1. Análisis de la síntesis y purificación.....	69
6.2.2. Caracterización	74
6.2.3. Discusión de resultados	85
6.3. Poli-(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)- aspartamida]-co-[N-(3-(carboximetil)- aminopropil)-aspartamida]-co-[(2-Hidroxietil)- aspartamida]) (PASP-DC-MC-MH)	
6.3.1. Análisis de la síntesis y purificación.....	95
6.3.2. Caracterización	98
6.3.3. Discusión de resultados	104
6.4. Determinación de la cantidad de agua de hidratación en la sal de oxovanadio (IV) por calcinación	130
6.5. Poli-(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)- aspartamida]-co-[N-(3-(carboximetil)-aminopropil)- aspartamida]-co-[(2-Hidroxietil)-aspartamida])- oxovanadio(IV) (PASP-DC-MC-MH-VO)	
6.5.1. Análisis de la síntesis	131
6.5.2. Análisis de la hidrosolubilidad de los Conjugados poliméricos	148
6.5.3. Caracterización	159
7. Conclusiones	176
8. Recomendaciones.....	181
9. Bibliografía.....	182

10. Anexo

10.1. Gráficas de η_{red} vs concentración de las polisuccinimidias sintetizadas	190
10.2. Espectro IR del PASP-MA-1	194
10.3. Espectro IR del PASP-MH-1	195
10.4. Cálculo de proporción de cadenas laterales en el PASP-MA-MH	196
10.5. Cálculo del peso molecular del PASP-MA-MH	198
10.6. Espectro ^{13}C -RMN del PASP-MA-MH-21 en D_2O a $25^{\circ}C$ y sus asignaciones	199
10.7. Estructura de la sección polimérica PASP-HIDRO	201
10.8. Espectro IR del PASP-DC-MC-1	202
10.9. Espectro IR del PASP-DC-MC-MH-4	203
10.10. Cálculo de proporción de cadenas laterales en el PASP-DC-MC-MH	204
10.11. Cálculo del peso molecular del PASP-DC-MC-MH	206
10.12. Espectro ^{13}C -RMN del PASP-DC-MC-MH-6 en D_2O a $25^{\circ}C$ y sus asignaciones	207
10.13. Espectros de XRF para la determinación cualitativa de Br en el PASP-DC-MC-MH-2	209
10.14. Espectros 1H -RMN a $25^{\circ}C$ de los PASP-DC-MC-MH-3 al 7	211
10.15. Ejemplo del cálculo para la obtención del número de aguas de hidratación por cara mol del sulfato de vanadilo	216
10.16. Ejemplo de cálculo de la masa de $VOSO_4 \cdot 3H_2O$ a utilizar en las síntesis de los complejos PASP-DC-MC-MH-VO	217
10.17. Espectros IR de los conjugados sintetizados en base al copolímero PASP-DC-MC-MH-3	218

Índice de figuras

Figura 1.	Incidencia de cáncer a nivel mundial actualizado en el 2011	5
Figura 2.	Comparación de tipos de tejidos celulares.....	7
Figura 3.	Roles biológicos del vanadio.....	12
Figura 4.	Efectos anticancerígenos de compuestos de vanadio.....	20
Figura 5.	Representación esquemática de la los componentes de un conjugado polímero-droga.....	22
Figura 6.	Distribución de polímeros sintéticos en el organismo después de su administración por diferentes vías	24
Figura 7.	Representación esquemática del efecto EPR y del mecanismo de entrada celular: Pinocitosis	26
Figura 8.	Estructura de los sistemas poliméricos a) xiloglucan y b) poli-[ε]-caprolactona	32
Figura 9.	Estructura química del vehículo polimérico PASP-DC-MC-MH	34
Figura 10.	Síntesis del PSI a partir del D, L Ácido aspártico.....	38
Figura 11.	Síntesis del PASP-MA-MH a partir del PSI	40
Figura 12.	Síntesis del PASP-DC-MC-MH a partir del PASP-MA-MH.....	41
Figura 13.	Síntesis del PASP-DC-MC-MH-VO a partir del PASP-DC-MC-MH	42
Figura 14.	Espectro ¹ H-RMN del PSI-7 en DMSO-d ⁶	64
Figura 15.	Espectro ¹ H-RMN del PASP-MA-1 en D ₂ O a 25°C.....	75
Figura 16.	Espectro ¹ H-RMN del PASP-MH-1 en D ₂ O a 25°C	76
Figura 17.	Espectro ¹ H-RMN del PASP-MA-MH-20 (70% mero teórico PASP-MH) en D ₂ O a 25 °C.....	78
Figura 18.	Espectro ¹ H-RMN del PASP-MA-MH-21 (50% mero teórico PASP-MH) en D ₂ O a 25 °C.....	80
Figura 19.	Espectro ¹ H-RMN del PASP-MA-MH-22 (40% mero teórico PASP-MH) en D ₂ O a 25 °C.....	81
Figura 20.	Espectro IR del PASP-MA-MH-20 (70% mero teórico PASP-MH) en KBR	82

Figura 21.	Espectro IR del PASP-MA-MH-21 (50 % mero teórico PASP-MH) en KBR	83
Figura 22.	Espectro IR del PASP-MA-MH-22 (40% mero teórico PASP-MH) en KBR	84
Figura 23.	Espectro COSY del PASP-MA-MH 21 a 25°C en D ₂ O	86
Figura 24.	Espectro HSQC del PASP-MA-MH 21 a 25°C en D ₂ O.....	88
Figura 25.	Comparación de los espectros ¹ H-RMN de los PASP-MA-MH a diferente proporción obtenidos siguiendo las consideraciones de Neuse, Caliceti y Murga.....	90
Figura 26.	Espectro ¹ H-RMN del PASP-MA-MH-12 en D ₂ O a 75°C.....	91
Figura 27.	Espectro ¹ H-RMN del PASP-MA-MH-12 rediseñado en D ₂ O a 75 °C.....	92
Figura 28.	Comparación de los espectros ¹ H-RMN en D ₂ O a 75 °C de los PASP-MA-MH-12, 12 re-diálisis, 16 y 17	93
Figura 29.	Comparación de los espectros ¹ H-RMN en D ₂ O a 25 °C de los PASP-MA-MH-16 y 19.....	94
Figura 30.	Espectro ¹ H-RMN del PASP-DC-MC-1 en D ₂ O a 25 °C.....	99
Figura 31.	Espectro ¹ H-RMN del PASP-DC-MC-MH-4 en D ₂ O a 25 °C (40% mero teórico PASP-MH)	101
Figura 32.	Espectro ¹ H-RMN del PASP-DC-MC-MH-6 en D ₂ O a 25 °C (50% mero teórico PASP-MH)	102
Figura 33.	Espectro IR del PASP-DC-MC-MH-6 (50% mero teórico PASP-MH) en KBR	103
Figura 34.	Espectro COSY del PASP-DC-MC-MH-6 en D ₂ O a 25°C	105
Figura 35.	Espectro ¹ H-RMN del PASP-MA-MH-16 en D ₂ O a 25 °C	106
Figura 36.	Espectro ¹ H-RMN del PASP-DC-MC-MH-6 en D ₂ O a 75 °C	107
Figura 37.	Espectro ¹ H-RMN del PASP-MA-MH-16 en D ₂ O a 75 °C.....	108
Figura 38.	Espectro HSQC del PASP-DC-MC-MH-6 en D ₂ O a 25 °C	110

Figura 39.	Espectro ^1H -RMN ampliado del PASP-DC-MC-MH-2 en D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$	110
Figura 40.	Espectro FRX tomado a $25\text{ }^\circ\text{C}$ para comprobar contenido de bromo en PASP-DC-MC-MH-2	112
Figura 41.	Estructuras de meros PASP-AcOH (a) y PASP-OMC (b)	114
Figura 42.	Espectros ^1H -RMN ampliados del PASP-MA-MH-16 y el PASP-DC-MC-MH-6 en D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$	116
Figura 43.	Espectros ^1H -RMN del PASP-MA-MH-16 y el PASP-DC-MC-MH-14 a $25\text{ }^\circ\text{C}$	117
Figura 44.	Espectro HMBC ampliado del PASP-DC-MC-MH-6 en D_2O a 25°C	118
Figura 45.	Espectro ^1H -RMN del PASP-DC-MC-2 en D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$	120
Figura 46.	Espectro ampliando ^1H -RMN del PASP-DC-MC-MH-6 en D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$ de región con picos secundarios desconocidos	121
Figura 47.	Comparación entre los espectros ampliados ^1H -RMN en D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$ del PASP-MA-MH-16 y el PASP-DC-MC-MH-6 en región de hidrógenos D	121
Figura 48.	Estructuras de las secciones poliméricas identificadas del PASP-DC-MC-MH con sus respectivas señales características en el espectro ^1H -RMN	125
Figura 49.	Espectro ^1H -RMN del PASP-DC-MC-MH-1 en D_2O a 25°C	125
Figura 50.	Espectro ^1H -RMN del PASP-DC-MC-MH-2 en D_2O a 25°C	126
Figura 51.	Espectro IR del sólido precipitado en acetona del conjugado 8A sintetizado a partir del PASP-DC-MC-MH-4 con un porcentaje teórico de 60% de PASP-MA y relación molar 1:1 DC:VO en KBr	162
Figura 52.	Espectro IR del sólido insoluble del conjugado 8A sintetizado a partir del PASP-DC-MC-MH-4 con un porcentaje teórico de 60% de PASP-MA y relación molar 1:1 DC:VO en KBr	163
Figura 53.	Espectro IR del sólido precipitado con acetona del conjugado 6B sintetizado a partir del PASP-DC-MC-MH-4 con un porcentaje teórico de 60% de PASP-MA y relación molar 2:1 DC:VO en KBr	164

Figura 54.	Espectro IR del sólido precipitado con acetona del conjugado 4D sintetizado a partir del PASP-DC-MC-MH-6 con un porcentaje teórico de 50% de PASP-MA y relación molar 1:1 DC:VO en KBr	167
Figura 55.	Espectro IR del sólido precipitado con acetona del conjugado 8D sintetizado a partir del PASP-DC-MC-MH-7 con un porcentaje teórico de 50% de PASP-MA y relación molar 1:1 DC:VO en KBr	168
Figura 56.	Espectro IR del sólido precipitado con acetona del conjugado 2E sintetizado a partir del PASP-DC-MC-MH-6 con un porcentaje teórico de 50% de PASP-MA y relación molar 2:1 DC:VO en KBr	169
Figura 57.	Desdoblamiento de los orbitales de vanadilo, para el caso del catión $VO(H_2O)_5^{2+}$, de acuerdo al modelo de Ballhausen – Gray	170
Figura 58.	Espectro UV-Vis del sólido precipitado con acetona completamente hidrosoluble del ensayo 5D.....	171
Figura 59.	Espectro UV-Vis del copolímero PASP-DC-MC-MH-7	171
Figura 60.	Espectro UV-vis del $VO(H_2O)_5^{2+}_{(ac)}$	172
Figura 61.	Estructura propuesta para el complejo PASP-DC-MC-MH-VO	173

Índice de tablas

Tabla 1.	Algunos conjugados polímero-droga analizados recientemente en estudios de fase clínica	28
Tabla 2.	Algunos conjugados poliméricos con drogas derivadas del cis-platino recientemente analizados en estudios de fase clínica.....	30
Tabla 3.	Resultados de las síntesis del PSI.....	62
Tabla 4.	Asignación de las señales del ¹ H-RMN en DMSO-d ⁶ del PSI.....	63
Tabla 5.	Viscosidades intrínsecas y pesos moleculares de las polisuccinimidas obtenidas en las síntesis de PSI realizadas.....	65
Tabla 6.	Pesos moleculares de las polisuccinimidas obtenidas en las síntesis de PSI realizadas variando el tiempo o la temperatura de reacción	66
Tabla 7.	Resultados de la síntesis del PASP-MA-MH.....	71
Tabla 8.	Rendimiento y asignación de las señales del ¹ H-RMN en D ₂ O del PASP-MA-1 y el PASP-MH-1 obtenidos experimentalmente	74
Tabla 9.	Asignación de las señales del espectro ¹ H-RMN en D ₂ O del PASP-MA-MH-20 (70% mero PASP-MH teórico) a 25°C.....	77
Tabla 10.	Asignación de las señales del espectro ¹ H-RMN en D ₂ O del PASP-MA-MH-21 (50% mero PASP-MH teórico) a 25°C.....	79
Tabla 11.	Asignación de las señales del espectro ¹ H-RMN en D ₂ O del PASP-MA-MH-22 (40 % mero PASP-MH teórico) a 25°C.....	79
Tabla 12.	Proporción experimental y peso molecular de los PASP-MA-MH sintetizados	85
Tabla 13.	Resultados de las síntesis del PASP-DC-MC-MH	97

Tabla 14.	Rendimiento y asignación de las señales del ^1H -RMN en D_2O del PASP-DC-MC obtenido experimentalmente	98
Tabla 15.	Asignación de las señales del ^1H -RMN en D_2O del PASP-DC-MC-MH-4 y 6 a 25°C	100
Tabla 16.	Asignación de las bandas características en el espectro IR del PASP-DC-MC-MH-6	100
Tabla 17.	Cantidad de ácido bromoacético empleado, proporción de meros y peso molecular promedio de los PASP-DC-MC-MH sintetizados	104
Tabla 18.	Condiciones de síntesis y asignación de señales del PASP-DC-MC-2	120
Tabla 19.	Número de moles de agua por cada mol de sulfato de vanadilo.....	130
Tabla 20.	Primer grupo de ensayos de síntesis de complejo	134
Tabla 21.	Resultados de los ensayos de la Tabla 20.....	134
Tabla 22.	Segundo grupo de ensayos de síntesis de complejo.....	136
Tabla 23.	Resultados de los ensayos de la Tabla 22.....	137
Tabla 24.	Tercer grupo de ensayos de síntesis de complejo.....	139
Tabla 25.	Resultados de los ensayos de la Tabla 24.....	140
Tabla 26.	Cuarto grupo de ensayos de síntesis de complejo	141
Tabla 27.	Resultados de los ensayos de la Tabla 26.....	142
Tabla 28.	Quinto grupo de ensayos de síntesis de complejo	144
Tabla 29.	Resultados de los ensayos de la Tabla 28.....	145
Tabla 30.	Sexto grupo de ensayos de síntesis de complejo	146
Tabla 31.	Resultados de los ensayos de la Tabla 30.....	147
Tabla 32.	Análisis de hidrosolubilidad de los complejos precipitados en acetona sintetizados en base a los PASP-DC-MC-MH-4 y 5 con relación molar 1:1 de DC:VO.....	149
Tabla 33.	Análisis de hidrosolubilidad de los complejos precipitados en acetona sintetizados en base al PASP-DC-MC-MH-5 con relación molar 2:1 de DC:VO.....	150
Tabla 34.	Análisis de hidrosolubilidad de los complejos precipitados en acetona sintetizados en base al	

	PASP-DC-MC-MH-3 con relación molar 2:1 de DC: VO.....	151
Tabla 35.	Análisis de hidrosolubilidad de los complejos precipitados en acetona sintetizados en base al PASP-DC-MC-MH-6 con relación molar 1:1 de DC:VO.....	152
Tabla 36.	Análisis de hidrosolubilidad de los complejos precipitados en acetona sintetizados en base al PASP-DC-MC-MH-7 con relación molar 2:1 de DC-VO	153
Tabla 37.	Análisis de hidrosolubilidad de los complejos precipitados en acetona sintetizados en base a los PASP-DC-MC-MH-6 y 7 con relación molar 2:1 de DC-VO	154
Tabla 38.	Porcentaje en peso teórico de vanadio en los conjugados sintetizados según el copolímero utilizado	155
Tabla 39.	Contenido de vanadio de los conjugados hidrosolubles determinado por AAS	174

Abreviaturas y símbolos

^1H -RMN	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de hidrógeno
^{13}C -RMN	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de carbono
$[\eta]$	Viscosidad intrínseca
η_{red}	Viscosidad reducida
AAS	Espectroscopía de Absorción Atómica
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADP	Adenosin difosfato
ADPV	Adenosin difosfato vanadato
ATP sintasa	Enzima transmembranal que se encarga de catalizar la formación de ATP a partir de ADP
ATO	Metalofármaco Trisenox
B16	Línea celular de cáncer de piel
B16F10	Línea celular de cáncer de piel
BAOV	Bis(alilxinato)oxovanadio (IV)
BEOV	Bis(etilmaltolato)oxovanadio (IV)
BMOV	Bis(metilmaltolato)oxovanadio (IV)
COSY	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de correlación de hidrógenos

DC	Secciones poliméricas di-carboximetiladas
DL	Tumor maligno de ganglio Dalton ascítico
DM	Diabetes Mellitus
DM-2	Diabetes Mellitus tipo 2
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO-d ⁶	Dimetil sulfóxido deuterado
EPR	Efecto de Permeabilidad y Retención Aumentada
FDA	Food and Drug Administration
FRX	Fluorescencia de Rayos-X
FT-IR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
GPC	Cromatografía de Permeación en Gel
HL-60	Línea celular de leucemia humana aguda
HMBC	Resonancia magnética nuclear de correlación de enlaces múltiples heteronucleares
HPMA	N-(2-hidroxipropil) metacrilamida
HSQC	Resonancia magnética nuclear de correlación heteronuclear de cuanto sencillo
IC ₅₀	Concentración de un compuesto para reducir <i>in vitro</i> el crecimiento poblacional
Leucemia T	Cáncer que se origina en la médula ósea
Linfoma B	Tumor maligno de ganglio no Hodgkin
M _n	Peso molecular promedio en número
M _v	Peso molecular promedio

M _w	Peso molecular real
MAPKs	Proteína transdutora de señales extracelulares
MC	Secciones poliméricas mono-carboximetiladas
MDAY-D2	Línea celular de tejido linfoide de origen humano de organismos, en un 50 por ciento
Mero	Sección polimérica
MG-63	Línea celular de cancer de tejido óseo
MWCO	Rango de corte de peso molecular
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADV	Nicotinamida adenina dinucleótido vanadato
NF-KB	Factor de transcripción nuclear
OMS	Organización mundial de la Salud
P-glicoproteína	Proteína encargada de eliminar sustancias que se encuentren dentro de la célula
PASP-AcOH	Poliaspartamida hidroxacetamida
PASP-DC-MC-MH	Poli(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-(carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]-co-[2(hidroxietyl)-aspartamida]
PASP-DC-MC-MH-VO	Poli-(α,β-D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-(carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]-co-[(2-Hidroxietyl)-aspartamida])-oxovanadio(IV)
PASP-MA	Poliaspartamida Monoaminada
PAS-MA-MH	Poli-(α,β-D,L-[N-(3-aminopropil)-aspartamida])-co-[2(hidroxietyl)-aspartamida]
PASP-MA-NR	Poliaspartamida Monoaminada No-reaccionada

PASP-MH	Poliaspartamida Monohidroxilada
PASP-OMC	Poliaspartamida mono-O-carboximetilados
PSI	Polisuccinimida
PTKs	Proteínas tirosina quinasas
PTP-1B	Proteína tirosina fosfatasa 1-B
PTPs	Proteínas tirosina fosfatasas
RES	Sistema retículo endotelia
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPE	Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica
SDD	Detector de la desviación del silicio
STZ	Modelo de ratas empleado para el análisis de drogas contra la obesidad
UV-Vis	Ultravioleta visible
VDC	Dicloruro de vanadoceno
Vh	Volúmen hidrodinámico
Zucker fa/fa	Modelo de ratas empleado para el análisis de drogas contra la obesidad



1. Introducción

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo. Según cifras de la OMS, en el 2012 se detectaron alrededor de 14 millones de casos nuevos de esta enfermedad. Se estima que en las siguientes dos décadas se produzca un aumento del 70% y se llegue a los 22 millones de casos nuevos a nivel mundial.¹ Actualmente existen diversos tratamientos para combatir el cáncer; entre ellos, la quimioterapia es uno de los más utilizados. Los principales fármacos que se emplean en esta técnica son compuestos moleculares orgánicos, estos medicamentos abarcan un amplio espectro en la acción anticancerígena hacia distintos tipos de tumores; sin embargo, su propia naturaleza limita su efectividad hacia otras líneas celulares malignas.²

El descubrimiento de la actividad anticancerígena de compuestos derivados del platino fomentó la búsqueda de otros metales con posible capacidad terapéutica.³ El vanadio demostró ser un buen candidato gracias a sus comprobadas propiedades antitumorales y antidiabéticas; sin embargo, la acción terapéutica de sus compuestos moleculares mostraba ciertas limitaciones.⁴ En este contexto, la técnica de conjugación de un agente activo a un portador polimérico ofrece una serie de ventajas que permitirían resolver los problemas inherentes en estos compuestos. El alto peso molecular y efecto protector del polímero aseguran una mayor concentración y tiempo de permanencia del agente activo en el sistema circulatorio; asimismo, el uso de un polímero hidrosoluble favorece una eficiente biodistribución y toma celular de la droga reduciendo la dosis necesaria, y por consiguiente, sus efectos tóxicos.^{5,6}

Sakurai y Zhang lograron sintetizar complejos poliméricos de vanadilo basados en el poli ácido glutámico y la carragenina/quitosano respectivamente con grupos ligantes carboxílicos, los que en ensayos preclínicos mostraron un efecto insulino mimético significativo.^{7,8,9} Por otro lado, nuestro grupo de investigación logró desarrollar dos complejos poliméricos de oxovanadio (IV) derivados de la polisuccinimida; el primero, del poliácido aspártico, con muy bajo rendimiento del conjugado hidrosoluble y el segundo, con diseño mejorado, que logró superar el problema.^{10,11} Sin embargo, todos los complejos descritos presentaban como

deficiencia la pérdida progresiva de hidrosolubilidad al ser aislados en fase sólida. Asimismo, otro inconveniente observado en estas investigaciones radica en el muy alto peso molecular (500 kDa) de los vehículos poliméricos sintetizados por Sakurai, esta característica introduciría toxicidad debido a la lentitud con la cual serían eliminadas del organismo. Finalmente, la falta de protocolos de síntesis eficientes para la obtención de complejos poliméricos de vanadio resulta ser otro problema observado en el desarrollo de este campo de investigación.

El problema de solubilidad descrito previamente se debe a la presencia de un gran número de grupos dicarboxílicos y monocarboxílicos libres presentes en los complejos poliméricos mencionados. Estas cadenas laterales aumentan la posibilidad de entrecruzamiento entre cadenas principales, vía coordinación del catión vanadilo a grupos carboxilato de diferentes esqueletos poliméricos. Asimismo, la formación de zonas rígidas dentro de una misma cadena principal, por coordinación del vanadilo a diferentes grupos terminales carboxilato, contribuye a aumentar la rigidez del conjugado y, en consecuencia, disminuir la solubilidad del complejo en medio acuoso.

En esta investigación se propone el diseño, la síntesis y caracterización de un innovador sistema polimérico capaz de actuar como un eficiente portador de vanadio que, a su vez, podría liberar de forma controlada el agente activo. El polímero estará constituido por una cadena principal poliaspartamida, provista de cadenas laterales con grupos terminales carboxilato capaces de unirse efectivamente al vanadio de forma bioreversible, así como grupos hidroxilo que cumplen una función exclusivamente solubilizante. La presencia de estos últimos grupos en el vehículo polimérico dificultaría la multicoordinación del oxovanadio (IV) tanto por un factor estadístico como estérico. De esta manera, se lograría superar el problema de la pérdida progresiva de solubilidad del conjugado una vez aislado y secado sin desmedro en su capacidad de acarreo del agente activo. Asimismo, el empleo de un esqueleto poliaspartamida permitiría obtener conjugados con un peso molecular entre 25-50 kDa que asegura su baja toxicidad en el organismo en vista hacia futuros estudios clínicos.

El presente proyecto constituirá, en primer lugar, un aporte valioso en el desarrollo de protocolos de síntesis de complejos poliméricos de vanadio, de los que se encuentra poca información reportada, la que además no profundiza en los factores (concentraciones, relación polímero/metal, etc) que influyen los rendimientos y pureza de estos conjugados. A su vez, el polímero sintetizado representa un aporte innovador en la investigación de sistemas poliméricos de transporte y liberación controlada de metalofármacos, en este caso particular, oxovanadio (IV).



2. Marco teórico

2.1. Cáncer

2.1.1. Introducción

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo. Según cifras de la OMS, en el 2012 se detectaron alrededor de 14 millones de casos nuevos de esta enfermedad (Figura 1), asimismo, provocó la defunción de más de 8.6 millones de personas en el mismo año. Se estima que en las siguientes dos décadas se produzca un aumento del 70% y se llegue a los 22 millones de casos nuevos a nivel mundial, de los cuales más de la mitad se encuentren en las regiones más pobres del mundo como Asia, África y Latinoamérica.¹

El término cáncer agrupa a un amplio rango de enfermedades relacionadas con el crecimiento y reproducción no controlados de las células afectadas en diferentes partes del organismo, que conducen a aglomeraciones de células enfermas denominadas tumores. Los tipos de cáncer que han sido detectados más frecuentemente en el hombre son los de pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado; por otro lado, los casos más comunes en la mujer son los de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago. Existen cinco factores de riesgo conductuales y dietéticos que causan, aproximadamente en un 30% de los casos, la muerte de las personas que padecen de esta enfermedad:¹²

- Índice de masa corporal elevado
- Ingesta reducida de frutas y verduras
- Falta de actividad física
- Consumo de tabaco
- Consumo de alcohol

En lo que respecta al Perú, La Fundación Peruana de Cáncer, reportó la aparición de más de 56 mil nuevos casos de cáncer en el 2014; asimismo, la Liga Peruana Contra el Cáncer anunció que se llegan a detectar alrededor de 45 mil nuevos casos de cáncer anualmente en nuestro país, cuyo tratamiento supera una inversión de 4 mil millones de dólares.^{13, 14}

Incidencia de cáncer a nivel mundial

Desglose de los 12,7 millones de nuevos casos estimados, las tasas de incidencia estandarizadas de la edad mundial y los cánceres diagnosticados con mayor frecuencia por las diferentes regiones del mundo, 2008

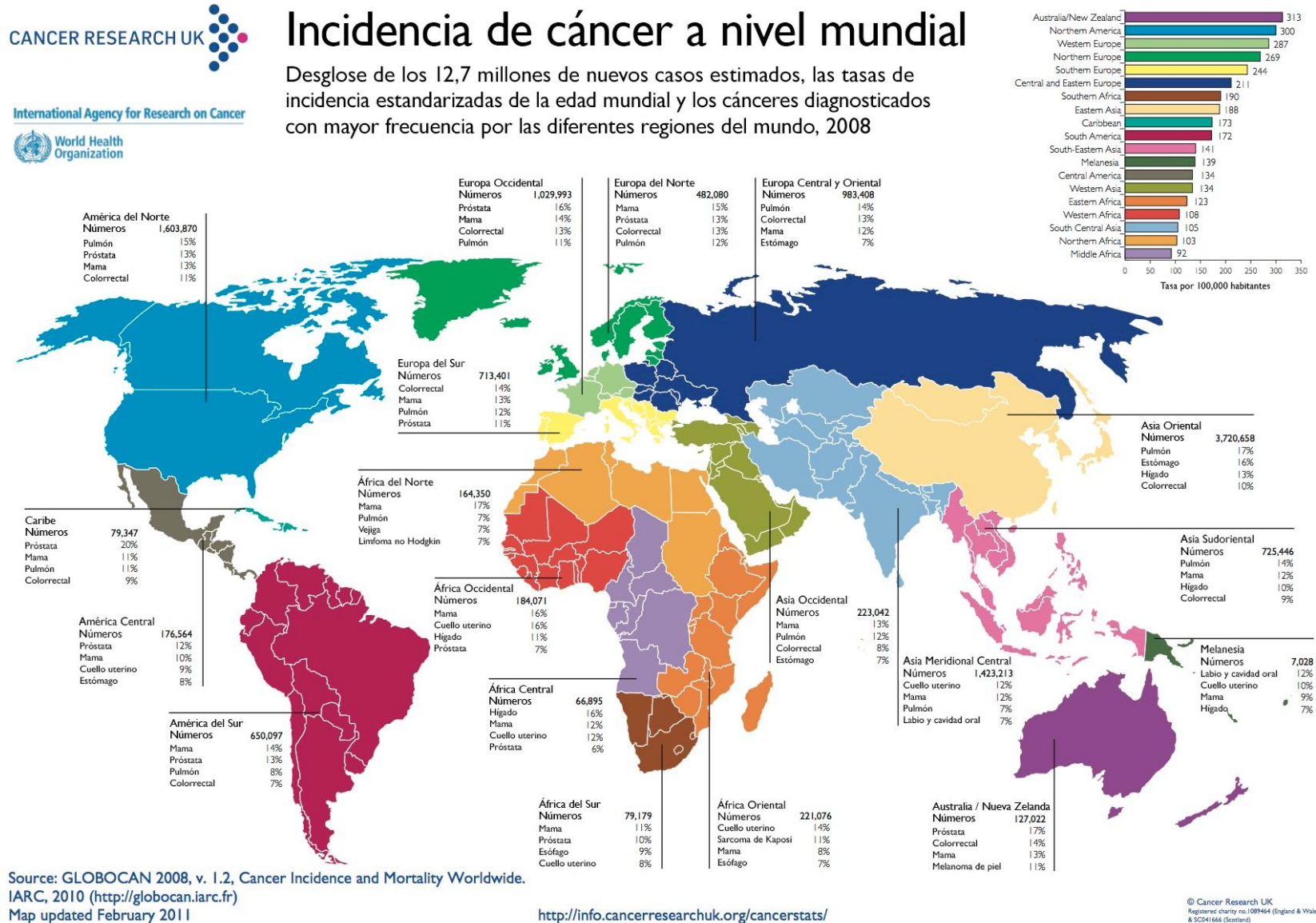


Figura 1. Incidencia de cáncer a nivel mundial actualizado en el 2011. Además, se muestran los tipos de cáncer más comunes para cada región ¹⁵

2.1.2. Patología y tratamiento

La carcinogénesis se conoce desde mucho tiempo atrás como el estado en el cual las células sanas del cuerpo comienzan a crecer y multiplicarse rápidamente. Se es posible encontrar diversos registros que datan de miles de años de antigüedad acerca de tumores tanto en animales como humanos. Entre la información más antigua que se tiene a la fecha sobresale el hallazgo de momias en Egipto que presentan rasgos de haber adquirido cáncer a los huesos, más conocido como osteosarcoma.¹⁶

El término cáncer fue acuñado, parcialmente, por el médico griego Hipócrates (460-370 AC) que le dio como nombre “*carcinos*” y/o “*carcinoma*” a una enfermedad en la cual se generaban tumores que podían, o no, presentar úlceras. Siglos más tarde, el médico romano Celsus, traduciría ambas palabras al término de “*cáncer*”, que se emplea hasta la fecha.¹⁶

Existen más de 200 enfermedades catalogadas como cáncer; sin embargo, según la clase de célula afectada, es posible dividirla en 5 categorías principales. Los carcinomas afectan el recubrimiento interno y externo de los órganos, mientras que los adenomas se manifiestan en el tejido glandular y los sarcomas en el tejido de soporte; los linfomas, por su parte, se originan en el tejido del sistema inmune y en los nodos linfáticos; finalmente, la leucemia se origina en la médula ósea para luego extenderse al sistema sanguíneo.¹⁷

Otra forma de clasificar a las células dañadas es mediante su capacidad de proliferación. Las células que son capaces de extenderse hacia otras secciones del cuerpo causando la destrucción de tejidos o el desarrollo de otros tumores son conocidas como malignas, mientras que las que poseen un crecimiento limitado se las conoce como benignas. Cabe mencionar que las células benignas pueden resultar peligrosas si su crecimiento se da en una zona sensible y/o si es que tienen tendencia a convertirse en células malignas después de un tiempo.^{17,18}

Las células cancerosas no se comportan de la misma manera que las células normales, las primeras tienden a crecer y morir sin seguir un orden establecido; caso contrario ocurre con las segundas. Cuando las células enfermas son localizadas se denominan carcinoma *in situ*; este tipo de cáncer se observa

cuando la enfermedad se encuentra en sus inicios y su tratamiento posee un alto índice de recuperación.

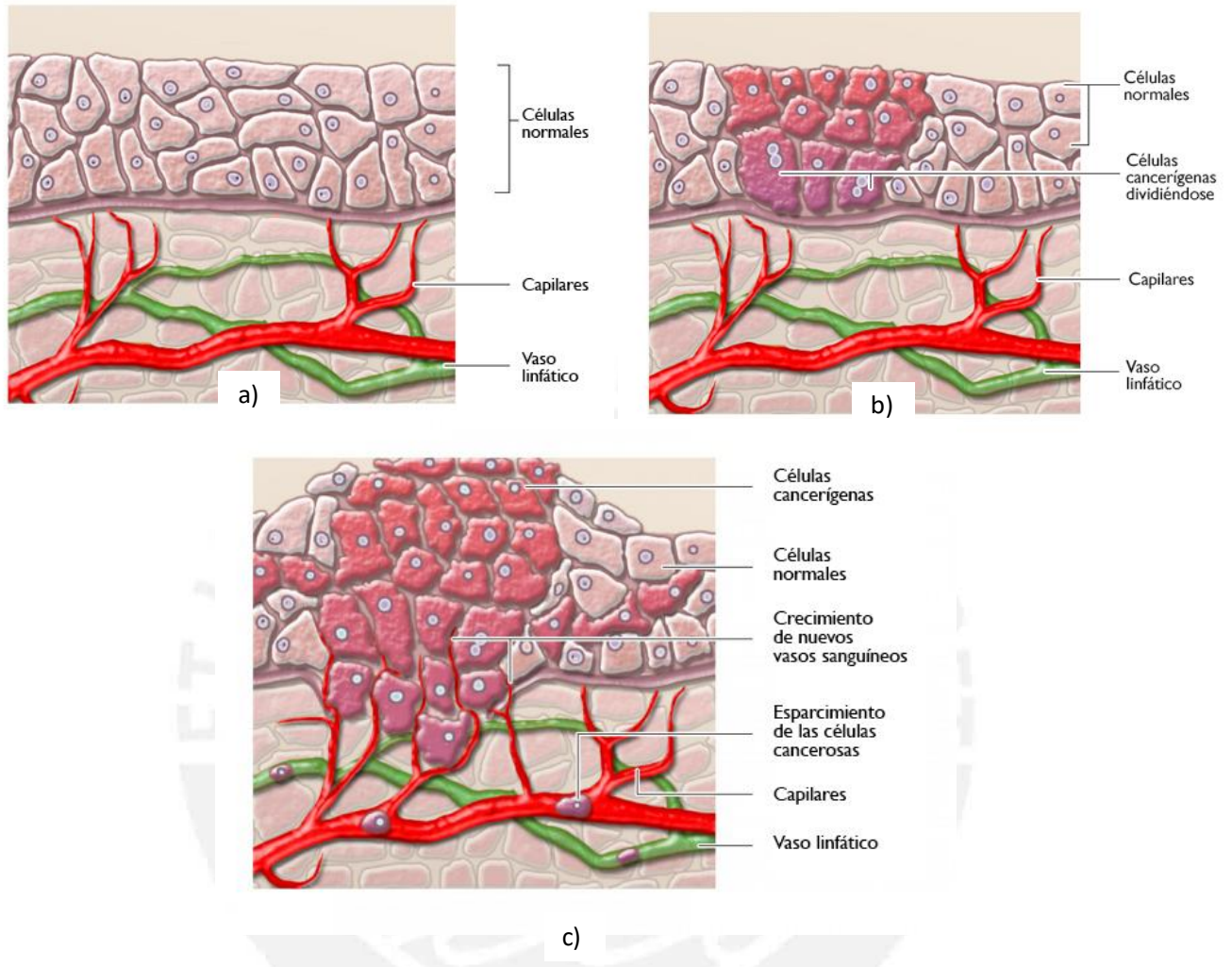


Figura 2. Comparación de tipos de tejidos celulares. a) Tejido normal, b) Carcinom *in situ*, c) Tumor Invasivo¹⁸

Cuando la enfermedad avanza, los tumores tienden a crecer rápidamente, por lo cual crean una nueva red vascular más amplia capaz de brindar el nivel de nutrientes necesario para su desarrollo, a este proceso se le conoce como angiogénesis. Al tipo de tumores que se encuentran en esta etapa se les denomina invasivos o metastásicos pues son capaces de viajar por el sistema linfático y/o vascular, depositándose en diferentes zonas del cuerpo y favoreciendo la formación de tumores secundarios (Figura 2). Las personas que

presentan la formación de este tipo de células poseen un muy bajo índice de recuperación.¹⁹

El desarrollo de esta enfermedad es consecuencia de diversas alteraciones en los genes responsables de la división y muerte celular, las cuales pueden ser causadas tanto por agentes externos al organismo, tales como el consumo de tabaco, la radiación ultravioleta, rayos X, exposición al asbesto y otros productos carcinógenos, como por defectos genéticos hereditarios. Actualmente existen diversos tratamientos para combatir el cáncer. Sin embargo, la elección del mismo dependerá de diversos factores: el tipo de cáncer, que tan expandido se encuentre, la edad y las condiciones particulares del paciente. Entre las terapias actuales, la cirugía, la radioterapia, la hormonoterapia, la inmunoterapia y la quimioterapia son las más conocidas.¹⁷

Esta última técnica se basa en el uso de drogas capaces de eliminar o reducir el crecimiento de las células cancerígenas. El principal beneficio del tratamiento radica en el amplio espectro de tipos de cáncer que puede tratar; asimismo, la forma de administración de la droga es muy variada, aplicándose de forma oral, intravenosa, por inyección intra-muscular, intra-arterial, intra-peritoneal y mediante cremas. El efecto secundario más reportado del tratamiento es la generación de fatiga; sin embargo, esta desaparece en poco tiempo por lo cual resulta ser uno de los procedimientos más empleados y con mejores índices de recuperación. Esta última técnica generalmente se aplica en pacientes con metástasis gracias a que ofrece la posibilidad de dispersión del agente activo por todo el organismo; utilizar cirugía o radiación para combatir esta dispersión sería poco beneficioso y eficiente. Por otro lado, el tratamiento con hormonoterapia utilizado especialmente para cánceres de mama y próstata, suele ser complementado con quimioterapia.²⁰

Los principales fármacos que se emplean en la técnica de quimioterapia son compuestos orgánicos como la Altretamina, 5-fluorouracilo, Daunorrubicina, Topotecán, etc.² Estos medicamentos abarcan una amplio espectro en la acción anticancerígena hacia distintos tipos de tumores; sin embargo, su naturaleza les impide la interacción hacia otras líneas celulares malignas, debido a esta razón

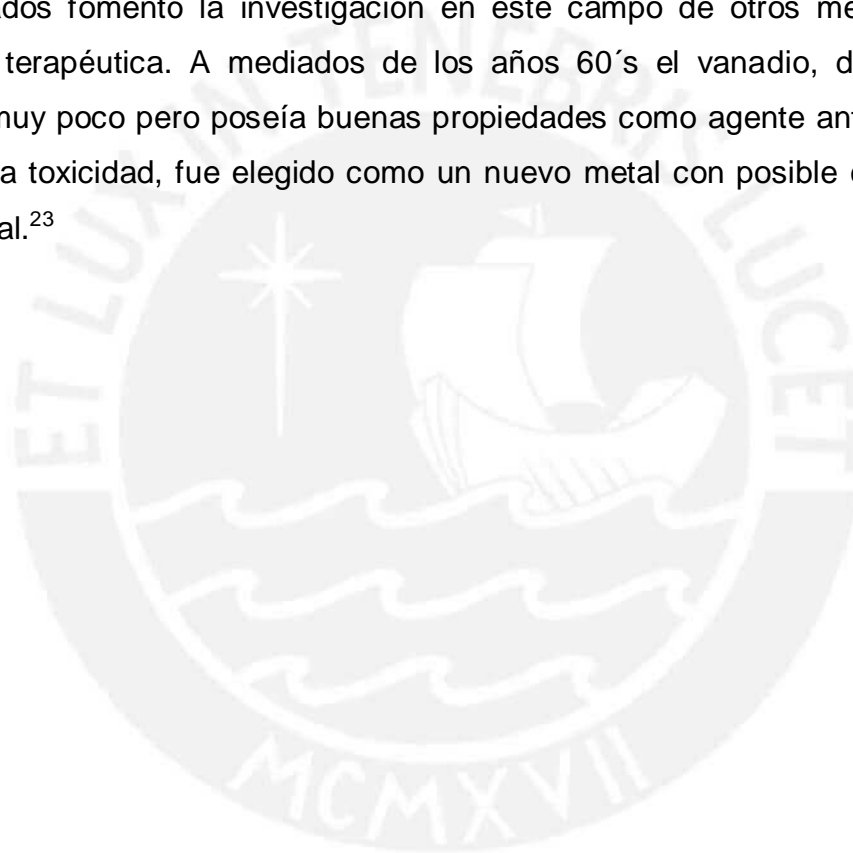
se promovió la búsqueda de otros compuestos químicos con diferente mecanismo de acción.

El descubrimiento del potencial terapéutico hacia diversas enfermedades de distintos compuestos con metales de transición como centro activo fomentó el interés por la investigación en este campo. A finales de los años 60 se desarrolló el primer metalofármaco con una alta actividad anticancerígena, el cis-diaminodicloroplatino(II) (cisplatino); diez años más tarde la FDA aprobó su uso para el tratamiento quimioterapéutico en seres humanos. Se demostró que este compuesto es capaz de tratar, de forma muy efectiva, el cáncer testicular, ovarico, pulmonar, de corazón, vejiga, cuello y cervical; asimismo, resulta ser muy efectivo hacia el tratamiento de otros tipos de cáncer cuando se usa en conjunto con diferentes drogas. Por su amplio rango de acción, el cisplatino se ha convertido en un medicamento estándar que sigue siendo empleado hasta la fecha en la técnica quimioterapéutica. Sin embargo, la alta efectividad del complejo va aunada a diversos efectos secundarios, como vómitos, neuropatía, mielosupresión y nefrotoxicidad; asimismo, su administración prolongada puede generar la aparición de nuevos tumores. Si bien se han desarrollado una serie de derivados del cisplatino con el fin de reducir su toxicidad (oxaliplatin, carboplatin, lobaplatin, nedaplatin, entre otros), la búsqueda de nuevos metales que puedan ejercer una actividad similar y/o resulten activos hacia otro tipo de cáncer, sin los efectos adversos descritos, constituye un campo muy activo de investigación.^{2,3,21}

De la amplia variedad de metales conocidos, se descubrió que el rutenio, galio y arsénico también poseen una alta actividad anticancerígena cuando se encuentran coordinados. Los primeros compuestos de rutenio con actividad antitumoral se descubrieron en el año de 1952 por Dwyer y colaboradores, estos se basaban en complejos de rutenio (II, III y IV) coordinados por ligandos monodentados. Se descubrió que poseían una alta efectividad hacia el tratamiento de tumores metastáticos y hacia un variado número de carcinomas, por lo cual, derivados de estos compuestos con ligandos más elaborados han sido evaluados clínicamente. Sin embargo, el estudio de esta línea de metalocompuestos se vio retrasada por la aparición del cisplatino. En lo que respecta al galio, se ha logrado sintetizar el tris(8-hidroxiquinolato)galio(III), un

compuesto con actividad anticancerígena que es capaz de ejercer su actividad mediante la absorción oral, y ha logrado entrar a pruebas clínicas de fase I. El arsénico es el único metal, aparte del platino, que ha sido aprobado para su uso en el tratamiento del cáncer en seres humanos. El metalofármaco Trisenox (ATO), basado en arsénico, se ha empleado desde comienzos del siglo XX en la lucha contra la leucemia promielocítica aguda; asimismo, la darinaparsina y el s-dimetilarsenioglutación son nuevas drogas basadas en arsénico que han sido aceptadas recientemente para formar parte de ensayos clínicos.^{3,22}

La efectividad en el tratamiento de esta enfermedad por los complejos mencionados fomentó la investigación en este campo de otros metales con actividad terapéutica. A mediados de los años 60's el vanadio, del que se conocía muy poco pero poseía buenas propiedades como agente antidiabético y una baja toxicidad, fue elegido como un nuevo metal con posible capacidad antitumoral.²³



2.2. Vanadio

2.2.1. Aspectos generales, propiedades químicas y biológicas

El vanadio es un metal de transición que presenta el símbolo V con número atómico 23, fue descubierto en el año de 1831 por Sefstrom y su nombre proviene de la diosa nórdica de la belleza y fertilidad “Vanadís” (Freyja). Este átomo ocupa la posición número 18 de los elementos que conforman la corteza terrestre del planeta con una abundancia del 0.019 %; asimismo, es el segundo metal de transición con mayor concentración en los océanos, siendo únicamente superado por el molibdeno.^{23,24,25}

Este elemento se presenta raramente puro en la naturaleza, por lo general se encuentra formando diversos compuestos gracias a la facilidad con la que puede cambiar su estado de oxidación desde -1 a +5 dependiendo del pH del medio. La concentración de vanadio en la superficie terrestre ha ido aumentando considerablemente con el paso de los años debido al uso continuo de hidrocarburos, los cuales poseen una alta presencia de este elemento y su combustión promueve la formación de diversos óxidos de vanadio, en especial el V_2O_5 .²³

A finales de los años 70's el vanadio fue añadido a la lista de metales de transición esenciales para la vida al realizarse distintos estudios en animales. En el ser humano se ha determinado que la concentración ideal de vanadio es de 0.3 μM ; esta se logra alcanzar sin el empleo de suplementos de vanadio debido a su omnipresencia en los alimentos de consumo diario; sin embargo, su deficiencia es capaz de causar disminución en el crecimiento, problemas reproductivos y alteraciones metabólicas/celulares en los riñones, corazón y cerebro.^{24,26,27}

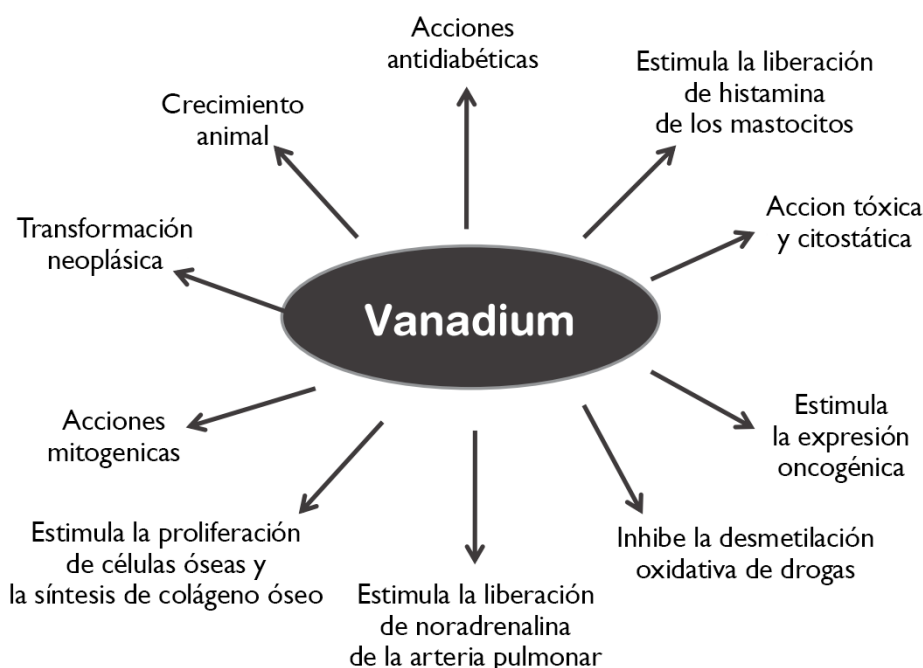


Figura 3. Roles biológicos del Vanadio ²²

A pH fisiológico y concentraciones micromolares, el vanadio está presente en el plasma en su estado pentavalente como HVO_4^{2-} o H_2VO_4^- monomérico. Una vez reducido a VO^{2+} por la glutatona de eritrocitos o por ácido ascórbico, entre otros agentes reductores extracelulares, es transportado en el organismo por las proteínas transportadoras de hierro, albúmina y transferrina. A nivel celular, predomina la forma pentavalente del vanadio; el vanadato (V) ingresa a la célula mediante canales aniónicos donde es reducido al catión vanadilo, VO^{2+} , principalmente por la glutatona intracelular y luego es enlazado a diversas proteínas. Se ha demostrado que el vanadio administrado a ratas en su estado penta y tetravalente se distribuye a nivel intracelular principalmente en la fracción nuclear (30-40%) seguido por el citosol y las fracciones mitocondriales. Además existe evidencia de que el vanadilo (IV) y el vanadato (V) en el citosol están coordinados a diversas biomoléculas vía grupos coordinantes fosfato, carboxilo y amino.²⁸

En lo que respecta a su distribución en el organismo, diferentes estudios en modelos animales han mostrado que el vanadio se acumula principalmente en los huesos, seguido de los riñones, bazo e hígado y en menor grado en los

pulmones y testículos. La excreción ocurre principalmente por vía renal con un tiempo de vida media en el organismo de 20-40 horas.²⁹

El mecanismo biológico de este elemento no se entiende a profundidad; sin embargo, se cree que este se basa, principalmente, en la similitud que existe entre los compuestos de vanadato (V) y los aniones fosfato. De esta manera, la presencia de los primeros genera la alteración de diferentes procesos dependientes de la concentración de los segundos como la inhibición de fosfatasas/quinasas y la regulación de bombas de Na⁺ y K⁺; asimismo, el vanadato es capaz de unirse al ADP y/o NAD formando ADPV y NADV. Por otro lado, el vanadio en sus estados de oxidación (IV) y (V) puede interferir con la formación o eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS), con lo cual se amplía su rol regulatorio en los sistemas biológicos (Figura 3).^{22,23,24}

Cabe mencionar que las áreas de aplicación del vanadio no solo se limitan al campo bioquímico y médico, sino que también es empleado en la formación de catalizadores homogéneos y heterogéneos, en la síntesis de aleaciones metálicas, en la formación de nano-materiales o redes moleculares y en la construcción de baterías.²⁶

2.2.2. Vanadio como agente terapéutico

2.2.2.1. Vanadio, diabetes y otras aplicaciones

Entre los distintos efectos terapéuticos que muestra el vanadio, su actividad antidiabética ha sido la más estudiada hasta la fecha. Si bien el primer reporte de una mejora en el estado de pacientes diabéticos por acción de un compuesto de vanadio (NaVO_3) data de 1899, el interés por este metal se vio opacado por el descubrimiento de la insulina en el año de 1922.²⁵ Estudios más profundos, *in vitro* e *in vivo*, sobre la efectividad de sales de vanadio como agentes insulinomiméticos se iniciaron en la década de los 80's. Estas primeras investigaciones demostraron, además de una notoria actividad hipoglicemiante, otros efectos beneficiosos del metal como un aumento a la sensibilidad hacia la insulina, la corrección de deficiencias en la hormona tiroides y la capacidad de prevenir o revertir complicaciones secundarias de la diabetes como cardiopatía, formación de cataratas y excesiva ingestión de líquidos y alimentos. Sin embargo, debido a la naturaleza salina de estos compuestos y su pobre absorción (1-2%), se requería de altas dosis que inducían efectos adversos relacionados con trastornos gastrointestinales en los modelos animales estudiados (dolor abdominal, náusea, diarrea, etc).^{2,3,30}

A inicios de la década de los 90's, con el fin de mejorar la bioabsorción del metal y por ende su acción insulinomimética, se desarrollaron los primeros complejos de vanadio (IV) con ligandos orgánicos; estos mostraron, entre otros efectos terapéuticos, un control adecuado de los altos niveles de glucosa en sangre. Posteriormente se han sintetizado un gran número de complejos vanadilo con distintas esferas de coordinación que incluyen átomos donadores de oxígeno, nitrógeno y azufre, entre los cuales destacan el bis(metilmaltolato)oxovanadio (IV) (BMOV) y el bis(alilxinato)oxovanadio (IV) (BAOV). Entre los principales beneficios del primer complejo, sobresale su comprobada acción hipoglicemiante superior a la del VO_2SO_4 ; asimismo, es capaz de reducir altos niveles de colesterol y triglicéridos en el organismo a concentraciones estables. Por otro lado, análisis en ratas Zucker fa/fa mostraron que el BMOV también posee la cualidad de aumentar la cantidad de insulina que puede generar el organismo y su consumo permite disminuir la intolerancia a la glucosa. El complejo

bis(alilxinato)oxovanadio (IV) también posee características terapéuticas importantes. Ensayos preclínicos en ratones STZ mostraron la alta actividad hipoglicemiante de este complejo, la cual resultó comparable a la del BMOV en los casos de tipo agudo e incluso la superó en los casos crónicos. Finalmente, se ha comprobado que el BAOV exhibe otras ventajas, como regulación del peso corporal, mejora en el metabolismo de lípidos y reducción de la presión arterial, las que lo convierten en un potencial metalofármaco en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1 y 2. El único ensayo clínico en humanos empleando un complejo de vanadio análogo al BMOV, el bis(etilmaltolato)oxovanadio (IV) (BEOV), fue realizado por Orvig y colaboradores. Esta investigación demostró una biodisponibilidad del compuesto tres veces mayor que la de ensayos con VOSO_4 . Este estudio completó la fase clínica I en el año 2000 y la fase clínica IIa en el 2008.^{4, 22, 30}

El principal mecanismo de acción del vanadio hacia el tratamiento de la diabetes se atribuye a la semejanza estructural entre el anión vanadato y el anión fosfato. La presencia de vanadato dentro de las células genera, a diferencia del fosfato, una unión muy estable entre el VO_4^{3-} y distintas fosfatasas como la proteína tirosina fosfatasa 1-B (PTP-1B); el enlace a esta enzima produce su inhibición, lo que a su vez mantiene activa las diferentes rutas de señalización para la toma de glucosa con el consiguiente efecto hipoglicémico.²⁶

La actividad terapéutica del vanadio no se encuentra restringida únicamente a la diabetes, se ha descubierto la capacidad de este elemento en tratar otras enfermedades tropicales como la leishmaniasis, amebiasis y la enfermedad de Chagas; asimismo, posee actividad contra afecciones virales como la influenza, el dengue, la tuberculosis y el VIH. Cabe resaltar el estudio de diversos complejos de vanadio con resultados muy prometedores, llegando a ser incluso más efectivos que las drogas más comúnmente usadas en el tratamiento de algunas de estas enfermedades.^{23,26}

2.2.2.2. Vanadio y el cáncer

Desde el primer reporte de los efectos anticancerígenos de las sales de vanadio en 1965, la investigación en este campo ha continuado y se ha multiplicado en las últimas dos décadas con resultados sumamente prometedores.³¹

Los efectos antitumorales del vanadio y los mecanismos bioquímicos y moleculares por los que ejerce esta acción han sido extensamente investigados *in vitro* usando un gran número de líneas celulares malignas, que incluyen el linfoma B y leucemia T celulares humanas, hepatoma, osteosarcoma así como los carcinomas testicular, mamario, ovárico, renal, pulmonar, nasofaríngeo y de laringe. A partir del conocimiento acumulado *in vitro* se ha logrado avanzar hasta la fase preclínica *in vivo*; y a través de numerosos estudios se ha demostrado el gran potencial de este metal en la prevención y terapia de una amplia variedad de tipos de cáncer.²⁷

Thompson y colaboradores realizaron el primer estudio en animales de los efectos quimiopreventivos del vanadio en carcinogénesis inducida por drogas. Encontraron que la administración de $VOSO_4$ en la dieta de ratas previamente tratadas con 1-metilnitrosourea redujo la incidencia y número promedio de tumores mamarios inducidos por animal (multiplicidad), además de prolongar el tiempo medio antes de su aparición.³² Estos efectos se manifiestan de modo similar sobre tumores de hígado y colon inducidos por otros potentes carcinógenos.^{27,28}

El vanadio ejerce su acción quimiopreventiva en la carcinogénesis químicamente inducida, principalmente, mediante inactivación de los metabolitos activos derivados de la droga carcinogénica en cuestión, vía modulación del contenido y actividad de varias enzimas que participan en la metabolización de sustancias xenobióticas en el hígado y/o incremento del status antioxidante de los órganos a ser afectados por el carcinógeno.²⁸

La efectividad del vanadio como agente antitumoral no se limita en absoluto a la carcinogénesis inducida, pues han quedado ampliamente demostrados sus efectos antitumorales sobre una variedad de líneas celulares de cáncer humano inoculados o heterotrasplantados en diversos órganos de modelos animales.

En una investigación reciente se demostró que el NH_4VO_3 reduce significativamente *in vitro*, en un modo dependiente del tiempo de administración y la concentración, la viabilidad y proliferación de tres de los tipos de cáncer humano más comunes: mamario, cuello uterino e hígado.³³ Asimismo, esta sal administrada en bajas dosis prolonga la tasa de supervivencia de ratones heterotransplantados con el linfoma Dalton ascítico (DL); a su vez, reduce la proliferación celular del tumor gracias a una mejora en los parámetros hematológicos de los animales tratados.²⁸ El vanadio mostró además ser efectivo en el tratamiento de tumores del tejido conectivo/ fibroso. El NaVO_4 en particular, logró reducir en un 85-100% el crecimiento de un tipo de linfosarcoma de origen humano altamente metastático (MDAY-D2).²⁷

Si bien los estudios iniciales se realizaron mayormente con sales inorgánicas de vanadio, investigaciones más recientes se han centrado en la síntesis y evaluación de las propiedades antitumorales de diferentes tipos de complejos de vanadio con ligandos orgánicos, debido al efecto favorable de la complejación sobre la bioabsorción de metalofármacos por el organismo. Esto conduce a un aumento en su efectividad con la consiguiente disminución de las dosis requeridas para observar alguna actividad farmacológica; de esta manera se reducen eventuales efectos colaterales adversos relacionados, principalmente, con trastornos gastrointestinales leves (dolor abdominal, náusea, diarrea, etc).⁴

Gambino y colaboradores sintetizaron una serie de nuevos complejos heterolépticos neutros de oxovanadio (IV), que incluyen un ligando 1,10-fenantrolina y uno de un conjunto de 5 ligandos tridentados, derivados de la salicilaldehído semicarbazona, en la esfera de coordinación del metal. En un estudio comparativo con cis-platino se evaluó el efecto antitumoral de dichos complejos frente a una línea celular de leucemia humana aguda (HL-60), obteniéndose valores de IC_{50} de magnitud comparable. Esta es una característica deseable, pues implica que se requiere de bajas concentraciones del agente activo para lograr un alto efecto citotóxico o antiproliferativo. Asimismo, se comprobó la capacidad de estos complejos para inducir necrosis y apoptosis en las células cancerígenas analizadas; esto tendría relación con su también demostrada interacción con el ADN.³⁴ Complejos mixtos relacionados mostraron efectos antitumorales similares hacia líneas celulares de cáncer

hepático humano.³⁵ Asimismo, en un estudio pionero, Koepf-Maier demostró la inhibición del crecimiento de tumores mamarios del tipo Ehrlich ascítico en ratones heterotransplantados utilizando al complejo dicloruro de vanadoceno (VDC), llegando incluso a curarlos completamente. Resultados similares fueron obtenidos con otros complejos de vanadio como el “metvan” y un complejo mixto peroxo relacionado.²⁷

Recientemente, León y colaboradores sintetizaron tres complejos orgánicos de oxovanadio(IV) que contienen ligandos oxodiacetatos bidentados con el fin de analizar su actividad antitumoral frente a líneas celulares humanas MG-63 (osteosarcoma). Los resultados indicaron una alta bioactividad de los tres compuestos gracias a su fuerte interacción con el ADN lo que conduce a la degradación de las células tumorales. Asimismo, estos compuestos eran capaces de alterar la actividad/metabolismo de distintas organelas como la mitocondria y los lisosomas. Cabe resaltar de esta investigación la superior acción antitumoral del complejo VO(oda) respecto a los otros debido a su considerable actividad antiproliferativa independiente de la concentración empleada.³⁶ A finales del 2014, Kowol y colaboradores realizaron un estudio sobre la acción antitumoral de complejos de vanadio (IV/V) unidos a ligandos piridínicos de la familia de las tiosemicarbazonas hacia tres líneas celulares cancerígenas distintas (ovario, colon y epitelial). Si bien no se observó ningún cambio en la actividad antitumoral de estos complejos respecto a los ligandos, una modificación estructural del ligando (sustitución del anillo piridínico por uno fenólico) condujo a un complejo mucho más activo que su correspondiente ligando. Esto apoya la notable influencia de la estructura particular del ligando sobre la eficacia terapéutica del metal.³⁷

De esta manera, se observa la alta efectividad en el tratamiento de distintos tipos de líneas celulares cancerígenas mediante el uso de complejos de vanadio; sin embargo, el salto hacia el empleo de estos compuestos como medicamentos efectivos se ve retrasado por la necesidad de realizar estudios más profundos sobre la farmacocinética y los efectos a largo plazo que puedan generar en el ser humano. Este proceso resulta ser complicado debido a la gran actividad fisiológica desconocida del metal, por lo cual se prevé un avance lento, pero con prometedoras expectativas.

2.2.2.3. Mecanismos de la acción antitumoral del vanadio

Existe múltiple evidencia de que los compuestos de vanadio ejercen sus efectos antitumorales activando, tanto en células normales como cancerígenas, diferentes rutas de señalización. La principal está relacionada con la inhibición de proteínas tirosina fosfatasas (PTPs) y/o activación de proteínas tirosina quinasas (PTKs); esto promueve la fosforilación de restos tirosina en diversas proteínas celulares, activando sus respectivas rutas de transducción de señal. En particular, las de una importante familia de proteínas transductoras de señales extracelulares en eventos intracelulares (MAPKs). Este camino conduce finalmente a la activación de factores de transcripción nuclear como el NF-KB, que regula la expresión de una variedad de genes capaces de ejercer un efecto apoptótico sobre las células cancerosas.^{38,39} Otro mecanismo antiproliferativo importante del vanadio es el de la ruptura indirecta del ADN mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como radicales libre hidroxilo, producidos por reacciones redox dentro del citosol gracias a la facilidad en que el vanadio puede alterar su estado de oxidación. Resulta de especial interés que la generación de ROS por vanadio se vea especialmente favorecida dentro de células cancerosas.^{40,41} Además, se ha demostrado que diversos compuestos de vanadio (IV) y (V), interaccionan *in vitro* e *in vivo* con el ADN induciendo directamente su ruptura.⁴² La ruta de señalización de las PTPs y PTKs podría asimismo influenciar el potencial invasivo y metastático de las células tumorales, al regular la inducción de varias proteínas adhesivas intracelulares, así como la sensibilización de células cancerosas resistentes a los efectos citotóxicos de diferentes agentes neoplásicos. Por ejemplo, se ha descubierto que el vanadio complejado es capaz de reducir la resistencia al cisplatino en células de cáncer ovárico humano (Figura 4).²⁸

De esta manera, el vanadio resulta un candidato atractivo para combatir al cáncer pues cumple, ya sea de modo independiente o en conjunto, con todos los criterios deseables para un agente anticancerígeno efectivo: 1) efecto antiproliferativo, 2) acción citotóxica y/o citostática expresada vía muerte celular necrótica o programada (apoptosis), 3) reducción y/o inhibición del potencial invasivo o metastático de las células cancerosas y 4) ausencia o reducción de la capacidad para inducir resistencia celular.²⁸

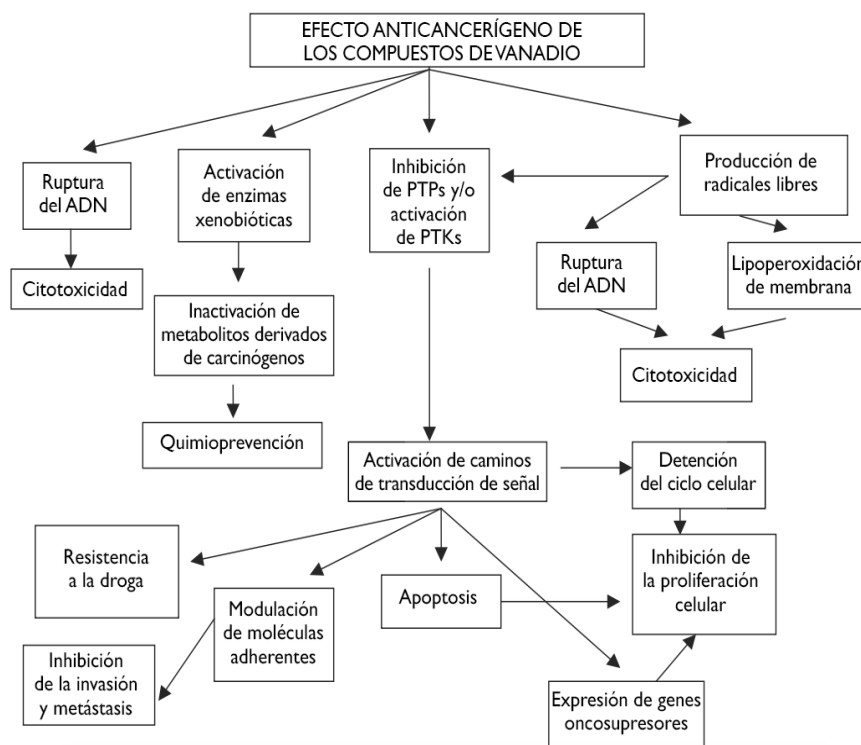


Figura 4. Efectos anticancerígenos de compuestos de vanadio ²⁸

En este contexto, otro aspecto de especial interés a considerar para el desarrollo de compuestos de vanadio como posibles fármacos anticancerígenos es la comprobada acumulación preferente de este metal en células y tejidos cancerosos respecto a aquellos normales. Así, el contenido de vanadio, estimado por fluorescencia de rayos X, resultó más elevado en tejido mamario canceroso. Asimismo, el ⁴⁸V complejado se acumuló en alto nivel en ciertos tipos de tumores y en mayor grado que el ⁴⁸V salino.²⁷ Existe también evidencia de que el vanadio, administrado en ciertas líneas celulares de cáncer (que incluyen leucemia, cáncer de colon, carcinoma pulmonar de Lewis, melanoma (B16) y tumores Ehrlich ascite) heterotransplantados a ratones atímicos, se acumula principalmente en las regiones ricas en ácidos nucleicos de las células tumorales.⁴³

Las beneficiosas propiedades mostradas por el vanadio hacia el tratamiento de distintas enfermedades fomentaron la investigación en nuevas formas de administración del metal, esto llevo al descubrimiento de la utilidad en emplear polímeros como agentes capaces de mejorar su actividad en el organismo.

2.3. Sistemas poliméricos de transporte y liberación controlada de metales

2.3.1. Introducción y propiedades

Las primeras aplicaciones de compuestos poliméricos sintéticos al campo medicinal tuvieron lugar a inicios de los años 40's, cuando eran utilizados, principalmente, como expansores plasmáticos, materiales antisépticos y recubrimientos de heridas. Sin embargo, veinte años después, surgió la idea de emplear macromoléculas, sean naturales o sintéticas, como agentes capaces de actuar terapéuticamente por sí mismos o cambiar la farmacocinética de diferentes compuestos orgánicos e inorgánicos. A esta nueva rama de la macrociencia se le denominaría "Polímeros Terapéuticos". Para este trabajo de investigación se describirá específicamente a una subrama catalogada como "vehículos poliméricos".⁴⁴

Entre los vehículos poliméricos más investigados destacan los hidrogeles, micelas poliméricas, dendrímeros y los conjugados polímero-droga; estos últimos resulta de interés para el presente trabajo de investigación.^{5,45} Un conjugado polímero-droga involucra una unión simbiótica y biorreversible entre los dos componentes: el polímero, que actúa como un vehículo de carga y transporte, y la droga propiamente dicha. El polímero "sabe" como vencer los obstáculos biológicos y "entregar su carga" en el terminal adecuado mientras que la droga "disfruta" de un viaje seguro para ejercer finalmente su bioactividad en el tejido enfermo.^{5, 46}

Es importante señalar que, a diferencia de otros polímeros capaces de solo encapsular físicamente al agente activo, los conjugados polímero-droga poseen beneficios adicionales como una alta capacidad de carga de la droga, una liberación prolongada del agente activo y una alta estabilidad del conjugado con poca pérdida del fármaco durante su paso por el sistema sanguíneo.⁴⁷ Asimismo, esta técnica permite superar ciertas deficiencias encontradas usualmente en los fármacos moleculares convencionales que limitan su efectividad.⁵

El diseño y construcción del vehículo polimérico resulta crítico para el desarrollo de un conjugado polímero-droga, ya que la actividad terapéutica del mismo dependerá fundamentalmente de una serie de características estructurales y químicas del polímero. El diseño básico debe incluir: 1) Una cadena principal flexible, no tóxica y biodegradable, y 2) cadenas laterales que contengan por lo menos dos tipos de unidades, solubilizantes y ligantes, con grupos hidrofílicos y coordinantes respectivamente. Es deseable, aunque no imprescindible, la presencia de unidades sitio específicas; que orienten preferentemente la droga hacia células y tejidos determinados (Figura 5).^{5,6}

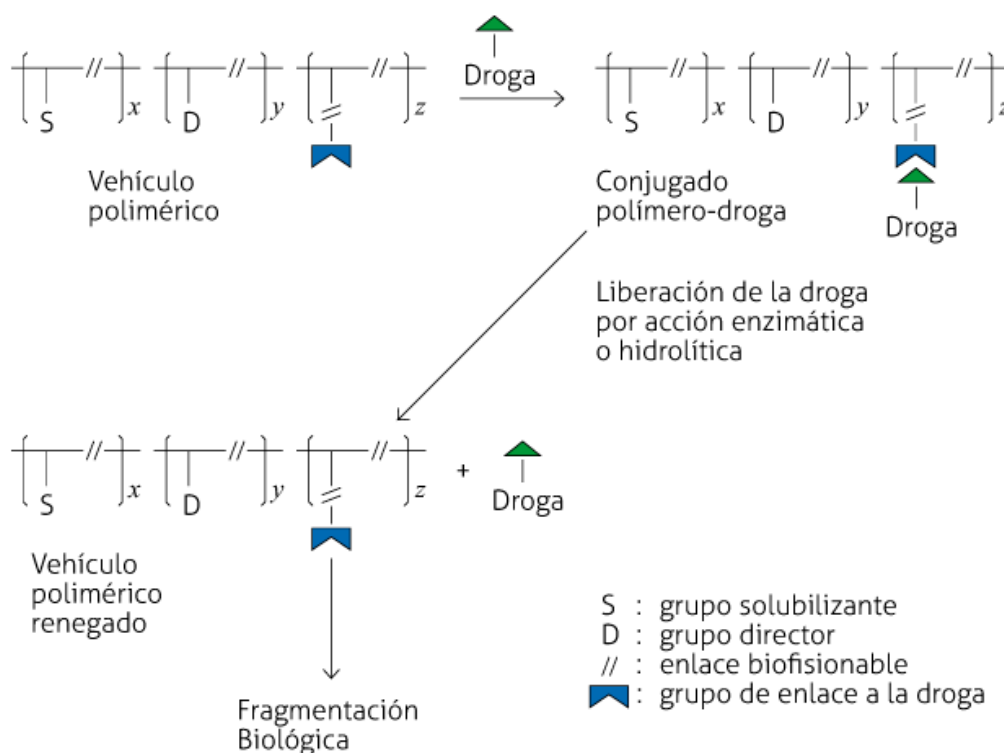


Figura 5. Representación esquemática de los componentes de un conjugado polímero-droga⁵

Otra característica deseable en el diseño de un vehículo polimérico es la presencia de espaciadores, es decir, una cadena de longitud apropiada entre el sitio de anclaje de la droga y la cadena principal, lo que disminuye el impedimento estérico a la coordinación ejercido por el correspondiente esqueleto polimérico y facilita la liberación del agente activo a nivel intracelular.

Otro aspecto importante a considerar en el diseño está relacionado con el tipo de unión entre el vehículo polimérico y el agente activo, lo que determina

finalmente el mecanismo intracelular de liberación de la droga. En caso de uniones covalentes fuertes, como enlaces peptídicos, la biofisión es de naturaleza enzimática, mientras que para ciertos enlaces coordinados dativos el medio ligeramente ácido (pH 5) en el espacio lisosómico induce una ruptura hidrolítica.⁵ En este contexto, cabe mencionar el observado aumento de acidez en células cancerosas, capaz de reducir el pH en un rango de 0.5-1.0 dentro del espacio lisosómico fomentando así una liberación más rápida del agente activo. Esto podría generar una actividad terapéutica más pronunciada a dosis más bajas.⁴⁷

Por otro lado, la “arquitectura molecular” del polímero, la que comprende su tamaño, conformación molecular en solución, flexibilidad y ramificación, juega un papel clave sobre la farmacocinética y biodistribución *in vivo* de los vehículos macromoleculares.⁴⁸

El peso molecular (Mw) del polímero y más específicamente su volumen hidrodinámico (Vh), influyen de modo crítico en los mecanismos de excreción del mismo. Para polímeros lineales, un rango referencial conveniente, basado en que la eliminación renal constituye el mecanismo principal de excreción, es que su Mw se encuentre entre los 25 y 50 kDa; de este modo, su diámetro hidrodinámico resulta del mismo orden de magnitud que los de los poros glomerulares de los riñones evitando una excreción demasiado rápida. Esto explica que en los polímeros lineales el tiempo de vida media en el sistema circulatorio aumente dramáticamente a partir de los 25 kDa.⁴⁵ Por otro lado, para polímeros aniónicos, se determinó que la toxicidad aumenta considerablemente cuando el peso molecular supera los 50 kDa, lo que apoya el límite superior propuesto.^{45,48} Adicionalmente, el hígado y los componentes del sistema retículo endotelial (RES) también son capaces de remover partículas de material polimérico de la sangre por fagocitosis cuando su diámetro hidrodinámico supera los 200 nm.⁴⁸

Otro factor que prolonga el tiempo de permanencia de la droga en el sistema circulatorio y aumenta su biodisponibilidad hacia los diferentes órganos y tejidos está relacionado con el efecto protector del polímero. Este disminuye las reacciones con proteínas y otras biomoléculas capaces de secuestrar al agente activo; además, el polímero reduce la permeabilidad vascular del conjugado gracias a su alto peso molecular, dificultando una excreción demasiado rápida.⁴⁹

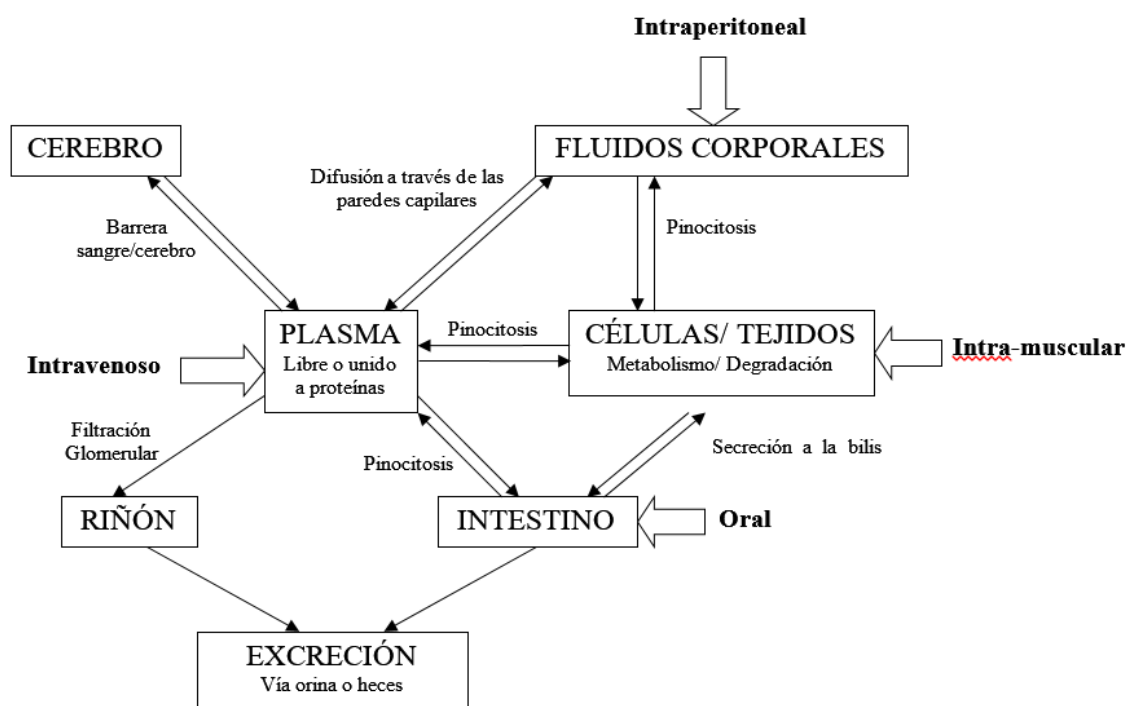


Figura 6. Distribución de polímeros sintéticos en el organismo después de su administración por diferentes vías ⁵⁰

El hecho que los conjugados polímero-droga contengan grupos hidrofílicos, le confiere una alta solubilidad en los fluidos corporales acuosos; esto permite, su rápida distribución en el sistema circulatorio y evita su captura y eliminación fagocítica por el RES, mecanismo de depuración clásico para material no disuelto en el plasma (Figura 6). ^{48, 49}

Asimismo, el carácter hidrosoluble del conjugado, permite su ingreso a la célula por pinocitosis, un mecanismo de difusión activa típico de polímeros solubles; el cual resulta más eficiente que el mecanismo de difusión pasiva, propio de compuestos moleculares neutros. A su vez, elude los inconvenientes asociados a compuestos cargados o muy polares incapaces de penetrar la membrana celular por el mecanismo molecular previamente mencionado. La pinocitosis involucra una invaginación del polímero hidrosoluble por la membrana celular para su posterior liberación al interior de la célula, específicamente en los lisosomas por acción de diversas enzimas o ruptura hidrolítica, favorecida por el cambio de pH (Figura 7). ⁴⁸

En lo que se refiere al desarrollo de un conjugado polímero-droga de interés como potencial agente anticancerígeno, la unión del compuesto activo a un polímero es capaz de resolver uno de los problemas más críticos en el tratamiento quimioterapéutico, la resistencia inducida a una droga. Al cabo de cierto tiempo de tratamiento, algunas de las células desarrollan resistencia a la actividad de los agentes terapéuticos moleculares al producir mecanismos enzimáticos capaces de expulsar al fármaco al entorno extracelular antes de ejercer su acción. Entre los principales compuestos que realizan esta acción sobresale la P-glicoproteína cuando se encuentra en grandes concentraciones; esta proteína es producida en el endosoma. Las células que han adquirido esta resistencia se multiplican y producen que el agente activo empleado pierda progresivamente su eficacia. El uso de vehículos poliméricos asociados al agente activo cambia drásticamente la farmacocinética de la droga dado que su entrada a la célula se realiza mediante pinocitosis. Al ser este mecanismo uno muy diferente al de difusión pasiva utilizado por los compuestos moleculares, la P-glicoproteína ya no es capaz de eliminar al agente activo, permitiendo prolongar la efectividad en el tratamiento.^{5, 51}

Finalmente, una característica general e inherente a la mayoría de conjugados polímero-droga es la acumulación preferente de estos compuestos en tejidos cancerígenos. A esta propiedad se la conoce como el “Efecto de Permeabilidad y Retención Aumentada” (EPR por sus siglas en inglés). A diferencia de las células normales, los tumores desarrollan una compleja arquitectura vascular con el fin de acelerar su crecimiento; sin embargo, esta resulta ser amorfa y con un tejido endotelial discontinuo, lo que permite una fácil hiperpermeabilidad de diversas macromoléculas presentes en el plasma. Asimismo, estos carcinomas poseen un sistema linfático defectuoso que es incapaz de realizar un efectivo trasvase de dichos macro-compuestos de regreso a la sangre.

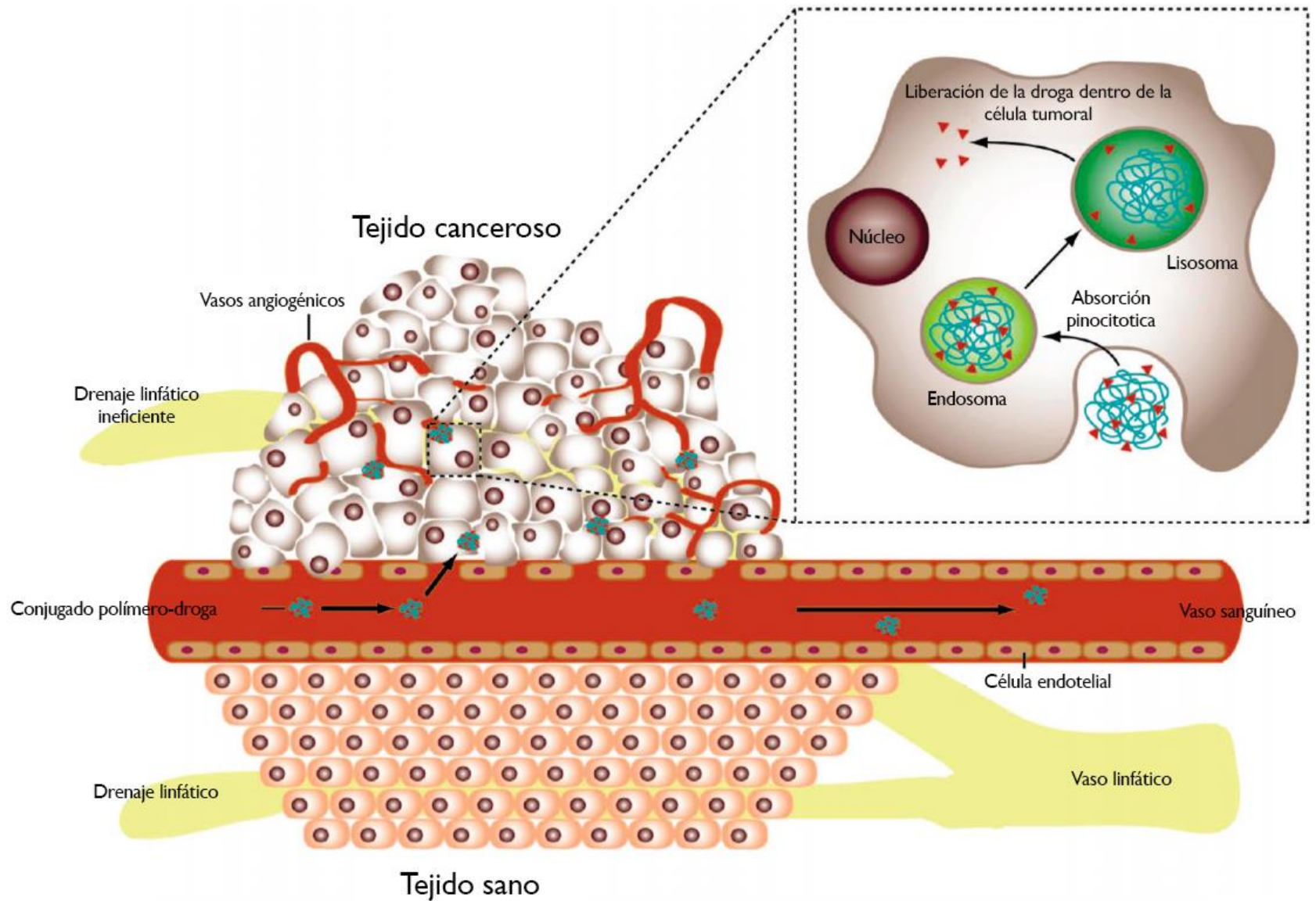


Figura 7. Representación esquemática del efecto EPR y del mecanismo de entrada celular: Pinocitosis. Las células tumorales poseen un sistema linfático defectuoso y una estructura vascular deformable que deja trasvasar fácilmente el conjugado polimérico al tejido dañado.⁴⁸

De esta manera, se produce una acumulación preferente del conjugado polimérico activo en los tejidos cancerosos respecto a los normales. En consecuencia, la unión de agentes terapéuticos a polímeros disminuye la toxicidad de los primeros ya que su distribución no es uniforme en todos los tejidos, sino que se vuelve específica hacia los dañados.^{51,52,53}

La conjunción de todos estos factores favorables, que varían radicalmente la farmacocinética y biodistribución del agente activo en el organismo, justifican la mayor efectividad terapéutica de los conjugados polímero-droga respecto a los fármacos moleculares convencionales.



2.3.2. Conjugados polímero-metal como agentes terapéuticos

La presente técnica se ha orientado principalmente al desarrollo de conjugados con drogas anticancerígenas, limitándose en su etapa inicial a la unión de las clásicas drogas antitumorales orgánicas usadas en quimioterapia como daunorubicina, metotrexato y doxorubicina. El primer compuesto polímero-droga sintético que llegó a la fase de ensayos clínicos (1994) fue el N-(2-hidroxiopropil) metacrilamida (HPMA), copolímero conjugado a Doxorubicina, el cual mostró actividad quimioterapéutica en pacientes resistentes a otras drogas.⁵⁴

En la Tabla 1 se muestran, según referencias bibliográficas, los más recientes conjugados poliméricos que se encuentran participando en ensayos clínicos. Es notable el amplio rango terapéutico para el que se analiza la eficacia de estos fármacos; asimismo, cabe mencionar que muchos de estos agentes podrían haber superado a la fecha los ensayos clínicos o encontrarse en las etapas finales.⁵⁵

Conjugados	Compañía	Tipo de carcinoma a tratar	Status
PEG-irinotecan	Nektar	Tumor sólido	Fase III/II
PHPMA-DACH-oxaliplatin	Access Pharmaceuticals	Cáncer de ovario	Fase II
PHPMA-doxorubicin	Pfizer	Cáncer de mama, pulmón y colorectal	Fase II
Cyclodextrin-camptothecin	Cerulean	Tumores sólidos avanzados	Fase IIa
Polyglutamic acid-paclitaxel	Cell Therapeutics	Cáncer de pulmón y de ovario	Fase III
Polyglutamic acid-camptothecin	Cell Therapeutics	Cáncer de colon y de ovario	Fase I/II

Tabla 1. Algunos conjugados polímero-droga analizados recientemente en estudios de fase clínica⁵⁵

No se ampliará la discusión respecto a estos agentes terapéuticos, puesto que, al estar basados en compuestos orgánicos activos, escapan del objetivo central de esta investigación; no obstante, queda claro el avance que se está generando en esta rama de los polímeros terapéuticos.

En lo referente al uso de metalofármacos como componente activo del conjugado, el desarrollo se ha centrado en el empleo de complejos basados en cis-platino (II) y ferroceno orientados hacia el tratamiento anticancerígeno. Neuse y Duncan han investigado ampliamente en este campo, logrando sintetizar y caracterizar una amplia serie de conjugados con metalofármacos del grupo del platino y de ferroceno; parte de los cuales han sido evaluados *in vitro* frente a una variedad de líneas celulares con resultados positivos.^{49, 54-57}

Investigaciones recientes han conducido al desarrollo de nuevos sistemas de liberación polimérica derivados del cis-platino que se encuentran actualmente en ensayos de fase clínica. En la Tabla 2 se muestran algunos ejemplos representativos; entre ellos, merece especial atención el conjugado Prolindac por involucrar a un polímero lineal. Este sistema ha mostrado una mayor efectividad antitumoral a comparación del Oxaliplatino, un metalofármaco basado en el platino; análisis pre-clínicos en ratones indicaron que el Prolindac generó una mayor inhibición en el crecimiento tumoral, menor toxicidad hacia células sanas y ejerció una mayor distribución, de hasta 14 veces, del platino en células cancerosas. Ensayos clínicos de fase I mostraron la no toxicidad del compuesto en pacientes que presentaban tumores sólidos avanzados e incluso se logró controlar la enfermedad en pacientes que presentaban cáncer de esófago, cérvix, tiroide y melanoma. Recientemente, esta droga ha entrado a estudios de fase clínica II donde está siendo combinado con otros compuestos anticancerígenos como paclitaxel y gemcitabina hacia el tratamiento de pacientes con cáncer de ovario y colorectal; asimismo, se han programado estudios combinatorios de esta droga en China y Korea del Sur frente a otros tipos de carcinomas.⁵⁸

Sistema	Tipo de carcinoma a tratar	Tamaño aproximado del conjugado	Status
Liboplatin	Mama, gástrico	110 nm	Fase III
Aroplatin	Colorectal, mesotelioma pleural	1 μ m	Fase II
Lipoxal	Gástrico avanzado	250 nm	Fase I
ProLindac	Ovario avanzado	25 kDa	Fase II
Nanoplatin	Pancreático avanzado o metastático	30 nm	Fase II

Tabla 2. Algunos conjugados poliméricos con drogas derivadas del cis-platino recientemente analizados en estudios de fase clínica ⁵⁸

Otros compuestos metálicos unidos a vehículos poliméricos que han sido evaluados en su actividad anticancerígena son aquellos basados en cobalto y rutenio. El compuesto $\text{Co}_2(\text{CO})_8$, unido a un copolímero en bloque derivado del etilenglicol y el metacrilato de propargilo, fue analizado frente a células leucémicas mostrando una considerable disminución en la viabilidad de las mismas; sin embargo, al emplear una micela entrecruzada de estructura similar como vehículo polimérico se reportó una reducción total en su actividad terapéutica. Esta disminución se atribuye a un incremento en la dificultad de entrada del macro-compuesto al entorno intracelular por una disminución en la flexibilidad del material polimérico en el plasma. Por otra parte, las drogas anticancerígenas RAPTA-C y NAMI-A, basadas en rutenio, mostraron un notable aumento en su actividad al encontrarse enlazadas a micelas hidrosolubles. El RAPTA-C, en combinación con el ácido poliláctico, experimentó un aumento de 20 veces en su eficiencia respecto al valor del IC_{50} de la droga no unida al polímero. Asimismo, la NAMI-A mostró una mejora en su potencial antimetastático por unión a un vehículo polimérico vía un grupo imidazol. ⁵⁹

En contraste a los avances antes mencionados con otros metalofármacos de conocida actividad antitumoral, el desarrollo de conjugados poliméricos de vanadio, como potenciales agentes terapéuticos, se encuentra aún en su etapa

inicial. De particular interés para este proyecto, resultan aquellas investigaciones relacionadas con el diseño, síntesis, caracterización y eventual evaluación de la efectividad terapéutica de conjugados vanadilo de polímeros naturales, naturales derivatizados y sintéticos que presenten grupos ligantes carboxílicos. Entre los naturales, se pueden citar los complejos vanadilo/quitosano y vanadilo/hialuronato sintetizados y caracterizados por Baran y Kawashima.⁶⁰⁻⁶³ Asimismo, Kremer y colaboradores prepararon recientemente complejos poliméricos de vanadio (IV) y (V) empleando macromoléculas aniónicas derivadas de la celulosa. Estos compuestos fueron analizados en su capacidad para liberar la especie activa bajo condiciones fisiológicas y se encontró una interesante dependencia de la misma con el pH del medio que propiciaría una liberación selectiva en el intestino.⁶⁴ Por otro lado, Sakurai y colaboradores obtuvieron el conjugado vanadilo-gamma-poli(ácido glutámico), el cual fue evaluado en modelos animales de diabetes mellitus (DM) tipo 1 y 2, logrando disminuir significativamente los niveles de glucosa por administración oral de soluciones del complejo. Además, se mejoraron varios parámetros relacionados con esta enfermedad y se logró comprobar una superior actividad de estos conjugados poliméricos respecto a la sal VO_2SO_4 .^{7,8} Asimismo, Zhang y colaboradores sintetizaron conjugados vanadilo de carragenina y quitosano carboximetilados, los cuales mostraron cierta actividad hipoglicemiante *in vivo* hacia la DM-2.⁹

Los únicos sistemas poliméricos de liberación controlada de vanadio que han sido evaluados en su actividad antitumoral son el conjugado Xiloglucan oxovanadio (IV) y poli-[ϵ]-caprolactona-bis(maltolato)oxovanadio (IV) (Figura 8). El primero fue desarrollado por Noletto y colaboradores y participó en un análisis *in vitro* hacia células B16F10 (melanoma). El conjugado polimérico logró reducir la viabilidad y proliferación de las células en un 50% luego de 72 horas de evaluación, este efecto es atribuido a la inhibición en la toma de oxígeno celular por acción del complejo; asimismo, las células afectadas mostraron una reducción en la expresión de la enzima piruvato quinasa y una disminución en la subunidad F1 de la ATP sintasa. El segundo agente fue sintetizado por Burt y colaboradores; éste se analizó en ratones que presentaban un linfosarcoma altamente metastático (MDAY-D2) logrando inhibir su crecimiento hasta en un 80%.

Asimismo, se confirmó que el empleo de estos compuestos no generó efectos tóxicos como en el caso de la administración del BMOV que requería de dosis continuas y muy concentradas en el organismo. Pese a que este último ejemplo se basa en el empleo de una matriz polimérica y no un conjugado polímero-droga, su actividad muestra la efectividad del uso de los vehículos poliméricos hacia el desarrollo de agentes terapéuticos más efectivos.^{65, 66}

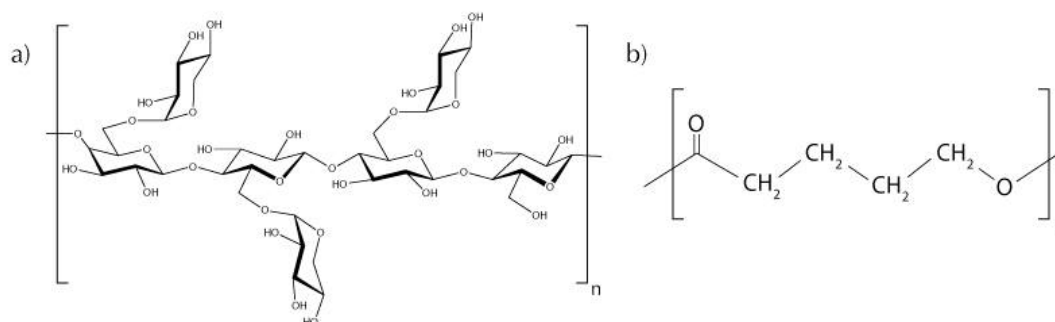


Figura 8. Estructura de los sistemas poliméricos a) xiloglucan y b) poli-[ε]-caprolactona

En base a los antecedentes presentados, se puede concluir que el uso de la tecnología polimérica es capaz de mejorar considerablemente la actividad terapéutica de distintos metales en el ser humano, no obstante, el estudio en este campo es ínfimo, por lo cual resulta de gran relevancia el realizar una mayor cantidad de experimentos que permitan ampliar la cantidad de información pertinente en esta área fomentando su desarrollo hacia el tratamiento del ser humano.

2.4. Diseño y síntesis del conjugado poliaspartamida-vanadilo

2.4.1. Diseño

En trabajos previos de nuestro grupo de investigación, se logró sintetizar dos conjugados poliméricos de vanadio con ligandos macromoleculares que compartían diversos aspectos estructurales que les brindaban propiedades especiales. En el Proyecto DGI 2010-0071 que culminó en una tesis de maestría se usó como ligando polimérico al ácido poliaspártico.^{10,67} En el posterior proyecto DGI 2010-0205, que culminó en una tesis de licenciatura, se sintetizó un ligando poliaspartamida derivatizado con un diseño mejorado respecto al del proyecto anterior, manteniendo la cadena principal poliaspartamida pero con la inclusión de cadenas laterales que contenían espaciadores y grupos carboxílicos terminales.^{11,68}

Nuestra actual propuesta contempla la síntesis de un nuevo conjugado de oxovanadio (IV) en que el ligando polimérico, poli(alfa,beta-D,L[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-(carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]-co-[2-(hidroxietil)-aspartamida-], (PASP-DC-MC-MH), contiene, además de las cadenas laterales con grupos ligantes dicarboxílicos (función ligante) y monocarboxílicos (función ligante/solubilizante), cadenas laterales adicionales con grupos hidroxilos terminales que cumplen una función exclusivamente solubilizante. El nuevo ligando polimérico PASP-DC-MC-MH cumple así con el diseño básico de un transportador polimérico (Figura 9).

La conveniencia de mantener la cadena principal poliaspartamida obedece a varios factores: 1) Facilidad de síntesis y derivatización del polímero polisuccinimida precursor, 2) Versatilidad en la introducción de cadenas laterales de diferente longitud y con diferentes grupos funcionales terminales (ligantes, solubilizantes y eventualmente sitio específicos) mediante reacciones orgánicas usuales con diversos nucleófilos, 3) Alta solubilidad por la flexibilidad de la cadena principal reforzada por la presencia de grupos solubilizantes, 4) Biodegradabilidad por ruptura enzimática lenta y controlada de los enlaces peptídicos presentes, mínima en los fluidos corporales (pH aprox. 7.5) y favorecida en el espacio intracelular (pH aprox. 5).⁵

Asimismo, el hecho que se trate de una poliaspartamida sintética, la alfa,beta-DL, la hace resistente a la degradación por actividad de la alfa-peptidasa en el plasma sanguíneo, enzima selectiva hacia los grupos CH con conformación L y unidades alfa-péptido.⁵

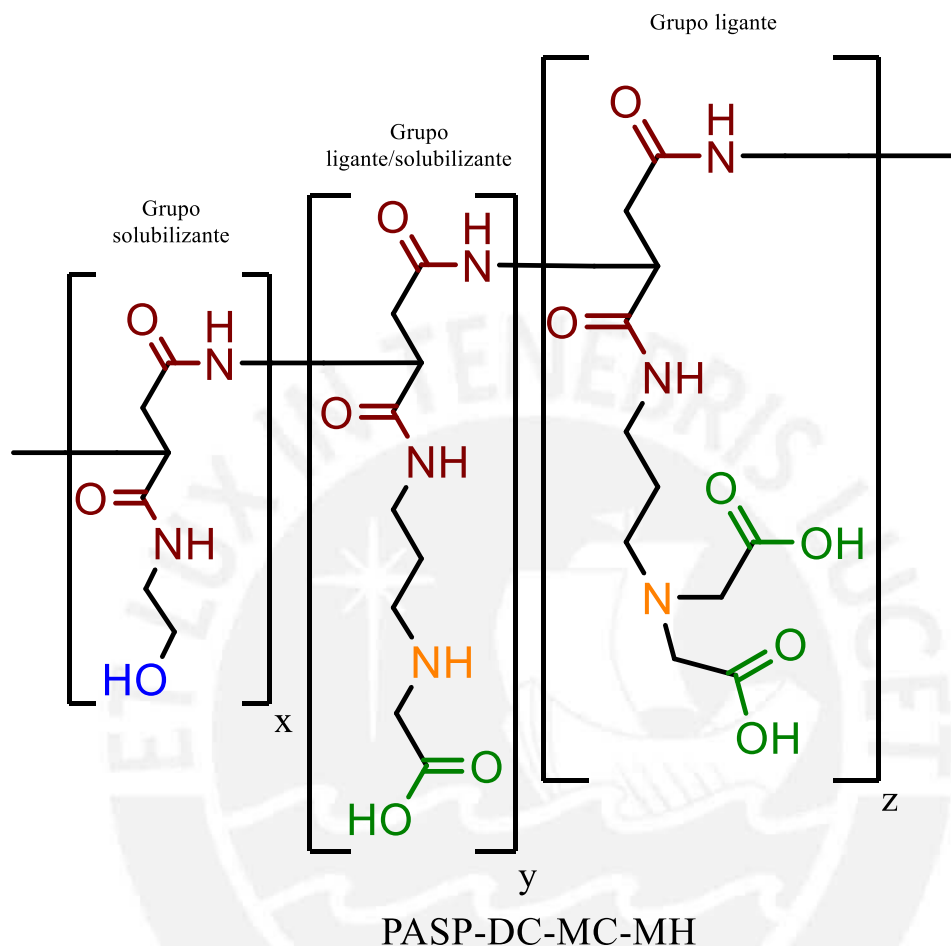


Figura 9. Estructura química del vehículo polimérico PASP-DC-MC-MH

Además, su origen no natural permite un control adecuado de su peso molecular.⁴⁵ Esto último permitió que, en el trabajo de tesis de licenciatura antes mencionado, se pudieran determinar las condiciones apropiadas para obtener una poliaspartamida derivatizada dentro del rango de peso molecular adecuado (25-50 kDa).¹¹ Dichas consideraciones servirán de referencia para la síntesis del nuevo conjugado. Por otro lado, Paolino y colaboradores realizaron ensayos en conjugados derivados de la poliaspartamida, sus resultados mostraron la tendencia del compuesto a concentrarse en tejido óseo, una característica adicional que puede llegar a ser de utilidad para su uso como un posible agente terapéutico.^{46,55}

La introducción de espaciadores en las cadenas laterales, entre los grupos funcionales terminales y la cadena principal, es recomendable. Trouet y colaboradores demostraron la influencia de la naturaleza y longitud de un espaciador sobre el grado de liberación enzimática y consiguiente efectividad terapéutica de un conjugado de la droga anticancerígena daunorubicina unida covalentemente, vía un espaciador peptídico de longitud variable, a un portador albúmina. En ausencia de espaciador, el conjugado resultó completamente resistente a hidrólisis enzimática, la liberación del agente activo aumentó ligeramente con el dipéptido (8%) y se optimizó (60-75%) en el tri y tetrapéptido. Estos últimos, mostraron una mayor eficacia quimioterapéutica in vivo frente a un tipo particular de leucemia.⁶⁹ Sin embargo, una excesiva longitud de la cadena tiene un efecto contraproducente.⁵⁷ El vehículo polimérico propuesto, PASP-DC-MC-MH, contiene espaciadores de tres miembros para los grupos ligantes mono y dicarboxílicos, lo que al distanciarlos de la cadena principal y a la vez aumentar la flexibilidad de las cadenas laterales, facilita la coordinación inicial y liberación posterior del oxovanadio (IV). La presencia de espaciadores no es requerida para los grupos solubilizantes, por lo cual se ha escogido un espaciador de solo dos miembros que evita la introducción de hidrofobicidad por el uso de cadenas alquílicas más largas.

En la selección del vehículo polimérico, otro factor importante a considerar es la capacidad ligante del mismo hacia el agente activo. En nuestro caso, este es el catión VO^{2+} , el cual, por su naturaleza de ácido duro, posee una gran afinidad por el oxígeno (base dura) y forma un enlace V-O particularmente fuerte con los grupos carboxílicos; esto permite que el polímero ejerza de modo eficaz su efecto estabilizante y protector hacia la droga. Por otro lado, el uso de grupos ligantes dicarboxilados en PASP-DC-MC-MH genera anillos quelatos más pequeños (8 miembros) por coordinación al metal, que aquellos formados por los grupos monocarboxilados más distantes entre sí. La ventaja de los primeros es que presentan una mayor estabilidad y tienden a permanecer íntegros en el plasma sanguíneo, mientras que los monodentados presentan una pobre estabilidad hidrolítica y conducen a una liberación prematura del agente activo.^{49, 56}

El incorporar un segundo tipo de cadena lateral provista de grupos hidroxilo terminales en el nuevo vehículo polimérico con una función exclusivamente

solubilizante permitirá obtener un polímero más soluble en medio acuoso con la capacidad de resolver algunos inconvenientes observados en la síntesis de complejos poliméricos de vanadio; estas serán discutidas en la siguiente sección. Al respecto, cabe mencionar el desarrollo de algunos conjugados poliméricos vanadilo de origen natural y/o sintético que presentan ambos grupos funcionales (OH y COOH) donde, incluso a pH's altos, se observa una complejación selectiva de los grupos carboxilos.^{9,60,70}

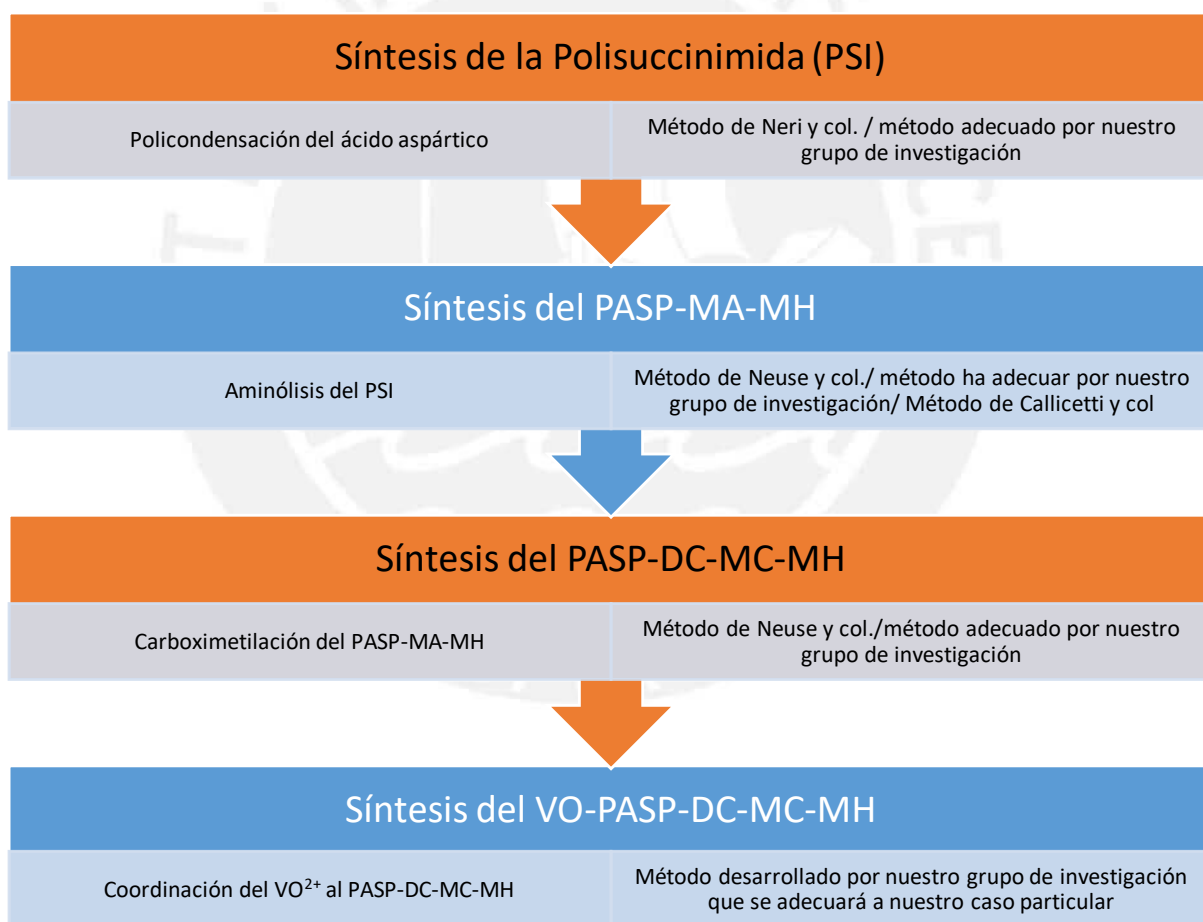
En lo que respecta a la posible efectividad del nuevo complejo polimérico en un estudio posterior de su actividad anticancerígena, esta se vería favorecida por la naturaleza macro-molecular del vehículo polimérico que permitiría el almacenamiento selectivo de los conjugados en tejidos cancerígenos gracias al antes mencionado efecto EPR. Asimismo, esta acumulación reduciría la posibilidad de toxicidad del vanadilo en el organismo puesto que la acción terapéutica ocurriría predominantemente en el tejido dañado.^{51,52,53}

Por otro lado, la superior hidrosolubilidad del complejo, gracias al uso de cadenas laterales hidroxilo y una cadena principal flexible de poliaspartamida, facilitaría la entrada del conjugado al ambiente intracelular mediante el conocido mecanismo de pinocitosis, mucho más efectivo que el de difusión pasiva, característico en compuestos de bajo peso molecular. Este mecanismo, además de aumentar su potencial terapéutico, sería capaz de resolver, en algunos casos, los problemas derivados de la resistencia inducida a una droga, discutidos en el acápite anterior.^{5,48}

Finalmente, el uso de agentes ligantes dicarboxílicos evitaría una liberación prematura del agente activo durante el tránsito del conjugado por el sistema sanguíneo del organismo. Esto se debe a que la liberación del vanadio solamente podría ocurrir a un pH ácido inferior a 5, característico del entorno lisosómico o mediante la acción de proteínas intracelulares, mientras que en el plasma este se mantiene en un valor de 7.2, muy básico para inducir una separación por protonación del grupo carboxilato.⁵

2.4.2. Síntesis y caracterización

El presente trabajo propone el diseño, síntesis y determinación estructural de un complejo oxovanadio (IV) con el ligando polimérico poli-(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-(carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]-co-[(2-Hidroxietil)-aspartamida]) (PASP-DC-MC-MH), el cual fue sintetizado por la carboximetilación del poli-(α,β -D,L-[N-(3-aminopropil)-aspartamida]-co-[2-(hidroxietil)-aspartamida]-] (PASP-MA-MH), que a su vez es el producto de la aminólisis secuencial de polisuccinimida (PSI) con etanolamina y la 1,3-propanodiamina. A continuación se presenta el esquema de síntesis del conjugado polimérico propuesto para la presente tesis; las siglas MH, MA, DC y MC corresponden a las secciones poliméricas con grupos funcionales mono-hidroxilados, mono-aminados, di-carboximetilados y mono-carboximetilados.



2.4.2.1. Síntesis del polímero precursor, polisuccinimida (PSI)

La síntesis de la polisuccinimida ha sido ampliamente discutida en la tesis para optar el grado de Magister en Química “Síntesis de un nuevo vehículo polimérico alfa,beta-poli(D,L-ácido aspártico) del agente activo antidiabético oxovanadio (IV)”.¹⁰ Asimismo, también se usará como guía el método ligeramente modificado empleado en la tesis para obtener el grado de Licenciatura en Química “Síntesis y caracterización de un novedoso conjugado poliaspartamida-oxovanadio (IV) como potencial metalofármaco insulino-mimético” basado en las investigaciones realizadas por Neri y colaboradores.^{11,71,72} El procedimiento de síntesis se presenta en la figura 10.

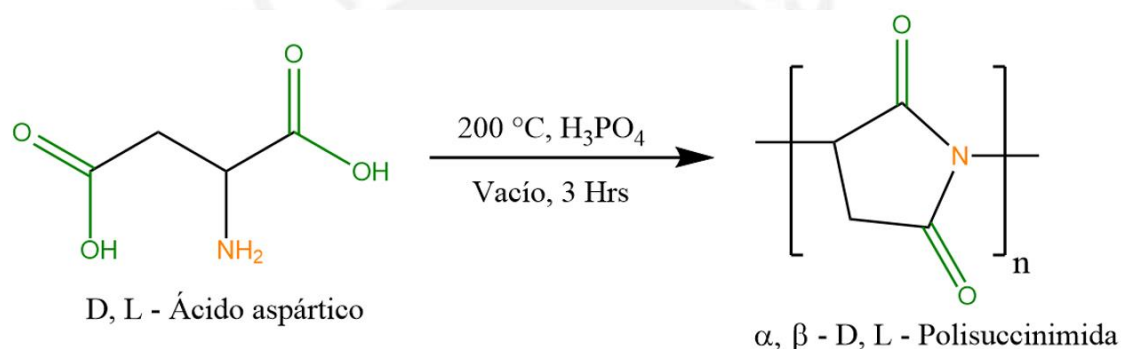


Figura 10. Síntesis del PSI a partir del D, L – Ácido aspártico

La pureza y estructura del polímero será evaluada mediante la técnica de resonancia magnética nuclear (¹H-RMN).

2.4.2.2. Determinación del peso molecular de la polisuccinimida por el método de viscosimetría capilar

Mediante el empleo de la técnica de viscosimetría capilar, es posible establecer una relación entre el peso molecular y la viscosidad intrínseca de la macromolécula. Esta última depende de diversos factores como la forma o tamaño del polímero, temperatura de medición empleada, solvente utilizado, etc.⁷³

La ecuación de Mark-Houwink (Ecuación 1) permite relacionar matemáticamente el peso molecular promedio del polímero, Mv , con la viscosidad intrínseca ($[\eta]$):

$$[\eta] = K * Mv^a \dots\dots\dots(1)$$

En donde "K" y "a" son constantes empleadas en el cálculo las cuales poseen un valor específico dependiendo del tipo de polímero a analizar, el solvente que se utiliza y la temperatura a la cual se trabaja. En el caso de la polisuccinimida, estas toman los valores de 0.0132 g/mL y de 0.76, respectivamente, a 25°C.⁷⁴ Finalmente, cabe mencionar que el empleo de esta técnica puede llegar a dar valores cercanos al peso molecular real, M_w , de la macromolécula.

2.4.2.3. Síntesis del polímero intermedio, poli-(α,β -D,L-[N-(3-aminopropil)-aspartamida])-co-[2(hidroxietil)-aspartamida] (PASP-MA-MH)

La síntesis de esta macromolécula se realizará mediante la aminólisis del anillo polisuccinimida en DMF empleando como reactivos la etanolamina y la 1,3 propanodiamina (Figura 11). La reacción propuesta se basará en los trabajos previos desarrollados por Murga, Neuse y Callisetti; ^{11, 75,76} estos serán adaptados para poder realizar una síntesis de dos pasos continuos en un mismo recipiente.

La adición de grupos laterales amino e hidroxilo al polímero inicial permitirá la posterior derivatización de la especie amina libre de la 1,3 propanodiamina, que conducirá a la introducción de los grupos carboxilato ligantes. Asimismo, las cadenas hidroxilo formadas por la reacción con etanolamina, introducirían una mayor hidrosolubilidad a la macromolécula y reducirían la posibilidad de entrecruzamiento mencionado en el acápite anterior.

Neuse ha realizado una amplia investigación en la síntesis de macromoléculas con cadenas laterales amino; entre sus principales recomendaciones resalta la necesidad de emplear espaciadores con un número de átomos de carbono mayor a uno o dos; caso contrario, en la etapa de purificación por diálisis, estas cadenas tendrían la posibilidad de generar un rompimiento hidrolítico considerable de la cadena polimérica principal.⁷⁶ La 1,3 propanodiamina posee

una cadena compuesta por tres carbonos por lo cual se evitaría el inconveniente descrito. En lo que respecta al uso de la etanolamina, esta posee un espaciador compuesto por dos carbonos; sin embargo, no se observaría la ruptura hidrolítica mencionada pues el grupo presente en esta cadena es uno hidroxilo, menos nucleofílico que el amino. Por otro lado, ambos espaciadores introducen una alta estabilidad hidrolítica en las cadenas laterales, lo que aseguraría que los grupos amido de estas últimas no se vean afectados en las reacciones y ensayos subsiguientes durante esta investigación.

Asimismo, será necesario realizar la síntesis y purificación bajo flujo de $N_2(g)$; si bien Callicetti menciona la posibilidad de efectuar la primera etapa de la síntesis en contacto con el aire, Neuse y Murga han comprobado la necesidad de emplear corriente de nitrógeno para evitar una reacción secundaria de los grupos amino terminales con el CO_2 del ambiente. Por otro lado, Neuse recomienda el empleo de un gran exceso de la 1,3 propanodiamina pues, debido a que posee 2 grupos activos, si se emplea una cantidad estequiométrica se corre el riesgo de propiciar un entrecruzamiento de cadenas principales, lo que conllevaría a la disminución en la solubilidad de la macromolécula. Finalmente, cabe mencionar que, en esta etapa de la síntesis, se prepararán copolímeros con distintas proporciones de cadenas laterales solubilizantes y ligantes con el fin de evaluar el cambio en la hidrosolubilidad y capacidad de liberación controlada producto de esta variación.

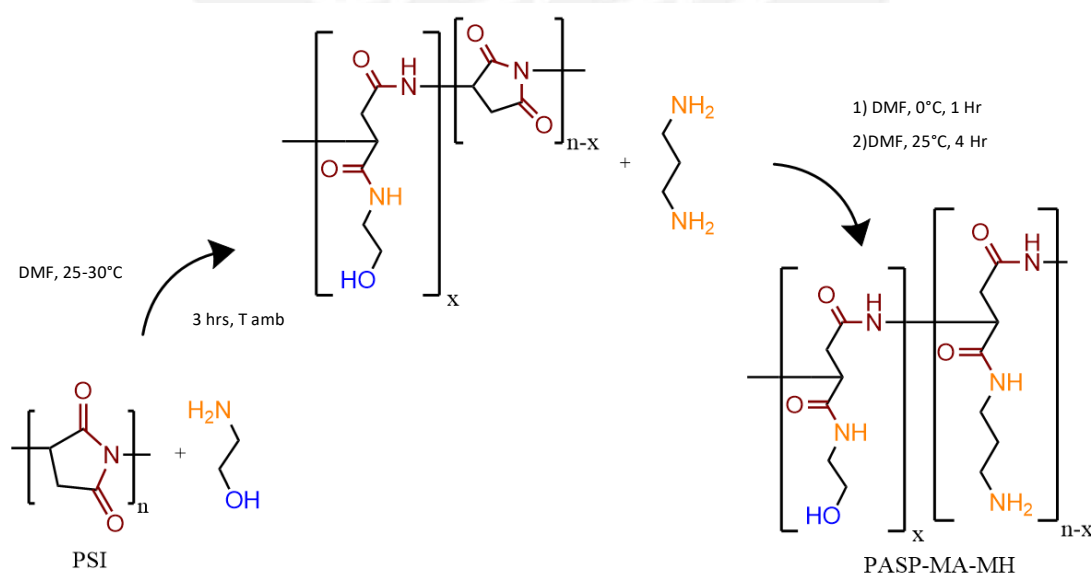


Figura 11. Síntesis del PASP-MA-MH a partir del PSI

El PASP-MA-MH será caracterizado por espectroscopía FT-IR, ¹H-RMN, COSY y HSQC.

2.4.2.4. Síntesis del polímero ligando, poli-(α,β-D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-(carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]-co-[(2-Hidroxietyl)-aspartamida]) (PASP-DC-MC-MH)

En esta etapa de la síntesis del vehículo polimérico se realizará la derivatización de los grupos amino del PASP-MA-MH siguiendo los trabajos de investigación previos de Murga y Neuse.^{11, 77} Se empleará al ácido bromoacético para realizar esta carboximetilación sin afectar al grupo hidroxilo; este se mantendrá intacto gracias a su reducido carácter nucleofílico. La derivatización permitirá obtener grupos di-carboximetilados y mono-carboximetilados; ambos con capacidad ligante al oxovanadio (IV) (Figura 12). Neuse y Murga reportan una mayor cantidad de la primera especie respecto a la segunda. Será necesario mantener el pH de la reacción entre 6 y 8 con el fin de permitir el avance de la reacción y al mismo tiempo disminuir la posibilidad de que ocurran reacciones secundarias. La macromolécula será purificada por diálisis y recuperada en su estado sólido mediante la técnica de liofilización.

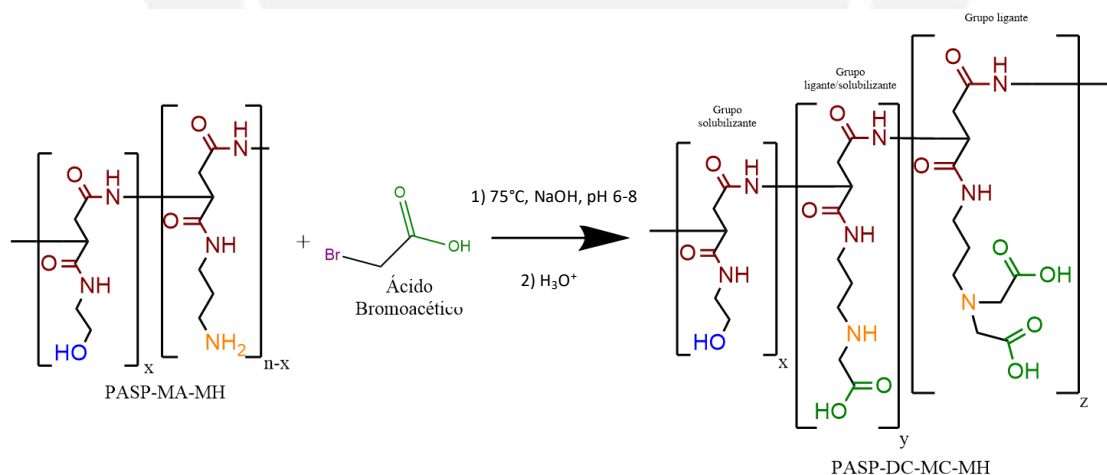


Figura 12. Síntesis del PASP-DC-MC-MH a partir del PASP-MA-MH

El PASP-DC-MC-MH será caracterizado por espectroscopía FT-IR, ¹H-RMN, COSY, HSQC y HMBC.

2.4.2.5. Síntesis del complejo polimérico Poli-(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-(carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]-co-[(2-Hidroxietyl)-aspartamida])-oxovanadio(IV) (PASP-DC-MC-MH-VO)

Las condiciones de síntesis para la unión de oxovanadio (IV) con vehículos poliméricos han sido ampliamente discutidas en el trabajo de investigación de Murga y Karmaker y col.^{11, 78} El presente proyecto utilizará como base las consideraciones de ambas investigaciones para la obtención de complejos de forma eficiente; sin embargo, será necesario introducir cambios en algunos parámetros experimentales debido a la presencia de las cadenas laterales hidroxilo extra. Como reactivos se empleará la sal $\text{VOSO}_4 \cdot \text{XH}_2\text{O}$ que reaccionará por metátesis en medio acuoso con el PASP-DC-MC-MH.

La unión del agente activo podría realizarse tanto mediante los grupos di-carboximetilados (DC) como los mono-carboximetilados (MC); no obstante, la complejación se vería más favorecida con los primeros gracias a la antes mencionada formación de un anillo quelato de ocho miembros, más estable que el anillo demasiado grande que se formaría con el mono-carboximetilado (Figura 13). Asimismo, la investigación de Murga ha reportado una mayor proporción de las cadenas DC respecto a las MC (4:1 a 2:1) la cual concuerda con los estudios realizados por Neuse. Cabe mencionar que, en esta etapa de la síntesis del conjugado, se obtendrán copolímeros con distintas cantidades de vanadio ligado con el fin de evaluar el cambio en la hidrosolubilidad y capacidad de liberación controlada producto de esta variación.

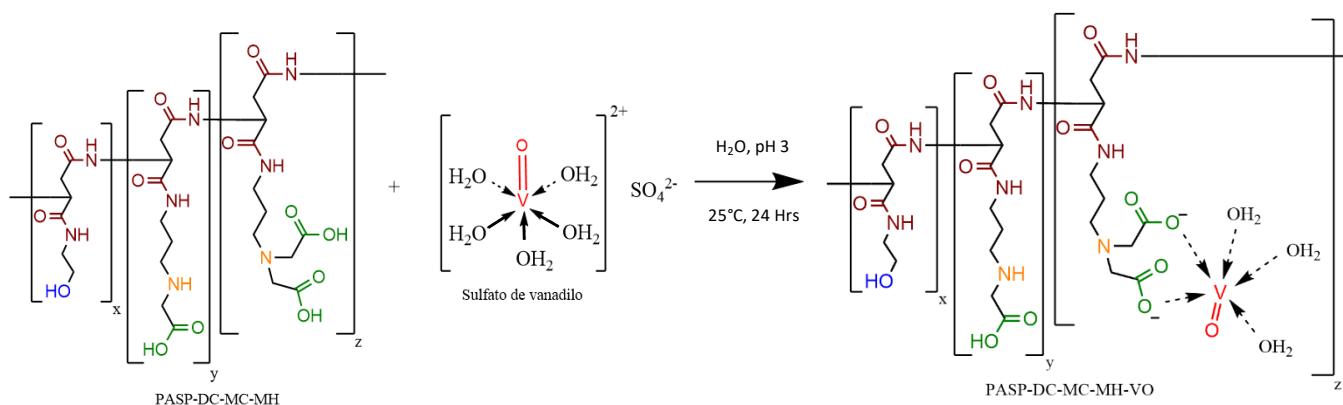
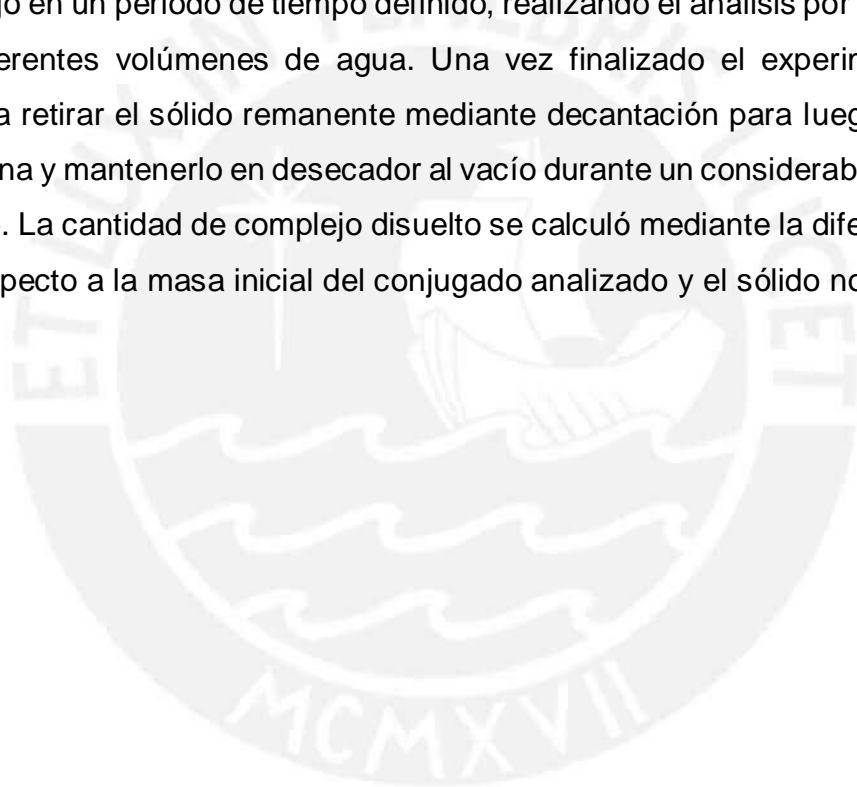


Figura 13. Síntesis del PASP-DC-MC-MH-VO a partir del PASP-DC-MC-MH

El complejo PASP-DC-MC-MH-VO será caracterizado por espectroscopía FT-IR y UV-visible, mientras que la determinación del contenido de vanadio se realizará mediante Espectroscopía de Absorción Atómica (AAS).

2.4.2.6. Determinación de la hidrosolubilidad de los compuestos poliméricos sintetizados

La solubilidad del conjugado en medio acuoso se evaluó mediante una metodología desarrollada por nuestro grupo de investigación. Se buscó disolver el complejo en un periodo de tiempo definido, realizando el análisis por duplicado y con diferentes volúmenes de agua. Una vez finalizado el experimento, se procedió a retirar el sólido remanente mediante decantación para luego secarlo con acetona y mantenerlo en desecador al vacío durante un considerable periodo de tiempo. La cantidad de complejo disuelto se calculó mediante la diferencia de pesos respecto a la masa inicial del conjugado analizado y el sólido no disuelto.



3. Problema e hipótesis de investigación

En los proyectos y tesis anteriormente mencionados de nuestro grupo de investigación, un problema recurrente durante la síntesis de los conjugados poliméricos de oxovanadio (IV) fue la formación simultánea de un complejo vanadilo insoluble, que disminuía el rendimiento del producto deseado e incluso podía convertirse en el principal. Por esta razón, resultó necesario trabajar a concentraciones muy diluidas de la macromolécula y el metal y con una proporción baja de vanadio en relación a la disponibilidad de grupos dicarboxílicos ligantes (2:1); de esta manera se logró obtener exclusivamente el conjugado hidrosoluble deseado con un alto rendimiento (92 %). Sin embargo, una vez aislados, estos conjugados iban perdiendo con el tiempo su carácter hidrosoluble, lo cual limita su potencial desarrollo como agente terapéutico.^{10,11}

La pérdida de solubilidad mencionada se ha relacionado, por un lado, con el gran número de grupos dicarboxílicos y monocarboxílicos libres en el conjugado hidrosoluble, los cuales aumentan la posibilidad de entrecruzamiento entre cadenas, vía coordinación del catión vanadilo a grupos carboxilato de diferentes cadenas. Este fenómeno, que ha sido reportado para otros conjugados poliméricos metálicos, incluso en el estado sólido y a baja temperatura,⁷⁹ conduce a una disminución de la flexibilidad del conjugado y consiguiente reducción en su solubilidad. Asimismo, la formación de zonas rígidas dentro de una misma cadena polimérica, por coordinación del vanadilo a grupos terminales carboxilato de diferentes cadenas laterales, contribuye a aumentar la rigidez del conjugado.

A partir del análisis previo, surgió la idea de insertar, además de las cadenas laterales con grupos terminales mono y dicarboxilados, otras provistas de grupos hidroxilo terminales que cumplan una función exclusivamente solubilizante y sean incapaces de coordinar al catión vanadilo bajo las condiciones requeridas para obtener un conjugado polimérico hidrosoluble y con un buen rendimiento. Este nuevo planteamiento, permitiría disminuir el entrecruzamiento y la rigidez derivados del exceso de grupos carboxilato libres. Su presencia en el vehículo polimérico dificultaría la multicoordinación del oxovanadio (IV) tanto por un factor estadístico como estérico. De esta manera, se lograría superar el problema de

la pérdida progresiva de solubilidad del conjugado una vez aislado y secado sin desmedro en su capacidad de acarreo del agente activo.

Asimismo, el conjugado polimérico propuesto en este proyecto presentaría varias ventajas en relación a los relativamente escasos trabajos publicados hasta la fecha en complejos vanadilo poliméricos.⁷⁻⁹ En primer lugar, sería hidrosoluble al estado sólido lo cual constituiría un avance respecto al complejo sintetizado por Sakurai y colaboradores, que fue preparado y evaluado en solución, por lo que solo pudo ser administrado por sondas intragástricas. La alta concentración de vanadio en el complejo sólido sería responsable de su carácter insoluble producto de un gran entrecruzamiento. A su vez, el alto rango de peso molecular de los polímeros polianiónicos utilizados en dicha investigación (500 kDa), conduciría a una eliminación renal demasiado lenta con la consiguiente acumulación del vehículo polimérico en el organismo, introduciendo toxicidad. Este inconveniente se evitaría al utilizar una cadena principal poliaspartamida, la cual, empleando condiciones de síntesis adecuadas, permitiría obtener polímeros con un peso molecular entre 25-50 kDa, óptimo para su uso en análisis clínicos. Como se mencionó en el acápite anterior, el rango propuesto permitiría obtener macromoléculas con un diámetro hidrodinámico similar al de los poros glomerulares de los riñones, permitiendo su excreción en un tiempo apropiado.^{45,55,56}

Por otra parte, el contenido de vanadio presente en el conjugado a sintetizar en este proyecto sería considerablemente mayor al obtenido por Zhang y colaboradores. La hidrosolubilidad al estado sólido de sus complejos vanadilo de polisacáridos derivatizados fue conseguida a expensas de un muy bajo contenido del metal (0,18-0,36%) para evitar el entrecruzamiento; esta limitada concentración del agente activo en el complejo explicaría su modesto efecto hipoglicemiante a comparación del logrado por Sakurai. Las características estructurales de la macromolécula propuesta en esta investigación y, en especial, la incorporación de las cadenas laterales hidroxiladas, disminuirían notablemente, la posibilidad de multicoordinación y le permitirían coordinar cantidades considerablemente superiores de oxovanadio (IV) (2-5%) a comparación del complejo macromolecular sintetizado por Zhang.⁹

De acuerdo a lo expuesto en esta sección, el presente proyecto constituiría, en primer lugar, un aporte valioso en el desarrollo de protocolos de síntesis de complejos poliméricos hidrosolubles de vanadio, de los que se encuentra poca información reportada, la que además no profundiza en los factores (concentraciones, pH, relación polímero/metal, etc) que influyen los rendimientos y pureza de estos conjugados. A su vez, el polímero sintetizado representa un aporte de interés y utilidad en la investigación de sistemas poliméricos de transporte de metalofármacos, en este caso particular, oxovanadio (IV).



4. Objetivos

4.1. Objetivo Principal:

- Sintetizar y caracterizar un complejo polimérico hidrosoluble compuesto por una poliaspartamida carboxi-hidroxilada (PASP-DC-MC-MH) ligada a oxovanadio (IV).

4.2. Objetivos Específicos:

- Sintetizar los precursores poliméricos PSI, PASP-MA-MH y PASP-DC-MC-MH.
- Determinar las mejores condiciones para obtener ligandos poliméricos que permitan producir conjugados poliméricos de hidrosolubles.
- Sintetizar al conjugado polimérico PASP-DC-MC-MH-VO.
- Determinar la cantidad adecuada de sulfato de vanadilo a utilizar y las mejores condiciones de reacción para sintetizar conjugados poliméricos de vanadilo hidrosolubles.
- Determinar el grado de hidrosolubilidad de los conjugados poliméricos de vanadilo
- Caracterizar al PSI mediante RMN y a los PASP-MA-MH y PASP-DC-MC-MH por FT-IR y RMN.
- Caracterizar al conjugado polimérico PASP-DC-MC-MH-VO por FT-IR y Uv-Vis.
- Determinar el contenido de vanadio de los complejos hidrosolubles mediante AAS.

5. Parte experimental

5.1. Equipos, materiales y reactivos

5.1.1. Equipos

Los espectros de Resonancia magnética nuclear fueron medidos en el espectrómetro Bruker Avance III-HD Ascend 500 NMR del laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de la Sección Química.

Los espectros infrarrojos fueron obtenidos mediante el espectrofotómetro FTIR-Perkin Elmer Frontier.

Los espectros ultravioleta-visible fueron medidos en un espectrofotómetro UV-visible Perkin Elmer Lambda 850

La determinación del contenido de vanadio se realizó mediante la técnica de espectroscopía de absorción atómica en llama (AAS) utilizando el espectrómetro OPTIMA 3000 DV Perkin Elmer.

La determinación cualitativa del contenido de vanadio en el PASP-DC-MC-MH se realizó mediante la técnica de Fluorescencia de rayos X utilizando el equipo portátil FRX Bruker Tracer III-SD, que cuenta con un tubo de rodio como fuente de rayos-X, detector Xflash SDD de 10 mm² y una ventana de análisis efectivo de 3 mm² de diámetro. El rango de potencial en el que puede trabajar el equipo va de 15 kV a 40 kV y el rango de corrientes va de 1,3 µA hasta 26 µA. El software utilizado para operar el espectrómetro es el Spectra ARTAX v7.4.0.0.

La liofilización de las muestras se llevó a cabo en el liofilizador Labconco, Freeze Dry System / LYPH LOCK 4.5.

En la síntesis de la polisuccinimida se usó una bomba de vacío Leybold AG, modelo DIVAC 2.2L.

El secado de la polisuccinimida tuvo lugar en una estufa Ecocell 55, modelo LSIS-B2V / EC 55.

La centrifugación de las muestras fue realizada en una centrífuga universal Kossodo PLC-012E.

La medición del peso molecular por viscosimetría capilar necesitó del termostatizador Julabo ED-5 para regular la temperatura de trabajo.

La determinación de la viscosidad de la polisuccinimida se llevó a cabo usando el viscosímetro Schott, modelo Ubbelohde Din tipo I, capacidad: 15-20 mL, longitud: 290 mm.

El secado de las muestras de complejos se realizó en un desecador al vacío y a temperatura ambiente usando una bomba de vacío KNF NEUBERGER, modelo UN 726.3 FTP.

5.1.2. Materiales

La remoción de agua residual presente en la 1,3-propanodiamina, etanolamina y N,N-dimetilformamida se logró empleando tamices moleculares de 3Å.

El gas nitrógeno (UHP) empleado como atmósfera inerte en todas las síntesis poliméricas fue obtenido de Praxair (El Callao, Perú).

El nitrógeno líquido empleado en la etapa de liofilización para la síntesis del PASP-MA-MH y el PASP-DC-MC-MH fue conseguido de AGA (El Callao, Perú).

La diálisis de los polímeros intermedio PASP-MA-MH y final PASP-DC-MC-MH se realizó a través de membranas de Spectrum Laboratories Inc., Spectra/Por® de poro 4 de 12000-14000 MWCO.

5.1.3. Reactivos y solventes

5.1.3.1. Reactivos

De J.T. Baker:

- Ácido fosfórico al 85%
- Etanolamina al 99.5%

De SigmaAldrich:

- D,L-ácido aspártico al 99%
- Sulfato de vanadilo hidratado al 97%
- Ácido bromoacético al 97%
- 1,3-propanodiamina al 99%
- Cloruro de litio al 99%
- Solución estándar de NH_4VO_3 1000 ppm

- Bromuro de potasio al 99%

De Merck:

- Ácido nítrico al 65%
- Hidróxido de sodio p.a.
- Ácido clorhídrico al 37%

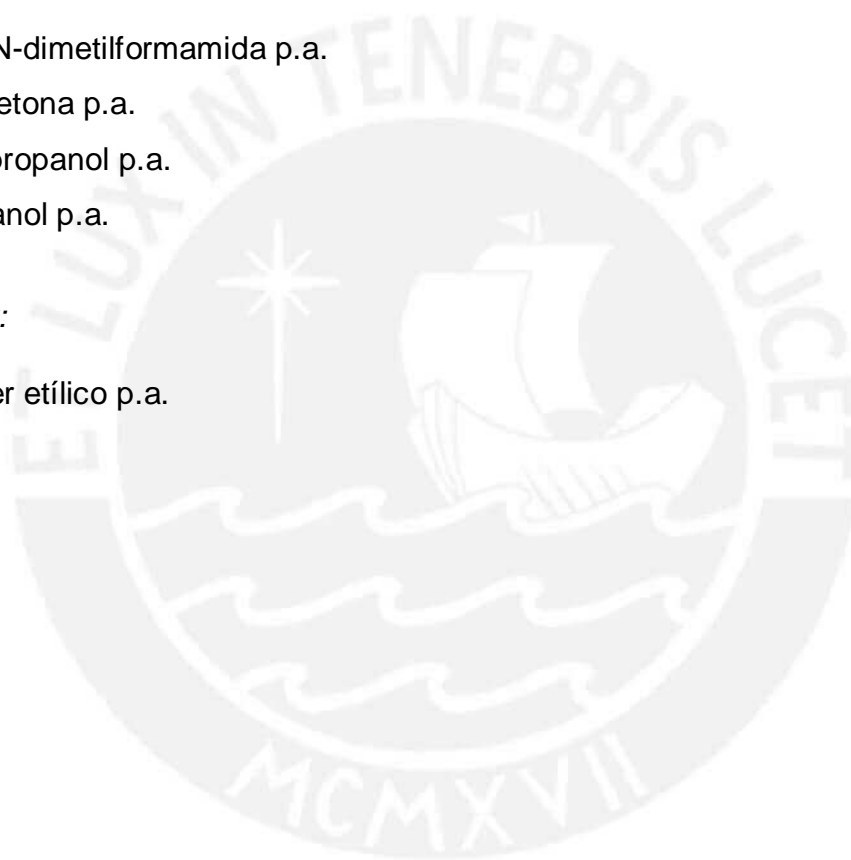
5.1.3.2. Solventes

De J.T. Baker:

- N,N-dimetilformamida p.a.
- Acetona p.a.
- 1-propanol p.a.
- Etanol p.a.

De Merck:

- Éter etílico p.a.



5.2. Metodología

5.2.1. Polisuccinimida (PSI), el polímero inicial

5.2.1.1. Síntesis

El monómero DL-ácido aspártico finamente dividido (10 g; 75,2 mmol) se mezcla completamente con ácido fosfórico 85% (5 g; 43,5 mmol) en un balón de 500 mL previamente calentado a 200°C. Luego de pasados 5 minutos de reposo, se deja reaccionar hasta completar tres horas a presión reducida (menor de 20 mmHg). Finalizado el tiempo establecido, se adiciona 100 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) al producto en caliente bajo atmósfera de N₂ y se deja bajo agitación constante a temperatura ambiente por 12 horas sellado para evitar el contacto con la atmósfera. El producto, una masa de consistencia viscosa y vítrea, debe disolverse completamente bajo estas condiciones dando una solución homogénea marrón claro. La solución resultante se vierte bajo agitación continua en un vaso de vidrio de 2 L conteniendo 500 mL de agua. El precipitado formado, blanco y de aspecto escamoso, se filtra por succión y se lava con agua hasta neutralidad (eliminando todo rastro de H₃PO₄). Una vez llegado a este punto, se vuelve a lavar el producto con 1.5 L de agua destilada para asegurar la eliminación completa de DMF. El sólido polimérico es secado a 105 °C durante 4 días.

Rendimiento: 93%

¹H-RMN (DMSO-d₆): 2.71 ppm (1H, B-CH₂); 3.22 ppm (1H, B-CH₂); 5.27 ppm (1H, A-CH).

5.2.1.2. Determinación del peso molecular por el método de viscosimetría capilar

Se preparan 500 mL de una solución de LiCl 0.1 M en DMF. Luego, en una fiola de 100 mL se prepara una solución al 1% de PSI utilizando como solvente la solución previamente mencionada. Una vez obtenida la solución polimérica al 1 %, se procede a preparar a partir de la misma y en fiolas de 25 mL, soluciones al 0.2 %, 0.4 %, 0.6 % y 0.8 % mediante extracción de 5, 10, 15 y 20 mL respectivamente; los recipientes se enrasan con la solución de LiCl.

El procedimiento a seguir para la medición de los tiempos de flujo de la solución de LiCl y de las soluciones del polímero se detalla a continuación:

- Se introduce el viscosímetro de Ubbelohde en la chaqueta con agua a 25 °C y se vierten en el mismo 25 mL de LiCl 0,1 M disuelto en DMF. Se deja reposar 10 minutos.
- Se determina el tiempo de flujo de dicha solución.
- Se retira la solución de LiCl del viscosímetro y se introduce, previo enjuague con la misma, la solución de PSI al 0.2 %. Se deja reposar 10 minutos y a continuación se determina el tiempo de flujo.
- Se repite el mismo procedimiento para las soluciones al 0,4 %, 0.6 %, 0.8 % y 1% y se toma el tiempo de flujo de cada una.

A partir de los resultados de tiempos de flujo obtenidos, se calculan las viscosidades reducidas η_{red} de cada una de las soluciones de PSI de acuerdo a la ecuación 2:

$$\eta_{red} = \frac{t-t_0}{c*t_0} \dots\dots\dots (2)$$

Donde t_0 es el tiempo de flujo (segundos) de la solución de LiCl en DMF usada como referencia, t es el tiempo de flujo (segundos) de la solución polimérica de una determinada concentración y c es la correspondiente concentración (g/mL).

Con los 5 valores de η_{red} obtenidos, se grafica η_{red} vs concentración. Se extrapolan las concentraciones a cero y del intercepto de la recta con el eje Y se obtiene el valor de la viscosidad intrínseca $[\eta]$, el cual se introduce en la ecuación de Mark-Howink (Ecuación 3) para el PSI y, despejando M_v , se obtiene el valor del peso molecular.

$$[\eta] = 1,32 \times 10^{-2} M_v^{0,76} \dots\dots\dots (3)$$

5.2.2. Poli-(α,β -D,L-[N-(3-aminopropil)-aspartamida]-co-[2-(hidroxietil)-aspartamida-]) (PASP-MA-MH), el polímero intermedio.

5.2.2.1. Síntesis de Poli- α,β -D,L-[N-(3-aminopropil)-aspartamida] (PASP-MA)

En un balón de tres bocas y de 50 mL provisto de un embudo de adición con compensación de presión, se introduce, previo cuidadoso purgado con N₂ y bajo atmósfera del mismo gas, una solución de 8,4 mL (100 mmol) de propilendiamina seca en 25 mL de DMF seco. Se burbujea dicha solución con N₂ durante 5 minutos. Por otro lado, se coloca en el embudo de adición bajo atmósfera de N₂ una solución, previamente burbujeada con N₂, de 0.97 g de PSI (10 mmol de mero) en 12.5 mL de DMF. A continuación, se enfría a 0 °C la solución de propilendiamina y se le añade gota a gota la solución de PSI en el lapso de 20-30 minutos. Una vez acabada la adición, se deja reaccionar por 15 minutos a 0 °C y luego durante 5 h a temperatura ambiente, manteniendo una agitación constante. Al cabo de este tiempo, se vierte la mezcla de reacción en 180 mL de una mezcla 1:1 de 1-propanol/éter etílico y el producto precipitado se recupera mediante filtración al vacío bajo atmósfera de N₂. Finalmente, el sólido recuperado se disuelve inmediatamente en un volumen total de 100 mL de agua saturada con N₂. A continuación se dializa con membranas de poro 4 de 12000-14000 MWCO, previamente humedecidas exterior e interiormente con agua destilada, por aproximadamente 40 h en agua saturada con N₂. Es conveniente no llenarlas demasiado puesto que se corre el riesgo de que se rompan durante el proceso. Durante las 40 h que dura la diálisis se hacen por lo menos dos cambios de agua de diálisis. Finalmente, la solución dializada se congela con N₂ líquido y se coloca en el liofilizador por 4-5 días.

Rendimiento promedio: 59 %.

¹H-RMN (D₂O) δ : 1,58 ppm (2H, D-CH₂); 2,58 ppm (2H, E-CH₂) 2,61 ppm (2H, B-CH₂); 3,14 ppm (2H, C-CH₂); 4,54 ppm (1H, A-CH)

5.2.2.2. Síntesis de Poli- α,β -D,L-[2(hidroxietyl)-aspartamida] (PASP-MH)

En un balón de dos bocas de 25 mL y provisto de un embudo con compensación de presión, se disuelve 1.0 g de PSI (10.3 mmol de mero) en 9.3 mL de DMF. Finalizada la disolución, se introduce 1.50 mL (24.8 mmol) de etanolamina en 1.3 mL de DMF. La solución de etanolamina se añade gota a gota y bajo agitación constante a la de PSI manteniendo la temperatura entre 25-26 °C. Una vez culminada la adición se deja reaccionar la mezcla hasta completar las 3 horas a temperatura ambiente y bajo agitación constante.

Finalizado el tiempo de reacción se procede a neutralizar la solución empleando ácido acético glacial. La solución polimérica resultante es trasvasada a una membrana de poro 4 de 12000-14000 MWCO, previamente humedecida exterior e interiormente con agua destilada, para efectuar la eliminación de solvente o reactivo residual mediante diálisis por 48 horas en medio acuoso realizando cambios de agua destilada cada 4 horas. Terminada la etapa de purificación se coloca la solución en tubos de centrífuga y se congela empleando nitrógeno líquido, luego se procede a liofilizar durante dos días.

Rendimiento: 86%.

$^1\text{H-RMN (D}_2\text{O)}$ δ : 2,68 ppm (2H, B-CH₂); 3,22 ppm (2H, G-CH₂) 3.52 ppm (2H, F-CH₂); 4.58 ppm (1H, A-CH)

5.2.2.3. Síntesis del Poli-(α,β -D,L-[N-(3-aminopropil)-aspartamida])-co-[2(hidroxietyl)-aspartamida] (PASP-MA-MH)

Se disuelven 1.94 g de PSI (20 mmol de mero) en 15.6 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) seco en un balón de 25 mL bajo atmósfera de N₂. Una vez acabada la disolución, se le acopla al balón un embudo de adición con compensación de presión y se vierte dentro de este una cantidad adecuada (número de mmoles necesario para formar el contenido teórico deseado de meros MH, sin usar exceso) de 2-aminoetanol seco (etanolamina) en 2.6 mL de DMF seco. En baño de agua y a temperatura ambiente se comienza la adición gota a gota de la solución de etanolamina al PSI bajo atmósfera de N₂ y agitación constante. Finalizada la adición se deja reaccionar la mezcla hasta completar las 3 horas a temperatura ambiente y bajo flujo de N₂.

Aparte, en un balón de 50 mL, se prepara previamente una solución de una cantidad adecuada (10 mmol respecto a la cantidad de mmol de PSI no reaccionado) de 1,3-propanodiamina seca en 12.6 mL de DMF seco bajo atmósfera de N₂. El recipiente se coloca en un baño de hielo y agua hasta llegar a alrededor de los 7 °C y se le acopla un embudo de adición con compensación de presión; se sella con parafilm.

Una vez finalizada la reacción con etanolamina, la solución resultante se vierte bajo atmósfera de N₂ en el embudo de adición acoplado al balón de la 1,3-propanodiamina. A continuación, se procede a añadir gota a gota (1 gota cada 6 segundos, durante una hora aproximadamente) la solución polimérica a la solución de 1,3 propanodiamina; debe cuidarse que, durante toda la adición, la temperatura del balón se mantenga en el rango de 7 a 9 °C, como máximo. Finalizada la adición, la mezcla de reacción se mantiene bajo flujo de N_{2(g)} a 7°C durante 10 minutos y luego se deja reaccionar a temperatura ambiente hasta completar 5 horas.

Una vez terminada la reacción, la solución polimérica se diluye con 100 mL de agua destilada saturada con N_{2(g)} y la mezcla se trasvasa a una membrana de poro 4 de 12000-14000 MWCO para comenzar el proceso de diálisis. Este se lleva a cabo en vasos de vidrio de 2L usando agua destilada acidificada a pH 3 (con HCl 37%). El tiempo de duración de esta etapa de purificación es de 52 horas, durante los cuales es necesario realizar cambios de agua cada 3 horas, excepto en las noches. Asimismo, se debe mantener un flujo permanente de N₂ a través del agua de diálisis, la cual debe recubrir la membrana con la solución polimérica. Antes de realizar el último cambio de diálisis se basifica la solución polimérica a pH 9-10 con solución de NaOH 5M y se procede a dializar en agua destilada a pH neutro.

Una vez culminada la etapa de purificación, la solución polimérica acuosa se deposita en tubos de centrifuga para luego congelarla empleando nitrógeno líquido. Finalmente, se procede a deshidratar el producto mediante la técnica de liofilización durante 4 días. El sólido polimérico es de aspecto esponjoso y blanco, parecido al algodón. Rendimiento: 54%

$^1\text{H-RMN (D}_2\text{O)}$ δ : 1,54-1,73 ppm (2H, D-CH₂); 2,67-2.72 ppm (2H, B-CH₂); 2,81 ppm (2H, E-CH₂); 3,20 ppm (2H, C-CH₂); 3,24 ppm (2H, F-CH₂); 3.56 ppm (2H, G-CH₂); 4.60 ppm (1H, A-CH).

$^{13}\text{C-RMN (D}_2\text{O)}$ δ : 171,72-172,58 (C=O amida); 50,59 (C_A, CH); 51,96 (C_A-hidro, CH); 36,84 (C_B, CH₂); 36,46 (C_C, CH₂); 27,64 (C_D, CH₂); 37,18 (C_E, CH₂); 41,52 (C_F, CH₂); 59,89 (C_G, CH₂).

IR (KBr): 3294 cm⁻¹ ($\nu_{\text{N-H}}$ y $\nu_{\text{O-H}}$); 1714 cm⁻¹ ($\nu_{\text{C=O}}$ COOH); 1653 cm⁻¹ ($\nu_{\text{C=O}}$ de la amida I); 1539 cm⁻¹ ($\delta_{\text{N-H}}$ de la amida II); 1063 cm⁻¹ ($\nu_{\text{O-H}}$ de grupo alcohol).

5.2.3. Poli-(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-(carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]-co-[(2-Hidroxietil)-aspartamida]) (PASP-DC-MC-MH), el polímero ligando.

5.2.3.1. Síntesis del Poli-(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-(carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]) (PASP-DC-MC)

En un balón de 25 mL de dos bocas se coloca una solución de 345 mg de PASP-MA (2 mmol de mero) en 3 mL de agua saturada con N₂. Paralelamente, se prepara una solución de ácido bromoacético (8 mmol) y NaOH (12 mmol) en 2 mL de agua también saturada en N₂. La última solución se añade lentamente a la primera y se deja reaccionar durante 1 h a temperatura ambiente, luego se aumenta a 80-85 °C y se deja bajo agitación constante por 24 horas. Durante este periodo de tiempo se controla el pH de la mezcla de reacción cada 30 minutos manteniéndolo en un rango de 8-9 empleando soluciones de NaOH o HCl según convenga. Al finalizar el tiempo predeterminado la solución se deja enfriar a temperatura ambiente y luego se acidifica la mezcla de reacción con HCl_(cc) hasta pH 0-1 y se precipita la solución resultante en 100 mL de una mezcla 1:1 de acetona/etanol. El sólido blanco es recuperado mediante la técnica de filtración por succión y se disuelve en 50 mL de agua saturada con N₂ para su posterior diálisis durante 48 horas. Durante dicho período, el agua de diálisis se cambia cada 3 horas exceptuando las noches. Finalmente, la solución dializada se congela con N₂ líquido y se liofiliza por 4 días. Rendimiento: 63%.

¹H-RMN (D₂O) δ: 1.85 ppm (2H, D-CH₂); 2.68-2.71 ppm (2H, B-CH₂); 3.21 ppm (2H, E-CH₂); 3.21 ppm (2H, C-CH₂); 3.83 ppm (2H, H'-CH₂); 3.83 ppm (2H, H-CH₂); 4.56 ppm (1H, A-CH)

5.2.3.2. Síntesis del Poli-(α,β-D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-(carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]-co-[(2-hidroxi)etil]-aspartamida]) (PASP-DC-MC-MH)

Se disuelven 345 mg del PASP-MA-MH en 3 mL de agua destilada saturada con N₂ en un balón de 25 mL a 75-80 °C. Luego se procede a añadir al recipiente una cantidad de ácido bromoacético (1.21 veces las mmoles requeridas para hacer reaccionar todas las cadenas PASP-MA dos veces) disuelto en 3 mL de agua destilada saturada con N₂ bajo agitación constante. La mezcla se deja reaccionando durante un tiempo aproximado de 12 horas manteniendo el pH entre 6-8 mediante adición de NaOH_(ac) a la temperatura previamente mencionada. Al completar el tiempo establecido, se procede a dejar reaccionando la solución toda la noche (12 horas) a temperatura ambiente y bajo agitación, realizando una previa basificación de la mezcla hasta pH 8. Al inicio de la síntesis el pH debe medirse cada 5 minutos, con el paso de las horas la variación de este parámetro se da en un intervalo de tiempo mayor.

Una vez finalizada la reacción, se procede a enfriar la mezcla en un baño de hielo y se acidifica con HCl hasta pH 1 bajo agitación constante. La solución polimérica ácida obtenida se somete a diálisis con agua destilada a través de una membrana de poro 4 de 12000-14000 MWCO para la eliminación de solventes e impurezas de bajo peso molecular. El proceso de diálisis dura un total de 48 horas y se realiza el cambio de agua cada 3 horas, exceptuando las noches. Una vez culminada la etapa de purificación, la solución polimérica acuosa se deposita en tubos de centrifuga para luego congelarla empleando nitrógeno líquido. Finalmente, se procede a deshidratar el producto mediante la técnica de liofilización durante 3-4 días. El producto sólido final es de aspecto esponjoso y blanco, parecido al algodón.

Rendimiento: 66%

¹H-RMN (D₂O) δ : 1.80-1.88 ppm (2H, D-CH₂); 2.68-2.74 ppm (2H, B-CH₂); 3.24 ppm (2H, E-CH₂); 3.24 ppm (2H, C-CH₂); 3.24 ppm (2H, F-CH₂); 3.57 ppm (2H, G-CH₂); 3.61-3.67 ppm (2H, H'-CH₂); 3.78-3.82 ppm (2H, H-CH₂); 4.61 ppm (1H, A-CH).

¹³C-RMN (D₂O) δ : 171,73-172,41 (C=O amida); 169,92 (C=O carboxílico); 50,60 (C_A y C_A-hidro, CH); 36,79 (C_B, CH₂); 36,30 (C_C, CH₂); 23,76-26,63 (C_D, CH₂); 36,79-37,97 (C_E, CH₂); 41,55 (C_F, CH₂); 59,92 (C_G, CH₂); 56,73 (C_H, CH₂); 48.63 (C_{H'}, CH₂).

IR (KBr): 3301 cm⁻¹ (ν_{N-H} y ν_{O-H}); 1717 cm⁻¹ ($\nu_{C=O}$ COOH); 1648 cm⁻¹ ($\nu_{C=O}$ de la amida I y ν_{as} COO⁻); 1542 cm⁻¹ (δ_{N-H} de la amida II); 1393 cm⁻¹ (ν_s COO⁻); 1063 cm⁻¹ (ν_{O-H} de grupo alcohol).

5.2.3.3. Determinación del contenido de bromo por el método de fluorescencia de rayos X

Se mezclan y muelen cantidades predeterminadas del PASP-MA-MH a utilizar con KBr sólido para formar pastillas con concentraciones en peso de bromo igual a 0, 1, 3, 8 y 10 %; luego de esto se prepara una pastilla del PASP-DC-MC-MH a medir sin añadir KBr. Los 6 comprimidos deben de ser lo suficientemente gruesos como para impedir el traspaso de los rayos X utilizados en la medición. Una vez terminado este proceso se realiza la medición de cada una de las muestras con el equipo portátil FRX Bruker Tracer III-SD (Tubo de rodio como fuente de rayos X, detector Xflash SDD de 10 mm², corriente de 30 uA, potencial de 40 kV, filtro 4 y sin vacío) durante un tiempo de 60 segundos a 25 °C; asimismo, es necesario realizar un análisis del fondo del equipo sin la presencia de muestra alguna.

5.2.4. Determinación de la cantidad de agua de hidratación en la sal de oxovanadio (IV) por calcinación

Se colocan tres muestras de aproximadamente 80 mg de sulfato de vanadilo (VOSO₄.xH₂O) en crisoles previamente pesados los cuales se llevan a la mufla. Luego, se aumenta la temperatura de la mufla de 25 a 200 °C y se mantiene a

esta temperatura por 20 minutos. Una vez terminado este tiempo se aumenta la temperatura de 200 a 400 °C y se mantiene por 30 minutos. Seguido de esto se vuelve a aumentar la temperatura de 400 a 600 °C y se mantiene por 30 minutos. Llegado a este punto se aumenta la temperatura de 600 a 800 °C y se mantiene a esta temperatura por 4 horas. Finalizado el tiempo de calentamiento, se dejan enfriar los crisoles dentro de la mufla hasta los 200 °C, luego se retiran y se colocan en un desecador con sílica gel, donde se dejan reposar durante toda la noche. Finalmente, los crisoles vuelven a pesarse y de acuerdo a la masa del residuo de pentóxido de vanadio (V_2O_5) se determinará el contenido de vanadio en la muestra.

5.2.5. Poli-(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-(carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]-co-[(2-hidroxietil)-aspartamida])-oxovanadio(IV) (PASP-DC-MC-MH-VO), el complejo

5.2.5.1. Síntesis del poli-(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-(carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]-co-[(2-Hidroxietil)-aspartamida])-oxovanadio(IV)

A una solución acuosa de PASP-DC-MC-MH se le agrega lentamente, gota a gota y bajo agitación constante, una solución de $VOSO_4 \cdot 3H_2O$. Se usan concentraciones y volúmenes predeterminados de ambas mezclas dentro de un rango establecido experimentalmente en cada caso. Una vez culminada la adición, se procede a verificar que el pH del medio sea de 3, caso contrario este se ajusta agregando pequeñas cantidades de NaOH o HCl en solución (con concentraciones de 0.1, 0.5 o 1M según convenga). Se deja reaccionar durante 16 horas bajo agitación constante.

Al término de la reacción se procede a verter la mezcla de reacción en acetona helada con el fin de precipitar el conjugado deseado. La relación entre los volúmenes de acetona y la mezcla de reacción necesaria para lograr una precipitación completa del complejo se determinará experimentalmente; sin embargo, esta proporción será cercana a 10/1 respectivamente.

El sólido obtenido de coloración celeste claro es separado de la mezcla mediante centrifugación e inmediatamente es lavado, empleando la misma técnica, con acetona helada. El sólido final es colocado en una placa de Petri y es secado al

vacío y a temperatura ambiente dentro de un desecador con sílica gel activada durante un mínimo de 8 horas.

5.2.5.2. Pruebas de hidrosolubilidad de los complejos poliméricos

En un vial de 5 mL se deposita una cantidad de 4.9 a 5.1 mg del complejo sintetizado, luego se le añade 0.5 mL de agua destilada a pH 7 y se deja disolver bajo agitación constante durante 0.5 horas; el volumen de agua y el tiempo para cada ensayo serán aumentados independientemente y luego en conjunto hasta un máximo de 2.5 mL y 2.5 horas. Terminado el tiempo de disolución, se extrae el sólido que haya quedado en el vial por decantación y este se trasvasa a un tubo de centrífuga de 15 mL el cual se encuentre lleno de acetona helada. Inmediatamente se procede a centrifugar el tubo durante 2 minutos a 2500 rev/min y luego se descarta la acetona hidratada. Este proceso de lavado con acetona y centrifugado se repite una vez más. Finalmente el sólido es secado al vacío durante un mínimo de 8 horas.

5.2.5.3. Determinación de Determinación del contenido de vanadio en los complejos por espectroscopía de absorción atómica en llama (AAS)

Se preparan 5 soluciones acuosas de 100 mL de 0, 3, 5, 7 y 9 ppm de V utilizando una solución estándar de NH_4VO_3 (1000 ppm de V) en agua al 6% en peso de HNO_3 . Estas serán utilizadas para obtener la curva de calibración del metal. En un vaso de precipitados se pesa entre 5 y 10 mg del complejo de oxovanadio (IV) producto de un ensayo de síntesis particular y posteriormente se añade 1 mL de ácido nítrico concentrado para luego evaporar a sequedad. Las cenizas resultantes del paso anterior se disuelven en 10 mL de una solución de ácido nítrico al 6%. Finalmente, se toma una alícuota de 1 mL de dicha disolución y se coloca en una fiola de 25 mL, se enrasa con agua destilada y las muestras son llevadas al espectrómetro de absorción atómica (Lámpara de vanadio modelo PHOTRON Perkin Elmer, Detector de estado sólido segmentado, monocromador diseño Littrow y longitud de onda de 318.4 nm) para ser analizadas. Esta medición se realiza por triplicado para cada complejo.

6. Presentación y discusión de resultados

6.1. Polisuccinimida (PSI)

6.1.1. Análisis de la síntesis

La síntesis de la Polisuccinimida ha sido realizada basándose en el procedimiento reportado por Neri y colaboradores^{71,72}. Asimismo, se ha aprovechado la experiencia en esta síntesis adquirida en dos trabajos de investigación previos de nuestro grupo de investigación los cuales concluyeron en una tesis de maestría y una de licenciatura.^{10,11}

El método de síntesis de este polímero precursor se basa en la policondensación del monómero D, L- ácido aspártico ($C_4H_7NO_4$) empleando altas temperaturas, alto vacío y ácido fosfórico (H_3PO_4) como catalizador. La reacción implica, en primera instancia, la formación de enlaces amido intermoleculares mediante el ataque del grupo amino de una molécula de ácido aspártico hacia el grupo carbonilo de otra. Luego de terminada esta etapa de unión de moléculas, ocurre una ciclación intramolecular que, en última instancia, genera los anillos succinimida.

Para realizar la policondensación del PSI se ha empleado un equipo diseñado previamente por nuestro grupo de investigación, el cual permite realizar una síntesis estática y con resultados similares a los descritos en el trabajo de Neri y colaboradores. Este último empleaba como equipo de síntesis un rotaevaporador al vacío para obtener el PSI con un rendimiento del 96 %.^{71, 72}

Neri recomienda añadir a la mezcla de reacción ácido fosfórico (H_3PO_4) como catalizador con el fin de aumentar el tamaño de las cadenas poliméricas. A su vez, menciona la necesidad de mantener la relación molar entre H_3PO_4 / $C_4H_7NO_4$ en un rango dentro de 0.6-0.8 para maximizar el peso molecular del polímero. El uso de H_3PO_4 para esta etapa es decisivo, pues permite evitar reacciones secundarias que producen rupturas de cadenas poliméricas; además, evita reacciones de desaminación que resultan ser contraproducentes para la presente síntesis.^{71, 80}

En la tabla 3 se presentan los resultados de las 10 síntesis de polisuccinimida realizadas. Cabe resaltar que el rendimiento es muy similar al reportado por Neri y colaboradores (96%) siendo las pequeñas variaciones resultado del proceso

de purificación donde una pequeña cantidad de sólido se pierde al estar fuertemente unido al papel filtro empleado.

Ensayo*	Masa del producto (g)	Rendimiento (%)	Temperatura promedio de reacción (°C)
1	7.02	96.22	175
2	6.62	90.74	180
3	6.66	91.26	195
4	6.34	86.40	200
5	6.84	93.71	200
6	6.86	94.03	200
7	6.85	93.85	200
8	6.96	95.41	203
9	7.04	96.53	203
10	6.85	93.94	200

*En todos los ensayos se empezó con 10,00 g del D,L-Ácido aspártico

Tabla 3. Resultados de las síntesis del PSI

6.1.2. Caracterización

En la tesis para optar por el grado de Magíster “*Síntesis de un nuevo vehículo polimérico alfa,beta-poli(D,L-ácido aspártico) del agente activo antidiabético oxovanadio (IV)*”, realizada por un miembro de nuestro grupo de investigación, se logró caracterizar al PSI exhaustivamente mediante espectroscopía infrarroja (IR) y de resonancia magnética nuclear (RMN).¹⁰ En lo que respecta a la última técnica, la caracterización se realizó mediante las técnicas de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, *Correlation Spectroscopy* (COSY ¹H-¹H) y *Heteronuclear Single-Quantum Correlation Spectroscopy* (HSQC ¹H-¹³C). En la presente investigación, los espectros ¹H-RMN medidos indican una buena correlación entre los polímeros obtenidos y los sintetizados en la investigación previamente descrita, por lo cual no se consideró necesario el utilizar pruebas adicionales para asegurar la pureza de la polisuccinimida.

En la figura 14 se presenta el espectro ¹H-RMN característico del PSI. En la tabla 4 se muestran las asignaciones para las señales de los hidrógenos de la polisuccinimida.

Señal	Asignación (ppm)
CH ₂ (B)	2.70
CH ₂ (B)	3.20
CH (A)	5.27

Tabla 4. Asignación de las señales del ¹H-RMN en DMSO-d⁶ del PSI

En el espectro se puede observar a 2.70 y 3.20 ppm la aparición de dos señales pertenecientes a los protones no equivalentes del grupo metileno, mientras que a 5.27 ppm se aprecia la señal perteneciente al protón metino. Por otro lado, es notoria la presencia de dos señales intensas a 2.50 y 3.36 ppm; la primera pertenece a los protones residuales del DMSO deuterado y la segunda es producto de los protones del agua remanente en el solvente mencionado.

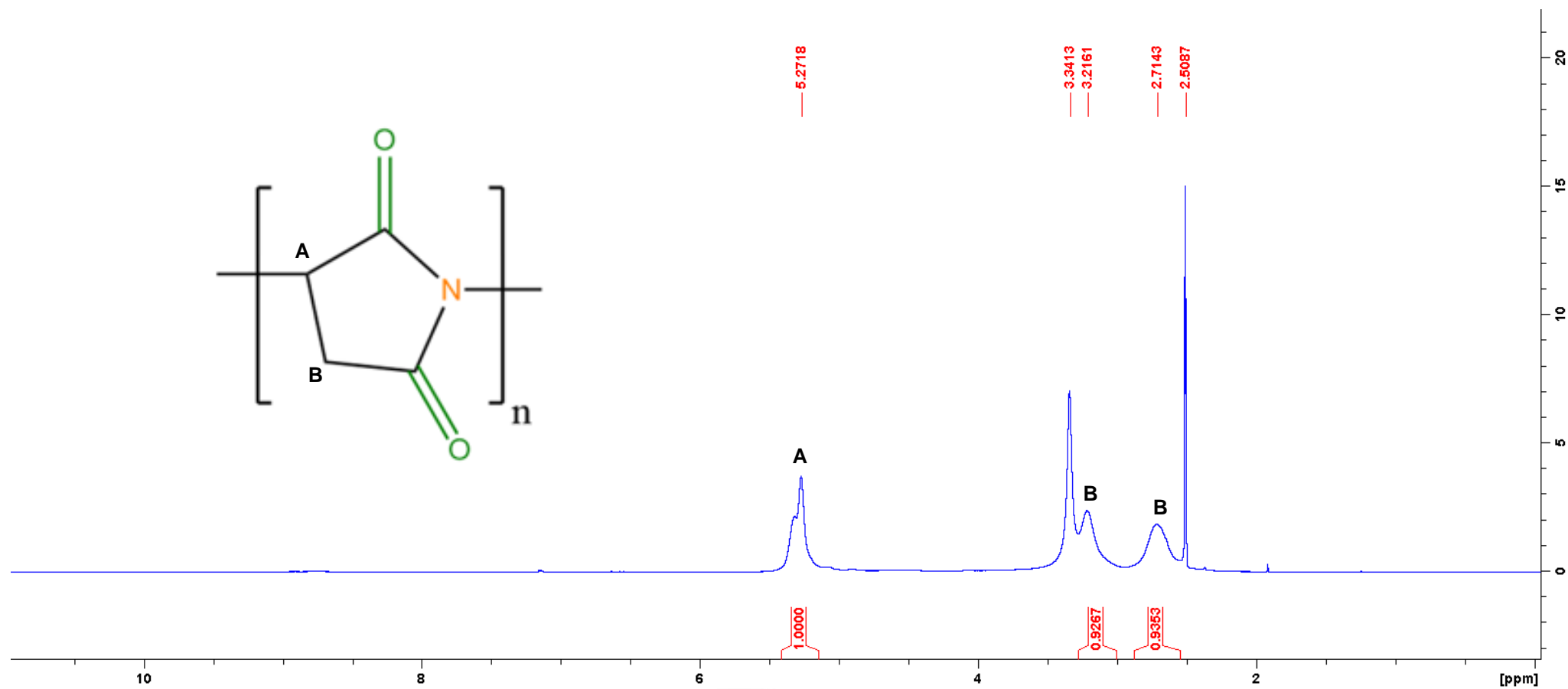


Figura 14. Espectro ¹H-RMN del PSI-7 en DMSO-d⁶.

6.1.3. Determinación del peso molecular por viscosimetría capilar

Para la evaluación del peso molecular de los PSI obtenidos en esta investigación se utilizó un viscosímetro Schott, modelo Ubbelohde. En la tabla 5 se muestran los valores de peso molecular y viscosidad intrínsecas obtenidos para los polímeros descritos en la tabla 3 del acápite 6.1.1. Como se observa, el análisis por viscosimetría ha sido realizado con R^2 's cercanos a 1; sin embargo, se ha obtenido un menor peso molecular a comparación del reportado por Neri (superior a los 100 kDa). En el anexo 1 se muestran las gráficas η_{red} vs concentración de los PSI sintetizados.

Síntesis	Ecuación de la gráfica	R^2	Tiempo de reacción promedio (Hrs)	Temperatura (°C)	Peso Molecular (kDa)
1	$\eta = 261.36 C + 26.985$	0.965	3	175	22.800
2	$\eta = 628.15 C + 25.495$	0.968	3	180	21.100
3	$\eta = 573.27 C + 38.717$	0.971	3	195	36.500
4	$\eta = 639.97 C + 38.056$	0.973	3	200	35.700
5	$\eta = 560.72 C + 42.424$	0.978	3	200	41.100
6	$\eta = 683.13 C + 43.435$	0.989	3	200	42.500
7	$\eta = 708.20 C + 41.159$	0.992	3	200	39.500
8	$\eta = 770.91 C + 41.271$	0.991	3	203	39.500
9	$\eta = 513.64 C + 43.120$	0.992	3	203	41.300
10	$\eta = 518.18 C + 41.971$	0.984	3	200	40.200

Tabla 5. Viscosidades intrínsecas y pesos moleculares de las polisuccinimidas obtenidas en las síntesis de PSI realizadas.

En el trabajo de tesis para optar por el grado de licenciatura previamente mencionado, aconteció un hecho similar. Se realizaron ensayos empleando las condiciones descritas por Neri y colaboradores (180 °C, alto vacío y 3 horas de reacción); sin embargo, se obtenían pesos moleculares menores al reportado (45 kDa en promedio). Por esta razón, Murga decidió variar la temperatura de síntesis incrementándola a 200 °C, con lo cual se llegó a sintetizar

polisuccinimidias con un peso molecular alrededor de los 50 kDa. Asimismo consideró importante asegurar la correcta aplicación de vacío a la mezcla de reacción.

Para el presente trabajo se realizó la síntesis del PSI empleando las condiciones reportadas por Neri en los ensayos 1 y 2 (tabla 5); sin embargo, se obtuvieron polímeros con pesos moleculares muy bajos (22 kDa). Es así que, en los ensayos 3 y 4 (tabla 5), se decidió trabajar a la temperatura recomendada por Murga; no obstante, si bien se incrementó el peso molecular (36 kDa), aun resultaron inferiores a los esperados.

A partir de estos resultados, se consideró necesario el modificar la temperatura y el tiempo de reacción del PSI con el fin de determinar si la variación de alguno de estos parámetros permitía aumentar el peso molecular de las macromoléculas. En la tabla 6 se muestran los resultados de las polisuccinimidias sintetizadas variando alguna de las condiciones mencionadas. Es importante aclarar que estos ensayos se realizaron antes de obtener los polímeros con mayor peso molecular (40 kDa) mostrados en la tabla 5.

Síntesis	Ecuación de la gráfica	Temperatura de reacción promedio (°C)	Tiempo (Horas)	Peso Molecular (kDa)
A	$\eta = 867.86 C + 37.045$	214	3	34.400
B	$\eta = 1214.7 C + 37.114$	215	3	35.600
C	$\eta = 531.37 C + 37.399$	203	3.5	34.600
D	$\eta = 959.14 C + 39.137$	204	3.5	36.800
E	$\eta = 988.11 C + 35.364$	200	6	32.400

Tabla 6. Pesos moleculares de las polisuccinimidias obtenidas en las síntesis de PSI realizadas variando el tiempo o la temperatura de reacción.

Los ensayos A-E mostraron que el aumento de la temperatura o el tiempo de reacción no producían alguna mejora en el peso molecular del PSI (32-36 kDa) respecto a las síntesis siguiendo las consideraciones de Murga. No obstante, durante el ensayo E se observó la presencia de pequeñas fugas en el sistema

de condensación, por lo que, luego de realizar la reparación del equipo se repitió la síntesis de la macromolécula bajo las condiciones recomendadas por Murga (PSI-5) obteniéndose un peso molecular de 40 kDa, mayor al de las polisuccinimidas previamente realizadas. Las reacciones subsiguientes permitieron concluir que al realizar la síntesis a 200 °C, durante 3 horas y empleando un equipo completamente sellado, se lograba obtener polímeros con un peso molecular cercano a los 40 kDa; no obstante, fue imposible llegar a reproducir los valores obtenidos por Murga. Se plantea que la principal razón por la cual no se llegó a obtener pesos cercanos a los 50 kDa se debió a deficiencias en el vacío generadas por un posible desgaste de la bomba empleada durante la síntesis de la polisuccinimida.

Esta idea resulta razonable al comparar los resultados obtenidos por Murga y Neri; pese a que ambos siguieron aparentemente las mismas condiciones de reacción, se observa que este último llegó a obtener cadenas con pesos moleculares de 100 kDa, el doble de lo reportado por el primero. Se propone que la diferencia en resultados se debió a que la bomba de vacío utilizada por Neri y colaboradores poseía una mayor potencia que la empleada por Murga. Cabe mencionar que en el trabajo de investigación realizado por Murga se utilizaron reactivos provenientes de las mismas fuentes que los empleados para la presente investigación; asimismo, se utilizó la misma bomba de vacío con la única diferencia en el tiempo de uso. Este último equipo tiene 8 años de trabajo continuo, por lo que resulta posible que para el presente trabajo haya ocurrido una disminución en su eficiencia respecto al tiempo en que fue utilizado por Murga.

Pese a que no ha sido posible llegar a los valores reportados por la literatura, el emplear cadenas poliméricas con un peso molecular cercano a los 40 kDa resulta adecuado para la presente investigación, en la que se busca obtener macromoléculas con un peso mínimo de 25 kDa. En este contexto, cabe resaltar que en la posterior derivatización del PSI, se introducirán cadenas laterales que incrementarán el peso molecular. En las dos etapas de síntesis siguientes que conducirán finalmente al polímero ligando, se emplearán membranas de diálisis de tamaño de poro adecuado que permitirán filtrar las macromoléculas

con bajo peso molecular, asegurando la obtención de cadenas con una longitud superior al mínimo requerido.



6.2. Poli-(α,β -D,L-[N-(3-aminopropil)-aspartamida]-co-[2-(hidroxietil)-aspartamida-]) (PASP-MA-MH)

6.2.1. Análisis de la síntesis y purificación

La síntesis del copolímero mixto PASP-MA-MH ha sido realizada basándose en los procedimientos de Neuse⁷⁶ y Caliceti⁷⁵ para los polímeros PASP-MA y PASP-MH respectivamente. También se ha utilizado como guía la experiencia previa obtenida en la síntesis del PASP-MA por C. Murga.¹¹

Como se mencionó en el acápite 2.4.2, Neuse y Murga recomiendan sintetizar el PASP-MA empleando un gran exceso de la 1,3-propanodiamina (10 moles por mol disponible de PSI), puesto que este último posee dos puntos posibles de ataque nucleofílico al PSI, lo que podría generar un entrecruzamiento de cadenas poliméricas si es que se trabaja en condiciones equimolares de reactivos. Por otro lado, mencionan la importancia de emplear una atmósfera de nitrógeno durante todo el proceso puesto que la 1,3-propanodiamina y el PASP-MA tienden a reaccionar fácilmente con el CO₂ del aire debido al carácter altamente reactivo de sus grupos amino terminales. Asimismo, enfatizan la necesidad de enfriar y mantener a 0°C la solución del compuesto diamino, antes y durante la adición de la solución polimérica a la misma, con el fin de evitar posibles reacciones de hidrólisis, ocasionadas por el medio tan básico en el que se trabaja. Con respecto a la síntesis del PASP-MH, Caliceti no reporta la necesidad de utilizar las condiciones mencionadas, puesto que la etanolamina es un agente nucleofílico moderado, mucho menos reactivo que la 1,3-propanodiamina y con un solo punto de ataque preferente al PSI. No obstante, dado que la síntesis del copolímero mixto PASP-MA-MH se llevará a cabo de manera secuencial, sin aislamiento del PSI parcialmente derivatizado, se consideró conveniente el trabajar bajo las condiciones recomendadas para el PASP-MA durante todo el proceso de síntesis y empezar por la unión de las cadenas laterales hidroxietilo a la polisuccinimida, cuyo procedimiento puede ser controlado con mayor facilidad. En este caso particular, no se utilizaría un exceso de reactivo.

En la tabla 7 se muestran las 22 síntesis del PASP-MA-MH realizadas en este trabajo de investigación. Los primeros 11 ensayos se llevaron a cabo mediante adición del PSI parcialmente derivatizado con etanolamina a la solución de la

1,3-propanodiamina a 0°C, purificación del polímero por precipitación en 100 mL de 1-propanol/éter etílico 1:1 y diálisis neutra. En las síntesis restantes se fueron introduciendo diversas modificaciones a este procedimiento inicialmente planteado, basado en una combinación de los procedimientos reportados por Neuse y Caliceti para los polímeros de referencia PASP-MA y PASP-MH. A este método inicial se hará referencia en adelante como procedimiento básico.

Como se observa en la tabla 7, los rendimientos de los 11 primeros ensayos realizados siguiendo el procedimiento básico varían según la proporción relativa de cadenas laterales mono-hidroxiladas y mono-aminadas que presenten (Desde 38% hasta 72%). Se plantea que esta diferencia tan marcada puede deberse a que las macromoléculas PASP-MA-MH con mayor proporción de cadenas laterales hidroxietiladas pueden ser parcialmente solubles en la mezcla de solventes empleada para la etapa de purificación. Esta hipótesis se reafirmaría al observar el rendimiento obtenido para los PASP-MA-MH con mayor proporción de cadenas laterales amino donde los porcentajes de recuperación son considerablemente más altos.

Por otro lado, resulta curiosa la diferencia en rendimientos obtenida para los copolímeros PASP-MA-MH sintetizados en comparación a los reportados para sus componentes, el PASP-MA por Neuse (73%) y el PASP-MH por Caliceti (86%). Sin embargo, es importante destacar que la macromolécula sintetizada en la presente investigación es un copolímero no reportado que integra ambos tipos de cadenas laterales, la del PASP-MA y el PASP-MH, por lo que no es posible establecer una comparación directa con los rendimientos de ambos componentes por separado.

Para la síntesis del copolímero PASP-MA-MH se realizaron dos modificaciones iniciales respecto al procedimiento básico las que se justificarán a continuación, y que fueron empleadas a partir de la undécima síntesis. Estas consistieron en aumentar la temperatura del baño de reacción durante la etapa de adición del PASP-MH a la diamina y eliminar la etapa de precipitación del copolímero en solventes orgánicos.

Síntesis	Proporción teórica de mero PASP-MH	PSI de partida	Moles de mero PSI utilizados ($\times 10^{-3}$)	Tiempo de reacción (horas)	Masa (g)	Rendimiento (%)
1	70%	1	10	8	0.628	37.69
2	70%	1	10	8	0.646	38.79
3	70%	1	10	8	0.697	41.81
4	70%	1	10	8	0.719	43.12
5	50%	1	10	8	0.980	58.46
6	50%	1	10	8	0.958	57.12
7	50%	2	10	8	0.956	57.04
8	50%	2	10	8	0.963	57.41
9	40%	2	10	8	1.009	59.00
10	40%	2	10	8	1.042	60.96
11	40%	2	10	8	1.151	67.31
12	50%	5	10	9	0.913	55.43
13	50%	5	10	9	0.781	47.43
14	70%	5	10	9	0.843	51.93
15	70%	5	10	9	0.770	47.47
16	50%	6	10	8	0.875	53.17
17	40%	6	10	8	0.950	57.24
18°	50%	6	10	8	0.771	46.77
19	50%	6	10	8	0.949	57.48
20	70%	7	20	8	1.931	59.38
21	50%	7	20	8	2.378	72.31
22	40%	7	20	8	2.127	63.86

° Se registraron pequeñas pérdidas del producto durante el proceso de purificación

Tabla 7. Resultados de la síntesis del PASP-MA-MH

En los primeros once ensayos realizados para obtener al PASP-MA-MH usando el procedimiento básico se observó la precipitación de un sólido blanco durante el proceso de adición del PASP-MH a la 1,3-propanodiamina en DMF a 0 °C. Esta observación no resultó importante para el caso de las macromoléculas con mayor proporción de cadenas laterales amino ($\geq 50\%$) pues el sólido se disolvía rápidamente al llevarlo a temperatura ambiente una vez finalizada la adición. Sin

embargo, para los polímeros con menores proporciones de dichas cadenas, se formaba un sólido gelatinoso que se mantenía estable durante todo el procedimiento, disolviéndose únicamente en agua y mediante agitación durante varias horas, una vez finalizada la reacción. Esta fracción se llevaba directamente a diálisis sin previa precipitación con la mezcla de propanol/éter. Se cree que el sólido en cuestión podría estar constituido por cadenas de PASP-MA-MH que, al encontrarse en solución no acuosa (DMF), formarían una micela en donde las cadenas laterales hidrofílicas constituirían el núcleo al interactuar entre sí vía enlaces de hidrógeno, mientras que las cadenas principales, más afines al solvente, formarían la superficie externa. Este problema no se observa en la síntesis de los copolímeros con mayor proporción de grupos amino terminales, puesto que los enlaces de hidrógeno entre estos últimos no son tan fuertes como aquellos que se dan entre grupos hidroxilo.

Con el fin de evitar esta complicación, se introdujo la primera modificación con respecto al procedimiento básico usado en las primeras once síntesis que consistió en aumentar la temperatura de adición a 7 °C y controlar que el proceso de adición fuese lo más lento posible. El aumento de temperatura incrementaría la movilidad de las cadenas poliméricas, mientras que una adición lenta evitaría la acumulación local de dichas cadenas; ambos factores dificultarían la interacción entre grupos hidroxilo que propicia la formación de las micelas.

En lo que respecta a la segunda modificación, Murga y Neuse utilizan un método de purificación para el PASP-MA basado en una primera precipitación de dicho polímero, disuelto en DMF, con una mezcla 1:1 propanol/éter seguida de un posterior lavado con dichos solventes. Murga menciona la ineficiencia de esta metodología, dado que involucra varios pasos de centrifugación y la naturaleza pegajosa que adquiere el producto en contacto con la humedad del aire dificulta su extracción; esto complica el procedimiento y genera significativas pérdidas en el rendimiento. En la presente investigación, como se mencionó previamente, la presencia de meros PASP-MH además de los PASP-MA en el copolímero sintetizado, le otorga cierta solubilidad frente a la mezcla de solventes utilizada para la precipitación del mismo; lo que influiría también en el bajo rendimiento de la macromolécula. Por otro lado, el procedimiento reportado por los autores involucra una exposición del copolímero al CO₂ del ambiente, lo que podría

favorecer una reacción de carbamatación de los grupos amino. Es por estas razones que se decidió eliminar la etapa de purificación por precipitación, y se eligió el dializar directamente la solución polimérica con agua destilada saturada de N₂. Esta última metodología ha sido empleada por Caliceti y en la síntesis de otras macromoléculas con buenos resultados.^{73, 76}

El aumento en la temperatura de adición de la solución polimérica a la 1,3-propanodiamina y la eliminación de la etapa de purificación mediante la precipitación de los PASP-MA-MH en una mezcla 1:1 de propanol/éter, permitieron facilitar la síntesis de los copolímeros posteriores a los realizados con el procedimiento básico. La primera variación eliminó completamente el problema de aparición de un sólido insoluble durante la etapa del PASP-MA, mientras que la diálisis directa permitió emplear menos solventes y simplificar la etapa de purificación del copolímero PASP-MA-MH. Asimismo, esta última modificación logró incrementar el rendimiento promedio para los PASP-MA-MH con menor proporción de meros PASP-MA (de 40% a 50%). Finalmente, el análisis por ¹H-RMN de todos los copolímeros PASP-MA-MH sintetizados permitió concluir que las dos variaciones mencionadas no generaron diferencias en la pureza de las macromoléculas ni en la proporción de meros PASP-MA y PASP-MH.

6.2.2. Caracterización

Para facilitar la caracterización por RMN e FT-IR del copolímero PASP-MA-MH se preparó, siguiendo los procedimientos reportados por Murga y Caliceti, los polímeros constituyentes PASP-MA-1 y PASP-MH-1.^{11, 76} En las figuras 15 y 16 se muestran los espectros ¹H-RMN de los productos obtenidos; en la tabla 8 se presenta las asignaciones de los hidrógenos y el rendimiento obtenido para cada macromolécula.

PASP-MA-1			
PSI de partida	Peso (g) / Rendimiento (%)	Señal	Asignación (ppm)
10	1.02 / 59	CH ₂ (D)	1.58
		CH ₂ (B)	2.61
		CH ₂ (E)	2.58
		CH ₂ (C)	3.13
		CH (A)	4.54
PASP-MH-1			
PSI de partida	Peso (g) / Rendimiento (%)	Señal	Asignación (ppm)
10	4.21 / 86	CH ₂ (B)	2.67
		CH ₂ (G)	3.22
		CH ₂ (F)	3.52
		CH (A)	4.58

Tabla 8. Rendimiento y asignación de las señales del ¹H-RMN en D₂O del PASP-MA-1 y el PASP-MH-1 obtenidos experimentalmente.

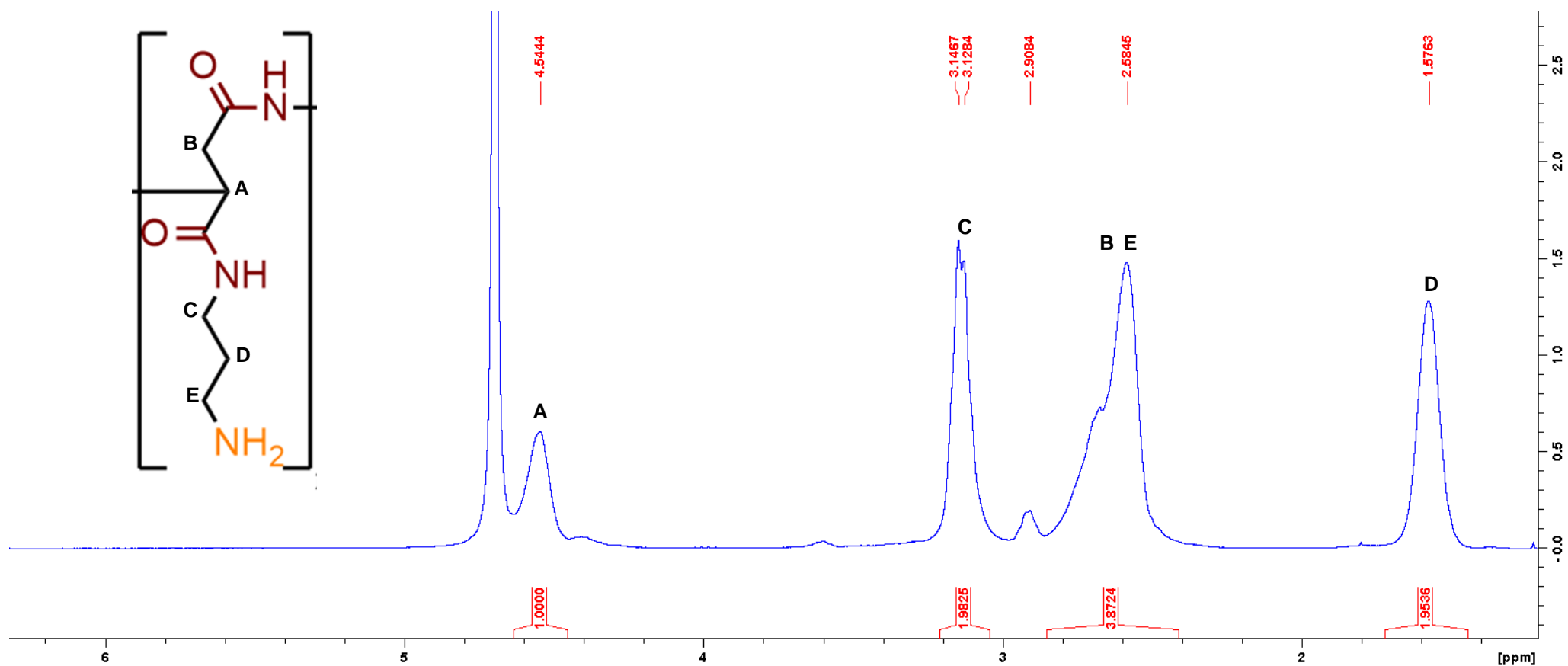


Figura 15. Espectro $^1\text{H-RMN}$ del PASP-MA-1 en D_2O a 25°C

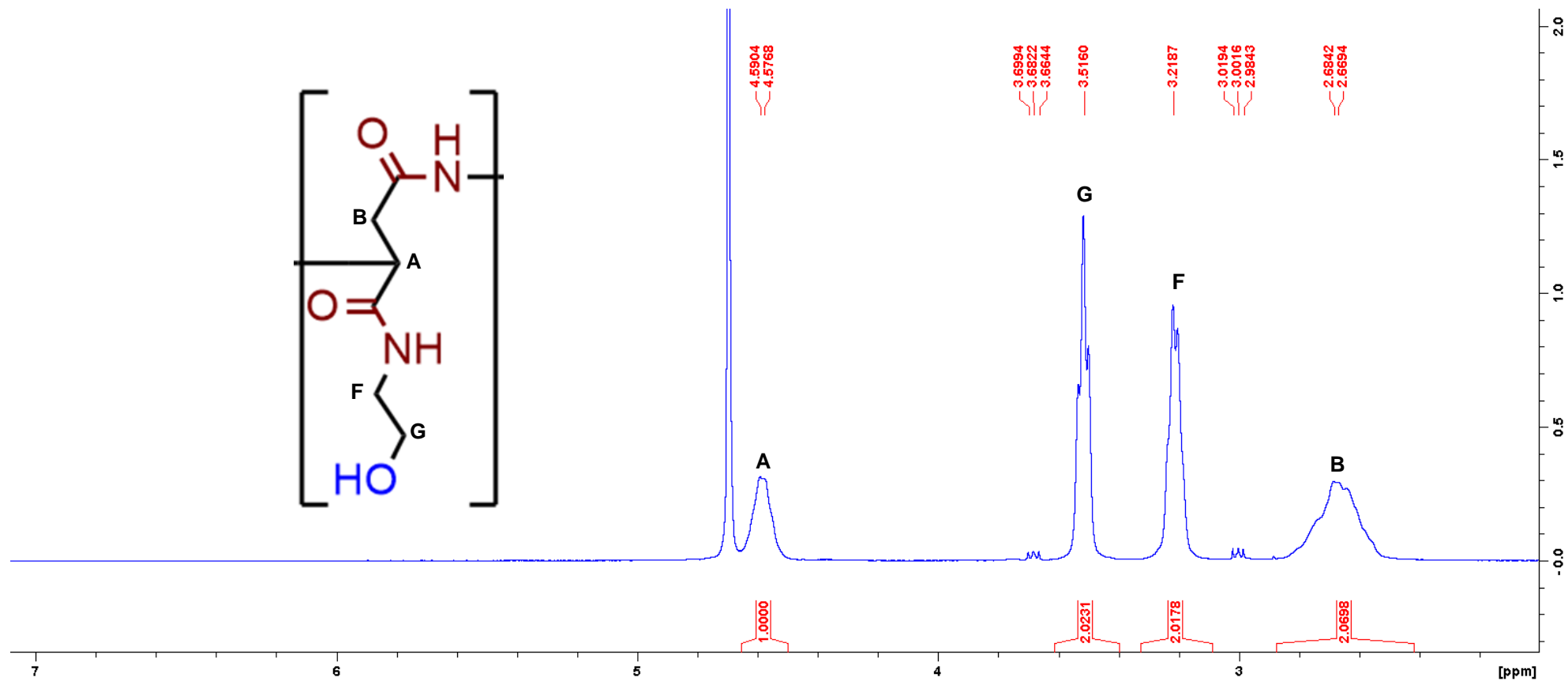


Figura 16. Espectro ¹H-RMN del PASP-MH-1 en D₂O a 25°C

Ambas síntesis muestran un buen rendimiento, en el caso del PASP-MH-1 el valor obtenido es el mismo que el reportado por Caliceti (86%); sin embargo, en el PASP-MA-1 no se logra alcanzar el rendimiento reportado por Neuse (73%), pero si un valor superior al de Murga (53%). El desplazamiento químico de los hidrógenos en ambos espectros $^1\text{H-RMN}$ concuerda con lo reportado. En lo que respecta a la pureza de las macromoléculas, el PASP-MA-1 no muestra señales pertenecientes a los reactivos empleados (PSI y 1,3-propanodiamina); no obstante, si se observa una pequeña señal a 2.91 ppm, no asignable al polímero, y que también ha sido reportada por Murga, la cual no es considerada para el análisis. En el caso del PASP-MH-1 es notable la presencia de dos pequeñas integrales a 3.00 y 3.68 ppm, las que provienen de la etanolamina residual que ha quedado atrapada en el polímero; sin embargo, su mínima proporción permite asumir que el producto se encuentra básicamente puro. En los anexos 2 y 3 se muestran los espectros IR del PASP-MA-1 y PASP-MH-1, se observa que cada uno presenta las bandas características reportadas en la literatura.^{71, 76}

En las figuras 17, 18 y 19 se muestran los espectros $^1\text{H-RMN}$ representativos de los copolímeros PASP-MA-MH con diferente proporción de cadenas laterales sintetizados con la metodología propuesta por la presente investigación. En las tablas 9, 10 y 11 se muestran los desplazamientos químicos asignados para cada hidrógeno de los tres tipos de copolímeros obtenidos. En las figuras 20, 21 y 22 se muestran los espectros IR representativos para los tres tipos de PASP-MA-MH mencionados.

PASP-MA-MH-20	
Señal	Asignación (ppm)
CH (A)	4.61
CH ₂ (B) y (E)	2.66*
CH ₂ (C)	3.17
CH ₂ (D)	1.63
CH ₂ (F)	3.25
CH ₂ (G)	3.56

*Solapamiento entre hidrógenos B y E

Tabla 9. Asignación de las señales del espectro $^1\text{H-RMN}$ en D_2O del PASP-MA-MH-20 (70% mero PASP-MH teórico) a 25°C

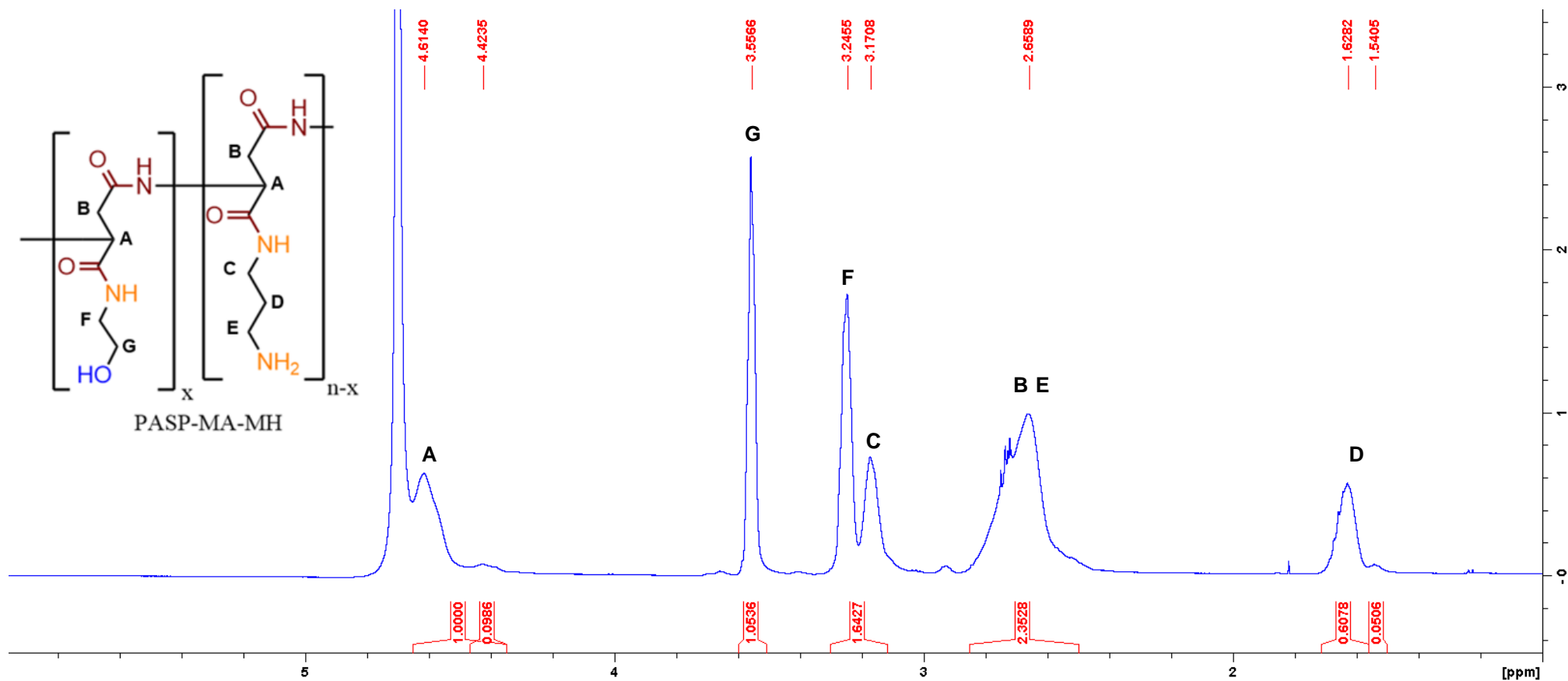


Figura 17. Espectro ¹H-RMN del PASP-MA-MH-20 (70% mero teórico PASP-MH) en D₂O a 25 °

PASP-MA-MH-21	
Señal	Asignación (ppm)
CH (A)	4.60
CH ₂ (B)	2.67-2.72
CH ₂ (C)	3.20
CH ₂ (D)	1.73
CH ₂ (E)	2.81
CH ₂ (F)	3.24
CH ₂ (G)	3.56

Tabla 10. Asignación de las señales del espectro ¹H-RMN en D₂O del PASP-MA-MH-21 (50% mero PASP-MH) a 25°C

PASP-MA-MH-22	
Señal	Asignación (ppm)
CH (A)	4.59
CH ₂ (B)	2.67
CH ₂ (C)	3.19
CH ₂ (D)	1.70
CH ₂ (E)	2.76
CH ₂ (F)	3.25
CH ₂ (G)	3.56

Tabla 11. Asignación de las señales del espectro ¹H-RMN en D₂O del PASP-MA-MH-22 (40 % mero PASP-MH) a 25°C

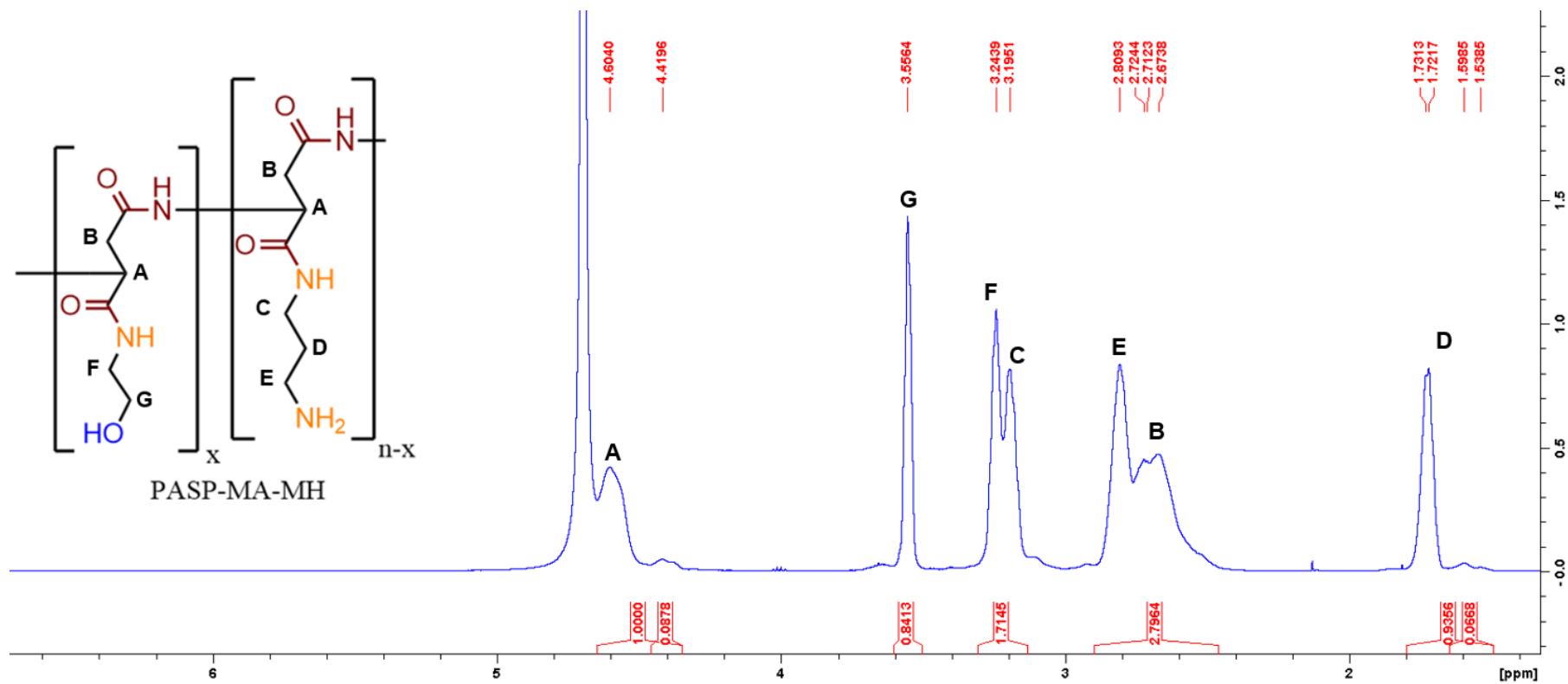


Figura 18. Espectro ¹H-RMN del PASP-MA-MH-21 (50% mero teórico PASP-MH) en D₂O a 25 °C

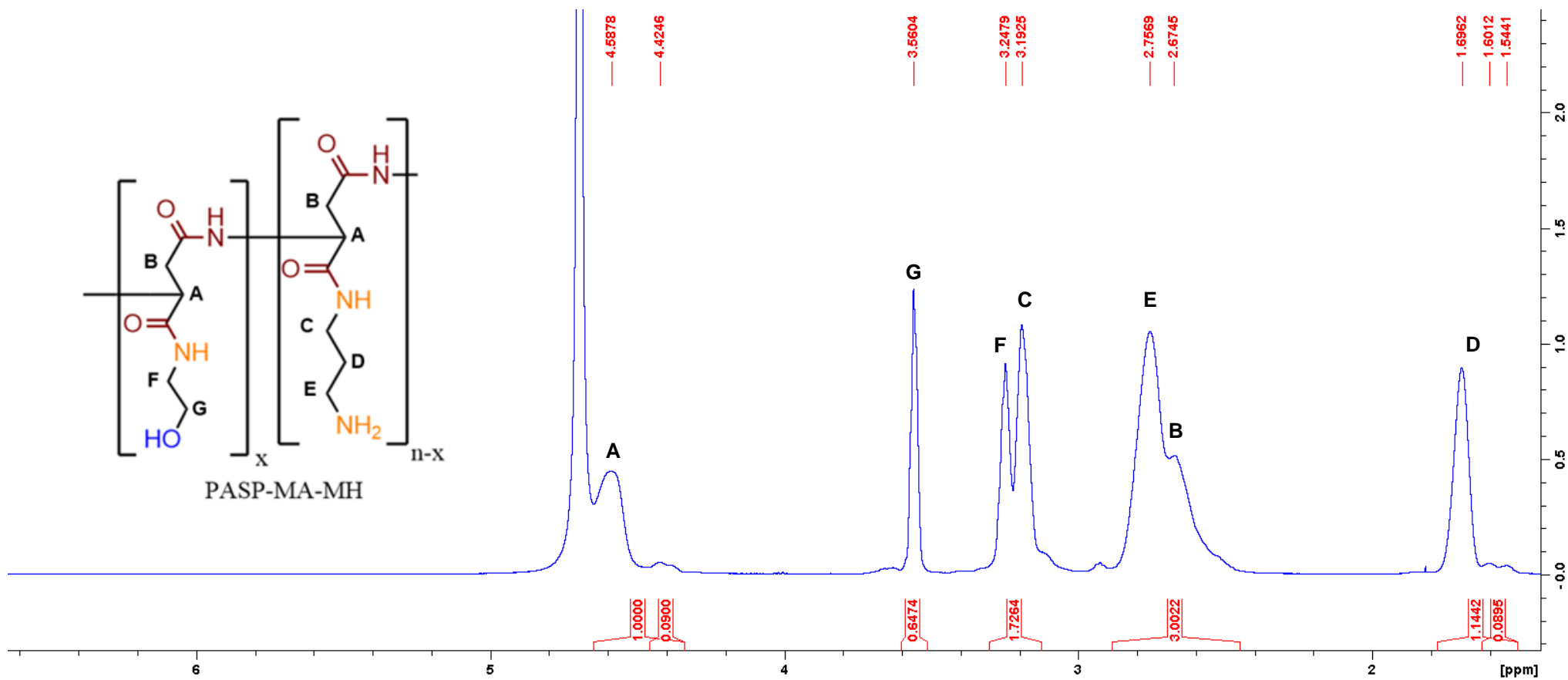


Figura 19. Espectro ¹H-RMN del PASP-MA-MH-22 (40% mero teórico PASP-MH) en D₂O a 25 °C



Figura 20. Espectro IR del PASP-MA-MH-20 (70% mero teórico PASP-MH) en KBR.

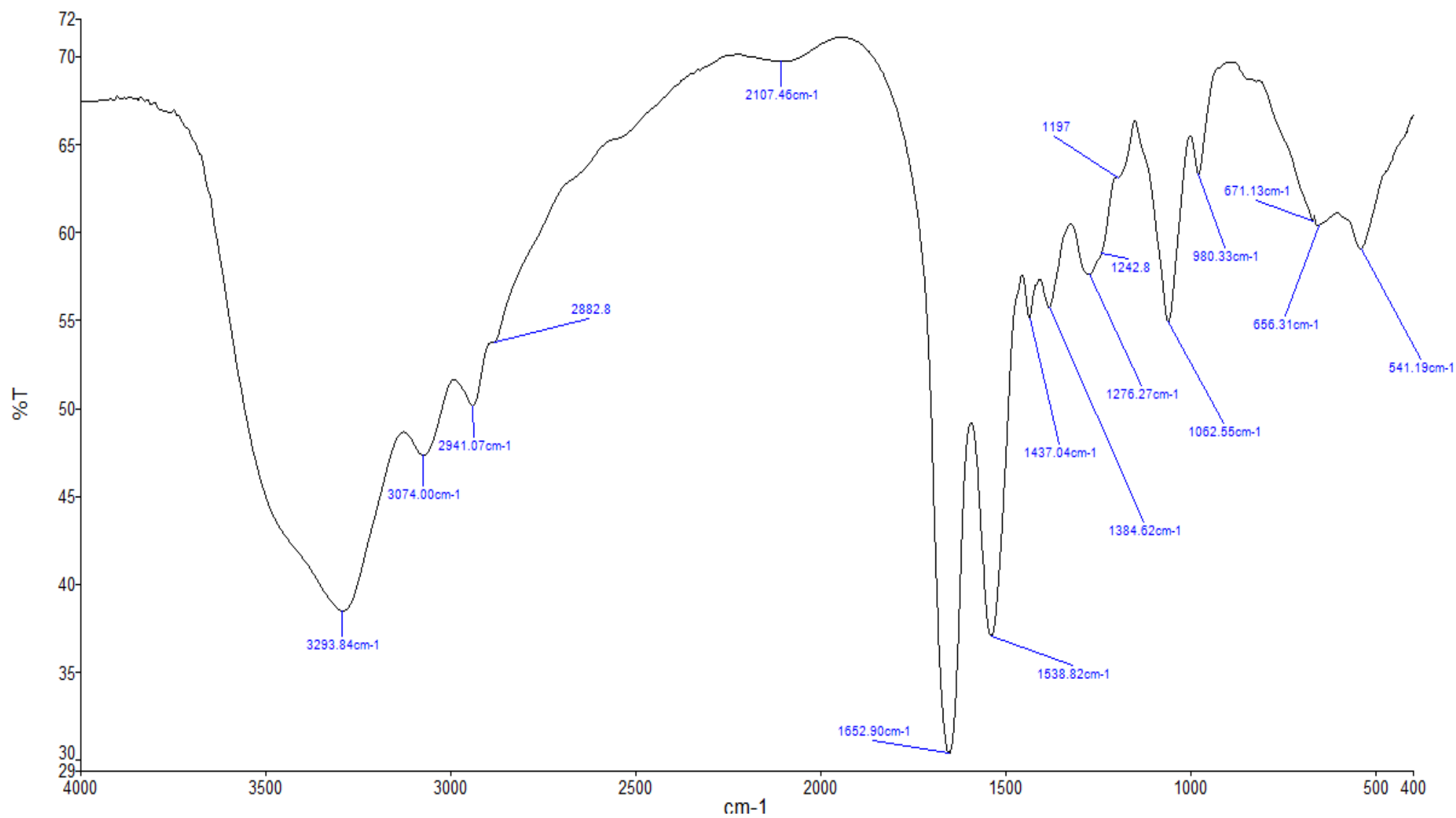


Figura 21. Espectro IR del PASP-MA-MH-21 (50 % mero teórico PASP-MH) en KBR.

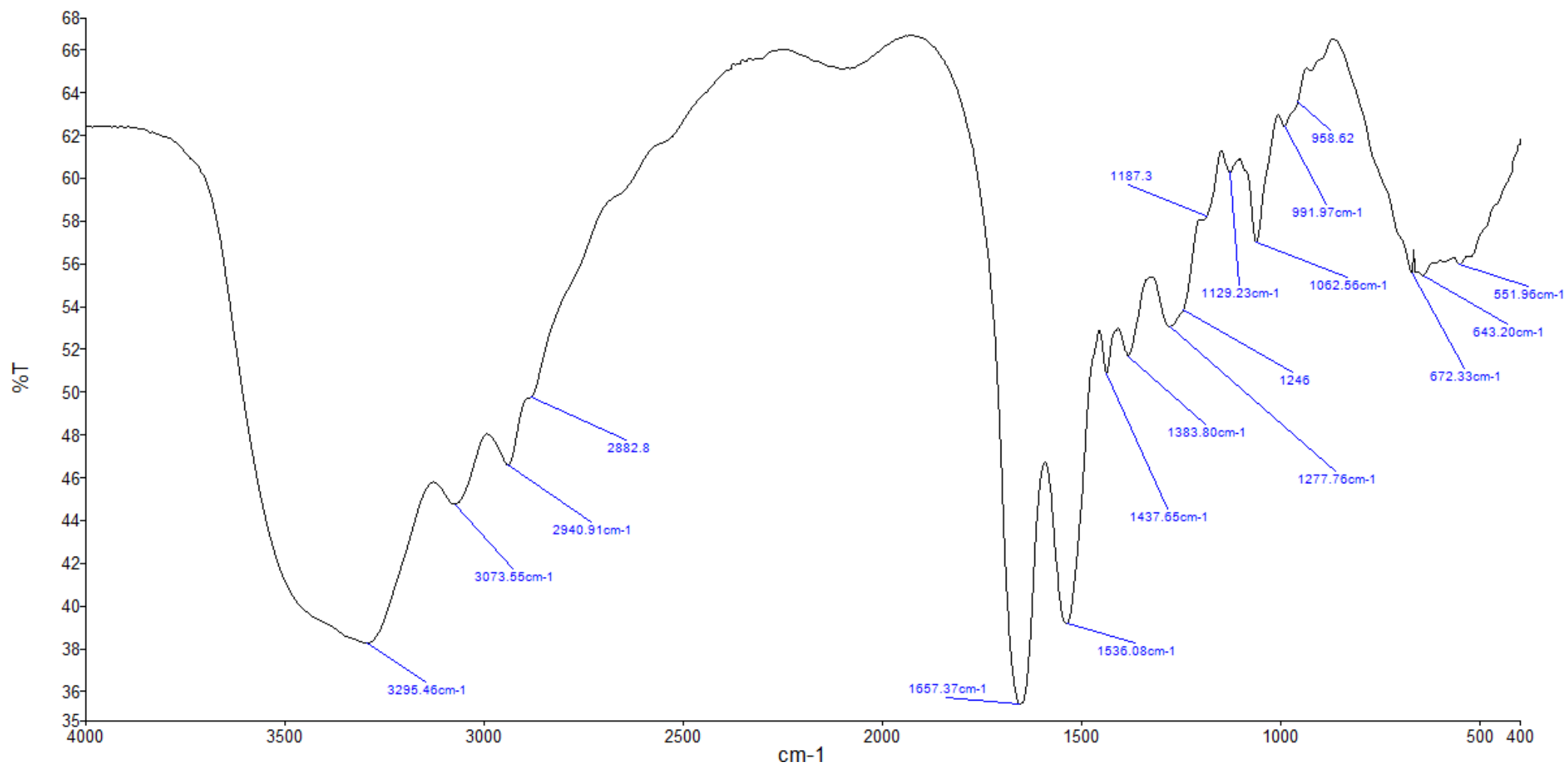


Figura 22. Espectro IR del PASP-MA-MH-22 (40% mero teórico PASP-MH) en KBR.

6.2.3. Discusión de resultados

En la tabla 12 se muestran las proporciones experimentales de los meros PASP-MA y PASP-MH en los copolímeros PASP-MA-MH, así como los pesos moleculares promedio obtenidos para dichos copolímeros en las 22 síntesis realizadas. En los anexos 4 y 5 se encuentran descritos los procedimientos usados para calcular la relación entre cadenas laterales amino e hidroxilo, basada en el cálculo de integraciones relativas, y el peso molecular de cada macromolécula.

Síntesis	Proporción de mero PASP-MA (%)		Proporción de mero PASP-MH (%)		Proporción Experimental PASP-HIDRO (%)	Peso molecular de mero promedio (g/mol)
	Teórico	Experimental	Teórico	Experimental		
1	30	33.17	70	56.93	9.90	158.06
2	30	30.88	70	58.33	10.79	157.37
3	30	31.25	70	57.21	11.54	157.10
4	30	31.50	70	58.50	10.00	157.80
5	50	49.53	50	40.90	9.57	160.32
6	50	44.73	50	44.14	11.14	159.03
7	50	48.09	50	41.27	10.64	159.68
8	50	48.76	50	42.29	8.95	160.50
9	60	53.77	40	33.02	13.21	159.31
10	60	53.81	40	35.71	10.48	160.49
11	60	57.30	40	33.30	9.40	161.41
12	50	49.96	50	39.91	10.13	160.14
13	50	43.99	50	46.46	9.45	159.50
14	30	31.93	70	60.23	7.84	158.78
15	30	27.63	70	63.25	9.15	157.70
16	50	46.80	50	45.50	7.7	160.77
17	60	56.67	40	35.66	7.67	161.97
18	50	46.64	50	41.75	11.61	159.07
19	50	46.90	50	42.35	10.75	159.47
20	30	34.71	70	57.42	7.87	159.13
21	50	47.72	50	42.32	9.96	159.92
22	60	57.64	40	33.54	8.82	161.70

Tabla 12. Proporción experimental y peso molecular de los PASP-MA-MH sintetizados

Los resultados mostrados en esta tabla serán discutidos más adelante, luego de un análisis detallado de los espectros ^1H -RMN de los copolímeros mostrados. La caracterización por espectroscopía ^1H -RMN de los PASP-MA-MH obtenidos se llevó a cabo mediante un análisis comparativo con los espectros ^1H -RMN de las macromoléculas de referencia PASP-MA-1 y PASP-MH-1 sintetizadas previamente. La asignación completa de las señales se logró mediante la aplicación de las técnicas COSY y HSQC. En las figuras 15 y 16 se mostraron los espectros ^1H -RMN de los polímeros referenciales PASP-MA-1 y PASP-MH-1; asimismo, en las figuras 17, 18 y 19 se muestran los espectros ^1H -RMN representativos de los tres tipos de copolímero sintetizados con diferente proporción de meros PASP-MA y PASP-MH.

En la figura 23 se presenta el espectro COSY del PASP-MA-MH 21 (50% de PASP-MH) en donde se muestran las correlaciones entre los hidrógenos acoplados. Se observa claramente el acoplamiento entre las señales a 3,24 y 3.56 ppm, ambas pertenecientes a los hidrógenos metileno F y G del PASP-MH respectivamente. El desplazamiento y forma de cada señal posee gran similitud con el reportado en la literatura y el obtenido en este trabajo para el PASP-MH-1.

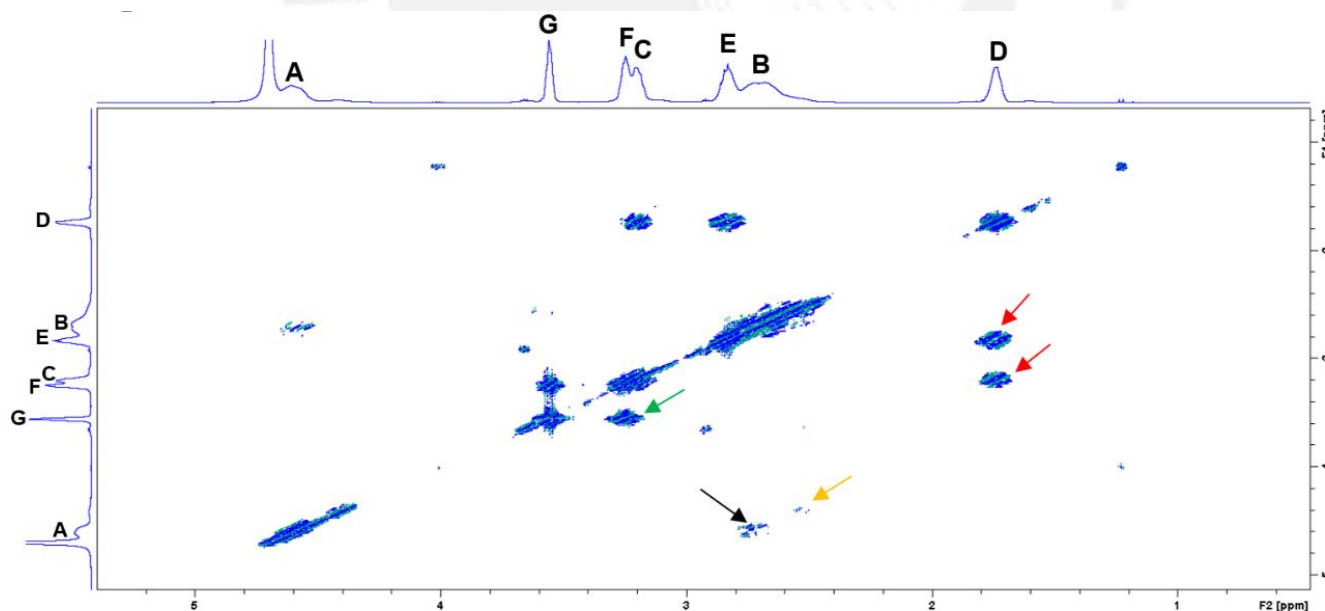


Figura 23. Espectro COSY del PASP-MA-MH 21 a 25°C en D_2O . La flecha verde muestra el acoplamiento de las señales F y G de los hidrógenos PASP-MH. Las flechas rojas muestran el acoplamiento la señal del hidrógeno D y los hidrógenos C y E del PASP-MA. La flecha negra muestra el acoplamiento entre los hidrógenos A y B de la cadena principal del PASP-MA-MH. La flecha naranja muestra el acoplamiento entre los hidrógenos metino y metileno del PASP-HIDRO.

Por otro lado, en el rango de 1.5 ppm a 3.20 ppm, se observan las 3 señales correspondientes a los hidrógenos metileno característicos del mero PASP-MA, C, D y E, a 3.20, 1.54-1.73 y 2.81 ppm respectivamente. Si bien el desplazamiento en el espectro ^1H -RMN de estos últimos hidrógenos, D y E, difiere notablemente del reportado por Neuse y Murga así como del observado en este trabajo para el polímero de referencia PASP-MA-1, el espectro COSY muestra la correlación entre la señal a 1.73 con las señales a 3.20 y 2.81 ppm, esto confirma la identidad del primer pico como perteneciente a los hidrógenos D. En este contexto, se postula que las pequeñas señales a 1.54 y 1.60 ppm también pertenecen a hidrógenos D de meros PASP-MA que se encontrarían en regiones de alta acumulación de los mismos, con mínima presencia de meros PASP-MH, por ello su similitud en el desplazamiento con los valores reportados y obtenidos en este trabajo para el PASP-MA-1. El pico a 3.20 ppm fue asignado como producto de los hidrógenos C, y no de los E, debido a su mayor cercanía con el grupo amido, relativamente más electronegativo que uno amino, lo que genera una mayor desprotección y por ende su mayor desplazamiento hacia campo bajo en el espectro. Esta propuesta fue respaldada más adelante con la caracterización del polímero PASP-DC-MC-MH derivado del PASP-MA-MH, acápite 6.3.2, en donde la señal perteneciente al hidrógeno E termina desplazándose a campo bajo luego de ocurrida la amidación del grupo amino adyacente.

Las señales a 4.60 y 2.67-2.72 ppm han sido asignadas a los hidrógenos metino (A) y metileno (B) de la cadena principal del PASP-MA-MH-21, respectivamente. Esto fue posible gracias a la información proporcionada por los espectros COSY y HSQC del PASP-MA-MH-21; este último se muestra en la figura 24. El primero permitió visualizar el acoplamiento existente entre A y B, mientras que con el segundo se pudo comprobar que la señal a 4.60 ppm no era debida a hidrógenos de un grupo metileno, y por ende debía de provenir de un metino. Ambas señales se ubican en posiciones similares a las de los correspondientes protones metino y metileno de la cadena principal en los polímeros de referencia PASP-MA y PASP-MH, observando un corrimiento máximo de 0.1 ppm hacia campo bajo en el polímero.

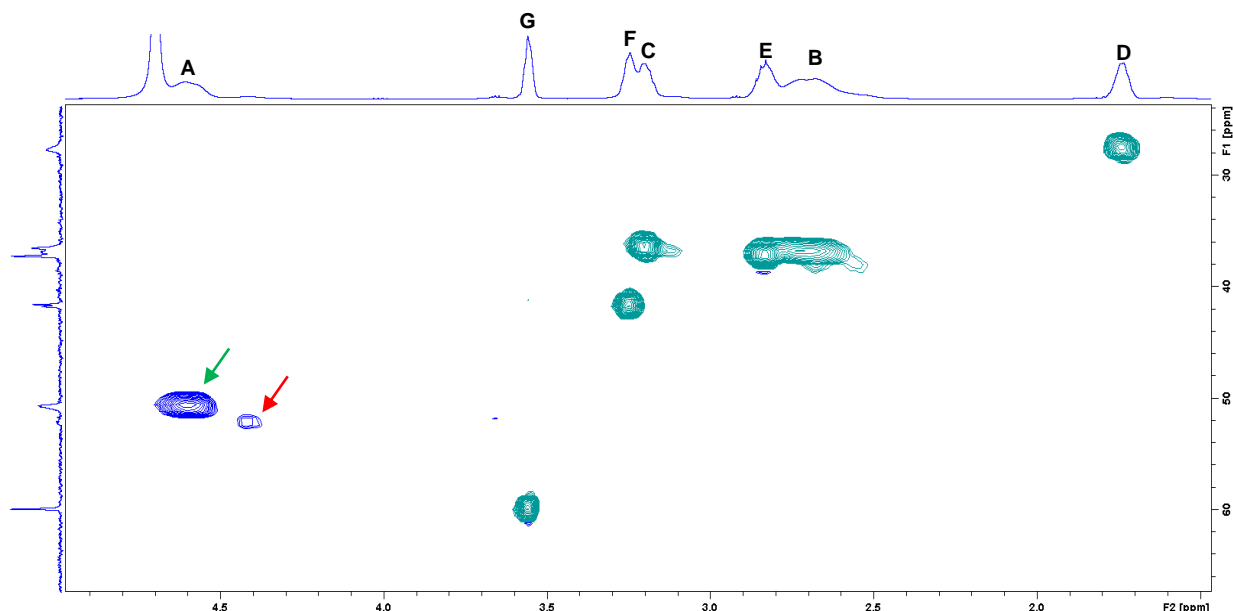


Figura 24. Espectro HSQC del PASP-MA-MH 21 a 25°C en D₂O. La flecha verde muestra la correlación entre el hidrógeno metino de los meros PASP-MA y PASP-MH con sus correspondientes carbonos. La flecha roja muestra la correlación entre el hidrógeno metino de los meros PASP-HIDRO con su respectivo carbono. Se observa que ambas señales no corresponden a hidrógenos metileno como el resto. La asignación de los carbonos con sus respectivos hidrógenos se realiza en el anexo 6

Finalmente, se observa una pequeña señal a 4.42 ppm la cual solo presenta acoplamiento con la región de los hidrógenos B de la cadena principal. Se presume que este pico pertenece a un hidrógeno producido por una reacción de hidrólisis en los grupos amida de los meros PASP-MA y PASP-MH del copolímero PASP-MA-MH. Murga en la tesis de licenciatura previamente mencionada, hace referencia a la aparición de una pequeña señal en el espectro ¹H-RMN del PASP-MA con un desplazamiento cercano al de la señal desconocida en este trabajo (4.34 ppm). Murga propuso y logró comprobar que este pico provenía de una reacción secundaria de hidrólisis, producto del medio básico generado por el gran exceso de la 1,3-propanodiamina en solución. Para el presente trabajo, la asignación de la señal problema a un metino de un mero hidrolizado ha sido reforzada gracias al análisis del espectro HSQC previamente mencionado. En este se observa claramente que la señal problema no puede pertenecer a un metileno (CH₂) y dada la imposibilidad de que pertenezca a un grupo metilo por su particular desplazamiento solamente podría ser asignado a un grupo metino (CH). La aparición de esta pequeña señal se observa en todos los PASP-MA-MH sintetizados, y por estar asociada a una reacción secundaria de hidrólisis se le designará en adelante como PASP-HIDRO (anexo 7).

De manera similar a la que acaba de ser descrita para el PASP-MA-MH-21 haciendo uso de las técnicas COSY y HSQC se asignaron las señales $^1\text{H-RMN}$ de los copolímeros relacionados PASP-MA-MH-20 y 22 con diferente proporción de cadenas laterales monoaminadas y monohidroxilados.

La caracterización del PASP-MA-MH-21 culminó con un análisis detallado de su espectro infrarrojo mostrado en la figura 21. Se puede apreciar una banda intensa y ancha de absorción centrada en 3294 cm^{-1} que corresponde a las vibraciones de estiramiento de los enlaces N-H y O-H de los grupos amino, amido e hidroxilo. Asimismo, se observan dos bandas intensas a 1653 y 1539 cm^{-1} las cuales provienen del estiramiento del doble enlace CO de la amida I y la flexión del enlace N-H de la amida II respectivamente. Por otro lado, a 1063 cm^{-1} destaca una banda medianamente intensa producto del estiramiento del enlace C-O en el grupo alcohol del mero PASP-MH. Cabe mencionar que las tres primeras bandas descritas se encuentran presentes en los espectros IR del PASP-MA-1 y PASP-MH-1 sintetizados como referencia y a una frecuencia e intensidad muy similar. Su presencia en ambos polímeros referenciales impide utilizarlas para estimar variaciones en el porcentaje de meros en los copolímeros PASP-MA-MH obtenidos en la presente investigación. En cambio, la banda medianamente intensa característica del grupo funcional alcohol a 1063 cm^{-1} sí resulta útil para apreciar diferencias en el porcentaje de meros PASP-MH en los tres tipos de copolímeros sintetizados. Al analizar los espectros IR de los PASP-MA-MH-20, 21 y 22, mostrados en las figuras 20, 21 y 22 se observó que la banda a 1063 cm^{-1} se reducía significativamente en el segundo. Este cambio resulta lógico si se toma en cuenta que el PASP-MA-MH-22 presenta la menor cantidad de meros PASP-MH de los tres copolímeros sintetizados (40 % teórico). Esta disminución en la intensidad de la banda podría utilizarse como un indicador cualitativo para estimar la proporción de meros del copolímero PASP-MA.

A continuación se discutirán los resultados obtenidos en la síntesis de los tres tipos de copolímeros PASP-MA-MH que se reportan en la tabla 12.

Como se mencionó en el acápite 6.2.1, los primeros 11 ensayos de síntesis del PASP-MA-MH fueron llevados a cabo tomando en cuenta las consideraciones de Neuse, Murga y Caliceti para la síntesis de los polímeros de referencia PASP-MA y PASP-MH, es decir, lo que se ha designado como el procedimiento básico.

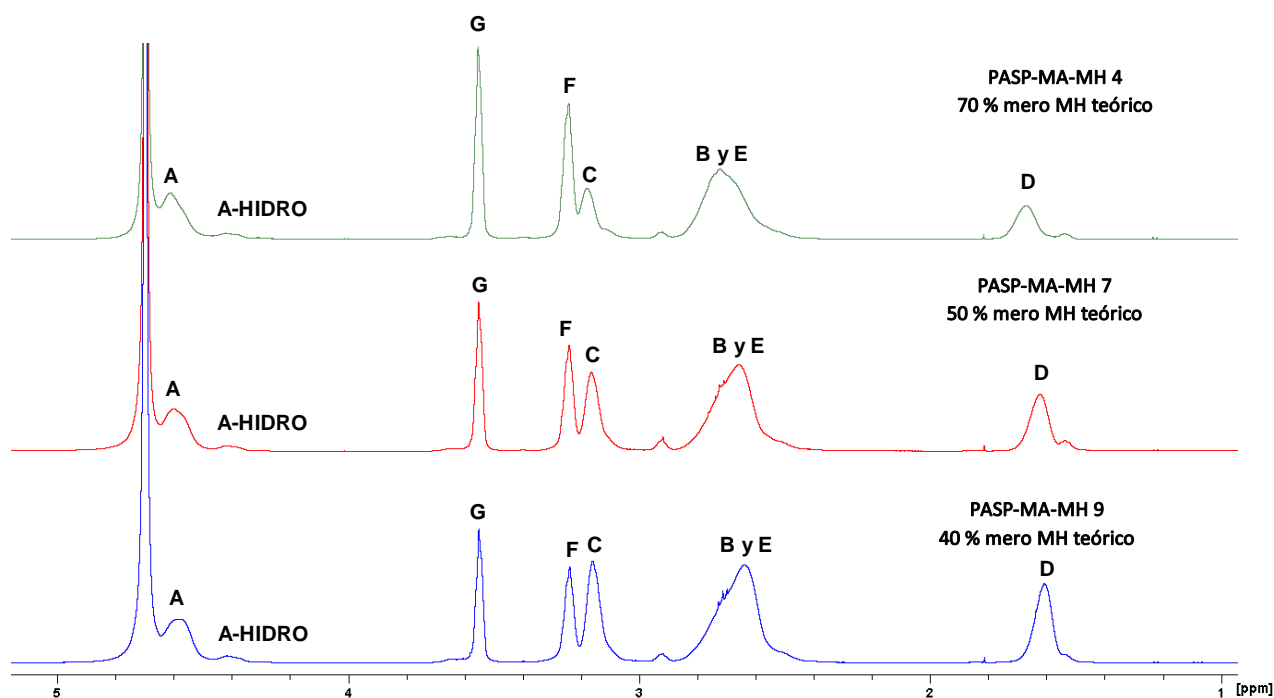


Figura 25. Comparación de los espectros ^1H -RMN de los PASP-MA-MH a diferente proporción obtenidos siguiendo las consideraciones de Neuse, Caliceti y Murga.

En la figura 25 se muestran los espectros ^1H -RMN a $25\text{ }^\circ\text{C}$ representativos para los tres tipos de copolímeros PASP-MA-MH con diferente proporción de meros PASP-MA y PASP-MH sintetizados siguiendo el procedimiento básico. Se observa claramente como las señales de los hidrógenos F y C, producto de los meros PASP-MH y PASP-MA respectivamente, varían en intensidad según su proporción relativa en el copolímero en el que se encuentren. Para el PASP-MA-MH-4 con una mayor proporción de meros PASP-MH, se registra una señal F muy intensa, mientras que el pico C resulta ser muy pequeño. Lo contrario ocurre en el copolímero PASP-MA-MH-9, con la menor proporción de meros PASP-MH, en donde ambas señales adquieren una intensidad muy similar.

En el acápite 6.2.1, se mencionaron dos modificaciones iniciales del procedimiento básico que permitieron facilitar la obtención de los copolímeros PASP-MA-MH a partir de la undécima síntesis. Sin embargo, durante la etapa de caracterización por ^1H -RMN de las macromoléculas obtenidas en las primeras once síntesis se identificó una complicación adicional que condujo a la modificación de los ensayos posteriores. Esta se basaba en la presencia de impurezas producto del reactivo, la 1,3-propanodiamina, que no había sido completamente eliminado durante la etapa de purificación. Las señales de este compuesto molecular son apreciadas de forma más clara al realizar la

caracterización por ^1H -RMN a 75°C . En la figura 26 se observa el espectro ^1H -RMN a 75°C del PASP-MA-MH-12 donde resaltan las pequeñas señales contaminantes a 2.17 y 3.26 ppm.

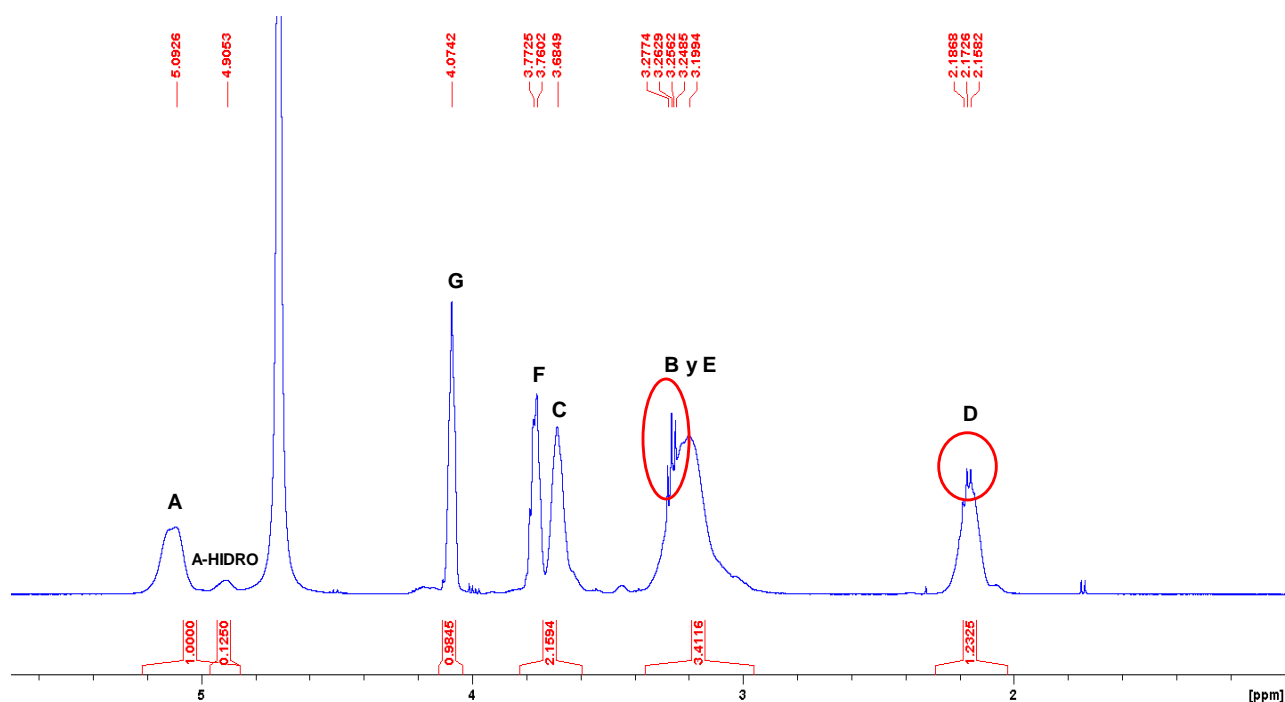


Figura 26. Espectro ^1H -RMN del PASP-MA-MH 12 en D_2O a 75°C . Se observan las impurezas de la 1,3-propanodiamina a 2.17 y 3.26 ppm

Se plantea que la persistencia de la contaminación de la macromolécula producto con el reactivo 1,3-propanodiamina, a pesar del exhaustivo proceso de diálisis al que se somete el copolímero, podría deberse a una fuerte interacción de enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo y amino terminales de las cadenas laterales del copolímero PASP-MA-MH con el reactivo en cuestión, usado en gran exceso. Con el fin de eliminar este impase se planteó llevar a cabo la etapa de purificación por diálisis del copolímero PASP-MA-MH empleando agua destilada en medio ácido (pH 3). La protonación de los grupos amino de las cadenas laterales así como del reactivo en exceso introduciría repulsiones entre ellos, lo cual facilitaría la eliminación de la 1,3-propanodiamina.

Para comprobar esta hipótesis se decidió re-disolver el PASP-MA-MH-12 (50 % PASP-MA teórico) en 20 mL de agua saturada de nitrógeno y dializarlo por segunda vez durante 20 horas a pH 3 realizando 4 cambios de agua destilada ácida en total.

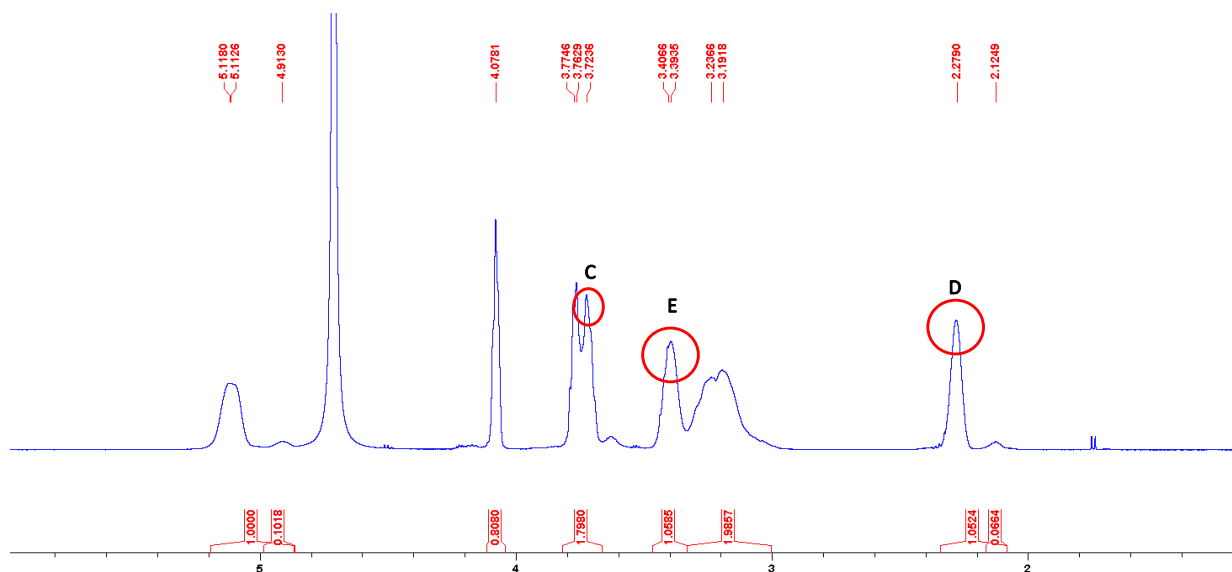


Figura 27. Espectro ^1H -RMN del PASP-MA-MH 12 redisoluto en D_2O a 75°C . Se observa el corrimiento de las señales producto de los hidrógenos C, D Y E respecto al PASP-MA-MH 12 original y la desaparición de las señales contaminantes productos de la 1,3 propanodiamina.

En la figura 27 se muestra el espectro ^1H -RMN del PASP-MA-MH 12 dializado por segunda vez en medio ácido. Se observó que esta modificación permitió eliminar las señales contaminantes producto de la 1,3 propanodiamina. Con el fin de evaluar la efectividad de esta nueva modificación, se sintetizaron los PASP-MA-MH-16 y 17 con proporciones teóricas de 50 y 60 % de meros PASP-MA (Figura 28) realizando su purificación en medio ácido. Al igual que en el PASP-MA-MH-12 re-dializado, el espectro ^1H -RMN a 25°C para estos dos copolímeros muestra una alta pureza.

Sin embargo, pese a que se logró el objetivo inicial, se observó que la purificación en medio ácido producía un inesperado desplazamiento hacia campo bajo de todas las señales pertenecientes a la sección PASP-MA de la macromolécula. Para el PASP-MA-MH-12 y 12 re-dializado se observó que la señal D pasó de 2.16 a 2.28 ppm, la E de 3.19 a 3.39 ppm y la C de 3.68 a 3.72 ppm respectivamente.

En un inicio se pensó que el desplazamiento de las señales propias del mero PASP-MA era consecuencia de algún tipo de reacción secundaria que involucraba a su grupo amino terminal. Un cambio químico de dicho grupo resultaría perjudicial en su posterior carboximetilación, ya que esta involucra un ataque nucleofílico del mismo al reactivo usado en su derivatización.

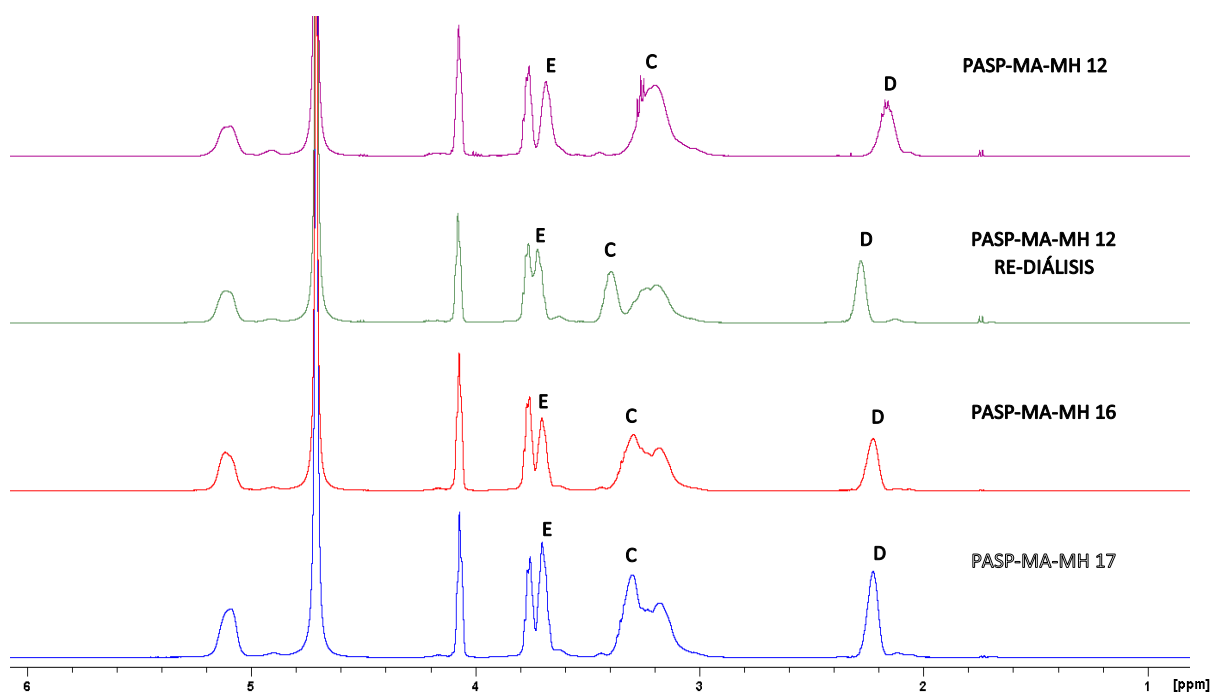


Figura 28. Comparación de los espectros ^1H -RMN en D_2O a $75\text{ }^\circ\text{C}$ de los PASP-MA-MH 12, 12 re-diálisis, 16 y 17. Se observa que las señales producto del PASP-MA para los PASP-MA-MH 16 y 17, poseen un desplazamiento muy similar

Con el fin de resolver esta incógnita, se llevó a cabo un estudio comparativo entre dos reacciones de carboximetilación empleando como reactivos a los copolímeros PASP-MA-MH-16 y 19 con una proporción muy similar de cadenas laterales PASP-MA y PASP-MH, pero con diferentes desplazamientos de sus señales D, E y C (Figura 29). La caracterización por ^1H -RMN de los polímeros derivatizados (PASP-DC-MC-MH) mostró que la diferencia en desplazamiento de las señales mencionadas no tuvo consecuencia alguna sobre la identidad de los productos. Esto llevó a concluir que el cambio en la posición de las señales no es generado por una alteración química del grupo amino. Un análisis más detallado sobre este experimento, así como los espectros ^1H -RMN de los copolímeros derivatizados, se presentará en el acápite 6.3.3.

Durante esta etapa se logró sintetizar un nuevo copolímero, el PASP-MA-MH, con tres diferentes proporciones de meros PASP-MA y PASP-MH partiendo de los procedimientos reportados por Neuse, Murga y Caliceti para los polímeros de referencia PASP-MA y PASP-MH e introduciendo una serie modificaciones tanto en la etapa de síntesis como de purificación del mismo. Estas variaciones respondieron a la necesidad de resolver ciertas complicaciones experimentales observadas durante la síntesis así como a simplificar el procedimiento.

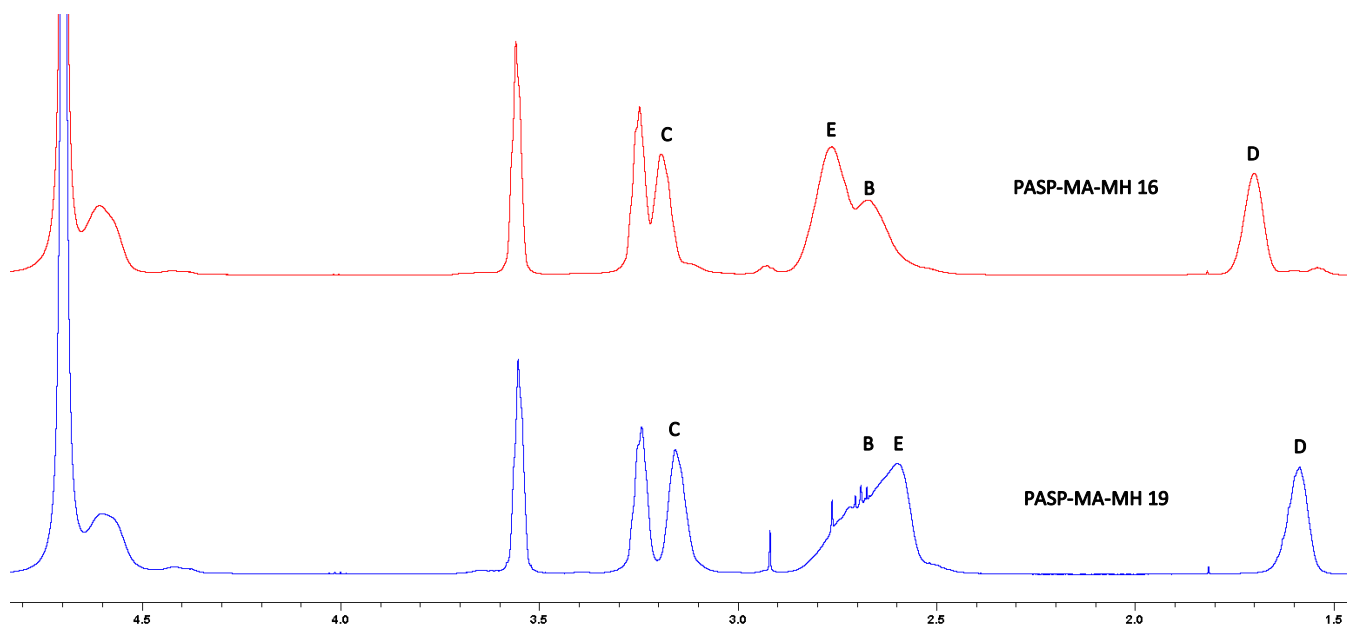


Figura 29. Comparación de los espectros ^1H -RMN en D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$ de los PASP-MA-MH 16 y 19. El PASP-MA-MH-19 fue dializado solamente 20 horas en medio ácido para realizar la presente comparación por ende se observa la presencia de pequeños contaminantes. Se observa que las señales C, D Y E producto del mero PASP-MA posee un desplazamiento muy diferente para cada copolímero.

Así, se logró desarrollar una metodología que permitió obtener los copolímeros intermedios PASP-MA-MH puros y con proporciones experimentales de los meros PASP-MA y PASP-MH reproducibles y cercanas a los valores teóricos esperados. En particular, los porcentajes experimentales del mero PASP-MA resultaron muy similares a las deseadas observándose, en general, una desviación máxima de alrededor del 3%. Cabe mencionar que las desviaciones son considerablemente mayores en el caso de los meros PASP-MH del orden de 5 a 10 % en las síntesis modificadas respecto al procedimiento básico. Asimismo, la aplicación de las técnicas bidimensionales COSY y HSQC condujo a una asignación precisa y completa de las señales características del copolímero; esto resultó fundamental para el cálculo de la proporción relativa de las cadenas laterales monoaminadas y monohidroxiladas así como para identificar la presencia de meros hidrolizados. Respecto a estos últimos, cabe comentar que pese a que se siguieron las recomendaciones de Neuse y Murga no se logró reducir la reacción secundaria responsable de su formación.

6.3. Síntesis del polímero ligando, poli-(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-(carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]-co-[(2-hidroxietil)-aspartamida]) (PASP-DC-MC-MH)

6.3.1. Análisis de la síntesis y purificación

La carboximetilación del copolímero PASP-MA-MH a PASP-DC-MC-MH fue llevada a cabo siguiendo el procedimiento propuesto por Neuse y tomando en cuenta las consideraciones de Murga para la síntesis del PASP-DC-MC, así como los datos experimentales obtenidos en el presente trabajo.^{11,77} El reactivo utilizado para la carboximetilación fue el ácido bromoacético; este posee un carbono alfa altamente electrofílico que promueve la sustitución de su halógeno por el grupo amino terminal presente en el mero PASP-MA del PASP-MA-MH, lo que genera ácido bromhídrico como producto secundario.

Neuse y Murga mencionan la necesidad de emplear un exceso de ácido (4 mmol por mmol de mero PASP-MA) para aumentar la probabilidad de generar una mayor proporción de cadenas laterales di-carboximetiladas (DC) sobre las mono-carboximetiladas (MC). La predominancia de las primeras es deseable para la presente investigación pues genera polímeros con una superior capacidad coordinante hacia el metal. La cercanía entre los dos grupos carboximetilados en los meros PASP-DC permite la formación de anillos quelato relativamente pequeños, más estables que los que se obtendrían al coordinarse únicamente los grupos MC. Por otro lado, una menor cantidad de grupos mono-carboximetilados asegura una disminución en la posibilidad de entrecruzamiento de las cadenas poliméricas producto de la coordinación de grupos MC de diferentes cadenas con el metal. Asimismo, una menor proporción de estos grupos, disminuiría la posibilidad de coordinación entre dos MC de una misma cadena y por ende, se evitaría el consiguiente aumento de rigidez, factor que también disminuye la solubilidad del conjugado polímero-metal. Sin embargo, en la presente investigación se observó que el empleo de un gran exceso de ácido bromoacético generaba la aparición de secciones poliméricas indeseables en una considerable proporción, lo que impedía el cálculo adecuado del porcentaje experimental de los distintos meros del PASP-DC-MC-MH. Se logró superar este

inconveniente al modificar la metodología propuesta, en el sentido de emplear solo un pequeño exceso del ácido bromoacético en vez del recomendado. En la tesis de licenciatura previamente mencionada, también se describe la aparición de una señal contaminante durante la caracterización del PASP-DC-MC. Murga propone que este pico desconocido puede ser producto de un grupo bromoacetamida; no obstante, este no fue considerado durante el cálculo de la proporción de cadenas laterales en su macromolécula. En el acápite 6.3.3 se realiza un análisis más profundo sobre esta complicación así como la posible identificación del grupo contaminante.

Por otro lado, en el procedimiento de síntesis del PASP-DC-MC tanto Neuse como Murga consideran necesario el añadir NaOH (6 mmol por mmol de mero PASP-MA) al inicio de la reacción así como mantener el pH del medio en un rango de 8-9 durante las primeras 12 horas de reacción. No obstante, para la síntesis del PASP-DC-MC-MH se decidió prescindir del NaOH inicialmente añadido y disminuir el rango de pH a 7-8. Estas variaciones se realizaron con el fin de trabajar en un medio lo suficientemente básico que permita el avance de la reacción de carboximetilación sin ser lo suficientemente alcalino como para propiciar reacciones de hidrólisis que pudieran romper las cadenas poliméricas. Además, se decidió disminuir la temperatura de reacción del PASP-DC-MC-MH 75-80°C, es decir 5°C menos respecto a lo recomendado por Neuse y Murga. Se postula que esta modificación permitiría trabajar a una temperatura adecuada que proporcione la energía necesaria para que proceda la reacción sin ser lo suficientemente alta como para promover la ruptura hidrolítica de las cadenas poliméricas. Finalmente, Neuse recomienda realizar todo el proceso de síntesis y purificación del PASP-DC-MC bajo flujo continuo de nitrógeno; no obstante, Murga reportó que la síntesis de esta macromolécula también podía realizarse obviando esta consideración, sin perjuicio en la pureza del macro-ligando. Con el fin de simplificar el procedimiento se decidió seguir con la recomendación de Murga y realizar las síntesis del PASP-DC-MC-MH sin nitrógeno.

Estos tres cambios fueron probados desde las primeras síntesis realizadas para adquirir experiencia en la obtención del polímero de referencia PASP-DC-MC. Se observó que la pureza de las macromoléculas y el perfil de las señales no variaban independientemente de si se utilizaban estas modificaciones o no, por

lo cual se decidió sintetizar al copolímero objetivo de la presente investigación, PASP-DC-MC-MH, utilizando estas últimas consideraciones.

En la tabla 13 se presentan los resultados obtenidos en las síntesis del PASP-DC-MC-MH realizados. Cabe mencionar que, para la etapa de síntesis del PASP-DC-MC-MH, se decidió emplear solamente macromoléculas que tuvieran una proporción de cadenas PASP-MA superior a 40 %. Esta consideración se realizó con el fin de sintetizar macro-ligandos que pudieran unirse a la mayor cantidad de metal posible. El rendimiento obtenido para cada ensayo fue calculado asumiendo que todos los grupos amino del precursor PASP-MA-MH fueron derivatizados formando grupos di-carboximetilados.

Síntesis	PASP-MA-MH utilizado*	PASP-MA teórico (%)	Masa de PASP-DC-MC-MH (g)	Rendimiento (%)
1	6	50	0.354	72.0
2	11	60	0.348	71.6
3	11	60	0.325	66.5
4	9	60	0.256	53.5°
5	9	60	0.341	66.5
6	16	50	0.310	62.0
7	19	50	0.301	59.9

° Se registró pérdidas durante el proceso de purificación

* Rango de peso: 2.13 - 2.18 mmol

Tabla 13. Resultados de las síntesis del PASP-DC-MC-MH

De acuerdo a la experiencia adquirida, los resultados observados e introduciendo las modificaciones antes mencionadas se ha logrado encontrar una metodología capaz de sintetizar al PASP-DC-MC-MH con alto rendimiento y pureza teniendo como base los trabajos realizados por Neuse y Murga para la síntesis del PASP-DC-MC.

6.3.2. Caracterización

Con el fin de facilitar la caracterización por espectroscopia de resonancia magnética nuclear e infrarroja de los nuevos ligandos poliméricos sintetizados, PASP-DC-MC-MH, se preparó, de acuerdo al procedimiento de Neuse y Murga y partiendo del PASP-MA-1 como precursor, el PASP-DC-MC-1. En la figura 30 se muestra el espectro ^1H -RMN de esta macromolécula; en la tabla 14 se presentan las asignaciones de sus hidrógenos característicos y el rendimiento de la reacción.

PASP-DC-MC-1*		
Peso (g) / Rendimiento (%)	Señal	Asignación (ppm)
0.374 / 63.14	CH ₂ (D)	1.85
	CH ₂ (B)	2.68-2.71
	CH ₂ (E)	3.21
	CH ₂ (C)	3.21
	CH ₂ (H)	3.83
	CH ₂ (H')	3.83
	CH (A)	4.56

*Sintetizado a partir de 0.347 g de PASP-MA-1

Tabla 14. Rendimiento y asignación de las señales del ^1H -RMN en D₂O del PASP-DC-MC obtenido experimentalmente.

El rendimiento del PASP-DC-MC-1 se encuentra dentro del rango reportado por Neuse y Murga (mayor a 60 %); asimismo, el desplazamiento de los hidrógenos concuerda con el asignado por estos autores.⁷⁸ En lo que respecta a la pureza de la macromolécula, no se observan señales producto de ácido bromoacético remanente; sin embargo, se registran dos señales a 1.58 y 4.39 ppm que no forman parte del perfil esperado. En el acápite 6.3.3 se realizará una descripción más detallada sobre estas señales y su procedencia. En el anexo 8 se muestra el espectro IR del PASP-DC-MC-1.

Las figuras 31 y 32 presentan los espectros ^1H -RMN representativos de los PASP-DC-MC-MH con diferente proporción de cadenas laterales sintetizados con la metodología propuesta por la presente investigación.

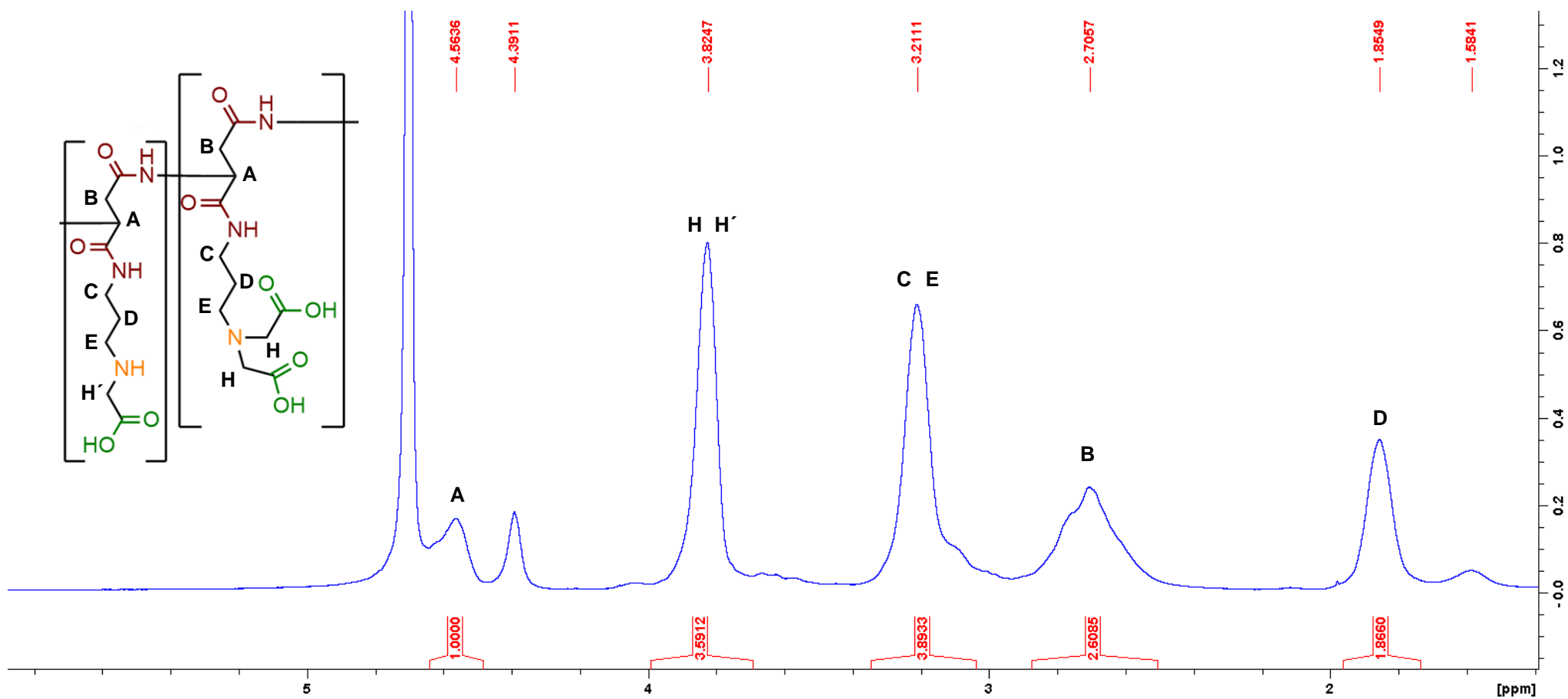


Figura 30. Espectro ^1H -RMN del PASP-DC-MC-1 en D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$

La tabla 15 muestra los desplazamientos típicos para cada hidrógeno de los dos tipos de copolímeros obtenidos. En la figura 33 se muestra el espectro IR para el PASP-DC-MC-MH-6 mencionado y en la tabla 16 la asignación de sus bandas más representativas. El espectro IR del PASP-DC-MC-MH-4, que es prácticamente idéntico, se muestra en el anexo 9.

PASP-DC-MC-MH-4 (60% PASP-MA teórico)		PASP-DC-MC-MH-6 (50% PASP-MA teórico)	
Señal	Asignación (ppm)	Señal	Asignación (ppm)
CH (A)	4.60	CH (A)	4.62
CH ₂ (B)	2.69-2.74	CH ₂ (B)	2.68-2.74
CH ₂ (C)	3.24	CH ₂ (C)	3.25
CH ₂ (D)	1.80-1.87	CH ₂ (D)	1.80-1.88
CH ₂ (E)	3.24	CH ₂ (E)	3.25
CH ₂ (F)	3.24	CH ₂ (F)	3.25
CH ₂ (G)	3.57	CH ₂ (G)	3.56
CH ₂ (H')	3.61	CH ₂ (H')	3.66
CH ₂ (H)	3.78	CH ₂ (H)	3.83

Tabla 15. Asignación de las señales del ¹H-RMN en D₂O del PASP-DC-MC-MH-4 y 6 a 25°C

PASP-DC-MC-MH-6	
Banda (cm ⁻¹)	Proviene
3301	Banda ancha e intensa de estiramiento de enlaces N-H amido y OH hidroxilo
1717	Banda de estiramiento C=O del grupo carboxilo (hombro)
1648	Bandas de estiramiento simétrico del doble enlace C=O de grupo amido I y del estiramiento asimétrico del grupo carboxilato
1542	Banda de flexión de enlace NH de grupo amido II
1393	Banda de estiramiento simétrico del grupo carboxilato
1063	Banda de estiramiento de enlace C-O del grupo alcohol

Tabla 16. Asignación de las bandas características en el espectro IR del PASP-DC-MC-MH-6

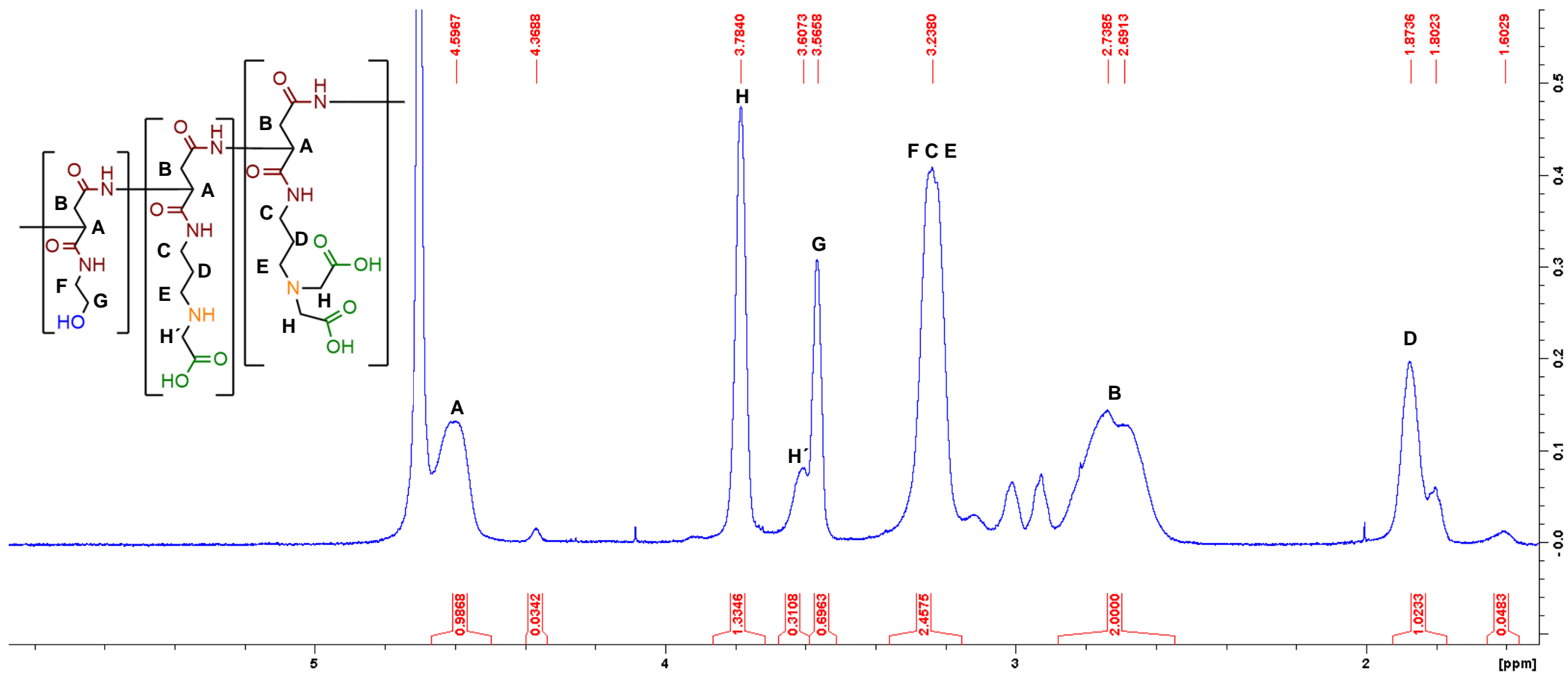


Figura 31. Espectro ¹H-RMN del PASP-DC-MC-MH-4 en D₂O a 25 °C (40% mero teórico PASP-MH)

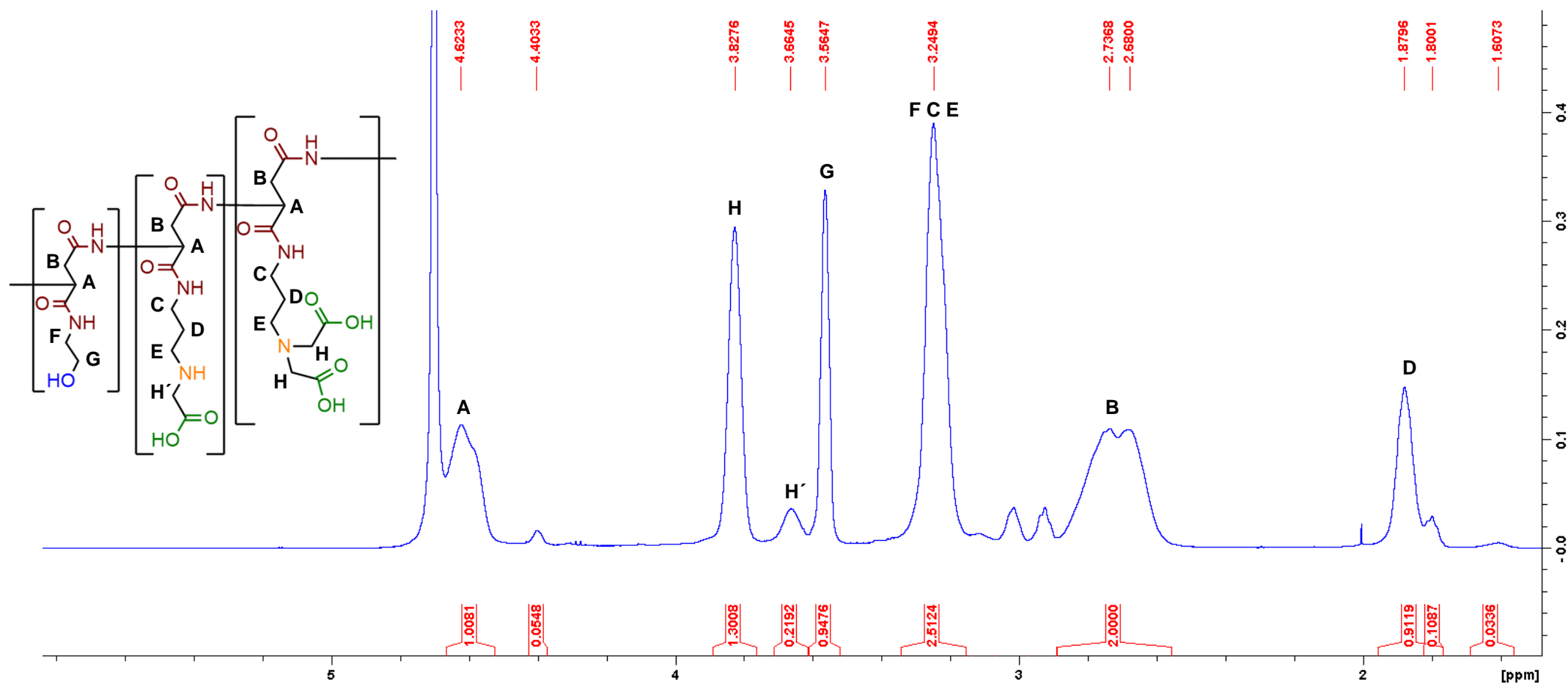


Figura 32. Espectro ¹H-RMN del PASP-DC-MC-MH-6 en D₂O a 25 °C (50% mero teórico PASP-MH)

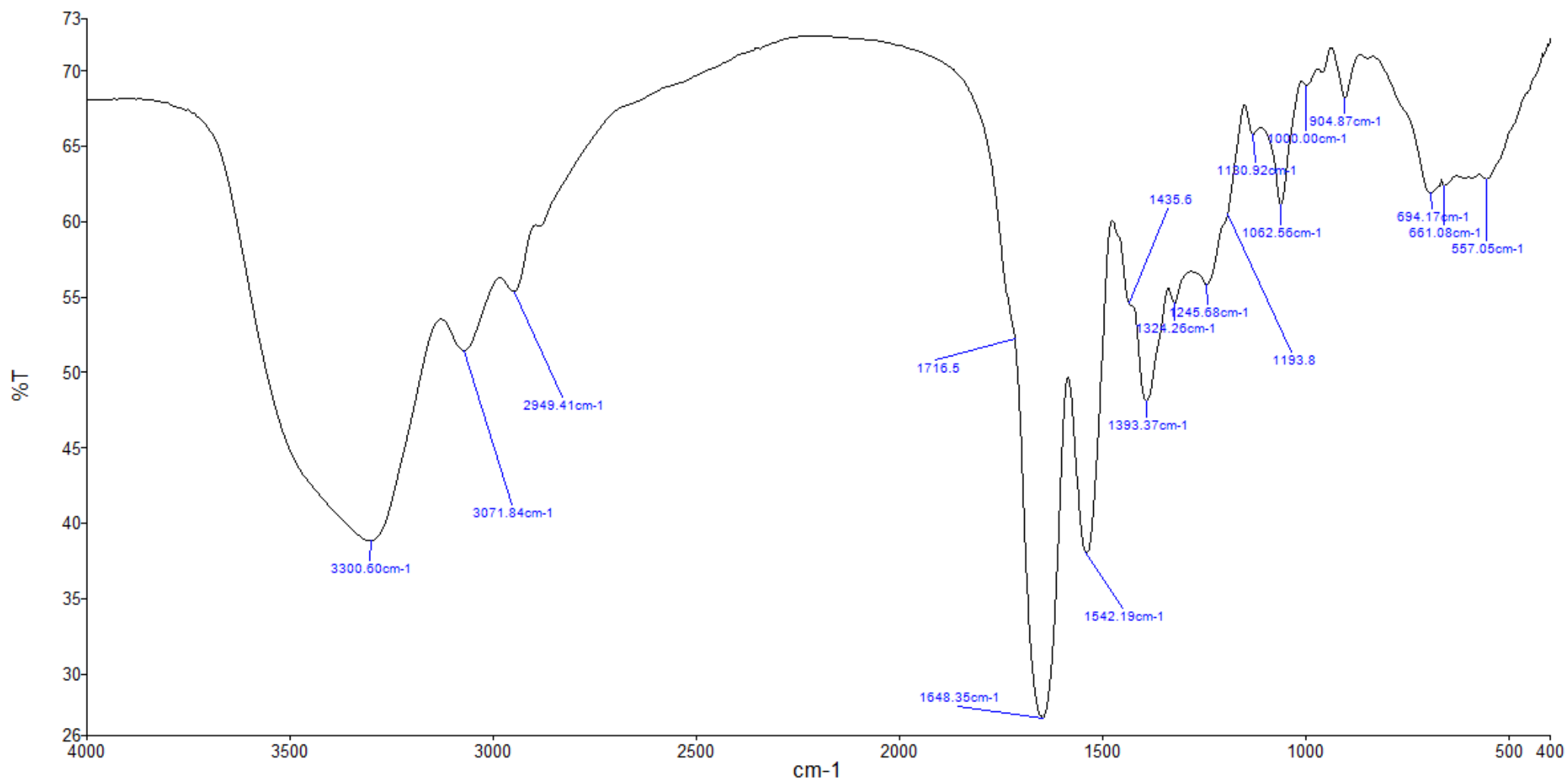


Figura 33. Espectro IR del PASP-DC-MC-MH-6 (50% mero teórico PASP-MH) en KBR.

6.3.3. Discusión de resultados

En la tabla 17 se muestra la cantidad de ácido bromoacético empleado en relación a aquella de meros PASP-MA presentes en el precursor PASP-MA-MH, los porcentajes experimentales de cada tipo de meros contenidos en el polímero producto y el peso molecular del mero promedio para las 8 síntesis del PASP-DC-MC-MH realizadas. En el anexo 10 y 11 se encuentran descritos los procedimientos realizados para calcular la relación molar entre los diferentes tipos de cadenas laterales (meros) presentes en el PASP-DC-MC-MH y el peso molecular promedio de cada macromolécula.

Ensayo	mmoles de PASP-MA presentes en el PASP-MA-MH	Ácido bromoacético empleado (mmol)	Proporción experimental de meros PASP-DC-MC-MH	Proporción experimental de los PASP-MA-MH precursores	Peso Molecular de mero promedio (g/mol)
1	0.97	4.28	No se calculó	No se calculó	No se calculó
2	1.22	12.00	No se calculó	No se calculó	No se calculó
3	1.23	3.00	PASP-DC: 41.01 %; PASP-MC: 10.52% ; PASP-MH: 34.88 %; PASP-HIDRO: 10.02%; PASP-MANR: 3.57%	PASP-MA: 57.30%; PASP-MH: 33.30%; PASP-HIDRO: 9.40%	214.53
4	1.17	2.36	PASP-DC: 33.86%; PASP-MC: 15.69%; PASP-MH: 35.14%; PASP-HIDRO: 14.13%; PASP-MANR: 1.36%	PASP-MA: 53.77%; PASP-MH: 33.02%; PASP-HIDRO: 13.21%	206.69
5	1.16	2.35	PASP-DC: 33.39 %; PASP-MC: 15.66 %; PASP-MH: 34.45 %; PASP-HIDRO: 13.99%; PASP-MANR: 2.51%	PASP-MA: 53.77%; PASP-MH: 33.02%; PASP-HIDRO: 13.21%	207.97
6	1.02	2.47	PASP-DC: 32.53%; PASP-MC: 9.88% ; PASP-MH: 47.06%; PASP-HIDRO: 7.84%; PASP-MANR: 2.69%	PASP-MA: 46.80%; PASP-MH: 45.50%; PASP-HIDRO: 7.70%	203.96
7	1.03	2.51	PASP-DC: 31.88%; PASP-MC: 10.16% ; PASP-MH: 41.96%, PASP-HIDRO: 13.14%, PASP-MANR: 2.51%	PASP-MA: 46.90%; PASP-MH: 42.35%; PASP-HIDRO: 10.75%	202.61

Tabla 17. Cantidad de ácido bromoacético empleado, proporción de meros y peso molecular promedio de los PASP-DC-MC-MH sintetizados

La caracterización de los PASP-DC-MC-MH se realizó mediante un análisis exhaustivo de sus espectros ^1H -RMN, COSY, HSQC y HMBC comparándolos con la información previamente obtenida de los ensayos PASP-MA-MH respectivos y del copolímero de referencia PASP-DC-MC-1. Asimismo, se empleó la técnica de espectroscopía infrarroja para determinar las bandas características del PASP-DC-MC-MH, no observadas en los espectros del PASP-MA-MH.

En la figura 34 se presenta el espectro COSY a 25 °C del PASP-DC-MC-MH-6 donde se muestran las correlaciones entre los hidrógenos acoplados de esta macromolécula. Se observa claramente el acoplamiento entre las señales a 3.25 y 3.56 ppm, cuyos desplazamientos resultan ser idénticos al de los metilenos F y G, respectivamente, de los meros PASP-MH del copolímero intermedio PASP-MA-MH-16 (Figura 35), precursor del PASP-DC-MC-MH-14. Se deduce, por tanto que estas señales deben pertenecer a los hidrógenos mencionados. La ausencia de algún cambio en la posición de ambos picos permite concluir que, como se esperaba, no ha ocurrido reacción entre los grupos hidroxilo de las cadenas laterales PASP-MH del polímero precursor PASP-MA-MH-16 y el ácido bromoacético.

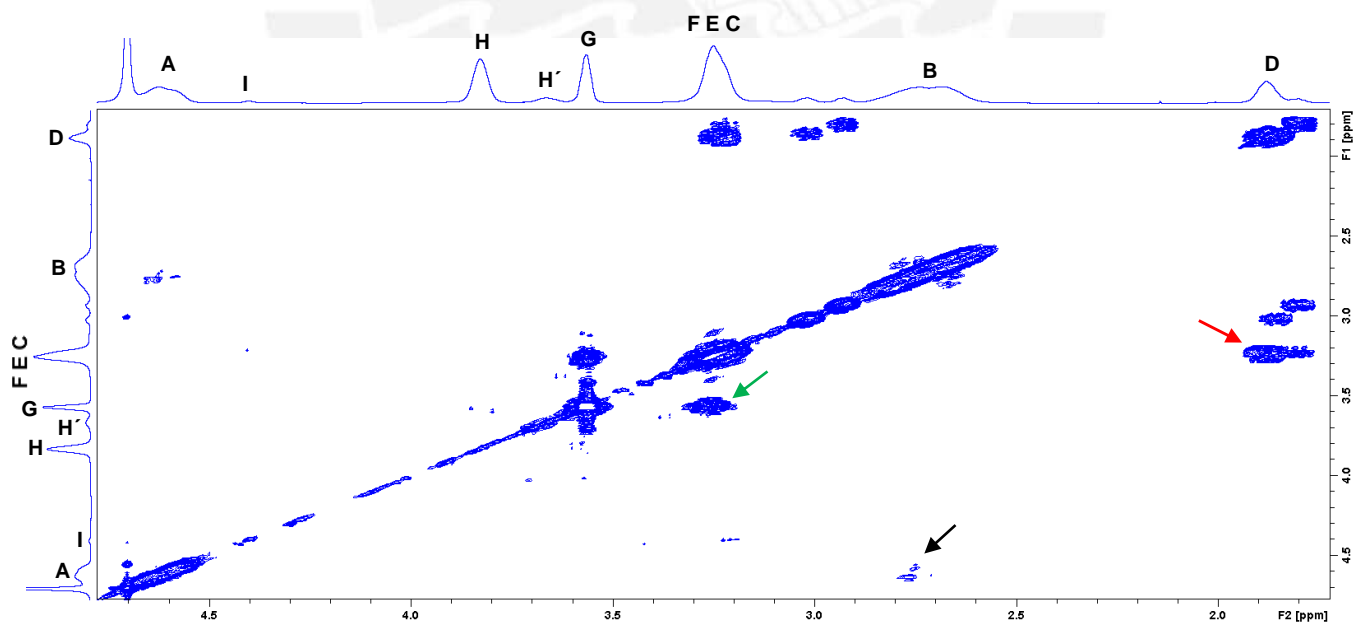


Figura 34. Espectro COSY del PASP-DC-MC-MH-6 en D_2O a 25°C. La flecha verde muestra el acoplamiento de las señales F y G de los hidrógenos PASP-MH. La flecha negra muestra el acoplamiento entre los hidrógenos A y B de la cadena principal del PASP-MA-MH. La flecha roja muestra el acoplamiento entre las señales C y E con la señal D de los hidrógenos PASP-MA. Se observa que los metilenos H y H' no presentan acoplamiento con alguna señal del espectro.

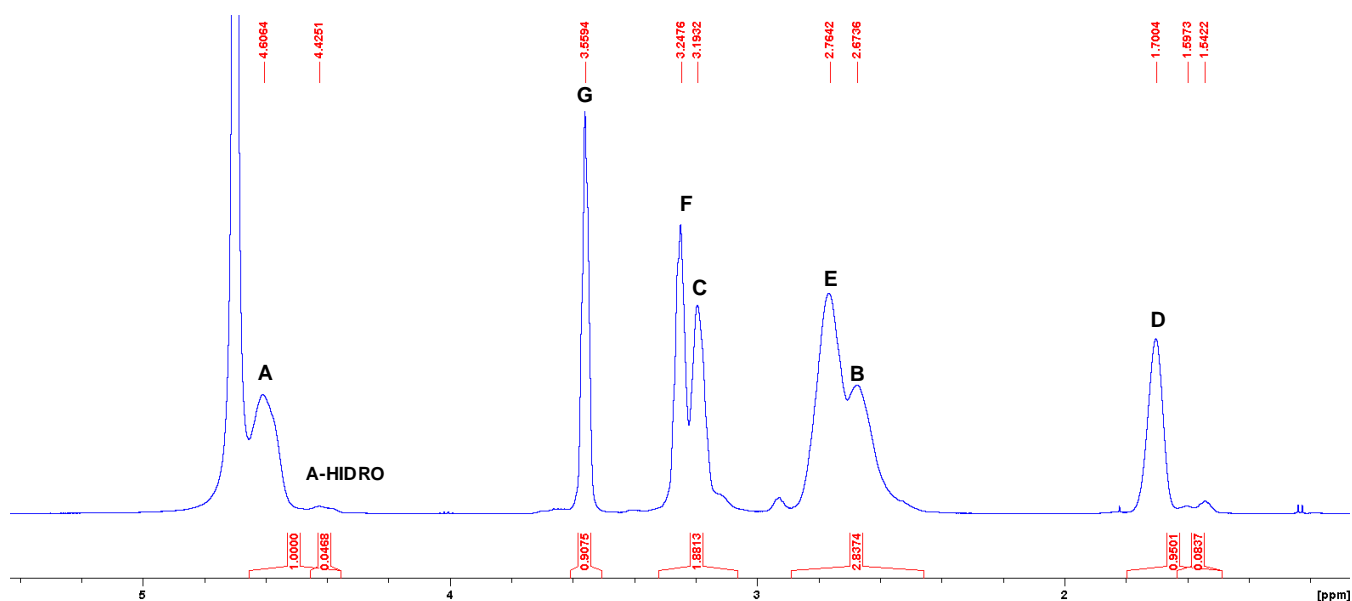


Figura 35. Espectro ^1H -RMN del PASP-MA-MH-16 en D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$

Asimismo, en el espectro COSY recién mencionado se observa un acoplamiento significativo entre las señales a 2.68-2.74 y 4.62 ppm. Se han asignado estos picos a los hidrógenos B y A respectivamente, puesto que el desplazamiento de ambas señales no ha sufrido alteraciones significativas respecto al valor registrado en el espectro ^1H -RMN a $25\text{ }^\circ\text{C}$ del PASP-MA-MH-16.

En este contexto resulta importante hacer mención de la relación de integraciones (2.00:1.00) entre estos dos picos, B y A, determinada a partir del espectro ^1H -RMN a $75\text{ }^\circ\text{C}$ del PASP-DC-MC-MH-6 mostrado en la figura 36. El fuerte desplazamiento hacia campo bajo de las señales observado en dicho espectro, permitió resolver la señal del hidrógeno A (superpuesta con la del agua residual en el espectro ^1H -RMN a $25\text{ }^\circ\text{C}$) e hizo posible el cálculo exacto de la relación de integraciones entre B y A previamente mencionada.

Al comparar esta última relación con aquella observada en el espectro ^1H -RMN del PASP-MA-MH-16 a $75\text{ }^\circ\text{C}$, precursor del PASP-DC-MC-MH-6, (Figura 37) se obtiene una relación completamente distinta entre las señales B y A de 2.95 a 1.00 en este caso. Cabe aclarar que esta diferencia se debe a que en el PASP-DC-MC-MH-6 la señal E perteneciente al mero PASP-MA se ve desplazada hacia campo más bajo que en el precursor PASP-MA-MH-16. En este último, dicha señal se encuentra superpuesta con el pico B, aumentando así su valor de integración.

Por otro lado, cabe recordar (acápite 6.2.3) que en el espectro ^1H -RMN a $75\text{ }^\circ\text{C}$ del precursor PASP-MA-MH-16 la señal correspondiente al hidrógeno A fue asignada a tres tipos distintos de hidrógenos metino, dos de los cuales se encuentran superpuestos a 5.12 ppm y el tercero se ubica a 4.91 ppm . Este último es el que fue asignado al PASP-HIDRO proveniente de la reacción secundaria de hidrólisis, mientras que los dos primeros son producto de los meros PASP-MA y PASP-MH.

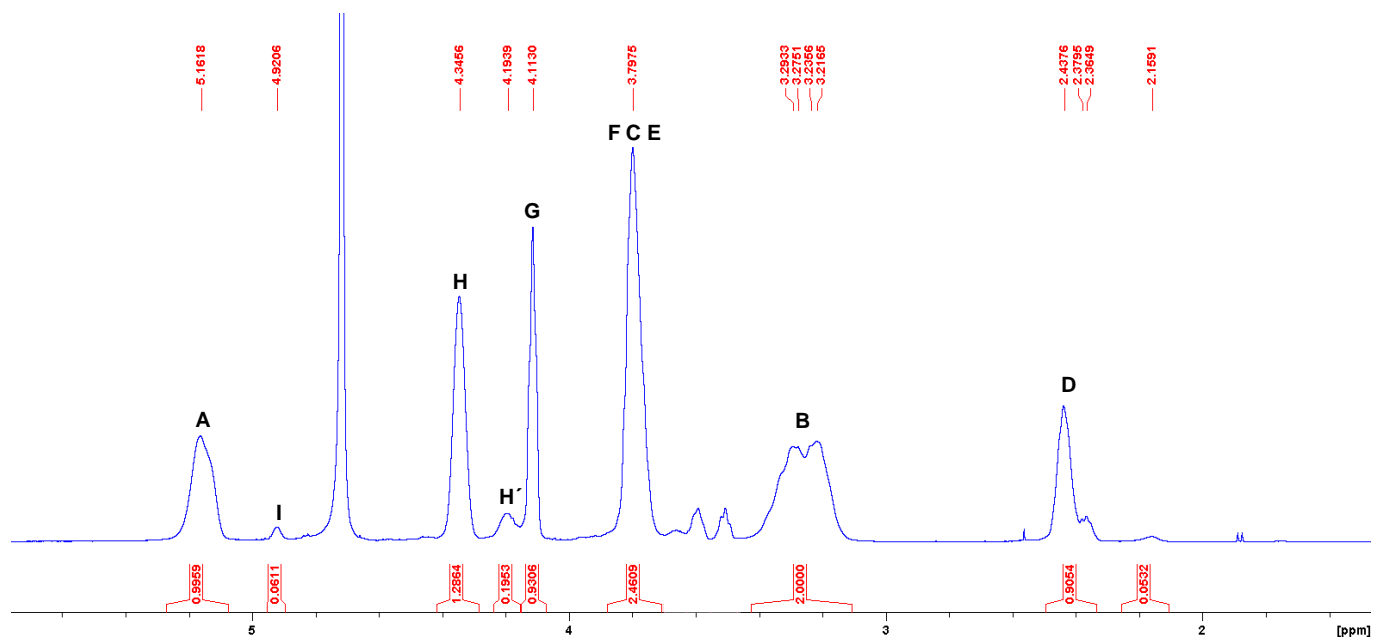


Figura 36. Espectro ^1H -RMN del PASP-DC-MC-MH-6 en D_2O a $75\text{ }^\circ\text{C}$

Estas observaciones permitieron plantear dos importantes hipótesis durante la caracterización por ^1H -RMN del PASP-DC-MC-MH-6. En primer lugar, para el espectro ^1H -RMN a $25\text{ }^\circ\text{C}$ del PASP-DC-MC-MH-6, la relación 2.00:1.00 entre las dos señales con un desplazamiento similar al de los hidrógenos B y A ($2.68\text{--}2.74$ y 4.62 ppm respectivamente) indicaría que todos los hidrógenos A de todas las secciones del copolímero (PASP-MA, PASP-MH y PASP-HIDRO) se han desplazado hacia una única región formando un solo pico. Esto constituye una diferencia notoria con el precursor PASP-MA-MH-16 donde la señal A del PASP-HIDRO se encuentra separada a la señal A del resto de los meros. En segundo lugar, el aparente desplazamiento del hidrógeno E en el espectro ^1H -RMN del PASP-DC-MC-MH-6 a $25\text{ }^\circ\text{C}$ observado en la figura 32 respecto al correspondiente precursor, donde aparecía superpuesto con la señal B a 2.76 ppm , indicaría que se ha producido la reacción de carboximetilación entre el grupo amino del PASP-MA con el ácido bromoacético.

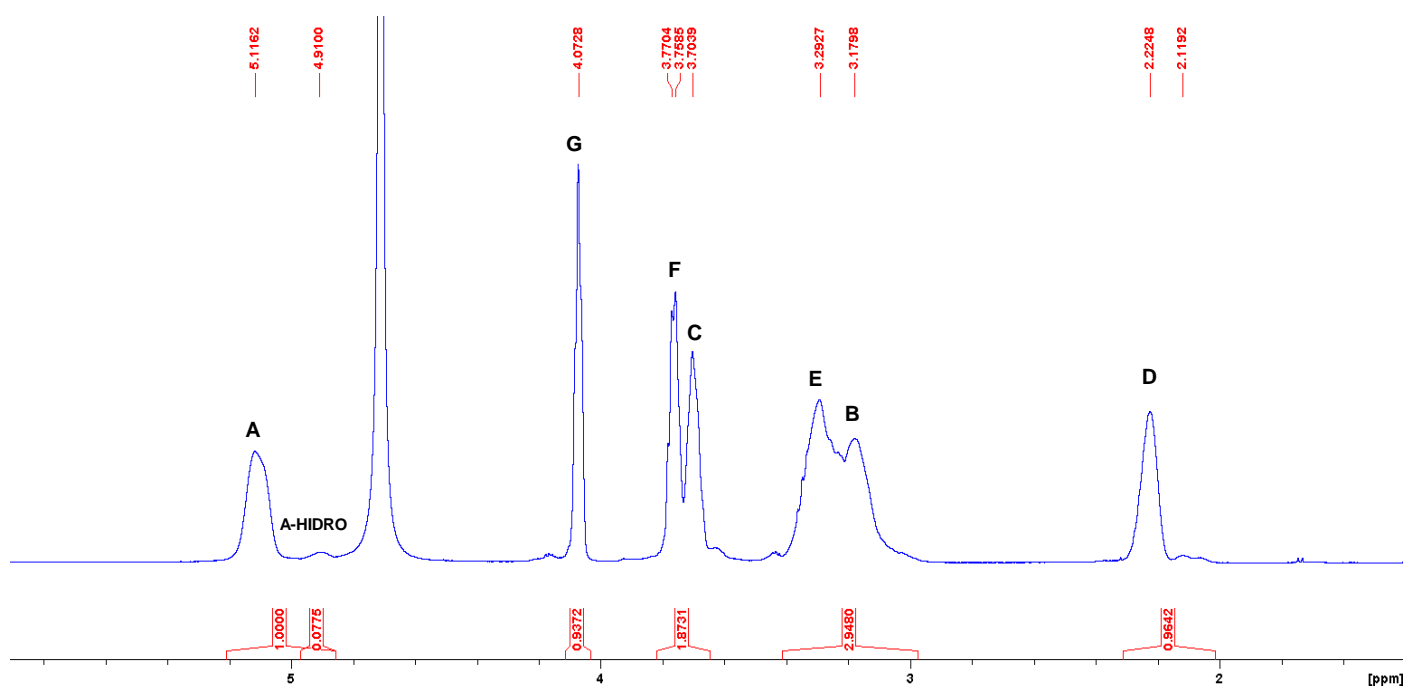


Figura 37. Espectro ^1H -RMN del PASP-MA-MH-16 en D_2O a $75\text{ }^\circ\text{C}$

Otra observación importante respecto al espectro ^1H -RMN a $25\text{ }^\circ\text{C}$ del PASP-DC-MC-MH-6 (Figura 32) se refiere a la pequeña señal a 4.40 ppm. En un inicio se especuló que el pico en cuestión, dada su posición muy cercana a la observada para el PASP-HIDRO en el espectro ^1H -RMN a $25\text{ }^\circ\text{C}$ de su precursor, el PASP-MA-MH-16 (Figura 35), podía ser producto del mismo mero. Sin embargo, la relación de integraciones (2:1) entre las señales B y A del PASP-DC-MC-MH-6, previamente mencionada, y la falta de acoplamiento entre esta señal problema y el pico B en el espectro COSY del PASP-DC-MC-MH-6 tomado a $25\text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 34) indicaban que el pico a 4.40 ppm no podía asignarse a la señal A del PASP-HIDRO, por lo que se le denominó como señal I. Con el fin de confirmar esta hipótesis se realizó un análisis HSQC a $25\text{ }^\circ\text{C}$ del PASP-DC-MC-MH-6 (Figura 38), donde se comprobó que el pico en cuestión no era producto de un grupo metino, sino de uno metileno.

Este hallazgo permitió también reforzar la hipótesis previa que postulaba que la señal de los hidrógenos metino A del mero PASP-HIDRO del polímero precursor PASP-MA-MH-16 se había desplazado a campo bajo en el polímero ligando PASP-DC-MC-MH-6, uniéndose con aquella proveniente de los hidrógenos A de los otros meros (PASP-MA y PASP-MH).

Este desplazamiento de picos resulta coherente si se toma en cuenta que el análisis de ^1H -RMN del PASP-MA-MH se realiza en un medio básico originado por los grupos amino de los meros PASP-MA, mientras que el del PASP-DC-MC-MH ocurre en un ácido debido a los grupos carboxílicos. Un entorno alcalino propiciaría la desprotonación de todos los grupos carboxílicos de las secciones PASP-HIDRO, lo que en consecuencia generaría que el hidrógeno A del PASP-HIDRO posea un entorno muy diferente al del hidrógeno A del PASP-HIDRO del copolímero ligando PASP-DC-MC-MH. En el primer caso el metino A-HIDRO se encontraría enlazado a un grupo COO^- , mientras que en el segundo sería a un COOH .

En lo que se refiere a la señal problema I, ubicada a 4.40 ppm en el espectro ^1H -RMN del PASP-DC-MC-MH-6 a 25°C (figura 32), cabe mencionar que Murga, en su tesis de licenciatura, también describe la aparición de una señal extraña en una posición similar (4.35 ppm). Murga realizó los análisis COSY y HSQC del PASP-DC-MC los que le permitieron comprobar, al igual que en la presente investigación, que dicha señal no mostraba acoplamiento con ninguna otra señal del espectro y que pertenecía a un grupo metileno. Basado en esta información, postuló que la señal inesperada a 4.35 ppm pudo haberse originado por la formación de un grupo bromoacetamida, producto de una reacción secundaria en que la amina terminal del grupo PASP-MA ataca al grupo carbonilo del ácido bromoacético.

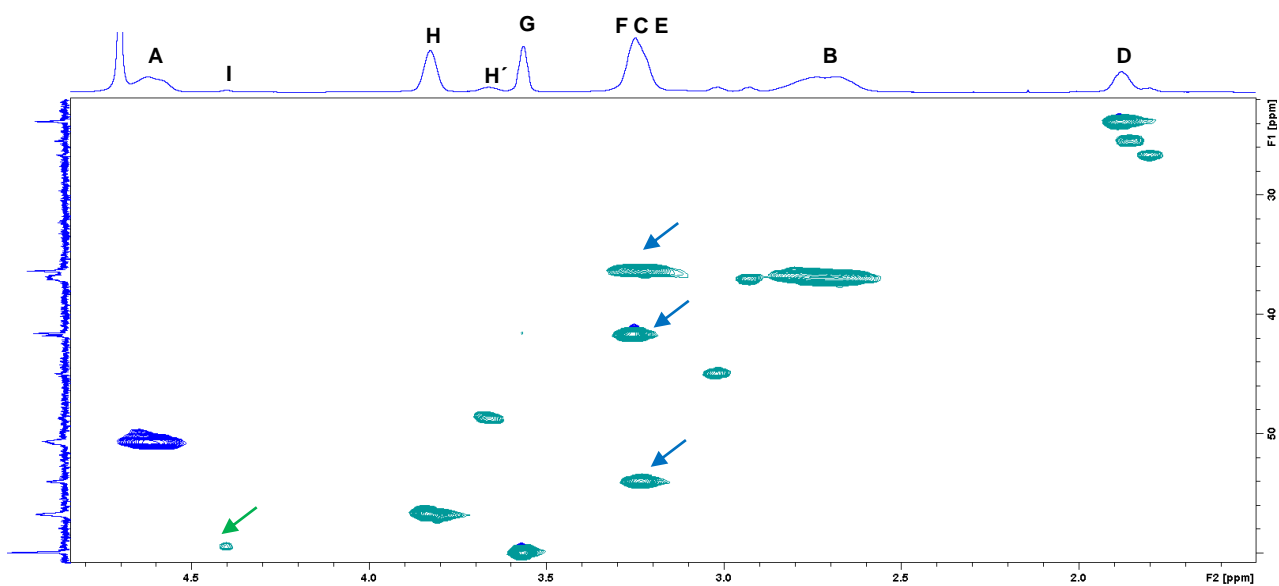


Figura 38. Espectro HSQC del PASP-DC-MC-MH-6 en D₂O a 25 °C. La flecha verde indica la correlación entre el hidrógeno desconocido y su carbono correspondiente. Las flechas azules muestran las correlaciones entre los 3 tipos de hidrógenos F, C y E con sus respectivos carbonos. El espectro del ¹³C-RMN con sus respectivas asignaciones se puede apreciar en el anexo 12.

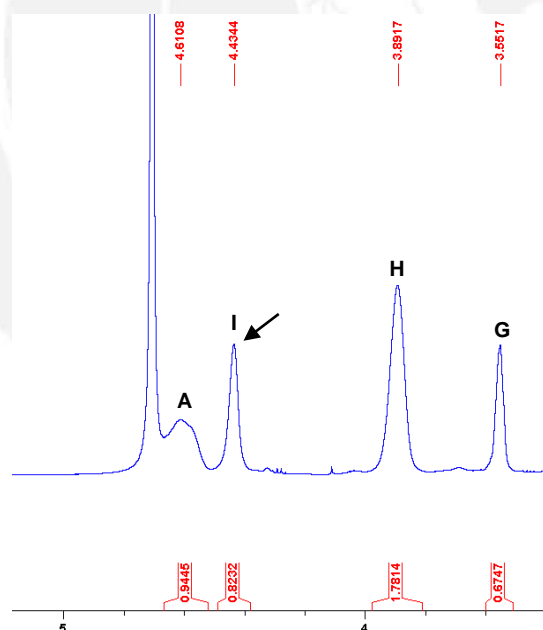


Figura 39. Espectro ¹H-RMN ampliado del PASP-DC-MC-MH-2 en D₂O a 25 °C. La flecha negra indica al pico I, es notable la gran intensidad de la señal a comparación del observado en el PASP-DC-MC-MH-6

Para comprobar la posible naturaleza del grupo desconocido se decidió realizar un análisis cualitativo de fluorescencia de rayos X (FRX) del PASP-DC-MC-MH-2, en el cual se utilizó un enorme exceso de ácido bromoacético. Este presenta en su espectro $^1\text{H-RMN}$ a 25 °C una señal I particularmente intensa a 4.43 ppm y comparable a la señal de los hidrógenos metino A (Figura 39). Mediante el uso de la técnica de FRX es posible establecer una relación proporcional entre la intensidad de señal o cuentas del elemento a medir con su concentración. Para realizar la medición es necesario emplear estándares del elemento a medir sobre una matriz lo más semejante posible al compuesto en estudio, de esta manera se evitan posibles interferencias en el análisis.⁸¹ Se prepararon 5 pastillas con diferente concentración del elemento a analizar, empleando KBr como fuente de bromo y al PASP-MA-MH-10 como matriz; este último compuesto es muy similar a la macromolécula en estudio por lo cual su elección como matriz es válida.

El objetivo de este ensayo radicaba en delimitar la cantidad aproximada de bromo que presentaría el PASP-DC-MC-MH-2, asumiendo que la señal problema estuviera formada por grupos bromoacetamida únicamente. El resultado de la medición hubiera permitido plantear una relación aproximada entre la concentración de bromo observada en la muestra medida de PASP-DC-MC-MH-2 y la cantidad aproximada de meros que generaban la señal en cuestión. En el anexo 13 se muestran los espectros FRX obtenidos para cada una de las muestras de PASP-MA-MH-10 con una concentración en peso de 0, 1, 3, 8 y 10% de Br; asimismo, se reporta el espectro de fondo del equipo. En la figura 40 se muestra en forma comparativa los espectros de FRX de la muestra y los estándares al 0 y 1% en bromo.

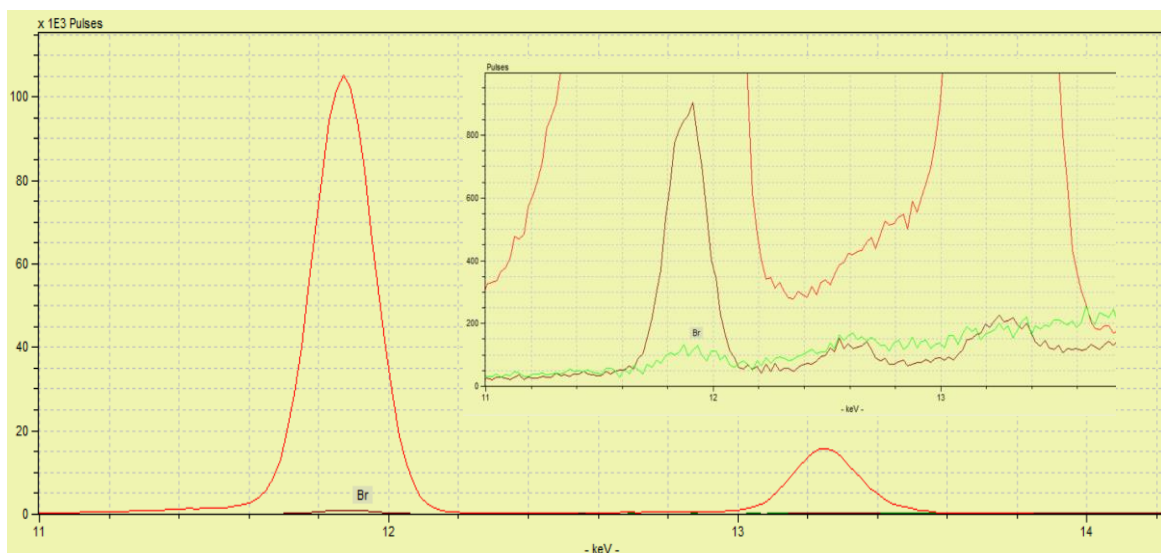


Figura 40. Espectro FRX tomado a 25 °C para comprobar contenido de bromo en PASP-DC-MC-MH-2. La línea roja muestra el perfil del PASP-MA-MH-10 al 1% en Br. La línea verde muestra el perfil del PASP-MA-MH-10 al 0% en Br. La línea marrón muestra el perfil del PASP-DC-MC-MH-2. Los picos intensos a 11.40 y 13.20 keV muestran las líneas $K_{\alpha} 1$ y $K_{\beta} 1$ del bromo respectivamente.

Se esperaba que el PASP-DC-MC-MH-2 presentara una concentración de bromo relativamente alta, puesto que la señal desconocida I, atribuida inicialmente al grupo bromoacetamida propuesto por Murga, era particularmente intensa en este copolímero, y comparable a la señal A, proveniente de los metinos de todos los meros de la macromolécula. No obstante, el espectro FRX del macro-ligando indicó que las señales propias del bromo resultaban minúsculas respecto a la muestra al 1% en concentración (figura 40).

Este ensayo llevó a concluir que la mínima cantidad de bromo observado en el espectro FRX del PASP-DC-MC-MH-2 no era consistente con el grupo bromoacetamida inicialmente propuesto por Murga y a reevaluar su posible estructura. Se consideró entonces la posibilidad de que el grupo bromoacetamida, inicialmente formado, hubiera experimentado una sustitución nucleofílica del bromo por iones OH^- del medio de reacción. Esta propuesta resulta lógica, dado que durante toda la síntesis del PASP-DC-MC-MH se trabaja en una solución ligeramente alcalina (pH 7-8) donde existe la posibilidad que los grupos nucleofílicos OH^- , presentes en el medio acuoso, ataquen al carbono positivado unido al bromo. El presente análisis permitió postular que la señal desconocida I (alrededor de 4.40 ppm) en los espectros ^1H -RMN de los PASP-

DC-MC-MH sintetizados provendría de un grupo hidroxiacetamida, el cual ha sido denominado como "PASP-AcOH".

No obstante, se hubiera esperado que el gran incremento en la intensidad de la señal I en el espectro $^1\text{H-RMN}$ del PASP-DC-MC-MH-2, respecto al observado en el PASP-DC-MC-MH-6, hubiera traído como consecuencia directa la reducción de la señal H dado que ambos picos provienen de un mismo mero, el PASP-MA. En cambio, se observa que, pese al aumento del pico I, la señal H mantiene su intensidad. Esta aparente inconsistencia se podría explicar partiendo del hecho de que en la síntesis del PASP-DC-MC-MH-2 se empleó, en contraste con la del PASP-DC-MC-MH-6, un enorme exceso de ácido bromoacético. La gran cantidad de este reactivo, respecto a la mínima necesaria para favorecer la di-carboximetilación de todos los meros PASP-MA del copolímero precursor PAS-MA-MH-10, podría dar lugar a una nueva reacción secundaria que justifique esta inusual observación.

Es un hecho conocido que los grupos amino terminales de los meros PASP-MA son mucho mejores nucleófilos que los grupos hidroxilo terminales de los meros PASP-MH, lo que favorece la esperada carboximetilación preferente de los primeros. Sin embargo, en presencia de un gran exceso del ácido bromoacético, este podría, una vez agotados los meros PASP-MA disponibles, reaccionar con los hidroxilos de los meros PASP-MH. De esta manera se generarían no solamente los meros deseados PASP-DC y PASP-MC sino, además del PASP-AcOH, un segundo tipo de mero no esperado al que denominaremos como mono-O-carboximetilados (PASP-OMC); esta última reacción no ocurriría en caso se emplee solo un ligero exceso del ácido bromoacético. En la figura 41 se muestran las estructuras de los dos tipos de secciones poliméricas generadas por reacciones secundarias.

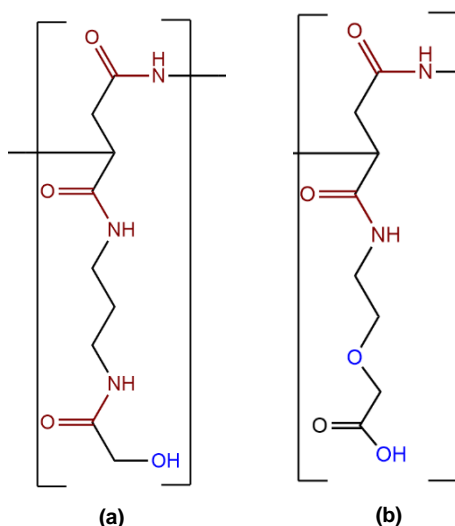


Figura 41. Estructuras de meros (a) PASP-AcOH y (b) PASP-OMC

El desplazamiento tan similar entre la pequeña señal I asignada al PASP-AcOH en el $^1\text{H-RMN}$ del copolímero PASP-DC-MC-MH-6 y aquel asignado al pico intenso, indicado también como I, en el espectro $^1\text{H-RMN}$ del PASP-DC-MC-MH-2 se atribuye a la similitud del entorno del grupo metileno terminal en ambos casos. En este contexto, cabe mencionar que la carboximetilación de los grupos hidroxilados de los PASP-MH no modifica significativamente el entorno de los protones metileno F y G; esto justifica que sus correspondientes desplazamientos en el espectro $^1\text{H-RMN}$ del PASP-DC-MC-MH-2 coincidan con aquellos de los meros PASP-MH eventualmente no reaccionados. Asimismo, su posición coincide con las señales F y G en el espectro $^1\text{H-RMN}$ del PASP-DC-MC-MH-6 a 25°C (Figura 32) en que no habría tenido lugar la carboximetilación de los grupos hidroxilo.

Por otro lado, esta última reacción secundaria, promovida por el gran exceso de ácido bromoacético, tendría lugar exclusivamente en los meros PASP-MH y, por consiguiente, no afectaría la cantidad de meros PASP-MA carboximetilados; esto explicaría que la intensidad de la señal H asignada a los meros PASP-DC en el espectro $^1\text{H-RMN}$ del PASP-DC-MC-MH-2 no experimente un cambio significativo. En cambio, si esta señal I se asignara al mero PASP-AcOH, dado que este proviene de las mismas cadenas laterales PASP-MA que dan origen a los meros PASP-DC y PASP-MC, su intensidad solo podría aumentar a expensas de las otras dos.

Sin embargo, pese a que se han planteado dos posibles explicaciones para justificar la aparición e intensidad de la señal I, ambas poseen ciertas deficiencias que no pueden ser ignoradas. Para el caso del posible mero PASP-AcOH, el medio de reacción entre 6-8 generaría que el grupo carboxílico del ácido bromoacético se encuentre desprotonado la mayor parte del tiempo, por lo cual la reacción de amidación entre el grupo amino de la sección PASP-MA y el carbonilo del ácido bromoacético sería muy poco probable. Por otro lado, la formación del mero PASP-OMC, pese a que podría ser una opción plausible, no explicaría la formación de la señal "I" en el $^1\text{H-RMN}$ del PASP-DC-MC-1 sintetizado en este trabajo y aquellos obtenidos por Murga, puesto que estas macromoléculas no presentan cadenas laterales hidroxilo. Es así que, para el cálculo de proporciones de meros del PASP-DC-MC-MH, se decidió no tomar en cuenta la señal I mencionada dado que no era posible identificar claramente su procedencia. Asimismo, resulta válido el no considerar este pico, pues para las posteriores síntesis del PASP-DC-MC-MH se logró mejorar el procedimiento de síntesis y reducir a valores muy bajos la intensidad de la señal problema I.

La segunda hipótesis planteada durante la caracterización del PASP-DC-MC-MH-6 postulaba que el desplazamiento de la señal E respecto a su posición inicial, superpuesta con B, en el espectro $^1\text{H-RMN}$ del polímero precursor PASP-MA-MH-16 a 25 °C (2.76 ppm) constituía un indicio de la reacción de los meros PASP-MA con el ácido bromoacético. Al comparar los espectros $^1\text{H-RMN}$ del PASP-DC-MC-MH-6 y el polímero precursor PASP-MA-MH-16 a 25 °C, se observó en el primero una señal a 3.25 ppm con un perfil e integración muy diferente al registrado en el espectro del precursor (Figura 42); esta se encuentra en la misma región que las señales de los hidrógenos F y C de los meros PASP-MH y PASP-MA, respectivamente, de los copolímeros PASP-MA-MH estudiados. La variación en el perfil de dicha señal así como el considerable aumento de integración respecto a las señales F y C observadas en el polímero precursor, permitió concluir que la señal E se había desplazado a esa posición y superpuesta con ambas señales. Esta propuesta es coherente con el hecho que, al ocurrir la reacción de carboximetilación, el grupo amino terminal del mero PASP-MA se une a un carbono positivado por un grupo carboxílico; el consiguiente desapantallamiento originaría un desplazamiento a campo bajo en el espectro $^1\text{H-RMN}$ del PASP-DC-MC-MH de dichos hidrógenos. Asimismo,

esta asignación se ve reforzada por el espectro HSQC a 25°C del PASP-DC-MC-MH-6 presentado en la figura 38. En este último se observa que la señal a 3.25 ppm está formada por 3 tipos de hidrógenos distintos, lo cual concuerda con la propuesta de que el pico en cuestión está conformado por los metilenos F, C y E.

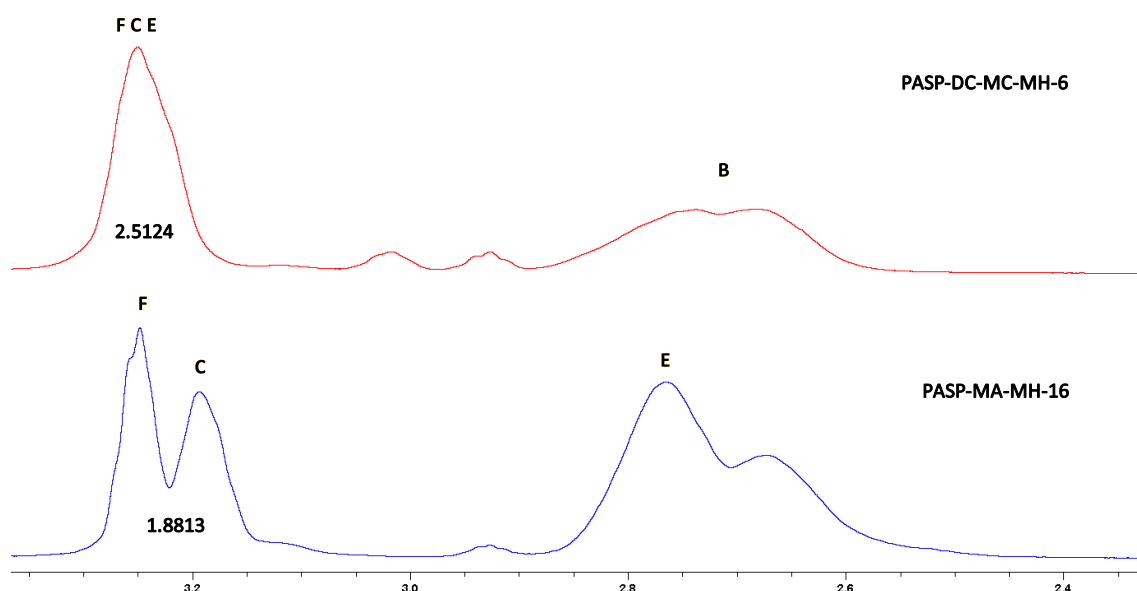


Figura 42. Espectros ^1H -RMN ampliados del PASP-MA-MH-16 y el PASP-DC-MC-MH-6 en D_2O a 25 °C. Se observa claramente el desplazamiento del pico E hacia la región de los hidrógenos F y C luego de finalizada la reacción de carboximetilación del PASP-MA-MH-16

Una vez identificados los picos C y E se procedió a buscar la señal producto de los metilenos D del mero PASP-MA. En el espectro COSY del PASP-DC-MC-MH-6 a 25°C (Figura 34) se observó que existía una correlación entre los picos a 3.25 y 1.88-1.80 ppm. Puesto que la primera señal correspondía a los hidrógenos C y E del PASP-MA se postuló que la segunda debía de pertenecer a los metilenos D de la macromolécula. Sin embargo, el espectro ^1H -RMN del PASP-DC-MC-MH-6 a 25°C (Figura 32) mostró que la región a 1.88-1.80 ppm se encontraba formada por dos picos traslapados entre sí. La presencia de estas dos señales extrañas en una región muy cercana a la del metileno D indicaba que durante la reacción de carboximetilación del mero PASP-MA posiblemente se habían formado dos compuestos distintos. En el acápite 6.3.1 se describió que la reacción de carboximetilación puede generar cadenas PASP-MA dicarboximetiladas (PASP-DC) como mono-carboximetiladas (PASP-MC). Ambas secciones poseen un entorno muy similar, por lo cual se esperaba que se

encuentren formando una sola señal; sin embargo, al no tener una estructura idéntica, estas podrían encontrarse un poco separadas. Por la información presentada se concluyó que los picos a 1.88-1.80 ppm se encontraban formados por hidrógenos D de las secciones PASP-DC y PASP-MC.

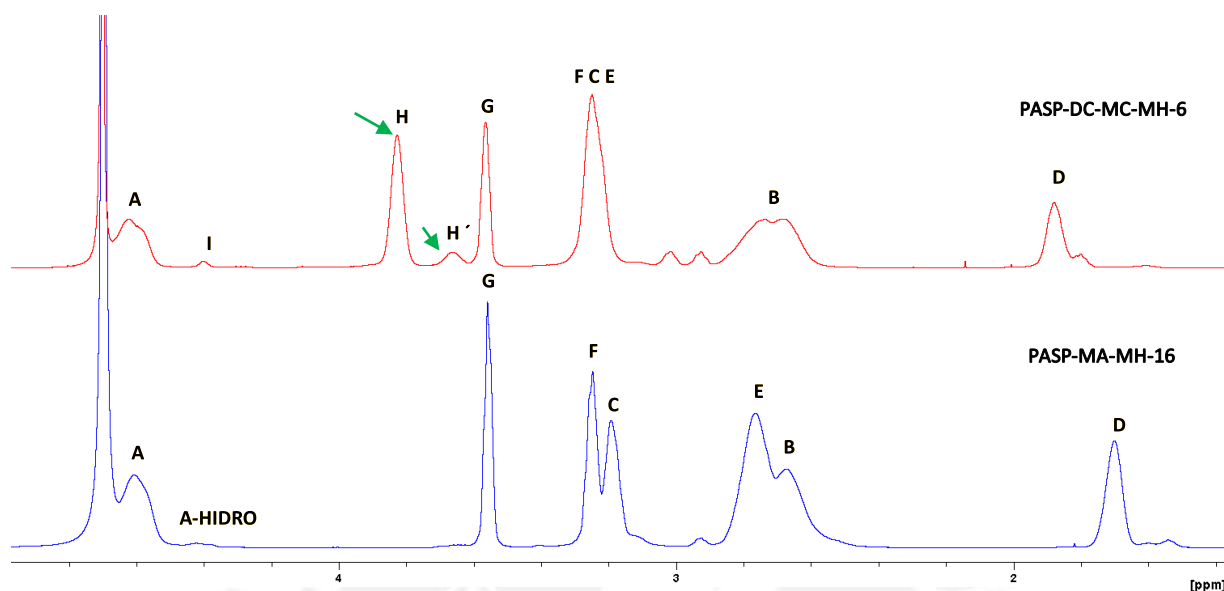


Figura 43. Espectros ^1H -RMN del PASP-MA-MH-16 y el PASP-DC-MC-MH-6 a 25 °C. Las flechas verdes muestran las señales nuevas a 3.67 y 3.83 ppm que han aparecido en el PASP-DC-MC-MH-6 luego de la carboximetilación del PASP-MA-MH-16.

La identificación de esta última señal E y las asignaciones previas para los metilenos C y D del mero PASP-MA, F y G del mero PASP-MH y A y B de la cadena principal en el ^1H -RMN del PASP-DC-MC-MH-6 facilitó la identificación de los picos característicos de los hidrógenos metileno en los meros PASP-DC y PASP-MC formados durante la reacción de carboximetilación del PASP-MA-MH-16. En la figura 43 se muestran los espectros ^1H -RMN a 25 °C del PASP-MA-MH-16 y el PASP-DC-MC-MH-6; se observa claramente la aparición de dos señales importantes a 3.67 y 3.83 ppm que no se habían registrado en el polímero precursor. El espectro COSY del PASP-DC-MC-MH-6 a 25 °C (figura 34) demostró que ambos picos estaban formados por hidrógenos aislados, pues no acoplaban con ninguna otra señal de la macromolécula; asimismo, el análisis por HSQC a 25 del PASP-DC-MC-MH-6 °C (figura 38) mostró que las dos señales estaban conformadas por hidrógenos metileno. La información obtenida por ambos análisis concordaba con lo que se esperaría si es que las señales fueran producto de los metilenos DC y MC. Para corroborar esta propuesta se realizó un análisis de HMBC a 25 °C del PASP-DC-MC-MH-6 (figura 44),

mediante el cual se demostró que las dos señales desconocidas se encontraban adyacentes a grupos carbonilo (pese a que para el pico pequeño H' el carbono se encontraba encubierto por el ruido de la medición). Este último hallazgo permitió concluir que los picos a 3.67 y 3.83 ppm correspondían a los metilenos H' y H de los meros PASP-MC Y PASP-DC. Se postuló que la señal pequeña a 3.67 ppm debía de pertenecer a los hidrógenos H' del mero PASP-MC mientras que el pico intenso a 3.83 ppm debía de ser producto del metileno H característico del mero PASP-DC. Esta asignación resulta lógica si se toma en cuenta que la cantidad de mmoles de ácido bromoacético utilizada en la síntesis del PASP-DC-MC-MH-6 correspondía a un ligero exceso sobre la mínima apropiada para favorecer la di-carboximetilación de todos los meros PASP-MA.

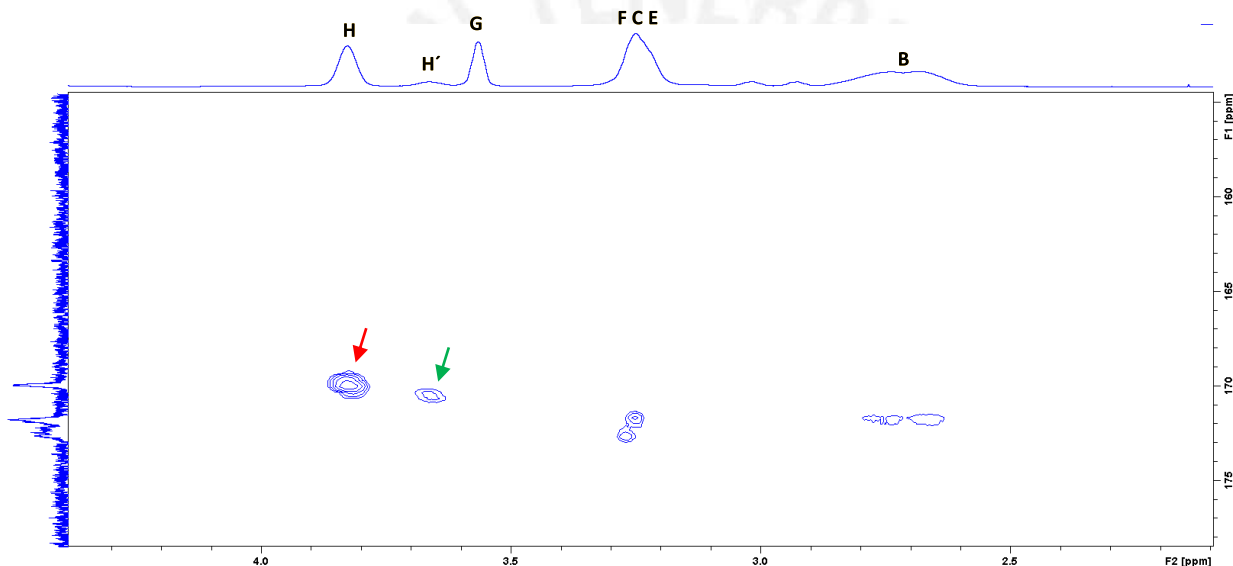


Figura 44. Espectro HMBC ampliado del PASP-DC-MC-MH-6 en D₂O 25 °C. La flecha verde muestra la correlación entre el hidrógeno H' con su respectivo carbono adyacente. La flecha roja muestra la correlación entre el hidrógeno H con su respectivo carbono adyacente.

La asignación de los hidrógenos H y H' en la presente investigación difiere de lo propuesto por Neuse y Murga para el PASP-DC-MC. Ambos mencionan que, empleando 4 o 5 equivalentes de ácido bromoacético respecto al número de meros PASP-MA, la síntesis del PASP-DC-MC genera una única señal producto de los meros PASP-MC y PASP-DC alrededor de 3.90 ppm en el espectro ¹H-RMN a 25 °C. Sin embargo, sus investigaciones no incluyeron ensayos donde se redujera el exceso de ácido bromoacético empleado en la reacción, por lo cual no les fue posible observar si con un menor exceso del ácido se mantenía la única señal mencionada. El trabajar exclusivamente con altas concentraciones

de ácido bromoacético, como las empleadas por Neuse y Murga, podría haber conducido a una mayor conversión de los meros PASP-MA a PASP-DC dejando una mínima proporción de meros PASP-MC, cuya señal no sería observable en el respectivo espectro $^1\text{H-RMN}$. Por otro lado, al utilizar solamente la cantidad equivalente teórica de ácido para di-carboximetilar todos los meros PASP-MA, aumentaría la probabilidad de formación paralela de meros mono-carboximetilados y por ende se observaría la aparición de una segunda señal en el espectro $^1\text{H-RMN}$ correspondiente. Para verificar esta hipótesis se realizó la síntesis del PASP-DC-MC-2, en la cual se empleó solo un pequeño exceso de ácido bromoacético a diferencia de lo recomendado por ambos investigadores. En la tabla 18 y la figura 45 se presentan las condiciones utilizadas para la síntesis del PASP-DC-MC-2 y su espectro $^1\text{H-RMN}$ a $25\text{ }^\circ\text{C}$ respectivamente. En este último se observa claramente la aparición de dos señales a 3.70 y 3.85 ppm con un perfil y posición muy similar al de los picos H' y H propuestos para el espectro $^1\text{H-RMN}$ del PASP-DC-MC-MH-6 a $25\text{ }^\circ\text{C}$.

La aparición de la pequeña señal H' asignada a los meros PASP-MC a 3.70 ppm no fue observada en el espectro $^1\text{H-RMN}$ a 25°C del polímero de referencia PASP-DC-MC-1 (Figura 30), sintetizado en la presente investigación con el mismo precursor polimérico que el empleado para la síntesis del PASP-DC-MC-2. La diferencia radica en que en el primer caso se empleó el exceso recomendado por Neuse y Murga (4 equivalentes del ácido bromoacético por mero PASP-MA) mientras que para el último se usó 2.1 equivalentes del ácido. Este hallazgo confirmaría que el emplear un gran exceso del reactivo ácido promovería una di-carboximetilación relativamente completa de los meros PASP-MA, ya sea en la síntesis del PASP-DC-MC o PASP-DC-MC-MH, por lo cual los espectros $^1\text{H-RMN}$ de los mismos mostrarían una sola señal producto de los hidrógenos metileno de los meros PASP-DC. Por el contrario, usar un ligero exceso sobre los dos equivalentes teóricos conduciría a una di-carboximetilación incompleta que conlleva a la aparición de la señal H' .

PASP-DC-MC-2					
PASP-MA de partida	Peso (g) / Rendimiento (%)	Meros de PASP-MA (mmol)	Ácido bromoacético (mmol)	Señal	Asignación (ppm)
1	0.355 / 59.93	2.06	4.35	CH ₂ (D)	1.88
				CH ₂ (B)	2.73
				CH ₂ (E)	3.24
				CH ₂ (C)	3.24
				CH ₂ (H)	3.85
				CH ₂ (H')	3.70
				CH (A)	4.59

Tabla 18. Condiciones de síntesis y asignación de señales del PASP-DC-MC-2

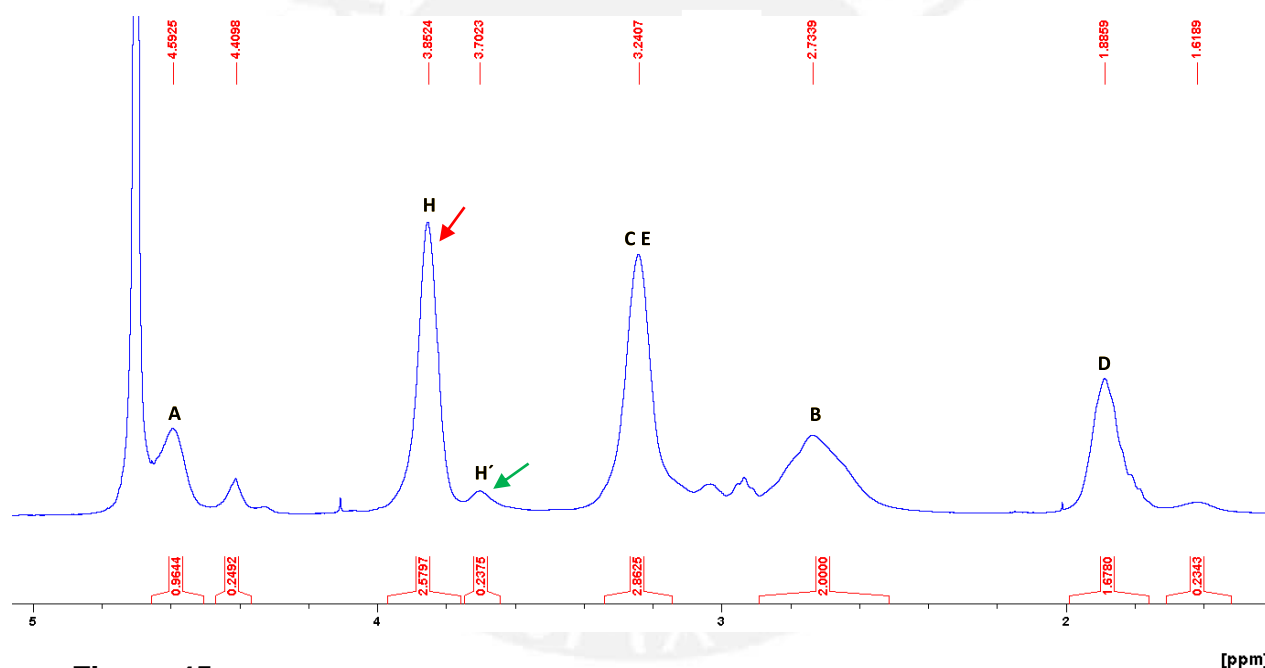


Figura 45. Espectro ¹H-RMN del PASP-DC-MC-2 en D₂O a 25 °C. La flecha verde muestra el pico H' del mero PASP-MC. La flecha roja muestra el pico H del mero PASP-DC.

Una vez identificadas todas las señales características de las diferentes secciones poliméricas en el espectro ¹H-RMN del PASP-DC-MC-MH-6 a 25°C (Figura 32) se observó que aún quedaban tres pequeños picos no asignados (Figura 46).

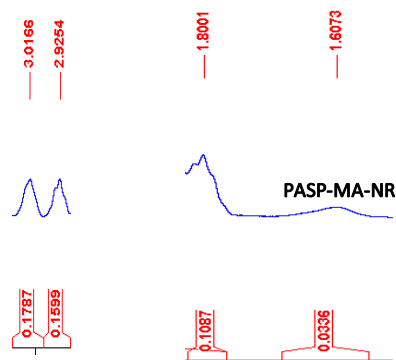


Figura 46. Espectro ampliando ^1H -RMN del PASP-DC-MC-MH-6 en D_2O a 25°C de región con picos secundarios desconocidos. Se presenta la integración y desplazamiento de la señal D a 1.61 ppm de los meros PASP-MA que no han reaccionado (PASP-MA-NR) así como las pequeñas señales relacionadas con la señal D de los meros carboximetilados

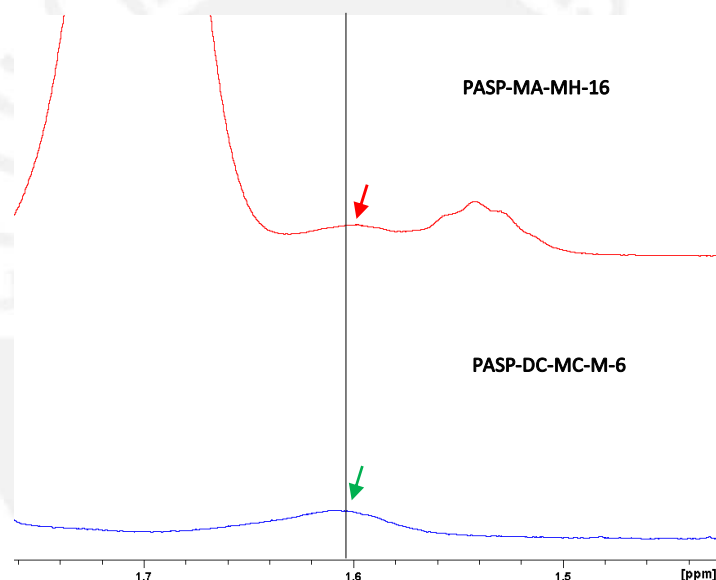


Figura 47. Comparación entre los espectros ampliados ^1H -RMN en D_2O a 25°C del PASP-MA-MH-16 y el PASP-DC-MC-MH-6 en región de hidrógenos D. La flecha roja indica el pequeño pico D del mero PASP-MA presente en el PASP-MA-MH-16. La flecha verde indica el pequeño pico D del mero PASP-MA-NR presente en el PASP-DC-MC-MH-6.

Se postuló que el pico a 1.61 ppm en el espectro ^1H -RMN del PASP-DC-MC-MH-6 a 25°C podía ser producto de los hidrógenos metileno D de los meros PASP-MA que eventualmente no hubieran reaccionado con el ácido bromoacético. Esta propuesta se apoya en el hecho que su desplazamiento es muy similar a aquel de una de las pequeñas señales D observadas a campo

ligeramente más alto que el pico D principal en el espectro ^1H -RMN del precursor PASP-MA-MH-16 (Figura 47); a este nuevo mero se le denominó PASP-MA-NR.

Por otro lado, se propone que la pequeña señal a 2.92 ppm podría ser asignada al pico E de los meros mono-carboximetilados, pues en el espectro COSY del PASP-DC-MC-MH-6 a 25°C (figura 34) se nota claramente que esta señal acopla tanto con el hombro a 1.80 ppm, asignado al pico D de los meros PASP-MC, como con la señal C superpuesta a la E de los meros di-carboximetilados. El hecho que se observe el mayor desplazamiento de la posible señal E de los meros PASP-MC, seguido del pico D correspondiente respecto a la C que no sufre desplazamiento observable, se atribuiría a la diferente cercanía de cada uno de ellos con el grupo amino derivatizado. Finalmente, la segunda señal pequeña a 3.02 ppm resulta difícil de asignar, pues solamente acopla con la señal principal D que de acuerdo al espectro HSQC del PASP-DC-MC-MH-6 (Figura 38) a 25°C encubre un señal D secundaria.

La caracterización del PASP-DC-MC-MH-6 culminó con el análisis de su espectro infrarrojo mostrado en la figura 33. Se puede apreciar una banda intensa y ancha de absorción centrada en 3301 cm^{-1} que corresponde a las vibraciones de estiramiento de los enlaces N-H y O-H de los grupos amido e hidroxilo. A 1717 cm^{-1} se nota un pequeño hombro, generado por el estiramiento del enlace C=O del grupo carboxílico, el cual no había sido observado en el espectro IR del PASP-MA-MH. Este último se encuentra traslapado con la banda intensa a 1648 cm^{-1} que resulta de la superposición de las bandas de estiramiento del enlace C=O de la amida I y del fuerte estiramiento asimétrico del grupo carboxilato que aparece en esa misma región. Asimismo, a 1542 cm^{-1} se observa la banda generada por la flexión del enlace N-H de la amida II. Por otro lado, a 1393 cm^{-1} se encuentran otra banda medianamente intensa producto del estiramiento simétrico del grupo carboxilato, la cual tampoco había sido observada en el espectro IR del PASP-MA-MH. Finalmente, a 1063 cm^{-1} destaca una pequeña banda producto del estiramiento del enlace C-O en el grupo alcohol del mero PASP-MH.

En este contexto, cabe justificar la relativamente baja intensidad del hombro correspondiente a la vibración del grupo carboxílico. Esta contrasta con el considerable aumento de la intensidad de la banda amido I en relación a aquella

observada en el precursor PASP-MA-MH, lo cual es consecuencia directa de su superposición con la banda del estiramiento asimétrico del grupo carboxilato. Dicho aumento aunado a la aparición de la banda de estiramiento simétrico del grupo carboxilato, ausente en el precursor, evidencia el predominio de grupos carboxílico desprotonados sobre aquellos protonados. Esto concuerda el dato bibliográfico reportado por Neuse para el PASP-DC-MC referente a la formación de un zwitterion entre grupos COOH terminales y grupos aminos secundarios o terciarios de sus correspondientes cadenas laterales. En el caso de los meros mono-carboximetilados estos se encontrarían desprotonados en su totalidad por acción del grupo amino secundario respectivo, mientras que en las secciones dicarboximetiladas, solo la mitad de los grupos COOH estarían desprotonados por acción del grupo amino terciario.

El análisis detallado de los espectros IR y ^1H -RMN que acaba de ser descrito para el PASP-DC-MC-MH-6 también fue realizado en la caracterización de los PASP-DC-MC-MH 1-5 y 7.

En lo que respecta al cálculo de la proporción de cada sección polimérica presente en el PASP-DC-MC-MH realizado para esta investigación, este comienza con una identificación inicial de las señales representativas de cada uno de ellos. Para los meros PASP-DC y PASP-MC, estas serían las señales H y H' respectivamente, la señal G para el PASP-MH y la señal D-PASP-MA-NR para los meros PASP-MA no reaccionados (PASP-MA-NR). La señal del mero PASP-HIDRO se encuentra encubierta por la señal A del metino de la cadena principal. Una vez culminada la identificación, se procede a determinar la integral de cada una de las señales descritas; en caso del PASP-HIDRO se considerará para este fin aquella calculada a partir del espectro del correspondiente precursor PASP-MA-MH, asumiendo que no ha ocurrido hidrólisis en el paso de carboximetilación. Cabe mencionar que en dicho espectro la señal del metino de la cadena lateral PASP-HIDRO aparece claramente separada de aquella del resto de los metinos de las demás cadenas laterales y por tanto se asigna la integral 1.0 al conjunto de ambas señales. Luego se procede a realizar la suma de las integraciones de las 5 señales, considerando que las 4 primeras corresponden a 2 H metileno, mientras que la del PASP-HIDRO debe ser multiplicado por 2, ya que corresponde a 1 H metino. En consecuencia, se espera

que esta suma resulte próxima al valor 2.0 de la integral de la señal B tomada como referencia, puesto que esta agrupa a los hidrógenos metileno de la cadena principal de todas las secciones poliméricas. Finalmente, se relaciona la integral de cada señal representativa con dicha suma, lo que permite determinar la proporción relativa de cada tipo de mero presente en el nuevo copolímero PASP-DC-MC-MH. Esto a su vez permite el cálculo del peso molecular de mero promedio de la cadena polimérica. En la figura 48 se muestra la estructura de todas las secciones presentes en la macromolécula PASP-DC-MC-MH con sus respectivas señales representativas observadas en el espectro ^1H -RMN.

Como se mencionó en el acápite 6.3.1, el procedimiento propuesto por Neuse y Murga para la síntesis de la poliaspartamida carboximetilada de referencia, PASP-DC-MC, plantea el utilizar un gran exceso de ácido bromoacético, lo que en principio favorecería un predominio de meros PASP-DC respecto a los PASP-MC. Sin embargo, un ensayo inicial de síntesis usando la proporción recomendada 4 a 1 de ácido bromoacético a meros PASP-MA condujo al copolímero PASP-DC-MC-MH-1 (50% PASP-MA teórico), el cual mostró la aparición del pico desconocido I (Figura 49). Esta señal presentaba una intensidad significativa, la cual no permitía un cálculo coherente de las proporciones de los distintos tipos de secciones poliméricas presentes en el PASP-DC-MC-MH.

La presencia de la señal I, al provenir de una sección polimérica no identificada, alteraría la proporción relativa antes calculada para las demás cadenas laterales y, por consiguiente, no permitiría una determinación adecuada de la relación de meros di y mono-carboximetilados ni del peso molecular de mero promedio del nuevo copolímero PASP-DC-MC-MH. Un conocimiento lo más exacto posible de dicha relación así como del peso molecular de mero promedio, resulta necesario para el cálculo de la cantidad del catión oxovanadio (IV) a utilizar en las síntesis del conjugado polímero-metal que constituye el objetivo final de este trabajo.

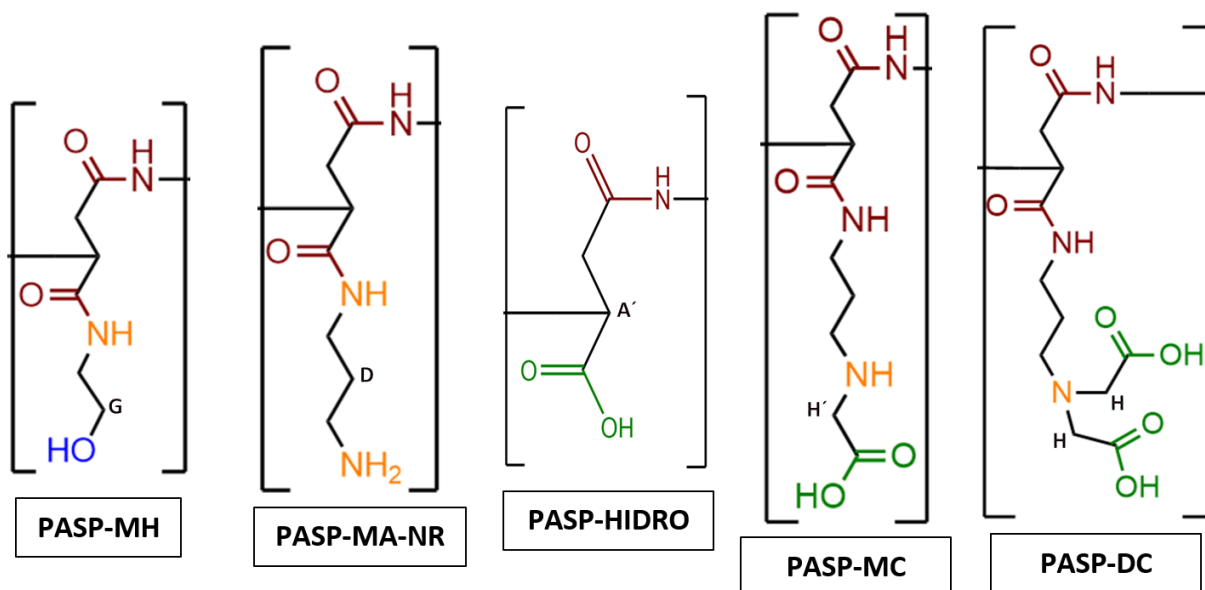


Figura 48. Estructuras de las secciones poliméricas identificadas del PASP-DC-MC-MH con sus respectivas señales características en el espectro $^1\text{H-RMN}$

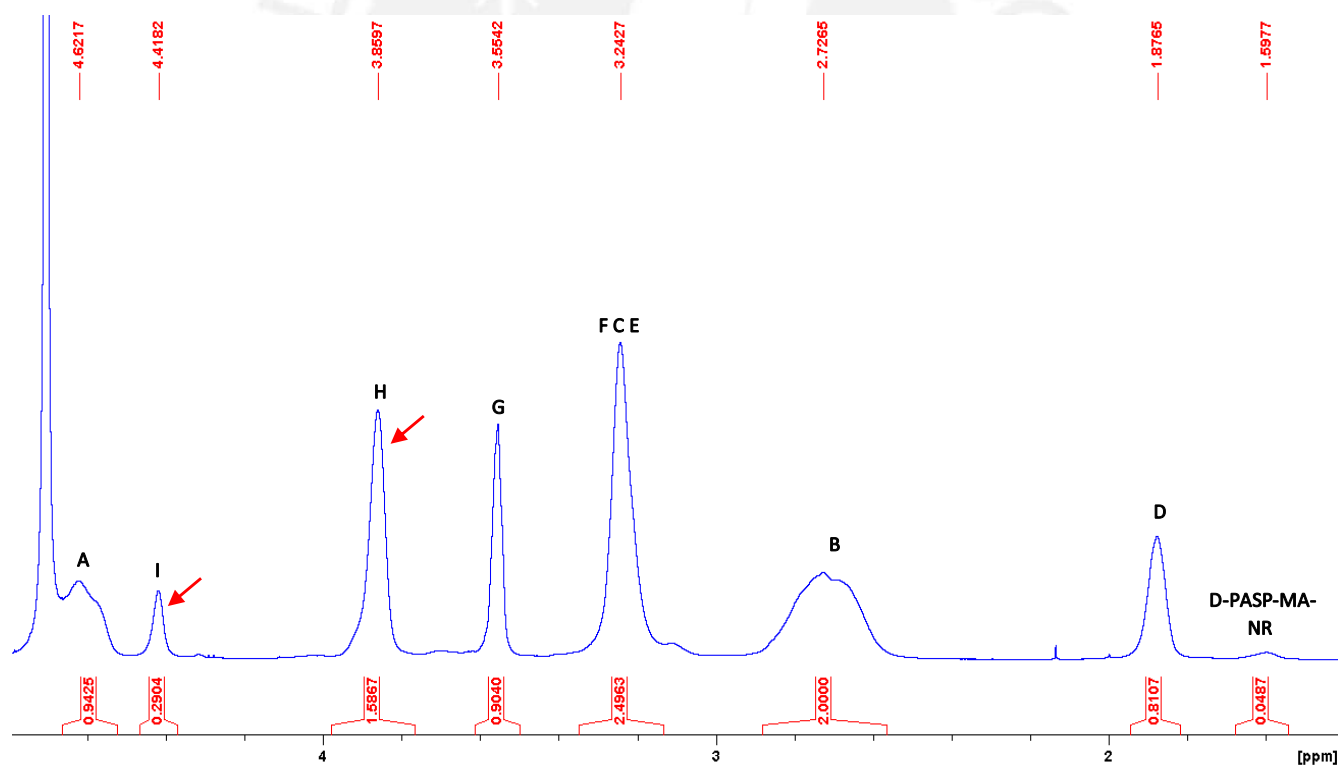


Figura 49. Espectro $^1\text{H-RMN}$ del PASP-DC-MC-MH-1 en D_2O a 25°C . Las flechas rojas muestran la aparición de dos señales no observadas en el perfil característico de los PASP-MA-MH

Con el fin de resolver este impase se decidió modificar la metodología de referencia propuesta por Neuse y Murga en el sentido de variar la cantidad de ácido bromoacético utilizado durante la reacción. Para comprobar si esta modificación alteraba la estructura de la macromolécula final se sintetizó al PASP-DC-MC-MH-2, utilizando como precursor al PASP-MA-MH-11 (60% PASP-MA teórico), en donde se aumentó el exceso de ácido bromoacético utilizado respecto a la síntesis del PASP-DC-MC-MH-1 (de 2 mmoles a 10 mmol). El espectro ^1H -RMN del PASP-DC-MC-MH-2 a 25°C (Figura 50) indicó un aumento dramático en la intensidad de la señal I. Este resultado permitió concluir que la magnitud de la señal desconocida I dependía directamente de la cantidad de ácido bromoacético utilizado, por lo cual se decidió probar reduciendo el exceso de ácido bromoacético empleado en las síntesis de los PASP-DC-MC-MH-3 al 7.

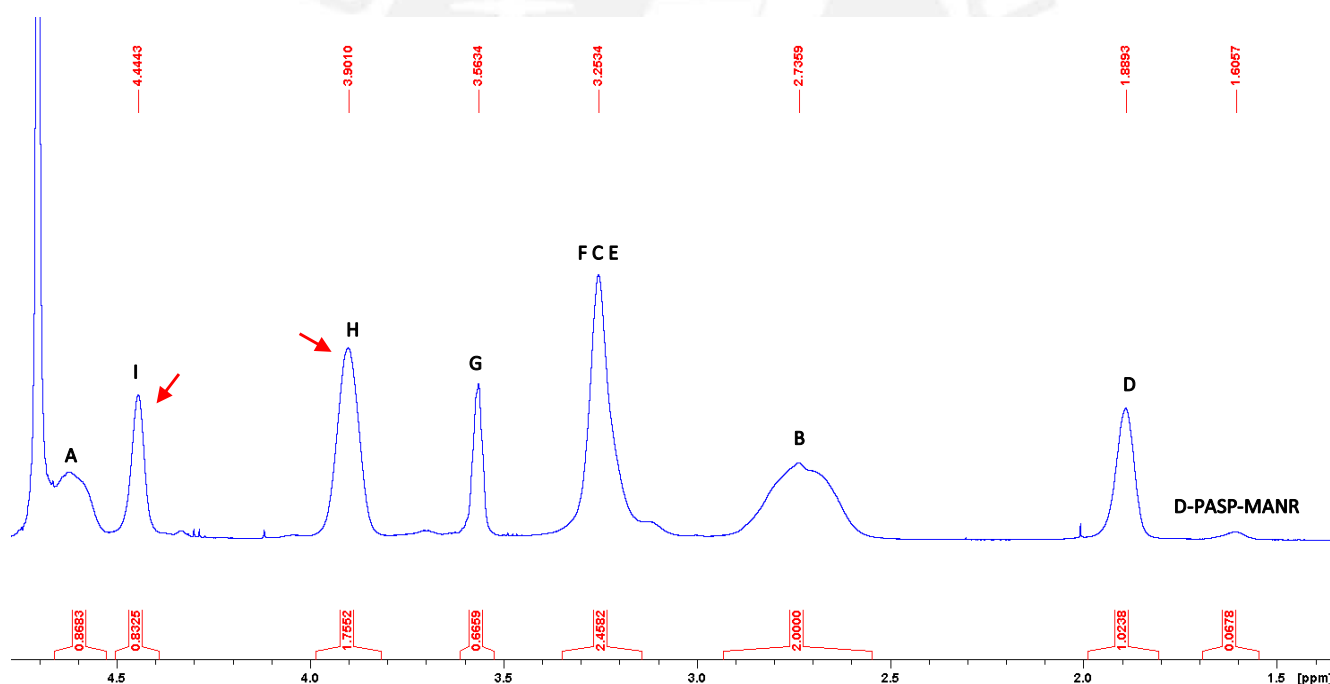


Figura 50. Espectro ^1H -RMN del PASP-DC-MC-MH-2 en D_2O a 25°C. Las flechas rojas muestran la aparición de dos señales desconocidas no observadas en el perfil característico de los PASP-MA-MH

Para la síntesis del PASP-DC-MC-MH-3 se utilizó como precursor al PASP-MA-MH-11 (60 % PASP-MA teórico) y un pequeño exceso de 0.54 mmol de ácido bromoacético respecto lo necesario para la completa di-carboximetilación teórica de todos los meros PASP-MA del respectivo copolímero PASP-MA-MH utilizado. En las síntesis de los PASP-DC-MC-MH-4 y 5, se decidió utilizar como precursor al PASP-MA-MH-9 (60% PASP-MA teórico) y trabajar sin exceso de ácido bromoacético en ambos casos. Finalmente, los polímeros PASP-DC-MC-MH 6 y 7 emplearon como copolímeros de partida a los PASP-MA-MH-16 y 19 (50% PASP-MA teórico) respectivamente y un pequeño exceso de 0.44 mmoles de ácido bromoacético en ambos casos. En el anexo 14 se muestran los espectros $^1\text{H-RMN}$ a 25°C de los 5 ensayos mencionados.

El análisis de los espectros $^1\text{H-RMN}$ a 25°C obtenidos para los polímeros descritos (3 al 7) permitió concluir que una disminución en la cantidad de ácido bromoacético empleado eliminaba casi completamente la señal indeseada I respecto a los PASP-DC-MC-MH-1 y 2. Sin embargo, los espectro $^1\text{H-RMN}$ a 25°C de los PASP-DC-MC-MH-4 y 5 indicaron que el utilizar una cantidad de moles de ácido bromoacético equivalente a lo necesario para realizar la completa di-carboximetilación teórica de los meros PASP-MA del precursor PASP-MA-MH resultaba perjudicial para el copolímero, pues producía una relación de meros di-carboximetilados/mono-carboximetilados muy baja (DC/MC igual a 2.1 dividiendo las integraciones de las señales H/H'). Este hecho no fue observado en la síntesis del PASP-DC-MC-MH-3 cuyo cálculo de relación de meros DC/MC presentó un valor de 3.9.

La diferencia en la relación de meros DC/MC resulta lógica si se toma en cuenta la ausencia de exceso de ácido bromoacético empleada para la síntesis de los PASP-DC-MC-MH-4 y 5 a comparación del PASP-DC-MC-MH-3. Una disminución en la cantidad de reactivo añadido generaría una menor probabilidad de que los grupos amino del mero PASP-MA experimenten un doble ataque del reactivo electrofílico. De esta manera, una menor proporción resultaría di-carboximetilada quedando una cantidad significativa como meros mono-carboximetilados. Sin embargo, la integración y el desplazamiento de los picos característicos para cada cadena lateral de los PASP-DC-MC-MH-4 y 5,

identificadas en sus respectivos espectros $^1\text{H-RMN}$ a 25°C , permitió concluir que el procedimiento modificado resultaba ser altamente reproducible.

La síntesis de los PASP-DC-MC-MH-6 Y 7 comprobó nuevamente la reproducibilidad de la metodología empleada; además, confirmó que esta propiedad se mantenía incluso al utilizar precursores poliméricos PASP-MA-MH distintos pero con proporciones de cadenas laterales similares. Asimismo, el pequeño exceso de ácido bromoacético utilizado para estas últimas dos síntesis permitió elevar la relación DC/MC de las macromoléculas a 2.97, valor mucho más adecuado que el obtenido en los PASP-DC-MC-MH-4 y 5.

Por otro lado, la obtención de los copolímeros PASP-DC-MC-MH 6 y 7 también permitió resolver una duda que surgió en la etapa de síntesis de sus correspondientes precursores PASP-MA-MH-16 y 19. Como se mencionó en el acápite 6.2.3, se logró sintetizar al nuevo copolímero PASP-MA-MH con una alta reproducibilidad en su proporción de meros y sin restos del reactivo en exceso (1,3-propanodiamina).

Sin embargo, se observó que ciertas diferencias en la etapa de diálisis de los PASP-MA-MH-16 y 19, durante el proceso de purificación de los mismos, generaban un desplazamiento notable a campo bajo de las señales C, D y E inherentes al mero PASP-MA en el espectro $^1\text{H-RMN}$ del primero (ver figura 29). En un inicio se pensó que este desplazamiento podía deberse a una reacción secundaria de los grupos amino del copolímero PASP-MA-MH lo cual impediría la posterior reacción del mismo con el ácido bromoacético para la síntesis del PASP-DC-MC-MH. No obstante, la similitud en los espectros $^1\text{H-RMN}$ de los PASP-DC-MC-MH-6 y 7 sintetizados a partir de estos precursores (16 y 19) permitió confirmar que el curioso desplazamiento de las señales C, D y E no había sido producto de un cambio químico, con lo cual se comprobó que el cambio en tiempo de diálisis no afectaba en absoluto la posterior reacción de carboximetilación para obtener al PASP-DC-MC-MH.

Por otra parte, resulta curiosa la diferencia en rendimientos, observada en la tabla 13 (página 100), para los PASP-DC-MC-MH-1 y 2 (72 %), sintetizados con un considerable exceso de ácido bromoacético, respecto a aquellos con un ligero o sin exceso (60-66%). Esta diferencia podría relacionarse con la mayor intensidad de la señal I que presentan los primeros. Dada la incertidumbre en la

naturaleza de la sección polimérica que da lugar a dicho pico, resulta difícil justificar dicho comportamiento.

Asimismo, las proporciones mostradas en la tabla 17 indican que la relación de meros PASP-MA, PASP-MH y PASP-HIDRO de los PASP-DC-MC-MH sintetizados presentan un valor muy similar al de sus respectivos precursores PASP-MA-MH (diferencias de 2% como máximo), lo cual permite concluir que durante la síntesis del PASP-DC-MC-MH no ocurrió o solo mínimamente la reacción de hidrólisis discutida en el acápite 6.2.3. En caso contrario se hubiera esperado observar un significativo cambio en las proporciones finales de los meros de cada PASP-DC-MC-MH respecto al presentado en sus copolímeros precursores PASP-MA-MH. Esto justifica la asunción antes mencionada respecto a utilizar la integración de la señal A del PASP-HIDRO en el $^1\text{H-RMN}$ del precursor para el cálculo de la proporción relativa de las distintas secciones poliméricas del copolímero final PASP-DC-MC-MH.

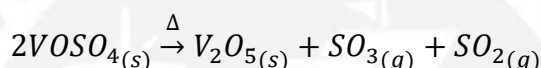
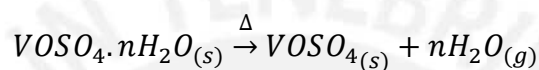
Finalmente, cabe destacar que en esta última etapa se logró la carboximetilación exitosa del copolímero precursor PASP-MA-MH basándose en los procedimientos reportados por Neuse y Murga para el polímero de referencia PASP-DC-MC e introduciendo la serie de modificaciones que han sido discutidas en este acápite. Estas variaciones respondieron a la necesidad de resolver ciertas complicaciones experimentales observadas durante la síntesis y evitar posibles reacciones secundarias indeseables. Así, se logró desarrollar una metodología que permitió obtener los copolímeros ligando finales PASP-DC-MC-MH puros, con buenos rendimientos y con proporciones experimentales convenientes y reproducibles de los meros PASP-DC y PASP-MC.

Asimismo, con respecto a la caracterización del nuevo copolímero, la aplicación de las técnicas bidimensionales COSY, HSQC y HMBC hicieron posible una asignación precisa de las señales características del copolímero; esto resultó fundamental para el cálculo de la proporción relativa de las distintas cadenas laterales presentes en la macromolécula. Sin embargo, no se logró identificar a cabalidad la sección polimérica que da origen a la señal desconocida I, observada tanto en el trabajo realizado por Murga como en la presente investigación.

6.4. Determinación de la cantidad de aguas de hidratación en la sal de oxovanadio (IV) por calcinación

Se realizó la presente medición del número de equivalentes de agua respecto a las moles de sulfato de vanadilo hidratado con el fin de determinar las mmoles exactas de vanadio del reactivo, necesaria durante la síntesis del complejo PASP-DC-MC-MH-VO.

El calentamiento en altas temperaturas del sulfato de vanadilo hidratado permite oxidar al metal de su estado de oxidación +4 al +5 formando V_2O_5 . En este procedimiento ocurre a la par la eliminación de las aguas de hidratación y el sulfato.



En la tabla 19 se muestran los resultados obtenidos para las tres mediciones realizadas, se observa que el valor promedio de aguas de hidratación es de 3.03; no obstante, para fines de cálculo posteriores se redondeará este valor a 3. En el anexo 15 se presenta un ejemplo del cálculo empleado para determinar las moles de agua de hidratación.

Ensayo	Masa de $VOSO_4 \cdot nH_2O$	Masa de V_2O_5	Número de moles de H_2O en una mol de $VOSO_4 \cdot nH_2O$
1	81.3	34.0	3.05
2	82.4	34.4	2.89
3	80,9	32,7	3.15

Tabla 19. Número de moles de agua por cada mol de sulfato de vanadilo.

6.5. Poli-(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-(carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]-co-[(2-Hidroxietil)-aspartamida])-oxovanadio(IV) (PASP-DC-MC-MH-VO)

6.5.1. Análisis de la síntesis

La síntesis del complejo final PASP-DC-MC-MH-VO ha sido realizada siguiendo la guía desarrollada por Murga, en su tesis de licenciatura llevada a cabo en el proyecto DGI 2010-0071, la cual a su vez partió del procedimiento muy general reportado por Karmaker y colaboradores, para la complejación del macro-ligando poliglutamato al catión vanadilo.^{11,68,78} Asimismo, Murga para la obtención del PASP-DC-MC-VO tomó en cuenta la síntesis del poliaspartato de vanadilo, realizado por una colaboradora de nuestro grupo de investigación, Carmen Zegarra, en el marco del proyecto DGI 2010-0205 para obtener el grado de Magíster en Química.^{10,67}

En lo que respecta a este último proyecto de investigación, Zegarra reportó la obtención de dos tipos de complejos de poliaspartato de vanadilo. El primero resultó ser un compuesto muy insoluble que se formaba durante el proceso de síntesis mientras que el segundo, presente en solución, solamente podía ser recuperado mediante su precipitación en acetona. Las condiciones de reacción utilizadas durante la síntesis de este macro-complejo generaron un rendimiento promedio del 86% para el conjugado insoluble no deseado. Durante dicho trabajo se comprobó que el pH de 3 propuesto como óptimo por Sakurai para la síntesis del poliglutamato de vanadilo era también el más conveniente para el poliaspartato de oxovanadio (IV). Una solución más ácida llevaría a una protonación demasiado extendida de los grupos carboxílicos, dificultando su unión al metal, mientras que un medio más básico generaría la hidrólisis del catión, propiciada a un pH de 4-4.5, formando el óxido $\text{VO}_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$ como contaminante.¹⁰

Los resultados obtenidos para la síntesis previamente descrita llevaron a desarrollar el proyecto de investigación realizado por Murga, la síntesis del macro-complejo PASP-DC-MC-VO, con el fin de aumentar el rendimiento del complejo soluble y disminuir al mínimo el rendimiento de aquel insoluble no deseado.⁶⁸ Sin embargo, siguiendo el procedimiento de Zegarra y, a pesar que el nuevo macro-ligando empleado PASP-DC-MC poseía, a diferencia del

poliaspartato, cadenas laterales mono y di-carboximetiladas que disminuyen la probabilidad de que dos o más grupos carboxílicos de una misma cadena o de diferentes cadenas coordinen a un mismo grupo vanadilo introduciendo rigidez y entrecruzamiento, se observó aún la formación de una considerable cantidad del complejo insoluble.

Con el fin de resolver esta complicación, Murga realizó una serie de variaciones en el procedimiento de complejación empleado por Zegarra, las cuales permitieron eliminar finalmente la aparición del macro-complejo insoluble y permitir un muy alto rendimiento del complejo soluble (94%).

La síntesis del complejo soluble PASP-DC-MC-VO permitió establecer que usando una relación molar 1:1 de meros di-carboximetilados a catión vanadilo (DC:VO) se logró, mediante variaciones en las concentraciones iniciales de ambos reactivos, aumentar el rendimiento del complejo soluble hasta un 60%. Al disminuir la cantidad de oxovanadio (IV), usando una relación molar 2:1 de DC:VO, logró eliminar la formación del complejo insoluble, con una ligera mejora del rendimiento del complejo deseado (65%). Estos ensayos llevaron a examinar a mayor profundidad el efecto de la concentración inicial de los reactivos empleados sobre el rendimiento del complejo soluble. De esta manera, se comprobó que disminuyendo las concentraciones iniciales del polímero y el vanadilo, de un valor inicial de 5% y 4mM a 1% y 1mM respectivamente, se obtenía una mejora considerable en el rendimiento del complejo soluble (81%). Finalmente, el uso de volúmenes comparables de las soluciones del oxovanadio(IV) así como una adición lenta de la primera a la segunda condujo a un excelente rendimiento del PASP-DC-MC-VO soluble (94%) sin formación del complejo indeseado.¹¹

No obstante, pese a que Murga logró cumplir con el objetivo principal de su investigación, se observó que su nuevo macro-complejo de vanadilo experimentaba gradualmente una pérdida de hidrosolubilidad, llegando a ser completamente insoluble a los pocos días de haber sido sintetizado y purificado. Esta complicación llevó a proponer el presente trabajo de investigación para la síntesis del PASP-DC-MC-MH-VO, para el cual se esperaba una mayor hidrosolubilidad una vez aislado al estado sólido gracias a la introducción de cadenas laterales hidroxilo adicionales, las cuales presentan una baja capacidad

de coordinación al VO^{2+} . La presencia de estas cadenas con grupos terminales no coordinantes, pero también solubilizantes, disminuiría la probabilidad de que distintos grupos carboxilato (ahora más alejados entre sí) ya sea de una misma cadena o de diferentes cadenas se enlacen a un mismo catión vanadilo. De esta manera, se aumentaría la flexibilidad del conjugado polimérico PASP-DC-MC-MH-VO y se disminuiría la posibilidad de entrecruzamiento entre cadenas, factores responsables de la disminución de hidrosolubilidad en los complejos sintetizados por Murga, PASP-DC-MC-VO.

Los buenos resultados obtenidos por Murga llevaron a emplear sus mejores ensayos como guía básica para la síntesis del PASP-DC-MC-VO; asimismo, se decidió realizar la etapa de complejación a pH 3, por los argumentos previamente mencionados. Por otro lado, en cada uno de los experimentos que se describirán a continuación, a menos que se indique lo contrario, se ha utilizado 12.4-12.6 mg del nuevo ligando polimérico PASP-DC-MC-MH. Asimismo, todos los ensayos que se presenten en las siguientes tablas han sido realizados por duplicado mostrando valores muy cercanos entre sí, por lo cual la cantidad de sólido obtenido así como el rendimiento del complejo hidrosoluble que se mostraran en dichas tablas corresponden a valores promedio.

Es importante tener en cuenta que para la síntesis de los presentes complejos se han empleado dos copolímeros PASP-DC-MC-MH con proporciones de cadenas laterales distintas entre sí (50 y 60 % de PASP-MA teórico), lo cual permitirá analizar cómo afecta esta variación la naturaleza del complejo obtenido y su hidrosolubilidad una vez aislado.

En la tabla 20 se presentan las condiciones de síntesis de los complejos PASP-DC-MC-MH-VO que emplearon como precursor un copolímero con 60% de meros PASP-MA teóricos, el PASP-DC-MC-MH-4, y con relación molar 1:1 de DC:VO. Un ejemplo del procedimiento seguido para determinar la cantidad de $VOSO_4 \cdot 3H_2O$ utilizada para los experimentos se presenta en el anexo 16. El ensayo 2 muestra la síntesis del complejo tomando como base las concentraciones iniciales recomendadas por Murga, 0.25% y 3.00 mM de polímero y vanadilo respectivamente, así como usando el mismo procedimiento de purificación y precipitación (lavado sucesivamente con agua destilada y acetona, y precipitado con un volumen de acetona 10 veces mayor que el

volumen total de la mezcla de reacción). Para los ensayos 2 y 3 se repitió el mismo procedimiento; no obstante, en el primero se decidió eliminar el lavado con agua destilada, mientras que en el segundo se aumentó el volumen de acetona (de 10 a 15 veces) y se lavó empleando exclusivamente acetona. Los resultados de este experimento se muestran en la tabla 21.

Ensayo	PASP-DC-MC-MH	Relación molar meros DC:VO ²⁺	[PASP-DC-MC] inicial	[VO ²⁺] inicial (mM)	[PASP-DC-MC] final	[VO ²⁺] final (mM)	Volumen total (mL)
1	4	1 : 1	0.25%	3.00	0.11%	1.70	11.60
2	4	1 : 1	0.25%	3.08	0.11%	1.70	11.60
3	4	1 : 1	0.25%	3.08	0.11%	1.70	11.60

Tabla 20. Primer grupo de ensayos de síntesis de complejo.

Ensayo	Masa promedio del precipitado inicial (mg)	Masa promedio del complejo precipitado con solvente (mg)	Rendimiento promedio del complejo precipitado con solvente (%)
1	1.0	8.1	55.1
2	0.7	10.8	72.7
3	0.8	9.9	65.9

Tabla 21. Resultados de los ensayos de la Tabla 20.

Los ensayos 1, 2 y 3 demostraron que el emplear agua destilada para el lavado así como un mayor exceso de acetona en la precipitación resultaban ser perjudiciales para la recuperación del complejo soluble deseado.

La diferencia en rendimientos entre las pruebas 2 y 1 puede explicarse si se toma en cuenta que el conjugado PASP-DC-MC-MH-VO obtenido en ambas síntesis sería más soluble que el PASP-DC-MC-VO sintetizado por Murga, como resultado de una reducción del entrecruzamiento de cadenas vía el catión vanadilo. En consecuencia, el lavado con agua destilada generaría una pérdida del producto, disminuyendo considerablemente el rendimiento para el ensayo 2. Para el caso del experimento 3, un mayor exceso de acetona conllevó a un gran aumento en el volumen empleado durante la etapa de precipitación, lo que complicó el proceso de extracción del producto luego de la etapa de centrifugación generando pequeñas pérdidas acumulativas.

A partir de lo expuesto anteriormente, se decidió eliminar el lavado del complejo PASP-DC-MC-MH-VO utilizando agua destilada así como mantener el volumen de acetona recomendado por Murga (exceso de 10 a 1).

Una vez establecido el procedimiento de precipitación y de lavado a seguir para la síntesis del presente complejo polimérico, se optó por variar la concentración inicial del polímero manteniendo constante la del sulfato de vanadilo o viceversa con el fin de evaluar la posibilidad de elevar el rendimiento obtenido en el ensayo 1 para el complejo soluble, así como disminuir aquel del sólido no deseado. En la tabla 22 se muestran las 8 síntesis realizadas empleando los PASP-DC-MC-MH-4 y 5, con un 60% de porcentaje teórico de meros PASP-MA y una relación equimolar de DC:VO siguiendo el nuevo procedimiento, mientras que en la tabla 23 se presentan los correspondientes resultados. Cabe mencionar que los 2 ligandos poliméricos utilizados para este experimento poseen una proporción experimental relativa de meros muy cercana entre sí, por lo cual los resultados obtenidos empleando cualquiera de los dos resultan representativos.

Ensayo	PASP-DC-MC-MH	Relación molar meros DC:VO ²⁺	[PASP-DC-MC] inicial	[VO ²⁺] inicial (mM)	[PASP-DC-MC] final	[VO ²⁺] final (mM)	Volumen total (mL)
1A	4*	1 : 1	0.25%	2.00	0.08%	1.30	14.90
2A	4*	1 : 1	0.25%	3.00	0.11%	1.70	11.60
3A	4*	1 : 1	0.25%	4.95	0.14%	2.20	8.96
4A	4*	1 : 1	0.25%	10.13	0.18%	2.85	6.98
5A	4*	1 : 1	0.25%	15.20	0.20%	3.15	6.32
6A	5**	1 : 1	0.10%	3.02	0.07%	1.06	19.22
7A	5**	1 : 1	0.50%	3.06	0.14%	2.23	9.22
8A	5**	1 : 1	1.00%	3.06	0.16%	2.57	7.97

*33.86% de meros PASP-DC

**33.39% de meros PASP-DC

Tabla 22. Segundo grupo de ensayos de síntesis de conjugado polímero vanadilo.

Ensayo	Masa promedio del precipitado inicial (mg)	Masa promedio del complejo precipitado con solvente (mg)	Rendimiento promedio del complejo precipitado con solvente (%)
1A	0.1	11.7	78.6
2A	0.8	10.8	72.4
3A	1.0	10.6	71.4
4A	0.9	10.6	70.2
5A	1.1	9.8	65.2
6A	0.0	12.2	81.9
7A	0.6	10.8	72.3
8A	1.1	10.7	71.1

Tabla 23. Resultados de los ensayos de la Tabla 22.

Los resultados de estos ensayos demostraron que a menor concentración, tanto de la solución polimérica como la del vanadilo (ensayos 1A y 6A), se generaba un significativo aumento en la cantidad de complejo soluble producido así como una correspondiente disminución en la del conjugado insoluble no deseado. Este comportamiento concuerda con lo esperado, puesto que a mayor dilución resulta menos probable la interacción de grupos carboxilato de diferentes cadenas poliméricas con un mismo catión vanadilo, disminuyendo así el número de entrecruzamientos. Por otro lado, se determinó que este efecto era prácticamente independiente de si lo que se disminuía era la concentración inicial de la solución polimérica o aquella del catión vanadilo. Así se observa que la diferencia en rendimientos entre los ensayos 1A y 6A es de alrededor del 3%.

No obstante, para estos dos últimos ensayos se observó que una vez finalizada las 24 horas de reacción ambas soluciones se encontraban ligeramente turbias, lo que no había ocurrido en las demás pruebas. Se cree que el gran volumen de agua utilizado para ambos ensayos dificultó la aglomeración de la mínima cantidad del sólido insoluble formado en estos dos casos, por lo cual este se mantuvo mayormente en suspensión. En este contexto, cabe mencionar que dicho sólido era demasiado fino; debido a ello resultó imposible separarlo por filtración o centrifugación antes de la etapa de precipitación con acetona del conjugado soluble. Se presume, por tanto, que el complejo soluble recuperado en estos dos casos presentaría una mínima contaminación con el sólido indeseado. Por esta razón, se concluyó que los mejores ensayos fueron el 2A y 7A a pesar que conducen a un menor rendimiento (6 a 10 % respectivamente).

A continuación se estudió la influencia de la relación molar entre los meros DC y el catión vanadilo sobre el rendimiento de los complejos sintetizados, para lo cual se decidió repetir las síntesis previas en que se varió la concentración del reactivo polimérico o del sulfato de vanadilo, pero esta vez utilizando una relación molar 2:1 de DC:VO. En la tabla 24 se presentan los 7 ensayos realizados con esta modificación utilizando al PASP-DC-MC-MH-5 como precursor y en la tabla 25 se muestran los correspondientes resultados.

Cabe mencionar que no se realizó una ulterior variación respecto a la relación molar descrita puesto que una relación mayor (3:1,4:1, etc) tendría como resultado complejos con un contenido del oxovanadio (IV) demasiado bajo.

Ensayo	PASP-DC-MC-MH	Relación molar meros DC:VO ²⁺	[PASP-DC-MC] inicial	[VO ²⁺] inicial (mM)	[PASP-DC-MC] final	[VO ²⁺] final (mM)	Volumen total (mL)
1B	5	2 : 1	0.25%	1.97	0.12%	0.99	10.05
2B	5	2 : 1	0.25%	2.88	0.15%	1.16	8.36
3B	5	2 : 1	0.25%	5.07	0.18%	1.45	7.00
4B	5	2 : 1	0.25%	9.91	0.21%	1.65	6.00
5B	5	2 : 1	0.10%	2.88	0.08%	0.61	15.86
16B	5	2 : 1	0.20%	2.95	0.13%	1.04	9.61
7B	5	2 : 1	0.50%	2.95	0.21%	1.69	5.86

Tabla 24. Tercer grupo de ensayos de síntesis de conjugado polímero vanadilo.

Ensayo	Masa promedio del precipitado inicial (mg)	Masa promedio del complejo precipitado con solvente (mg)	Rendimiento promedio del complejo precipitado con solvente (%)
1B	0.0	11.5	83.5
2B	0.0	12.2	88.9
3B	0.0	12.2	88.6
4B	0.0	10.9	79.1
5B	0.0	11.3	82.0
6B	0.0	11.6	84.2
7B	0.0	11.6	84.2

Tabla 25. Resultados de los ensayos de la Tabla 24.

A diferencia de los resultados obtenidos previamente, estos ensayos mostraron una eliminación prácticamente completa del sólido insoluble precipitado inicialmente, lo cual resulta consistente con la hipótesis de que una menor cantidad de vanadio disminuiría la posibilidad de entrecruzamiento de los ligandos poliméricos. No obstante, cabe mencionar que para los experimentos 4B Y 7B, en los cuales se utilizó la mayor concentración de sulfato de vanadilo o polímero respectivamente, sí se registró una ligera turbidez en la mezcla de reacción, lo cual constituye un claro indicio de la presencia de una baja cantidad del complejo indeseable. Al igual que en los experimentos de la tabla 22, fue imposible separar el sólido en suspensión de ambas soluciones poliméricas, por lo que es probable que los complejos solubles obtenidos en estos casos se hallaran también contaminados con dicho sólido.

Por otro lado, mediante este último grupo de ensayos también se pudo demostrar que la síntesis de complejos con una relación molar 2:1 de meros DC y vanadilo respectivamente, tiende a elevar el rendimiento del complejo soluble a comparación de los ensayos con relación molar 1:1 (de 72.4% a 88.9%). Se

determinó que el mejor resultado se obtuvo con las condiciones utilizadas en la síntesis 2B empleando concentraciones iniciales de vanadilo y polímero de aproximadamente 3mM y 0.25% respectivamente.

En una siguiente serie de ensayos se decidió explorar la posibilidad de aumentar la cantidad de oxovanadio (IV) ligado al copolímero PASP-DC-MC-MH sin desmedro en el rendimiento del complejo soluble. Con este fin se utilizó un macro-ligando, el PASP-DC-MC-MH-3, con la misma proporción teórica de meros PAS-MA (60%) que la de los copolímeros utilizados previamente, pero con una mayor proporción relativa de meros DC/MC (4:1) que la de dichos ligandos poliméricos (2:1). En la tabla 26 se muestran los 7 ensayos realizados con la nueva macromolécula, en los cuales se evaluó la influencia de la variación en la relación molar DC:VO sobre el rendimiento del complejo soluble. En la tabla 27 se presentan los correspondientes resultados.

Ensayo	PASP-DC-MC-MH	Relación molar meros DC:VO ²⁺	[PASP-DC-MC] inicial	[VO ²⁺] inicial (mM)	[PASP-DC-MC] final	[VO ²⁺] final (mM)	Volumen total (mL)
1C	3	1 : 1	0.25%	3.05	0.10%	1.86	12.87
2C	3	1 : 1	0.50%	3.02	0.12%	2.29	10.37
3C	3	1 : 1	1.00%	3.05	0.14%	2.63	9.12
4C	3	2 : 1	0.25%	2.03	0.11%	1.10	10.90
5C	3	2 : 1	0.25%	2.99	0.14%	1.32	8.93
6C	3	2 : 1	0.25%	4.98	0.17%	1.60	7.36
7C	3	2 : 1	0.25%	9.77	0.20%	1.86	6.18

Tabla 26. Cuarto grupo de ensayos de síntesis de conjugado polímero vanadilo.

Ensayo	Masa promedio del precipitado inicial (mg)	Masa promedio del complejo precipitado con solvente (mg)	Rendimiento promedio del complejo precipitado con solvente (%)
1C	0.0	14.0	90.9
2C	0.2	13.2	88.7
3C	0.9	13.2	85.7
4C	0.0	12.6	90.6
5C	0.0	13.3	96.2
6C	0.0	13.6	98.1
7C	0.0	13.1	95.0

Tabla 27. Resultados de los ensayos de la Tabla 26.

En la tabla 27 se observa que en la serie de ensayos empleando el copolímero PASP-DC-MC-MH-3 con una elevada proporción de cadenas laterales de carboximetiladas (DC/MC 4:1), se logró aumentar considerablemente el rendimiento del complejo soluble (hasta un máximo de 98%) respecto a ensayos comparables utilizando los copolímeros PASP-DC-MC-MH-4 y 5 (DC/MC 2:1). Cabe mencionar que la elevada cantidad de meros di-carboximetilados conduce, especialmente en el caso de los ensayos con relación 1:1 de DC:VO, a un deseable y considerable aumento en la cantidad de oxovanadio(IV) enlazado al copolímero. Sin embargo, para todos los conjugados incluidos en esta tabla, excepto el 4C y 5C, se apreció un importante aumento en el grado de turbidez de la solución final relacionado con un incremento en la cantidad de sólido insoluble remanente en suspensión, antes de la etapa de precipitación con acetona. Como se ha mencionado previamente, este conjugado insoluble sería arrastrado durante la precipitación del complejo soluble contaminándolo. Por otro

lado, los ensayos 4C y 5C presentan la triple ventaja de tener, por un lado, un rendimiento alrededor de 7-8% más alto que el de ensayos comparables empleando a los PASP-DC-MC-MH con proporción DC/MC de 2:1, no presentar el problema de la turbidez contaminante y un contenido mucho más alto del agente activo oxovanadio(IV).

Estas ventajas inducirían a concluir la conveniencia de usar un copolímero con una elevada proporción de cadenas laterales di-carboximetiladas en la síntesis del conjugado PASP-DC-MC-MH-VO; no obstante, como se discutirá en el siguiente acápite, estos complejos, una vez aislados al estado sólido, presentaron una solubilidad en agua muchísimo menor que la de los correspondientes PASP-DC-MC-MH-VO-4 y 5 con menor proporción de meros di-carboximetilados.

Una vez culminado el análisis de las condiciones óptimas de síntesis para obtener complejos de copolímeros con un 60% de meros teóricos PAS-MA con altos rendimientos y sin presencia del conjugado insoluble contaminante, se decidió repetir el estudio descrito, pero empleando macromoléculas con un porcentaje teórico de 50% de meros PASP-MA. En la tabla 28 se muestran 8 ensayos en los cuales se emplearon los PASP-DC-MC-MH-6 y 7 como ligandos macromoleculares. Cabe mencionar que para esta nueva serie de ensayos se decidió variar, además de la relación molar DC:VO, solo la concentración de las soluciones poliméricas iniciales, puesto que los experimentos previos demostraron que el rendimiento final no es dependiente del tipo de reactivo cuya concentración se modifique. En la tabla 29 se presentan los correspondientes resultados.

Ensayo	PASP-DC-MC-MH	Relación molar meros DC:VO ²⁺	[PASP-DC-MC] inicial	[VO ²⁺] inicial (mM)	[PASP-DC-MC] final	[VO ²⁺] final (mM)	Volumen total (mL)
1D	6	1 : 1	0.10%	3.01	0.07%	1.02	18.93
2D	6	1 : 1	0.20%	3.05	0.10%	1.55	12.68
3D	6	1 : 1	0.50%	2.98	0.14%	2.15	8.93
4D	6	1 : 1	1.00%	2.98	0.16%	2.49	7.68
5D	7	2 : 1	0.10%	3.00	0.08%	0.63	15.80
6D	7	2 : 1	0.19%	2.93	0.13%	0.97	10.00
7D	7	2 : 1	0.50%	3.00	0.22%	1.71	5.80
8D	7	2 : 1	1.00%	3.00	0.27%	2.18	4.55

Tabla 28. Quinto grupo de ensayos de síntesis de conjugado polímero-vanadilo.

Ensayo	Masa promedio del precipitado inicial (mg)	Masa promedio del complejo precipitado con solvente (mg)	Rendimiento promedio del complejo precipitado con solvente (%)
1D	0.0	14.0	94.1
2D	0.0	14.1	95.1
3D	0.0	14.1	95.7
4D	0.0	13.7	92.4
5D	0.0	12.2	89.4
6D	0.0	12.9	94.2
7D	0.0	13.4	98.2
8D	0.0	13.3	97.1

Tabla 29. Resultados de los ensayos de la Tabla 28.

La síntesis de complejos utilizando macro-ligandos con un 50% de meros teóricos PASP-MA presentó resultados sorprendentes respecto a los ensayos previos. Una de las características más resaltantes para estas pruebas radica en la eliminación completa del sólido insoluble; asimismo, no se observó la aparición de turbidez para ninguno de los ensayos, incluso en los que fueron realizados con una alta concentración de la solución polimérica inicial (4D y 8E). Por otro lado, se observó que, tanto para la relación molar 1:1 como la 2:1 de DC:VO, el rendimiento máximo del complejo soluble obtenido para ambos grupos de ensayos resultaba ser muy alto y comparable al observado en los conjugados de la tabla 27, sintetizados en base al ligando polimérico PASP-DC-MC-MH-3 con elevado contenido de cadenas laterales di-carboximetiladas (rendimiento máximo de 91 % y 98% para relación 1:1 y 2:1 respectivamente).

Los resultados mostrados para esta serie de ensayos concuerdan con lo propuesto para la presente investigación. La presencia de una mayor proporción de meros hidroxilados en el polímero ligando, a comparación de las pruebas empleando macromoléculas con un 40% de meros PASP-MH teóricos, parece reducir significativamente el entrecruzamiento de cadenas poliméricas, por lo cual no se observó la formación de sólido insoluble y por ende se terminó recuperando una gran cantidad del complejo soluble.

Una vez obtenidos los parámetros de síntesis adecuados para la obtención de complejos PASP-DC-MC-MH-VO empleando macromoléculas con distinta proporción de meros PASP-DC (50 y 60% teóricos) se decidió escalar el ensayo 6D (tablas 28 y 29) con el fin de determinar si se mantenía el alto rendimiento del complejo soluble y la eliminación del sólido insoluble. En la tabla 30 se muestran los tres ensayos realizados y en la tabla 31 se presentan sus correspondientes resultados.

Ensayo	PASP-DC-MC-MH	Relación molar meros DC:VO ²⁺	[PASP-DC-MC] inicial	[VO ²⁺] inicial (mM)	[PASP-DC-MC] final	[VO ²⁺] final (mM)	Volumen total (mL)
1E	6	2 : 1	0.19%	2.99	0.13%	0.99	29.44
2E	6	2 : 1	0.19%	3.00	0.13%	0.99	39.23
3E	6	2 : 1	0.19%	3.00	0.13%	0.99	39.23

Tabla 30. Sexto grupo de ensayos de síntesis de conjugado polímero-vanadilo.

Ensayo	Masa promedio del precipitado inicial (mg)	Masa promedio del complejo precipitado con solvente (mg)	Rendimiento promedio del complejo precipitado con solvente (%)
1E*	0.0	35.9	87.5
2E**	0.0	47.6	87.0
3E**	0.0	48.0	87.8

* Ensayos en los que se partió de 37.5 mg de PASP-DC-MC-MH (escalado por 3 y 24 horas de reacción)

** Ensayos en los que se partió de 50 mg de PASP-DC-MC-MH (escalado por 4 y 32 horas de reacción)

Tabla 31. Resultados de los ensayos de la Tabla 30

El resultado obtenido en el ensayo 1E permitió concluir que al escalar a 3 veces el procedimiento realizado para la obtención del PASP-DC-MC-MH (de 12.5 mg de polímero a 37.5 mg) no se observaba tampoco la formación del sólido insoluble ni la aparición de turbidez en la mezcla de reacción; Sin embargo, sí se observó una significativa reducción en el rendimiento del complejo precipitado en acetona respecto a lo observado en la tabla 29 (de 94.2% a 87.5%). Se postuló que este hecho pudo deberse a que un tiempo de 24 horas no resultaba suficiente como para permitir la reacción completa entre los reactivos en el caso escalado, aun cuando se trabajase con iguales concentraciones de los mismos. Para comprobar esta hipótesis se decidió sintetizar los complejos 2E y 3E, utilizando una mayor cantidad del reactivo polimérico (50 mg), pero aumentando el tiempo de reacción en 8 horas. Esta variación permitió mantener el rendimiento del complejo deseado cercano al observado del ensayo 1E, pero no se logró llegar al valor registrado en la prueba 6D; todo parece indicar que resulta ser necesario el otorgar un mayor tiempo de reacción mientras más reactivo se utilice en las síntesis. Esto último no ocurrió en la investigación realizada por Murga para la síntesis del PASP-DC-MC-VO; sin embargo, hay que destacar que, a diferencia del presente copolímero, su macromolécula poseía exclusivamente cadenas laterales carboximetiladas, por lo que en una relación molar 2:1 de DC:VO como la utilizada en este caso, la mayor cantidad de meros DC disponibles facilitaba una complejación más rápida con el catión vanadilo.

6.5.2. Análisis de la hidrosolubilidad de los conjugados poliméricos

Una vez determinados los parámetros óptimos requeridos para sintetizar al conjugado soluble deseado en alto rendimiento y sin presencia del complejo insoluble, se procedió a evaluar la hidrosolubilidad de los complejos representativos para cada grupo de ensayos descritos en el acápite previo.

La prueba de hidrosolubilidad utilizada para el presente trabajo ha sido diseñada por nuestro grupo de investigación y está basada en la determinación de la cantidad de sólido recuperado luego de añadirle una determinada cantidad de agua destilada regulada a pH 7 y a temperatura ambiente. Las pruebas se realizaron al interior de un vial cerrado y bajo agitación; en cada caso, se varió el volumen de agua y el tiempo utilizado para lograr la máxima disolución posible de los conjugados ensayados. Cabe mencionar, además, que las pruebas de hidrosolubilidad realizadas, cuyas condiciones de análisis y resultados serán mostradas en las siguientes tablas, fueron realizadas por duplicado.

En la tabla 32 se presentan las pruebas de hidrosolubilidad realizadas para los complejos precipitados en acetona empleando a los copolímeros PASP-DC-MC-MH-4 y 5 (60 % de meros teóricos PASP-MA) con una proporción molar 1:1 de DC:VO.

Ensayo	Complejo analizado	Relación molar meros DC:VO ²⁺	Vol agua (mL)	Tiempo (Hrs)	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Porcentaje de disolución (%)
1S	1	1 : 1	0.5	0.5	5.1	4.1	19.6
2S	5A	1 : 1	2.5	0.5	4.9	3.9	20.4
3S	3A	1 : 1	0.5	2.5	5.1	4.1	19.8
4S	2A	1 : 1	2.5	2.5	5.0	3.7	25.4

Tabla 32. Análisis de hidrosolubilidad de los complejos precipitados en acetona sintetizados a partir de los PASP-DC-MC-MH-4 y 5 con relación molar 1:1 de DC:VO

Cada prueba de hidrosolubilidad realizada para un tipo de conjugado polimérico consistió, en general, de cuatro ensayos; en el primero de los cuales se utilizó una cantidad mínima razonable de agua (0.5 mL) y un tiempo de 0.5 horas. Para el segundo se decidió mantener el tiempo de disolución y aumentar en 5 veces el volumen de agua. En el tercer ensayo se mantuvo el volumen de agua en 0.5 mL pero se elevó a 5 veces el tiempo de la prueba. Finalmente, en el cuarto análisis tanto el tiempo como el volumen de agua fueron elevados 5 veces del valor inicial.

Se observa claramente en la tabla 32 que el porcentaje de disolución de los complejos resulta ser relativamente bajo (alrededor de 20%); sin embargo, el ensayo 4S indicó que un aumento simultáneo en el volumen de agua y tiempo de disolución permitían elevar el porcentaje de disolución en un 5%.

En la tabla 33 se muestra el análisis de hidrosolubilidad realizado para los complejos precipitados en acetona y sintetizados a partir del copolímero PASP-DC-MC-MH-5 (60 % de meros teóricos) con una relación molar 2:1 de DC:VO.

Ensayo	Complejo analizado	Relación molar meros DC:VO ²⁺	Vol agua (mL)	Tiempo (Hrs)	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Porcentaje de disolución (%)
5S	1B	2 : 1	0.5	0.5	5.0	2.8	43.4
6S	9B	2 : 1	2.5	0.5	5.0	2.2	55.8
7S	9B	2 : 1	0.5	2.5	4.9	0.6	88.8
8S	1B	2 : 1	2.5	2.5	5.0	0.4	93.0

Tabla 33. Análisis de hidrosolubilidad de los complejos precipitados en acetona sintetizados a partir del PASP-DC-MC-MH-5 con relación molar 2:1 de DC:VO

El ensayo 5S demostró que la síntesis de conjugados con una relación molar 2:1 de DC:VO, que equivale a que solo la mitad de los meros di-carboximetilados estén coordinados al catión vanadilo, promovía un importante aumento de la hidrosolubilidad del conjugado, respecto a los complejos sintetizados con relación molar 1:1 de DC:VO, en que todos los meros PASP-DC coordinan al VO²⁺ (de 20% a 43%). Sin embargo, el porcentaje obtenido aun distaba de ser satisfactorio. En los ensayos 6S y 7S se observó que la variación por separado del volumen de solvente así como del tiempo de disolución permitió un incremento sustancial en la cantidad de sólido disuelto, siendo el tiempo el factor de mayor influencia para la disolución de los macro-complejos. Finalmente, el ensayo 8S, con un aumento en ambos parámetros, permitió elevar hasta 93% el porcentaje de disolución mas no condujo a una completa hidrosolubilidad del conjugado. Sin embargo, cabe mencionar que el alto porcentaje obtenido para este último ensayo fue alcanzado mediante el uso de condiciones combinadas extremas que no resultan razonables.

La mejorada, pero aun baja solubilidad en medio acuoso mostrada en el ensayo 5S (tabla 33), con un volumen de agua y tiempo de disolución adecuados, llevó

a evaluar, una vez establecida la influencia de la relación molar de DC:VO sobre la hidrosolubilidad relativa de dos complejos sintetizados a partir de copolímeros con la misma proporción de meros PASP-DC, la dependencia de la hidrosolubilidad del conjugado de la proporción relativa de meros di y monocarboximetilados. Con este fin, se repitió el análisis de hidrosolubilidad, pero empleando conjugados poliméricos sintetizados a partir del PASP-DC-MC-MH-3, el cual presenta una mayor proporción de cadenas laterales DC a MC (4:1) respecto a los PASP-DC-MC-MH-4 y 5 (2:1). En la tabla 34 se muestran las pruebas realizadas para estos conjugados con sus respectivos resultados.

Ensayo	Complejo analizado	Relación molar meros DC:VO ²⁺	Vol agua (mL)	Tiempo (Hrs)	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Porcentaje de disolución (%)
9S	4C	2 : 1	0.5	0.5	5.0	4.0	20.0
10S	4C	2 : 1	2.5	2.5	5.0	3.6	28.0

Tabla 34. Análisis de hidrosolubilidad de los complejos precipitados en acetona sintetizados en base al PASP-DC-MC-MH-3 con relación molar 2:1 de DC: VO

Se realizaron solo dos ensayos, uno a condiciones razonables y el otro utilizando una combinación extrema de ambos parámetros. Para el primero, 9S, se determinó un porcentaje de disolución del 20%, el cual se pudo aumentar hasta 28% en el segundo, 10S. En ambos casos, resulta curioso que los porcentajes obtenidos sean tan similares a aquellos observados, a condiciones comparables, para los conjugados sintetizados a partir de los PASP-DC-MC-MH-4 y 5 con una relación molar 1:1 de DC:VO, los cuales presentarían un contenido teórico de oxovanadio(IV) considerablemente mayor.

Una vez establecida la imposibilidad de sintetizar complejos completamente hidrosolubles empleando copolímeros PASP-DC-MC-MH con una proporción teórica de 60% de meros PASP-MA, se procedió a analizar la solubilidad de los complejos sintetizados a partir de los PASP-DC-MC-MH-6 y 7 con un 50% de meros teóricos PASP-MA. En la tabla 35 se muestran los ensayos de

hidrosolubilidad realizados para los complejos precipitados en acetona sintetizados con el copolímero PASP-DC-MC-MH-6 (50 % de meros teóricos) con una relación molar 1:1 de DC:VO.

Ensayo	Complejo soluble analizado	Relación molar meros DC:VO ²⁺	Vol agua (mL)	Tiempo (Hrs)	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Porcentaje de disolución (%)
11S	2D	1 : 1	0.5	0.5	5.0	4.3	13.1
12S	3D	1 : 1	2.5	0.5	5.0	4.1	18.2
13S	3D	1 : 1	0.5	2.5	5.1	3.8	25.8
14S	2D	1 : 1	2.5	2.5	5.1	3.2	36.7

Tabla 35. Análisis de hidrosolubilidad de los complejos precipitados en acetona sintetizados en base al PASP-DC-MC-MH-6 con relación molar 1:1 de DC:VO

Los resultados del análisis de esta nueva serie de ensayos demostraron que la solubilidad para los complejos precipitados en acetona y sintetizados a partir del PASP-DC-MC-MH-6 con relación molar 1:1 de DC:VO resultaba ser muy baja. Los ensayos 12S, 13S y 14S permitieron comprobar nuevamente que la hidrosolubilidad podía ser aumentada si se elevaba el tiempo y la cantidad de agua destilada empleada durante el análisis; no obstante, el porcentaje de disolución seguía siendo comparable al observado en los complejos formados por los PASP-DC-MC-MH-4 y 5 también con relación 1:1 de PAS-DC:VO (Tabla 32). Únicamente en el caso de las condiciones extremas, se logró un aumento sustancial de la hidrosolubilidad.

Finalizado este experimento se decidió probar si es que la solubilidad de los complejos sintetizados a partir de los ligandos PASP-DC-MC-MH con proporción teórica de 50% PASP-MA incrementaba cuando poseían una menor cantidad de

vanadio incorporado. En la tabla 36 se muestran los ensayos de hidrosolubilidad realizados en los complejos formados por el ligando PASP-DC-MC-MH-7 con una relación molar 2:1 de DC: VO.

Ensayo	Complejo analizado	Relación molar meros DC:VO ²⁺	Vol agua (mL)	Tiempo (Hrs)	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Porcentaje de disolución (%)
15S	6E	2 : 1	0.5	0.5	5.0	0.0	100
16S	7E	2 : 1	2.5	0.5	4.9	0.0	100

Tabla 36. Análisis de hidrosolubilidad de los complejos precipitados en acetona sintetizados en base al PASP-DC-MC-MH-7 con relación molar 2:1 de DC:VO

Sorprendentemente, el experimento 15S, empleando condiciones deseables, evidenció un enorme aumento en la hidrosolubilidad de los conjugados sintetizados a partir de los PASP-DC-MC-MH con proporción teórica de 50% PASP-MA, como consecuencia de la disminución en la cantidad de vanadio complejado. Cabe mencionar que para este ensayo la disolución se completó alrededor de los 15 minutos de haber iniciado el ensayo. Por otro lado, el ensayo 16S también comprobó que una mayor cantidad en el volumen del solvente no influía en la velocidad de disolución del conjugado, puesto que tomó el mismo tiempo lograr una solución sin sólido remanente.

Una vez comprobada la completa hidrosolubilidad de los complejos vanadilo sintetizados a partir de los PASP-DC-MC-MH con 50% de proporción teórica de meros PASP-MA y en relación molar 2:1 de DC:VO, se decidió determinar, otro aspecto de particular interés, que es si esta característica perduraba al cabo de cierto tiempo. En la tabla 37 se muestran los análisis de hidrosolubilidad para dos complejos representativos, los cuales fueron llevados a cabo luego de un considerable periodo después de haber sido sintetizados y purificados.

Ensayo	Complejo analizado	Días después de sintetizado	Vol agua (mL)	Tiempo (Hrs)	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Porcentaje de disolución (%)
17S	5D	21	0.5	0.5	4.9	0.0	100
18S	5D	26	0.5	0.5	5.0	0.0	100
19S	2E	50	0.5	0.5	5.0	0.0	100

Tabla 37. Análisis de hidrosolubilidad de los complejos precipitados en acetona sintetizados en base a los PASP-DC-MC-MH-6 y 7 con relación molar 2:1 de DC:VO probados en diferentes tiempos

Los ensayos 17S y 18S demostraron que los complejos en estudio seguían manteniendo una completa hidrosolubilidad luego de 3 semanas de haber sido sintetizados. Asimismo, el experimento 19S comprobó que esta característica se mantenía incluso luego de 7 semanas de haber sido obtenidos y que el escalar la reacción de complejación no perjudicaba la hidrosolubilidad de los mismos.

La variación en la hidrosolubilidad de los complejos analizada en el presente acápite, puede ser explicada tomando en cuenta la proporción de meros hidroxilados propios de cada precursor polimérico empleado, así como en la cantidad de oxovanadio (IV) utilizado para la complejación.

Una mayor proporción de cadenas laterales hidroxilo dificultaría en mayor grado posibles reacciones de entrecruzamiento entre los meros carboximetilados de distintas cadenas propiciadas por el catión vanadilo así como la presencia de rigidez en una misma cadena polimérica; esto debido a un efecto tanto estadístico como estérico. En cuanto al primer factor, la presencia de una mayor cantidad de cadenas hidroxietiladas ocasiona el alejamiento relativo de las cadenas laterales carboximetiladas entre sí, lo que en consecuencia hace menos probable una coordinación simultánea de dos grupos carboxilato de una misma cadena o de diferentes cadenas a un mismo catión vanadilo. Asimismo, en lo que respecta al factor estérico, la presencia de estas cadenas hidroxietiladas

dificultaría el encuentro entre grupos carboxilato de una misma o diferentes cadenas con un mismo catión vanadilo complicando la unión de este con más de un grupo ligante. Una cadena principal más flexible y un menor grado de entrecruzamiento permitiría elevar la hidrosolubilidad de los conjugados.

Por otro lado, la coordinación de un gran número de cationes oxovanadio (IV) produciría un aumento de regiones neutras en el conjugado polimérico. Al respecto, cabe mencionar que los copolímeros usados como ligandos empleados en la síntesis de los conjugados vanadilo, son sumamente solubles en medio acuoso debido a la presencia tanto de grupos terminales hidroxilos como carboxilos y carboxilatos, los cuales generan zonas polares e interacciones fuertes de enlace de hidrógeno con el medio acuoso. La coordinación del oxovanadio(IV) a las macromoléculas en cuestión generaría una neutralización de carga de los grupos laterales carboxilato enlazados al catión vanadilo (VO^{2+}); de esta manera, se reduce la cantidad de secciones hidrosolubles en el conjugado resultante, lo que en consecuencia disminuiría la insolubilidad de los conjugados poliméricos.

En la tabla 38 se presentan los porcentajes en peso teóricos de vanadio que se esperaría observar en los conjugados sintetizados de acuerdo al copolímero de partida utilizado. Estos han sido calculados teniendo en cuenta la proporción relativa de cadenas laterales di-carboximetiladas en cada copolímero y la cantidad de vanadio a complejar según la relación molar utilizada. Los datos presentados en esta tabla serán de utilidad en la discusión de las diferencias en los resultados de las pruebas de hidrosolubilidad realizadas para los distintos copolímeros utilizados en la complejación del oxovanadio(IV).

Copolímero empleado	Proporción relativa DC/MC	Porcentaje de vanadio en relación molar 1:1 de DC:VO (%)	Porcentaje de vanadio en relación molar 2:1 de DC:VO (%)
3	4	7.93	4.37
4 y 5	2	6.94	3.78
6 y 7	3	6.77	3.72

Tabla 38. Porcentaje en peso teórico de vanadio en los conjugados sintetizados según el copolímero utilizado

Así, para los complejos vanadilo sintetizados a partir de los PASP-DC-MC-MH-4 y 5 con proporción teórica de 60% de meros PASP-MA (tablas 32 y 33), se observa que la mayor hidrosolubilidad la presentan los conjugados con una relación molar 2:1 de DC:VO respecto a aquellos 1:1; esta diferencia se podría justificar por la menor cantidad de cationes vanadilo coordinados en caso de los primeros. Como se observa en la tabla 38, existe una considerable diferencia, alrededor del 3%, en la cantidad teórica de vanadio presente en cada complejo. Un menor grado de coordinación del catión metálico a los grupos carboxilato conlleva una disminución de las zonas neutras en el respectivo conjugado, como se discutió previamente, lo cual tiende a elevar la hidrosolubilidad de los macro-complejos.

En este contexto, llamó la atención que para el caso de los complejos sintetizados a partir del PASP-DC-MC-MH-3 con relación molar 2:1 de DC:VO (tabla 34) se haya observado una hidrosolubilidad muy baja y comparable a la obtenida en los ensayos para los complejos formados por los PASP-DC-MC-MH-4 y 5 con relación molar 1:1 de DC:VO, pero con una proporción muy similar de meros hidroxilados (40% teórico). Para estos últimos, el contenido teórico de vanadio resulta ser mayor que el calculado para los primeros (6.94% y 4.37% respectivamente), lo cual generaría un aumento en la cantidad de zonas neutras y, por tanto, no se hubiera esperado que ambos conjugados presenten una hidrosolubilidad comparable. Todo parece indicar, que un porcentaje de vanadio de alrededor del 4% podría constituir el límite superior para obtener conjugados relativamente hidrosolubles empleando condiciones extremas de disolución (2.5 horas y 2.5 mL de agua). Esto es consistente con lo reportado para algunos otros conjugados poliméricos empleando platino, en que se hace referencia de un límite superior dependiente de la naturaleza del copolímero particular.⁷⁹

En lo que respecta al análisis de los complejos sintetizados a partir de los PASP-DC-MC-MH-6 y 7, ambos con un porcentaje teórico de 50% de meros PASP-MA, cabe destacar, la total hidrosolubilidad alcanzada en aquellos con relación molar 2:1 de DC:VO (tabla 36), a diferencia de los que poseen una relación 1:1 (tabla 35), empleando condiciones de disolución razonables. Dado que ambos poseen la misma proporción de grupos solubilizantes hidroxilados, la baja hidrosolubilidad del 1:1 radicaría en su considerablemente mayor contenido de

oxovanadio(IV) y, en consecuencia mayor cantidad de zonas neutras presentes en el respectivo conjugado.

Finalmente, es importante discutir la razón por la cual los conjugados vanadilo provenientes de los PASP-DC-MC-MH-6 y 7 con una proporción de 50% de meros teóricos PASP-MA y relación molar 2:1 de DC:VO (tabla 36) son totalmente hidrosolubles, empleando condiciones de disolución razonables, a diferencia de aquellos sintetizados a partir del PASP-DC-MC-MH-5 con la misma relación molar 2:1 de DC:VO (tabla 33), pero con una proporción teórica de 60% de meros PASP-MA. Ambos conjugados presentan una proporción teórica de vanadio muy similar entre sí (alrededor de 3.7%), por lo cual se esperaría que el número de regiones no solubilizantes sea comparable; sin embargo, los complejos obtenidos partiendo de macromoléculas con un 50% de meros PASP-MA presentan una mayor cantidad de cadenas laterales hidroxiladas con respecto a los sintetizados a partir de copolímeros con un 60% de meros PASP-MA. El incremento en cadenas laterales hidroxiladas, como ya fue explicado, favorecería, por un factor tanto estadístico como estérico, una disminución en el entrecruzamiento de cadenas poliméricas por acción del catión vanadilo. Asimismo, causaría un aumento en la flexibilidad de las cadenas, al disminuir la posibilidad de que coordinen grupos carboxilato no adyacentes de una misma cadena.

Por otra parte, cabe comentar una posible explicación sobre la formación del conjugado insoluble obtenido, como un producto secundario minoritario, en la síntesis de algunos conjugados obtenidos a partir de los PASP-DC-MC-MH-3,4 y 5. La formación, en pequeñas cantidades, de este sólido se observa desde la etapa inicial de la adición de la solución de sulfato de vanadilo a la polimérica. El oxovanadio (IV), presente en muy baja concentración en la solución, se uniría a un grupo carboxilato, que podría pertenecer tanto a una cadena lateral monocarboximetilada o a uno de los dientes de una di-carboximetilada; el segundo diente se encontraría protonado al pH 3 del medio. La reacción de complejación procede lentamente debido a la baja concentración de ambos reactivos, en particular la del VO^{2+} en la etapa inicial, la presencia de cadenas laterales no ligantes y el pH del medio. La baja concentración de vanadilo favorecería que este, una vez enlazado a un determinado carboxilato, “busque” otro grupo COO^-

disponible al cual coordinar para lograr la electroneutralidad. Sin embargo, si está enlazado a un mero di-carboximetilado, el diente adyacente se encontraría protonado y sería más probable que enlace a algún otro disponible; de esta manera podría unirse a un carboxilato lejano de la misma u otra cadena polimérica, lo que introduciría rigidez o produciría entrecruzamiento de las mismas. Cuando se sobrepasa un cierto límite el conjugado se vuelve completamente insoluble y precipita. Por otro lado, conforme se sigue añadiendo más VO^{2+} , el número de carboxilatos vacantes disminuye, y por ende, el entrecruzamiento y la formación del conjugado insoluble se ven desfavorecidas. Esto a su vez permitiría que el vanadilo ligado a un diente de un mero PASP-DC coordine al segundo diente cercano cuya desprotonación no es inmediata y es promovida por el metal.



6.5.3. Caracterización

Los complejos PASP-DC-MC-MH-VO solubles obtenidos mediante precipitación en acetona han sido caracterizados utilizando las espectroscopías infrarroja (FT-IR) y ultravioleta visible (UV-vis); asimismo, el contenido de vanadio de los compuestos completamente hidrosolubles ha sido determinado mediante la técnica de espectroscopía de absorción atómica en llama (AAS). Por otro lado, los sólidos iniciales insolubles han sido caracterizados solamente por IR.

En las figuras 51 y 52 se muestran los espectros IR representativos de los conjugados vanadilo soluble e insoluble respectivamente, sintetizados a partir del ligando polimérico PASP-DC-MC-MH-5 (60% meros PASP-MA teóricos) con una relación molar 1:1 de DC:VO.

En el espectro IR del complejo soluble de la figura 51 se observan, en primer lugar, las bandas características del ligando polimérico. A 3316 cm^{-1} aparece la banda intensa y ancha correspondiente a las vibraciones de estiramiento de los enlaces N-H y O-H de los grupos amido e hidroxilo. Por otro lado, a 1650 cm^{-1} resalta una banda muy intensa que resulta de la superposición de las bandas de estiramiento del enlace C=O de la amida I y de la particularmente fuerte absorción del estiramiento asimétrico del grupo carboxilato que aparece en esa misma región. Asimismo, a 1540 cm^{-1} se observa la banda generada por la flexión del enlace N-H de la amida II. Por otro lado, a 1371 cm^{-1} se encuentra otra banda medianamente intensa producto del estiramiento simétrico del grupo carboxilato. Finalmente, a 1048 cm^{-1} destaca una pequeña banda producto del estiramiento del enlace C-O en el grupo alcohol del mero PASP-MH. Curiosamente, la posición de esta última banda en los espectros IR de los ligandos macromoleculares PASP-DC-MC-MH se da a una frecuencia ligeramente mayor, 1060 cm^{-1} aproximadamente.

Sin embargo, se observa que, a diferencia del espectro IR del correspondiente precursor polimérico (presentado en el anexo 9.9), ya no aparece el pequeño hombro a 1723 cm^{-1} aproximadamente, que correspondía al estiramiento del enlace C=O del grupo COOH; asimismo han aparecido dos bandas medianamente intensas a 974 y 1128 cm^{-1} .

La desaparición de la primera señal es consecuente con la relación molar 1:1 de DC:VO presente en este conjugado, que da lugar a la complejación de todos los grupos di-carboximetilados con el catión vanadilo. La coordinación de este último requiere la presencia de grupos COOH desprotonados. Por otro lado, las cadenas laterales mono-carboximetiladas se encontrarían como zwitterion, y por ende también darían lugar a grupos carboxílicos desprotonados. De esta manera, la ausencia de grupos COOH conduce a la eliminación de la pequeña banda en discusión.

Por otro lado, es sumamente importante resaltar la presencia de la banda medianamente intensa a 974 cm^{-1} , la cual es característica del estiramiento del doble enlace $\text{V}=\text{O}$ del catión oxovanadio (IV). Esta banda se encuentra significativamente desplazada a menores valores respecto al observado en el espectro del sulfato de vanadilo (1001 cm^{-1}), lo que concuerda con una efectiva complejación de los meros di-carboximetilados al metal.

Finalmente, la banda a 1128 cm^{-1} sería producto de la presencia, en baja cantidad, de grupos sulfato contaminantes, los cuales, dada la imposibilidad de efectuar lavados con agua para estos conjugados, no pudieron ser eliminados durante la etapa de purificación. Cabe mencionar que para la síntesis del complejo PASP-DC-MC-VO, realizada por Murga, también se observó la presencia de esta banda del anión sulfato contaminante, aun cuando en ese caso sí se empleó agua destilada y acetona como solventes de lavado.

El espectro IR del sólido insoluble formado como precipitado inicial durante la síntesis del complejo soluble, antes discutido, se presenta en la figura 52. Resulta evidente la gran similitud con el espectro del correspondiente complejo soluble de la figura 51, lo cual indica que este producto también es un conjugado PASP-DC-MC-MH-VO. Se postula que en este caso, su insolubilidad sería debida a que el catión vanadilo ha coordinado a grupos carboxilato de distintas cadenas poliméricas produciendo un entrecruzamiento de las mismas, el cual no altera significativamente el patrón observable de bandas en el IR. Una diferencia significativa, que cabe mencionar, es la notable reducción en la intensidad de la banda característica del anión sulfato y el ligero desplazamiento en aquella de la $\nu\text{ C-O}$ del grupo hidroxilo presente en las secciones PASP-MH hacia su posición original en el correspondiente copolímero libre. La presencia de una menor

cantidad de sulfato se debe a que este conjugado, a diferencia del soluble, precipita antes de la adición de acetona, por lo cual el sulfato, en lugar de coprecipitar, se mantiene en solución.

En la figura 53 se muestra el espectro IR representativo de los complejos solubles sintetizados a partir de los mismos copolímeros, PASP-DC-MC-MH-4 y 5, pero empleando una relación molar 2:1 de DC:VO. Al compararlo con su análogo con relación molar 1:1 (Figura 51) se comprueba la gran similitud entre ambos espectros. Cabe destacar, no obstante, ciertas diferencias, de las cuales la más importante es la considerable disminución de la intensidad de la banda característica del catión vanadilo a 970 cm^{-1} , lo cual resulta consistente con que el contenido teórico de vanadio en este conjugado es la mitad que en el de relación molar 1:1 de DC:VO. Otra diferencia relacionada a esto último radica en la aparición de un ligero hombro en la intensa banda a 1647 cm^{-1} , que indica la presencia de cierta cantidad de grupos carboxílicos no desprotonados. Esto es de esperar si se toma en cuenta que al enlazarse menos cationes oxovanadio(IV) a los grupos di-carboximetilados, quedan una considerable proporción de dichos grupos libres. Cada cadena lateral PASP-DC posee dos grupos carboxílicos terminales, de los cuales uno se encuentra como zwitterion con el nitrógeno terciario del grupo amino terminal del cual deriva, mientras que el segundo se encontraría protonado considerando el pH 3 utilizado en la síntesis. Por último, la disminución en la intensidad de la banda del vanadilo se puede relacionar directamente con la correspondiente disminución de la banda del anión sulfato a 1129 cm^{-1} .

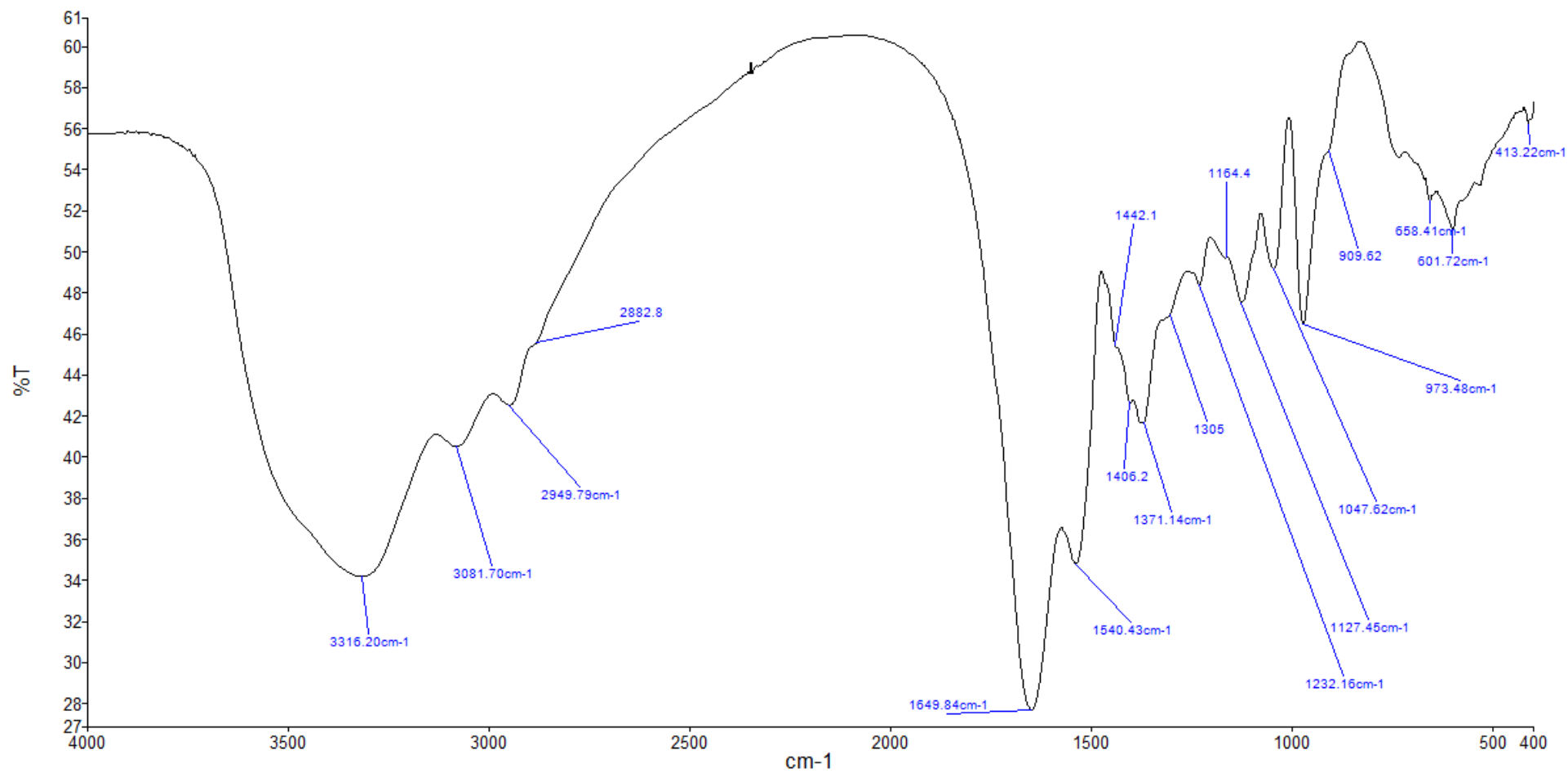


Figura 51. Espectro IR del sólido precipitado en acetona del conjugado 8A sintetizado a partir del PASP-DC-MC-MH-4 con un porcentaje teórico de 60% de PASP-MA y relación molar 1:1 DC:VO en KBr

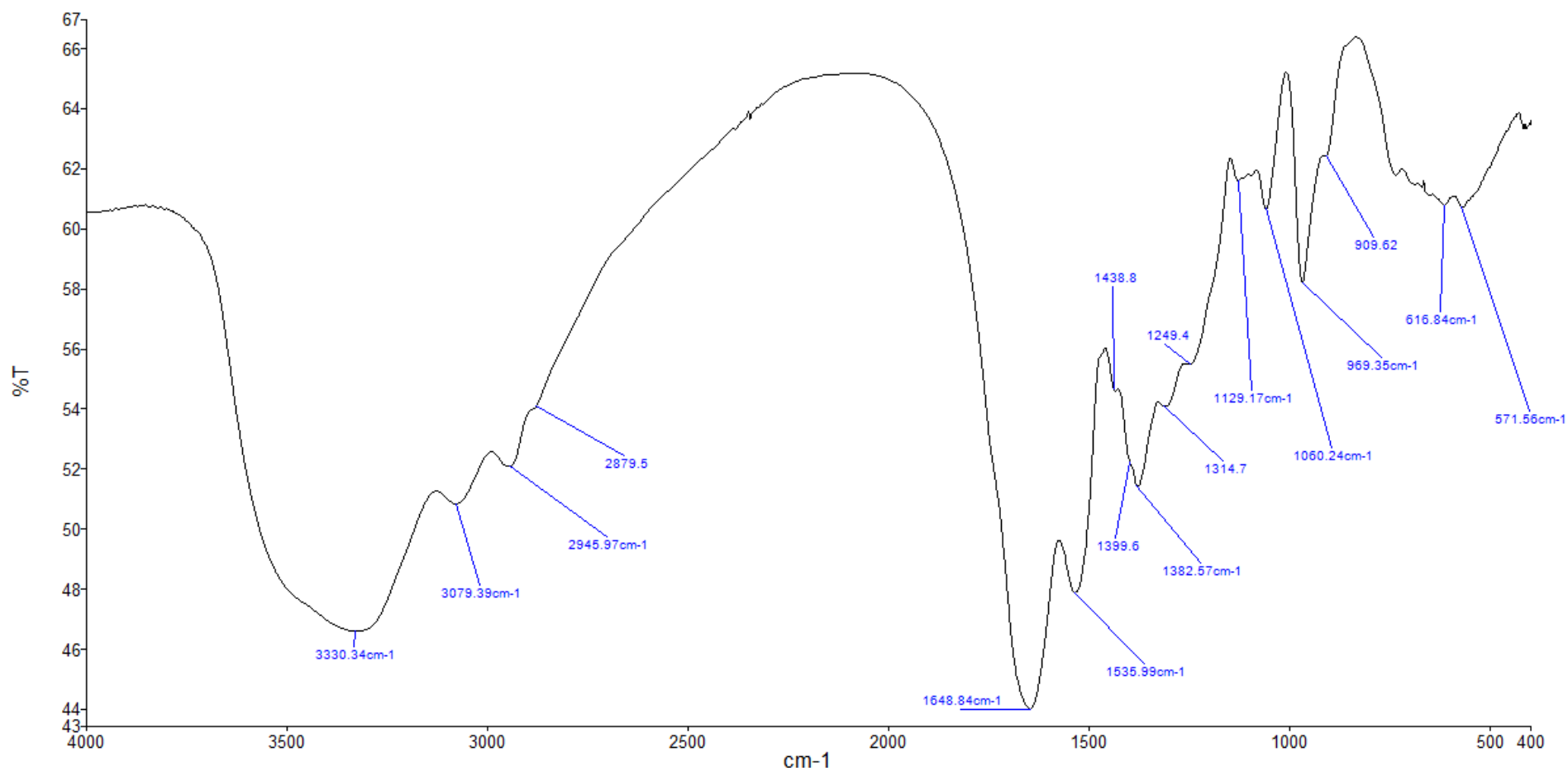


Figura 52. Espectro IR del sólido insoluble del conjugado 8A sintetizado a partir del PASP-DC-MC-MH-4 con un porcentaje teórico de 60% de PASP-MA y relación molar 1:1 DC:VO en KBr

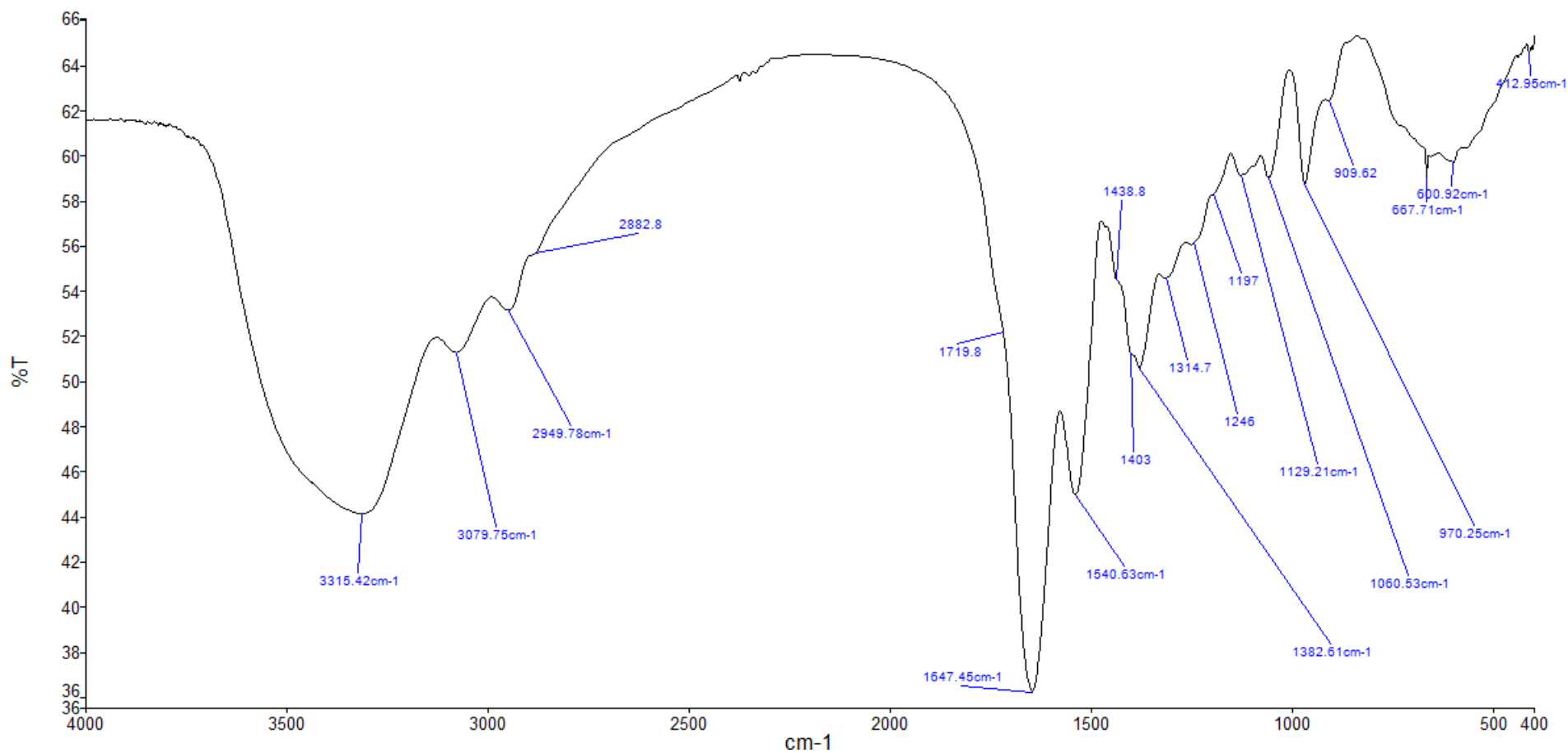


Figura 53. Espectro IR del sólido precipitado con acetona del conjugado 6B sintetizado a partir del PASP-DC-MC-MH-4 con un porcentaje teórico de 60% de PASP-MA y relación molar 2:1 DC:VO en KBr

En el anexo 17 se muestran los espectros IR representativos de los complejos soluble e insoluble con relación molar 1:1 de DC:VO, así como del conjugado soluble con relación 2:1, sintetizados a partir del PASP-DC-MC-MH-3 (60 % de proporción teórica de meros PASP-MA), el cual presenta una mayor proporción relativa de meros PASP-DC a meros PASP-MC (4:1) que los PASP-DC-MC-MH-5 (2:1). Se puede observar claramente que los tres espectros presentan bandas con desplazamientos e intensidades similares a los correspondientes espectros de los complejos sintetizados a partir del ligando polimérico PASP-DC-MC-MH-5. Sin embargo, para el conjugado soluble con la misma relación molar 1:1 DC:VO, es notorio el significativo incremento en las intensidades de las bandas características del catión vanadilo (974 cm^{-1}) y del anión sulfato (1128 cm^{-1}); esta observación es congruente con la mayor cantidad de oxovanadio(IV) coordinado en estos conjugados debido al incremento en la proporción relativa de meros di-carboximetilados (DC:MC 4:1) con respecto al complejo soluble sintetizado a partir del PASP-DC-MC-MH-5 (DC:MC 2:1). En el caso del correspondiente complejo insoluble, la principal diferencia frente al análogo formado por el PASP-DC-MC-MH-5 radica en la aparición de un ligero hombro en la intensa banda a 1651 cm^{-1} . Esto último indicaría, como se mencionó previamente, que una significativa cantidad de meros di-carboximetilados no se encuentran unidos a cationes oxovanadio(IV). Esto resulta compatible con lo discutido en el análisis de hidrosolubilidad previo, en el cual se postuló que la formación del conjugado insoluble ocurriría como consecuencia de un entrecruzamiento de cadenas poliméricas hasta un cierto límite, que daría lugar a su precipitación, dejando así grupos terminales di-carboxilados libres, pese a que se ha adicionado la cantidad de vanadio adecuada para la coordinación completa de los meros PASP-DC. Finalmente, al comparar el conjugado soluble sintetizado a partir de este mismo copolímero, pero con una relación molar 2:1 de DC:VO, con aquel obtenido a partir del PASP-DC-MC-MH-5, prácticamente no se observan diferencias significativas, salvo un cierto incremento en la intensidad de la banda a 971 cm^{-1} del grupo VO^{2+} atribuible al mayor contenido de este catión.

Una vez finalizado el análisis de los espectros IR de los complejos formados por ligandos PASP-DC-MC-MH con un 60% de meros teóricos PASP-MA, se procederá a analizar de los complejos solubles obtenidos utilizando como copolímero de partida al PASP-DC-MC-MH-6 con un 50% de meros teóricos PASP-MA. En las figuras 54 y 55 se muestran los espectros IR de los complejos solubles (precipitados en acetona) con una relación molar 1:1 y 2:1 de DC:VO respectivamente. Se observa claramente en ambos casos que la posición e intensidad de las bandas resulta ser prácticamente idéntica a la descrita para los complejos solubles sintetizados a partir del PASP-DC-MC-MH-5 con un 60% de meros teóricos PASP-MA. Esto puede explicarse si es que se toma en cuenta que, pese a que los conjugados provenientes de los PASP-DC-MC-MH-6 y 7 poseen un porcentaje de meros PASP-MA teórico inferior en 10% a aquellos provenientes de los PASP-DC-MC-MH-5, esto se ve prácticamente compensado por su mayor proporción relativa de meros DC:MC (3:1 vs 2:1). Así, el contenido teórico de vanadio calculado (tabla 38) para la relación molar 1:1 es muy similar al correspondiente en el conjugado del PASP-DC-MC-MH-12 (6.77 y 6.94 respectivamente); y para el 2:1 se observan valores casi idénticos (3.72 vs 3.78 respectivamente)

Finalmente, en la figura 56 se muestra el espectro correspondiente al complejo soluble sintetizado a partir del PASP-DC-MC-MH-6 con relación molar 2:1 de DC:VO, pero sintetizado en base a 50 mg del polímero como reactivo inicial (escalado 4 veces). Se observa claramente que el desplazamiento e intensidad de las bandas características del conjugado resulta ser igual al del correspondiente espectro no escalado (figura 55), lo cual indica una excelente reproducibilidad de la síntesis.

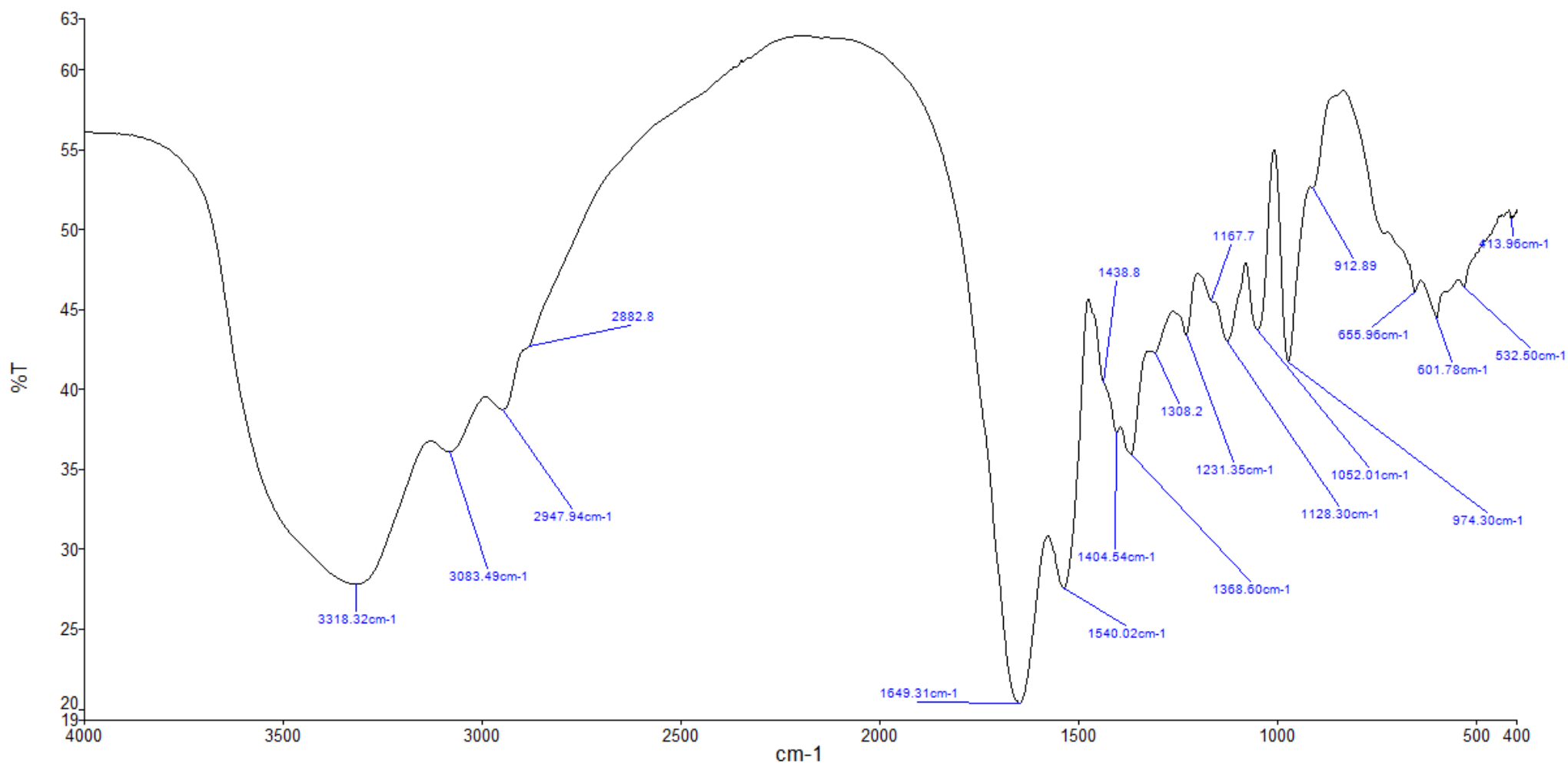


Figura 54. Espectro IR del sólido precipitado con acetona del conjugado 4D sintetizado a partir del PASP-DC-MC-MH-6 con un porcentaje teórico de 50% de PASP-MA y relación molar 1:1 DC:VO en KBr

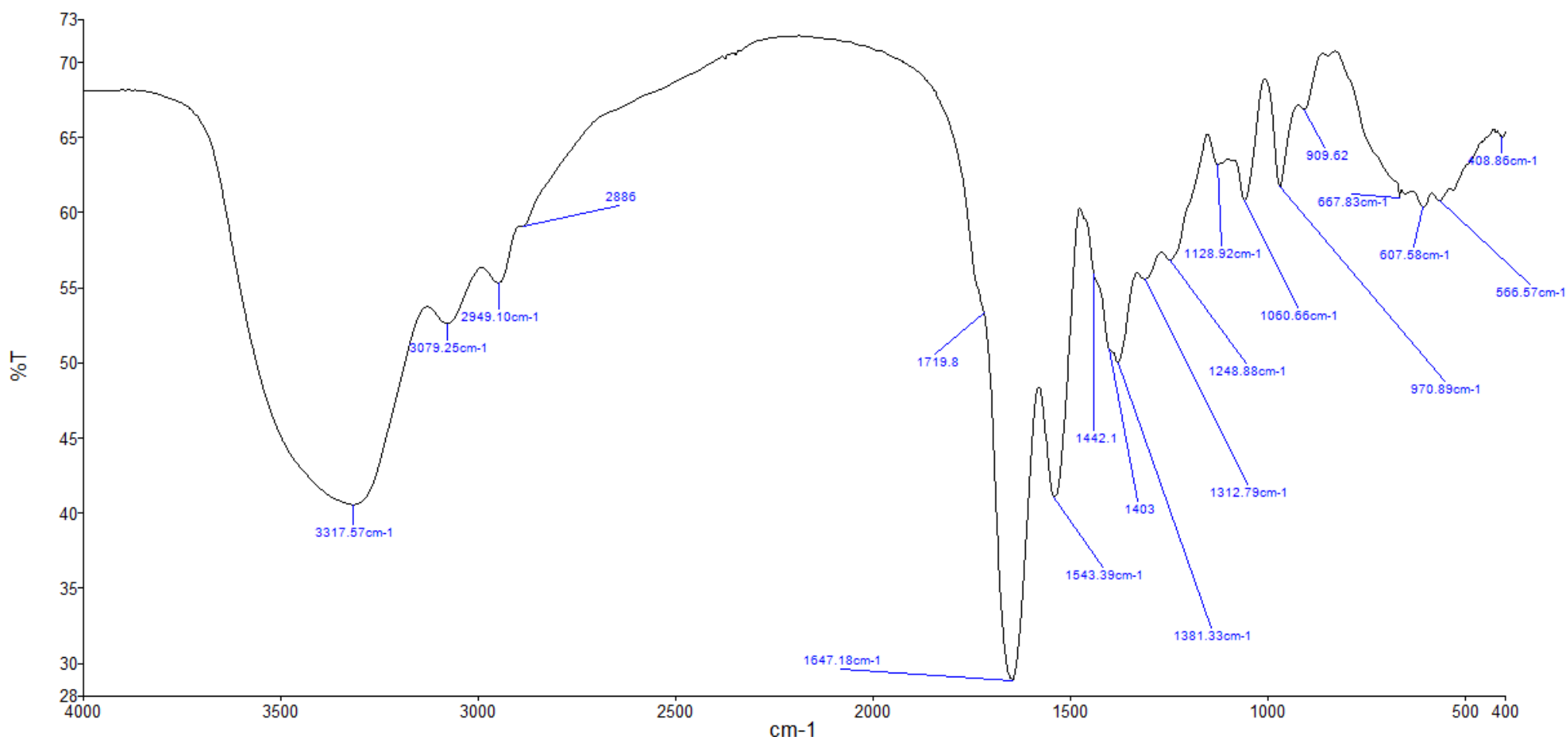


Figura 55. Espectro IR del sólido precipitado con acetona del conjugado 8D sintetizado a partir del PASP-DC-MC-MH-7 con un porcentaje teórico de 50% de PASP-MA y relación molar 1:1 DC:VO en KB



Figura 56. Espectro IR del sólido precipitado con acetona del conjugado 2E sintetizado a partir del PASP-DC-MC-MH-6 con un porcentaje teórico de 50% de PASP-MA y relación molar 2:1 DC:VO en KBr

En lo referente a la caracterización de los conjugados por espectroscopía UV-Vis, es conocido que la mayoría de oxocomplejos de vanadio (IV) generan 3 bandas en los espectros UV debido a transiciones d-d. Estas bandas se encuentran localizadas en las regiones de 625-909 nm, 527-687 nm y 333-500 nm; no obstante, la última suele encontrarse encubierta por bandas de transferencia de carga con mucha mayor intensidad.⁸²

Para el caso de complejos de oxovanadio(IV) con una coordinación octaédrica, como, por ejemplo, el acuación $\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5^{2+}$, el modelo de Ballhausen – Gray⁸³ indica que ocurre una distorsión de la geometría octaédrica ideal producto del acortamiento del enlace múltiple $\text{V}=\text{O}$, lo que da lugar a un desdoblamiento adicional de los orbitales “d” del vanadilo causado por esta compresión en el eje Z. En la figura 57 se muestra de manera esquemática el desdoblamiento mencionado. Cabe mencionar que, para los complejos sintetizados en la presente investigación, también debería de observarse un desdoblamiento similar al del $\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5^{2+}$ puesto que solamente se habrían reemplazado dos moléculas de H_2O en el plano ecuatorial por dos ligandos carboxílicos. Esta observación permitiría proponer que el espectro UV-VIS de los conjugados PASP-DC-MC-MH-VO debería ser muy similar al del acuación VO^{2+} .

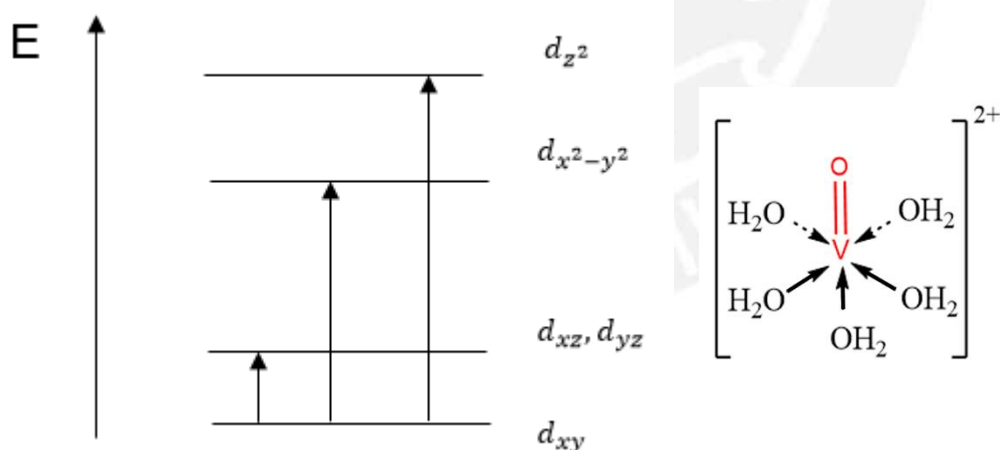


Figura 57. Desdoblamiento de los orbitales de vanadilo, para el caso del catión $\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5^{2+}$, de acuerdo al modelo de Ballhausen – Gray.⁸³

Las figuras 58 y 59 muestran los espectros UV-Vis experimentales del complejo vanadilo completamente hidrosoluble así como de su correspondiente ligando polimérico respectivamente. Se observa claramente que para el primero se han

formado dos bandas superpuestas las cuales se encuentran a 765 nm y 590 nm. La banda de absorción de mayor longitud de onda correspondería a la transición $d_{xy} \rightarrow d_{xz}, d_{yz}$ mientras que la segunda sería producto de la transición $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$. La tercera banda, de mayor energía, correspondiente a la transición $d_{xy} \rightarrow d_{z^2}$, se encuentra aparentemente encubierta por la intensa banda de transferencia de carga carboxilato – metal en la región ultravioleta que se extiende hasta la región visible. Por otro lado, la figura 59 comprueba que el ligando polimérico no presenta absorción alguna dentro de la región visible en estudio.

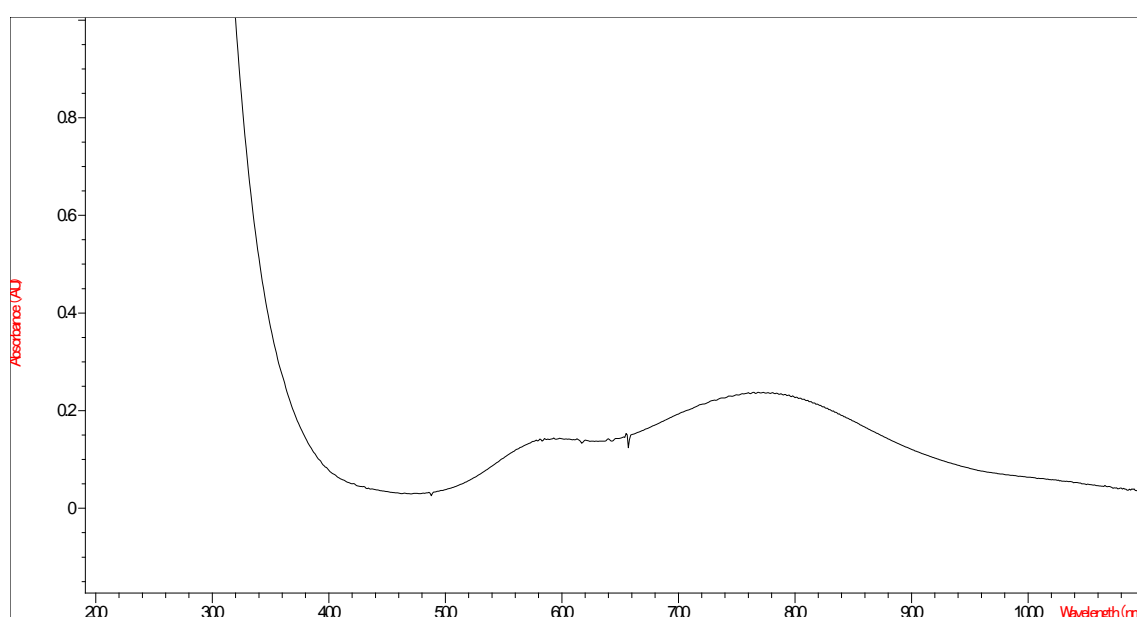


Figura 58. Espectro UV-Vis del sólido precipitado con acetona completamente hidrosoluble del ensayo 5D

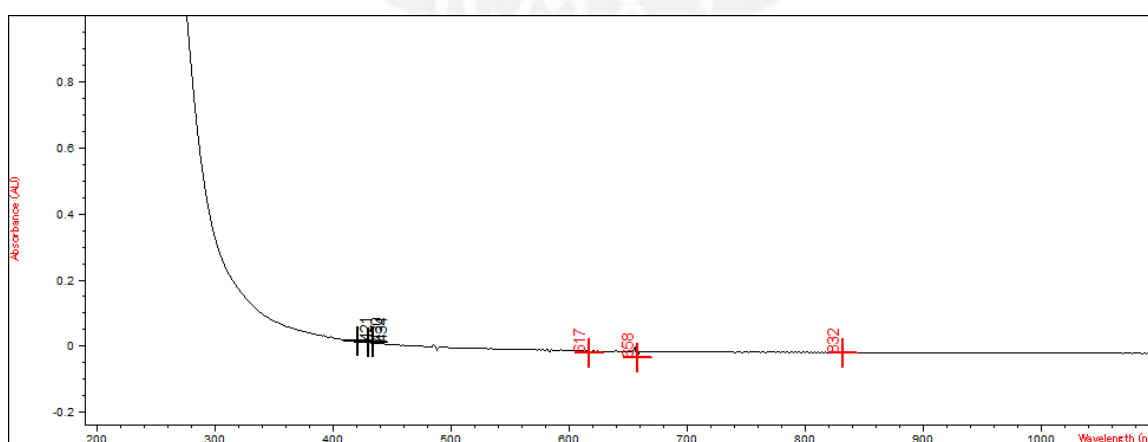


Figura 59. Espectro UV-Vis del copolímero PASP-DC-MC-MH-7

En la figura 60 se presenta el espectro UV-VIS del $\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5^{2+}(\text{ac})$, en el cual es posible apreciar la formación de una banda principal y un hombro de menor intensidad a 768 y 635 nm respectivamente. Al compararlo con el del conjugado vanadilo hidrosoluble, se observa que mientras que, la banda correspondiente a la transición $d_{xy} \rightarrow d_{xz}, d_{yz}$ en este último prácticamente mantiene su posición, la banda a menor longitud de onda ha sufrido un desplazamiento hipsocrómico ubicándose ahora a 590 nm. Este último corrimiento constituye evidencia adicional de la complejación del catión vanadilo a los grupos carboximetilados del copolímero PASP-DC-MC-MH.

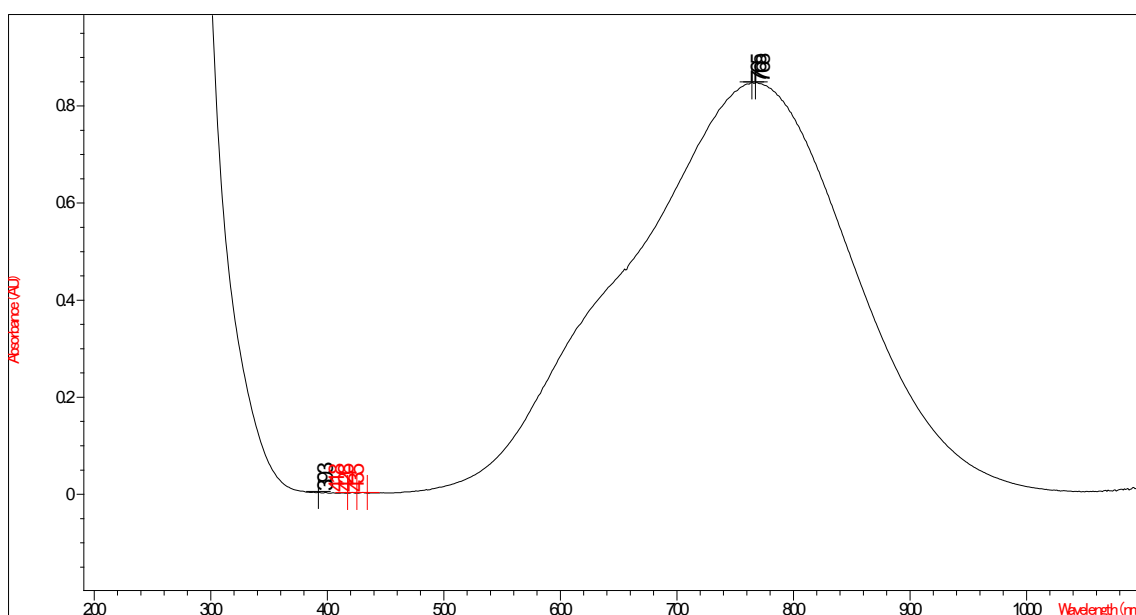


Figura 60. Espectro UV-vis del $\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5^{2+}(\text{ac})$

En lo que respecta al modo de coordinación de los grupos carboximetilados al catión vanadilo, Deacon y colaboradores han reportado que valores altos de $\Delta[v_{\text{as}}(\text{COO}^-) - v_{\text{s}}(\text{COO}^-)]$ en el espectro IR indican una coordinación de modo monodentado. Para el caso de los complejos analizados en el presente acápite (figuras 51-56) se tiene un valor mínimo de 265 cm^{-1} para dicha diferencia, lo cual es un número suficientemente alto como para confirmar que la coordinación del catión vanadilo ocurre de forma monodentada.⁸⁴ Por otro lado, otro indicio que reforzaría esta propuesta se encuentra en la investigación realizada por Sakurai y colaboradores en conjugados poliglutamato-vanadilo, en la cual determinaron, mediante la técnica de EPR, que los grupos carboxilato coordinaban de modo monodentado.

Se propone, por tanto, que el ligando polimérico PASP-DC-MC-MH, independientemente de las proporciones de diferentes cadenas laterales que posea, se encontraría coordinando al oxovanadio (IV) mediante sus grupos carboxilatos de forma monodentada. Además, se asume que la coordinación al vanadilo ocurre preferentemente mediante los grupos terminales di-carboxilato, dada la mayor probabilidad que una vez enlazado el VO^{2+} a uno de ellos, coordine al carboxilato disponible más cercano; de esta manera se generarían anillos de 8 miembros relativamente estables. La coordinación al metal se completaría con dos o tres moléculas de agua que darían lugar a una geometría pirámide cuadrada u octaédrica en el complejo (Figura 61).

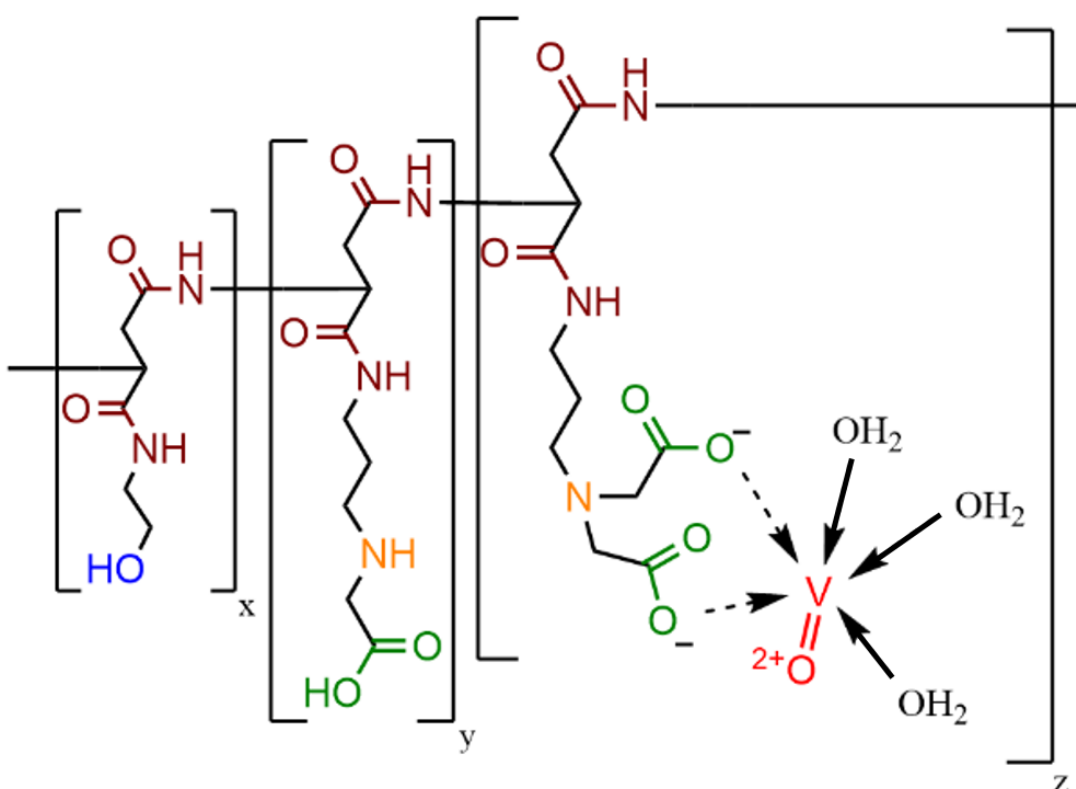


Figura 61. Estructura propuesta para el complejo PASP-DC-MC-MH-VO

Finalmente, la determinación del contenido de vanadio para los complejos completamente hidrosolubles, sintetizados a partir del PASP-DC-MC-MH-6 con 50% de meros PASP-MA teóricos y relación molar 2:1 de DC:VO, fue realizada mediante la técnica de Espectroscopía de Absorción Atómica (AAS). En la tabla 39 se muestran los dos análisis, realizados cada uno por triplicado, a los complejos precipitados en acetona 2E y 3E. Se observa claramente que el

porcentaje promedio de vanadio determinado para cada ensayo es relativamente cercano al calculado teóricamente (3.72%).

Ensayo	% de vanadio
Sólido precipitado con acetona ensayo 2E	3.09
Sólido precipitado con acetona ensayo 3E	2.81

Tabla 39. Contenido de vanadio de los conjugados hidrosolubles determinado por AAS

En lo que respecta a las escasas investigaciones encontradas en la literatura sobre la síntesis de complejos poliméricos de oxovanadio(IV), cabe destacar que en el presente trabajo se ha logrado superar las principales deficiencias que estos presentan. Zhang y colaboradores también consiguieron sintetizar conjugados hidrosolubles de oxovanadio(IV) obtenidos a partir de dos polímeros naturales carragenina y quitosano carboximetilados, pero estos mostraron un porcentaje de metal muy inferior (0.36%) al obtenido para el presente trabajo (2.95%). Asimismo, Sakurai y colaboradores obtuvieron conjugados vanadilo de poliglutamato que, a diferencia de los de Zhang, poseían un irracionalmente alto contenido del metal; no obstante, esta característica fue conseguida a expensas de una completa insolubilidad de los conjugados una vez obtenidos al estado sólido. Los conjugados sintetizados en ambas investigaciones mostraron una significativa actividad hacia el tratamiento de la diabetes mellitus en ratones; sin embargo, para el caso de Zhang, el efecto resultó ser muy leve debido a la baja cantidad del agente activo administrado. Por otro lado, tanto los conjugados de Sakurai como los de Zhang, no resultan ser agentes terapéuticos adecuados, puesto que la eliminación renal de las macromoléculas sería demasiado lenta debido a su alto peso molecular (200-500 kDa), esto en consecuencia generaría una alta toxicidad. Finalmente, con respecto al complejo oxovanadio(IV) sintetizado por Murga a partir de la poliaspartamida derivatizada PASP-DC-MC, el presente trabajo ha permitido obtener un conjugado con un porcentaje de vanadio inferior (2.95% vs 5.80% respectivamente), pero con la ventaja de ser completamente hidrosoluble al estado sólido y, además, por un largo periodo de tiempo. Estas propiedades, deseables para una futura evaluación de conjugados

poliméricos de vanadilo como agentes terapéuticos, fue imposible de alcanzar para el mencionado complejo. ⁷⁻¹⁰



7. Conclusiones

1. Se han sintetizado 2 copolímeros no reportados en la literatura, la poli-(α,β -D,L-[N-(3-aminopropil)-aspartamida])-co-[2(hidroxietyl)-aspartamida] (PASP-MA-MH) y la poli-(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida])-co-[N-(3-(carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]-co-[(2-Hidroxietyl)-aspartamida]) (PASP-DC-MC-MH) por métodos desarrollados en la presente investigación y basados en los trabajos de Neuse, Caliceti y Murga para la síntesis de los polímeros componentes del PASP-MA-MH, la poli- α,β -D,L-[N-(3-aminopropil)-aspartamida] y la poli- α,β -D,L-[2(hidroxietyl)-aspartamida], así como del PASP-DC-MC, la poli-(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida])-co-[N-(3-(carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]).
2. Los dos nuevos copolímeros fueron sintetizados a partir de la polisuccinimida (PSI), que fue preparada de acuerdo al procedimiento reportado por Neri. La síntesis del PASP-MA-MH se realizó mediante la aminólisis del anillo polisuccinimida con la etanolamina y la 1,3 propanodiamina que fueron utilizados en diferentes proporciones con el fin de obtener copolímeros PASP-MA-MH con diferentes proporciones de cadenas laterales PASP-MA y PASP-MH. Se obtuvieron tres copolímeros con proporciones experimentales PASP-MA:PASP-MH cercanas a las teóricas 30:70, 50-50 y 60-40, buena reproducibilidad y rendimientos promedio de 59%.
3. El copolímero ligando, PASP-DC-MC-MH, se sintetizó mediante la derivatización selectiva de los grupos amino terminales en el PASP-MA-MH con el ácido bromoacético. De esta manera, se generó un copolímero con tres secciones poliméricas principales, la constituida por las cadenas laterales hidroxiladas exclusivamente solubilizantes, ya presentes en el precursor, y aquellas di-carboximetiladas (DC) y mono-carboximetiladas (MC) con capacidad ligante. El uso de pequeños excesos sobre la relación molar 2:1 del agente carboximetilante al sustrato polimérico PASP-MA-MH permitió obtener copolímeros con un predominio de cadenas DC sobre las MC con proporciones DC:MC entre 2:1 y 4:1.
4. Los complejos de oxovanadio(IV) obtenidos en la presente investigación han sido sintetizados por una reacción de metátesis entre el ligando polimérico PASP-DC-MC-MH y el sulfato de vanadilo. Para la complejación se

emplearon los copolímeros PASP-DC-MC-MH con proporción teórica de meros PASP-MA de 50% y 60%. Mediante sucesivas series de ensayos, en que se varió la concentración de ambos substratos y se mantuvo constante la relación molar de meros DC a vanadilo para luego introducir variaciones en esta última, 1:1 y 2:1.

5. Se desarrolló un procedimiento optimizado para la síntesis de los conjugados formados por los copolímeros PASP-DC-MC-MH con proporción teórica de meros PASP-MA de 50% y 60%, logrando altos rendimientos de conjugados solubles en el rango 89-98% y sin formación de su contraparte insoluble, evitando así un problema recurrente en este tipo de síntesis.
6. Se diseñó una metodología apropiada, mediante la variación del volumen de solvente y el tiempo de disolución, para evaluar la hidrosolubilidad de los conjugados vanadilo sintetizados una vez aislados al estado sólido. Los ensayos descritos permitieron establecer que la solubilidad se ve favorecida en los conjugados poliméricos de oxovanadio(IV) que presentan una relación molar 2:1 de meros di-carboximetilados a VO^{2+} . Asimismo la completa hidrosolubilidad del conjugado vanadilo al estado sólido se alcanzó usando los ligandos poliméricos PASP-DC-MC-MH con un 50% de meros teóricos PASP-MA. Esta característica se mantiene incluso al cabo de 7 semanas de haber sido aislado.
7. La caracterización de los nuevos copolímeros PASP-MA-MH se llevó a cabo mediante las técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear e infrarroja. La presencia de la ancha e intensa banda correspondiente a las vibraciones de estiramiento de los enlaces N-H y O-H de los grupos amino, amido e hidroxilo, así como aquella de flexión del enlace N-H de la amida II y la medianamente intensa producto del estiramiento del enlace C-O en el grupo alcohol, además de la intensa banda correspondiente al estiramiento C=O de la amida I, permitieron comprobar una aminólisis exitosa de la polisuccinimida.
8. El análisis por resonancia magnética nuclear 1H -RMN y ^{13}C -RMN complementado por las técnicas bidimensionales COSY y HSQC permitió determinar la proporción relativa de cadenas laterales PASP-MA y PASP-MH; se comprobó así que los valores calculados eran cercanos a los teóricamente propuestos. Asimismo, este análisis demostró la presencia de una cantidad

- significativa de meros no deseados producto de una reacción secundaria de hidrólisis de grupos amido.
9. Los PASP-DC-MC-MH fueron caracterizados por las técnicas de resonancia magnética nuclear e infrarroja. La técnica FT-IR mostró que se mantenían las bandas características de los estiramiento de los enlaces N-H, O-H, C=O de la amida I, enlace C-O en el grupo alcohol y aquella de flexión del enlace N-H de la amida II. La efectiva carboximetilación de los grupos amino de las cadenas PASP-MA se evidencia en la intensificación de la banda de estiramiento C=O de la amida I por superposición con la fuerte banda de absorción correspondiente al estiramiento asimétrico del grupo carboxilato, así como en la aparición de una nueva banda medianamente intensa producto de aquel simétrico de dicho grupo. La presencia de un hombro en la primera mencionada se asocia con grupos carboxílicos no desprotonados presentes en los meros di-carboximetilados.
 10. El análisis de los copolímeros PASP-DC-MC-MH por la técnica de resonancia magnética nuclear permitió una asignación prácticamente completa de las señales en los espectros $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$, gracias a una complementación de la misma con los espectros bidimensionales COSY, HSQC y HMBC. La identificación de picos característicos exclusivos de los meros di y mono-carboximetilados permitió determinar la proporción relativa entre ambos. Asimismo, esta técnica indicó la presencia de pequeñas señales que pudieron ser asociadas a una baja, pero significativa, cantidad de nuevas cadenas laterales no deseadas.
 11. Los conjugados poliméricos oxovanadio(IV) se caracterizaron mediante espectroscopía infrarroja y ultravioleta-visible. La FT-IR demostró la presencia de todas las bandas características del ligando polimérico, así como la aparición de una nueva banda medianamente intensa producto de la vibración de estiramiento del doble enlace V=O del catión vanadilo a 971 cm^{-1} . El considerable desplazamiento respecto a aquella observada en el sulfato de vanadilo (1000 cm^{-1}), constituye evidencia de una efectiva coordinación del catión vanadilo.
 12. El espectro infrarrojo permitió determinar la diferencia entre las frecuencias de estiramiento asimétrico y simétrica del grupo carboxilato ($\Delta[\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-) - \nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)]$) que corresponderían a un modo de coordinación monodentado del

mismo. Asimismo, la caracterización por ultravioleta visible del conjugado polimérico oxovanadio(IV) mostró la presencia de dos bandas características en la región visible, carente de absorciones en el copolímero precursor, asignables a transiciones “d-d” entre niveles t_{2g} y e_g desdoblados de complejos vanadilo con geometría octaédrica distorsionada. El notable desplazamiento de una de estas bandas hacia menores longitudes de onda, respecto al espectro del VO_2 en medio acuoso, demostraría la coordinación del VO^{2+} con los carboxilato del copolímero.

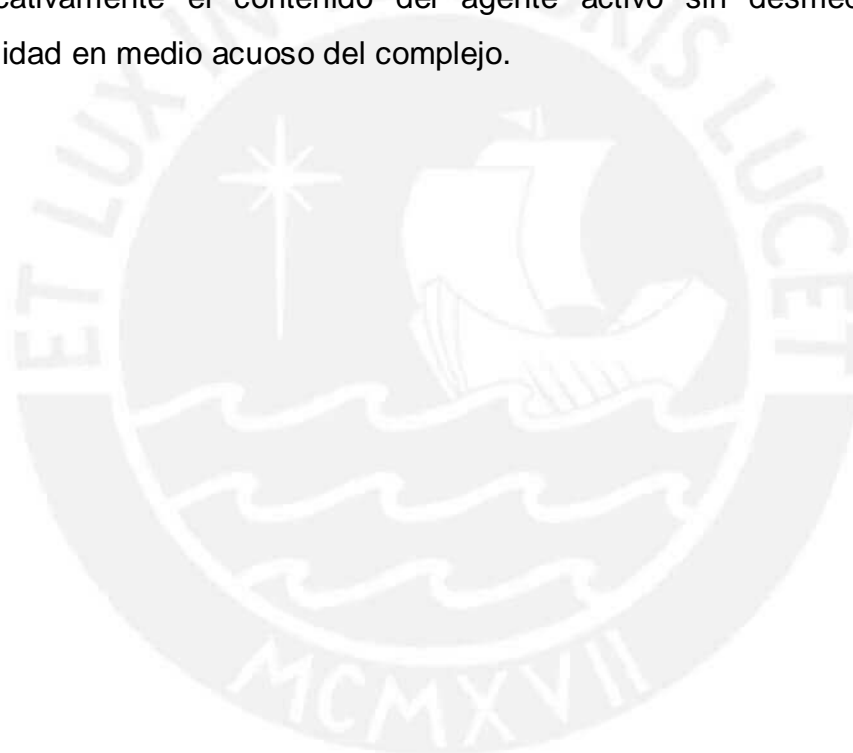
13. El contenido de vanadio determinado por Espectroscopía de Absorción Atómica para los conjugados vanadilo hidrosolubles al estado sólido, sintetizados a partir de los PASP-DC-MC-MH con un porcentaje teórico de 50% de meros PASP-MA y relación molar 2:1 DC:VO fue de 2.95% en promedio. Este valor resultó relativamente cercano al teóricamente calculados para este conjugado asumiendo una coordinación exclusiva de los meros DC.
14. Se logró alcanzar el objetivo central de esta investigación, que consistió en la obtención de un conjugado vanadilo completamente hidrosoluble bajo condiciones razonables al estado sólido. Esto fue posible al utilizar como ligandos poliméricos a los PASP-DC-MC-MH con una proporción teórica de PASP-MA de 50% y usando una relación molar 2:1 de DC:VO que equivale a la saturación de un 50% de las cadenas laterales di-carboximetiladas. Se estableció que la completa hidrosolubilidad de los conjugados poliméricos vanadilo depende de dos parámetros importantes: una proporción considerablemente alta de meros PASP-MH y un contenido límite de oxovanadio(IV). La presencia de suficientes cadenas PASP-MH, además de cumplir por sí misma una función solubilizante, disminuye, por un factor estadístico y estérico, la posibilidad de multi-coordinación del catión vanadilo por grupos carboxilato de una misma o distintas cadenas, lo que al introducir rigidez y entrecruzamiento perjudica la solubilidad. Un contenido del metal por encima de cierto límite, genera demasiadas zonas neutras en el conjugado, que a su vez reduce su solubilidad en medio acuoso.
15. Este trabajo constituye un valioso aporte al, hasta la fecha, incipiente desarrollo de complejos poliméricos de oxovanadio(IV), ya que se ha logrado obtener un conjugado que reúne las características deseables para ser

evaluado como potencial agente terapéutico, en particular antitumoral. El conjugado vanadilo sintetizado posee un peso molecular adecuado (40 kDa) que aseguraría un suficiente tiempo de permanencia en el sistema circulatorio, una alta hidrosolubilidad que permitiría su rápida distribución en el organismo y un contenido relativamente alto del agente activo que incrementaría su eventual actividad terapéutica.



8. Recomendaciones

1. Se recomienda que, previamente a una evaluación de su actividad antitumoral frente a líneas celulares de los tipos cáncer más comunes, se realicen pruebas de liberación controlada del agente activo oxovanadio(IV) a condiciones fisiológicas (pH y temperatura) que se asemejen a las que el conjugado sería sometido en el estómago, intestino y sangre.
2. Se propone evaluar la hidrosolubilidad de conjugados poliméricos PASP-DC-MC-MH-VO empleando macromoléculas con una mayor proporción teórica de meros PASP-MH (60 %) que los analizados para esta investigación. Un mayor número de cadenas hidroxiladas podría permitir elevar significativamente el contenido del agente activo sin desmedro en la solubilidad en medio acuoso del complejo.



9. Bibliografía

- 1- Organización Mundial de la Salud. Cáncer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> (visitado el 10 de setiembre del 2016).
- 2- American Cancer Society. How Chemotherapy Drugs Work. <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/chemotherapy/how-chemotherapy-drugs-work> (visitado el 6 de octubre del 2016).
- 3- Mjos. D. K, Orvig. C. Metallo Drugs in Medicinal Inorganic Chemistry. *Chem. Rev.* **2014**, 114, 4540-4563.
- 4- Alvino, N; Galli, R.C; et Al. Diseño de Agentes Antidiabéticos de Vanadio: Desarrollo y Avances recientes. Revista de Química. Departamento de Ciencias, Pontificia Universidad Católica del Perú, **2007**, XXI, 37-48.
- 5- Neuse, E.W. Synthetic Polymers as Drug-Delivery Vehicles in Medicine. *Met Based Drugs*, **2008**, 1-19.
- 6- Merkle, H. Drug delivery's quest for polymers: Where are the frontiers?. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, 97, 293-303.
- 7- Yoshikawa, Y.; Sakurai, H; et. al. Amelioration of Hyperglycemia and Metabolic Syndromes in Type 2 Diabetic KKAy Mice by Poly(γ -glutamic acid) oxovanadium(IV) Complex, *Chem. Med. Chem*, **2007**, 2, 1607-1612.
- 8- Yoshikawa, Y.; Sakurai, H; et. al. Vanadyl-poly(γ -glutamic acid) complexes as oral therapeutics agents for the treatment of type 1 like diabetic mice. *Afr. J. Pharm. Pharmacol*, **2010**, Vol. 4(5), 235-243.
- 9- Zhang, H; Yi, Y; et Al. Hypoglycemic Properties of Oxovanadium (IV) Coordination Compounds with Carboxymethyl-Chitosan and Carboxymethyl-Carrageenan in Alloxan-Induced Diabetic Mice, *Evid Based Complement Alternat Med*, **2011**, Article ID: 691067, 7 pages.
- 10- Zegarra, Carmen. "Síntesis de un nuevo vehículo polimérico alfa,beta-poli(D,L-ácido aspártico) del agente activo antidiabético oxovanadio (IV)". Tesis para optar el grado de Magíster en Química. Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima (Perú) **2012**.
- 11- Murga, C. "Síntesis y Caracterización de un Novedoso Conjugado Poliaspartamida - Oxovanadio (IV) como Potencial Metalofármaco

- Insulino – Mimético*". Tesis para optar por el grado de Licenciado en Química. Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima (Perú) **2013**.
- 12- Medical News Today. Crosta, P. Cancer: Facts, Causes, Symptoms and Research. <http://www.medicalnewstoday.com/info/cancer-oncology/> (visitado el 10 de setiembre del 2016).
 - 13- El Comercio. El cáncer mata a unos 25 mil peruanos al año. <http://elcomercio.pe/sociedad/lima/cancer-mata-25-mil-peruanos-al-ano-noticia-1776612> (visitado el 10 de setiembre del 2016).
 - 14- RPP. Registran 45 mil nuevos casos de cáncer al año en Perú [en línea]. http://www.rpp.com.pe/2013-08-13-registran-45-mil-nuevos-casos-de-cancer-al-ano-en-peru-noticia_621747.html (visitado el 10 de setiembre del 2016).
 - 15- Cancer Research UK. Cancer Incidence Worldwide. <http://www.thecancerian.org/wp-content/uploads/2013/07/Cancer-Incidence-worldmap.jpg> (visitado el 10 de setiembre del 2016).
 - 16- American Cancer Society. Early History of Cancer. <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/thehistoryofcancer/the-history-of-cancer-what-is-cancer> (visitado el 11 de setiembre del 2016)
 - 17- Medicals News Today. What is cáncer? What causes cancer. <http://www.medicalnewstoday.com/info/cancer-oncology/> (visitado 10 de setiembre del 2016).
 - 18- U.S. National Library of Medicine. How do cancer cells grow and spread?. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0072594/> (visitado el 11 de setiembre del 2016)
 - 19- Martin TA, Ye L, Sanders AJ, et al. Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; **2000-2013**.
 - 20- National Cancer Institute. Cancer treatment. <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/surgery> (visitado el 11 de setiembre del 2016).
 - 21- Komeda, S. Casini, A. Next-Generation Anticancer Metallodrugs. *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, 12, 219-235.
 - 22- Sakurai, H. Overview and Frontier for the Development of Metallopharmaceutics. *J. Health. Sci.* **2010**, 56, 129-143

- 23- Rehder, D. The potentiality of vanadium in medicinal applications. *Future Med. chem.* **2012**, 14, 1823-1837.
- 24- Korbecki, J. Baranowska-Bosiacka, et al. Biochemical and medical importance of vanadium compounds. *ACTA. ABP.* **2012**, 59, 195-200.
- 25- Sakurai, H. Yoshikawa, Y, et al. Current state for the development of metallopharmaceutics and anti-diabetic metal complexes. *Chem. Soc. Rev.* **2008**. 37, 2383-2392.
- 26- Pessoa, J. Thirty years through vanadium chemistry. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.03.004>.
- 27- Bishayee, A. Waghray, A, et al. Vanadium in the detection, prevention and treatment of cancer: the *in vivo* evidence. *Cancer. Let.* **2010**. 294, 1-12.
- 28- Evangelou, A.M. Vanadium in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol*, **2002**, 42, 249 – 265.
- 29- Barcelous, D.G. Vanadium. *J Toxicol Clin Toxicol*, **1999**, 37, 265 – 278.
- 30- Thompson, H, K. Lichter, J, et al. Vanadium treatment of type 2 diabetes: A view to the future. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, 103, 554-558.
- 31- Kieler, J.; Gromek, A.; et, al. Studies on the antineoplastic effect of vanadium salts. *Acta Chir. Scand.* **1965**, 343, 154 – 164.
- 32- Thompson, H.J.; Chasten, N.D, et, al. Dietary vanadyl (IV) sulfate inhibits chemical-induced mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **1984**, 5, 849 – 851.
- 33- Abudalleh, A.; Zhivkova, T, Et, al. Effect of ammonium vanadate on viability and proliferation of human and animal tumor and non-tumor cells. *J. Biosic. Biotech*, **2012**, 25 – 29.
- 34- Benítez, J.; Becco, L.;et, al. Vanadium polypyridyl compounds as potential antiparistic and antitumoral agents: New achievements. *J. Inorg. Biochem*, **2011**, 105, 303 – 312.
- 35- Zhang, Y.; Wang, X.;et, al. Synthesis and *In Vitro* Antitumor Activity of Two Mixed-Ligand Oxovanadium (IV) Complexes of Schiff Base and Phenanthroline. *Bioinorg Chem and Appl*, **2013**, 14 pages.
- 36- León. E. I, Butenko. N, et. Al. Vanadium and cancer treatment: Antitumor mechanisms of three oxidovanadium (IV) complexes on human osteosarcoma cell line. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, 134, 106-117.

- 37- Kowol. R. C, Nagy, V, N, et al. Vanadium (IV/V) complexes of triapine and related thiosemicarbazones: Synthesis, solution equilibrium and bioactivity. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, 152, 62-73.
- 38- Morinville A, Maysinger D, et Al. From Vanadis to Atropos: vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signaling. *TIPS.* **1998**, 19, 452-460.
- 39- Jaspers. I, Samet. JM, et Al. Vanadium Induced kB dependent transcription depends upon peroxide-induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **2000**, 23, 95-102.
- 40- Sakurai H. Vanadium distribution in rats and DNA cleavage by vanadyl complex: Implication fir vanadium toxicity and biological effects. *Envir Health Perspect.* **1994**, 3, 35-36.
- 41- Altamirano-Lozano. M, Valverde. M, et Al. Reprotoxic and genotoxic studies of vanadium pentoxide (V_2O_5) in male mice. II. Effects in several mouse tissues. *Teratog Carcinog Mutagen.* **1999**, 19, 243-245.
- 42- Rojas. E, Valverde. M, et Al. Genotoxicity of vanadium pentoxide evaluated by the single cell gel electrophore-Sis in human lymphocytes. *Mut Res.* **1996**, 359, 77-84.
- 43- Harding, M.M., Moksdi, G. Antitumor metallocenes: structure-activity studies and interactions with biomolecules. *Curr Med Chem.* **2000**, 7, 1289-1293.
- 44- Duncan, R; Vicent, M. Polymer therapeutics-prospects for 21st century: the end of the beginning. *Adv. Drug. Delic. Rev.* **2013**, 65, 60-70.
- 45- Duncan, R. The Dawning Era of Polymer Therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, **2003**, 2, 347 – 360.
- 46- Aderibigbe, B.A; Sinha Ray, S. Preparation , characterization and in vitro reléase kinetics of polyaspartamide-based conjugates containing antimalarial and anticancer agents for combination therapy. *J. Drug. Deliv. Sci. Technol*, **2016**, 36, 34-45.
- 47- Pang, X; Jiang, Y. pH-responsive polymer-drug conjugates: Design and progress. *J. Control. Release.* **2016**, 222, 116-129.
- 48- Fox, M.; Szoka, F.; Fréchet, J. Soluble Polymer Carriers for the Treatment of Cancer: The importance of Molecular Architecture. *Acc. Chem. Res.* **2009**, 42 (8), 1141 – 1151.

- 49- Komane, L.L.; Mukaya, E.H.; et Al. Macromolecular Antiproliferative Agents Featuring Dicarboxylato-Chelated Platinum. *J. Inorg. Organometal. Polym.* **2008**, 18, 111-123.
- 50- Duncan, R. Soluble Synthetic Polymers as Potencial Drug Carriers, *Advances in Polymer Science.* **1984**, 51-101.
- 51- Markovsky, E; Baabur-Cohen, H; et Al. Administration, distribution, metabolism and elimination of polymer therapeutics. *J. Control. Release*, **2012**, 161, 446-460.
- 52- Pang, X; Du, H; et Al. Polymer-drug conjugates: present state of play and future perspectives. *Drug. Discov. Today*, **2013**, 18, 1316-1322.
- 53- Xu, H; Ma, H; et Al. Targeted polymer-drug conjugates: Current progress and future perspective. *Colloids. Surf. B*, **2015**, 136, 729-734.
- 54- Duncan, R. Development of HPMA copolymer-anticancer conjugates: Clinical experience and lessons learnt. *Adv. Drug. Deliv. Rev*, **2009**, 61, 1131 – 1148.
- 55- Zhai, G; Zhai, Y; et Al. Polymer-drug conjugates: present state of play and future perspectives. *Drug. Discov. Today*, **2013**, 18, 1316-1322.
- 56- Neuse, E.W.; Ntshengedzeni, M.; et Al. Synthesis and preliminary *in vitro* evaluation of polymeric dicarboxylato- and dihydroxilato platinum (II) chelates as antiproliferative agents. *Polym. Adv. Technol*, **2002**, 13, 884 – 895.
- 57- Caldwell, G.; Neuse, E.W; et Al. Cytotoxic Activity of Two Polyaspartamide based Monoamineplatinum (II) Conjugates Against the HeLa Cancer Cell Line. *Appl. Organometal. Chem.* **1999**, 13, 189 – 194.
- 58- H.S, Oberoi; et Al. Nanocarriers for delivery of platinum anticancer drugs. *Adv. Drug. Deliv. Rev*, **2013**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.09.014>.
- 59- Callari, M; et Al. Polymers with platinum drugs and other macromolecular metal complexes for cáncer treatment. *Prog Polym Sci*, **2014**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.05.002> .
- 60- Baran, E. Spectroscopic Investigation of the VO₂⁺/Chitosan Interaction, *Carbohydr polym*, **2008**, 74 (3), 704 – 706.
- 61- Williams, P.A.M.; Baran E. Spectroscopic Investigation of the VO₂⁺/hyaluronate interaction. *Carbohydr polym*, **2011**, 86, 1385 – 1388.

- 62- Baran, E. Oxovanadium(IV) complexes of carbohydrates: A brief overview, *J Inorg Biochem*, **2008**, 103, 547-553.
- 63- Kawashima. S, Murata. Y, et. Al. The controlled release of insulin-mimetic metal ions by the multifunction of chitosan, *J Inorg Biochem*, **2005**, 99, 1329-1334.
- 64- Kremer, L; McLeod, A; et Al. Vanadium (V) and (IV) complexes of anionic polysaccharides: Controlled release pharmaceutical formulations and models of vanadium biotransformation products, *J Inorg Biochem*, **2015**, 147, 227-234.
- 65- Farias, A; Cadena, S; et Al. "Complex xyloglucan vanadium decreases the cell proliferation and alters the oxidative metabolism of cells B16F10 in vitro". *38th European Society For clinical Nutrition And Metabolism Congress*. Copenhagen (Dinamarca), 17-20 de setiembre del **2016**.
- 66- Hunter, W.L.; Burt, H.M; et. al. A polymer-based drug delivery system for the antineoplastic agent bis(maltolato)oxovanadium in mice. *Br J Cancer*, **1997**, 75, 1014 – 1020.
- 67- Proyecto DGI 2010-0071, Síntesis y caracterización de alfa, beta-poli(D, L-ácido aspártico) como nuevo vehículo polimérico para complejación, transporte e ingreso intracelular más efectivo del agente antidiabético oxovanadio(IV).
- 68- Proyecto DGI 2010-0205, Síntesis y caracterización de un novedoso conjugado poliaspartamida-vanadato para un transporte eficiente y liberación controlada del metalofármaco insulino-mimético oxovanadio(IV).
- 69- Trouet, A.; Masquelier M.; et Al. Covalent linkage between daunorubicin and proteins that is stable in serum and reversible by lysosomal hydrolases, as required for a lysosomotropic drug-carrier conjugate: In vitro and in vivo studies, *Proc. Natl. Acad. Sci*, **1982**, 79, 626-629.
- 70- Yan, G; Li, Z; et Al. Porphyrin-containing polyaspartamide gadolinium complexes as potential magnetic resonance imaging contrast agents, *Int J Pharm*, **2011**, 407, 119-125.
- 71- Neri, P; Antoni, G. Alpha, Beta-Poly(2-Hydroxyethyl)-DL-Aspartamide, *Macromolecular Synthesis*, **1982**, 8, 25-28.

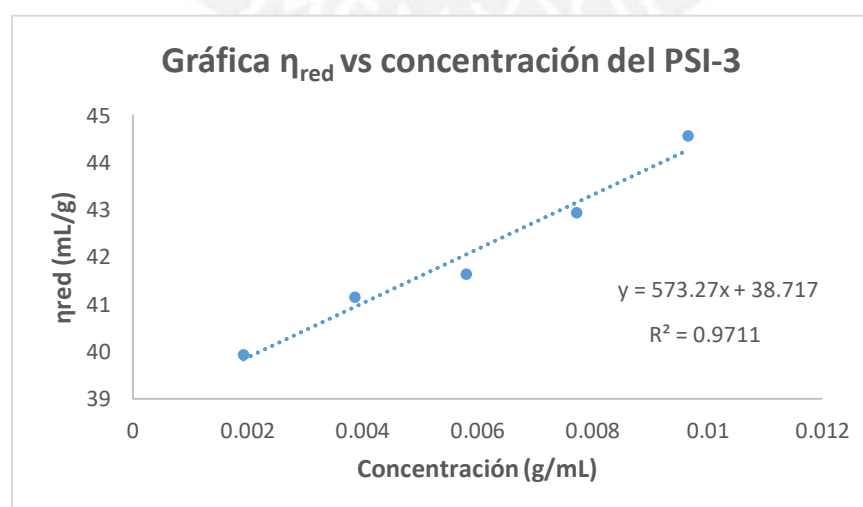
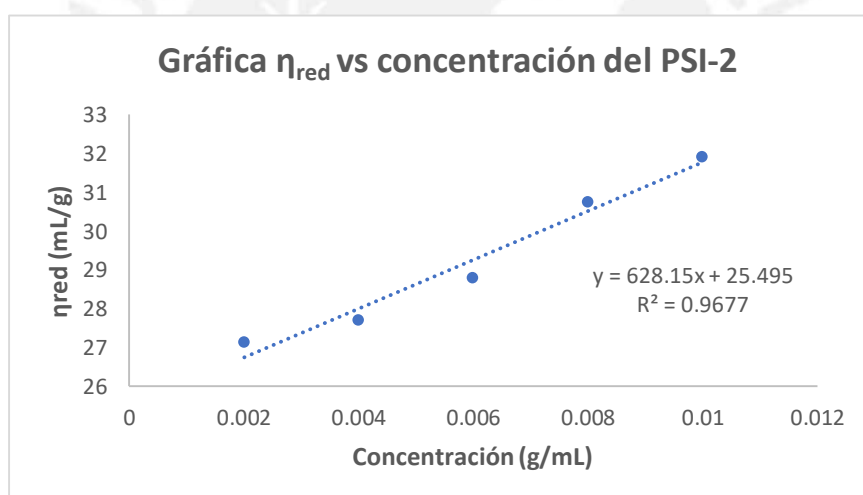
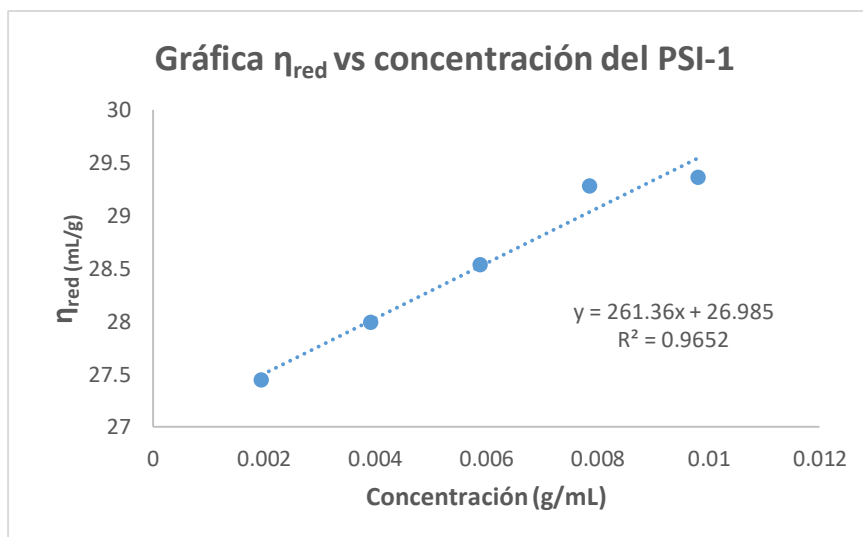
- 72- Neri, P; Antoni, G. Alpha, Beta-Poly(2-Hydroxyethyl)-DL-Aspartamide, A New Plasma Expander, *J Med Chem*, **1973**, 16, (8), 893-897.
- 73- Odian, G.; Principles of Polymerization. Wiley–Interscience. Fourth Edition, Staten Island, New York, **2004**, 22.
- 74- Vlasák, J.; Rypáček, F.; et Al. Properties and Reactivity of Polysuccinimide. *J Polym Sci A Polym Chem*, **1979**, 66, 59-64.
- 75- Caliceti, P; Quarta, S.M; et Al. Synthesis and biopharmaceutical characterization of new poly(hydroxyethylaspartamide) copolymers as drug carriers. *Biochim Biophys Acta*, **2001**, 1528, 177-186.
- 76- Schmitt, S.; Neuse, E. W.; et Al. Water-soluble polyamides as potential drug carriers, III. Relative main-chain stabilities of side chain-functionalized aspartamide polymers on aqueous-phase dialysis, *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, **1991**, 192 (3300), 35 -50.
- 77- Machado, M. De L.; Neuse, E. W.; et Al. Water-soluble polyamides as potential drug carriers, V. Carboxy-functionalized polyaspartamides and copolyaspartamides, *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, **1992**, 195 (3347), 35-56.
- 78- Karmaker, S.; Saha, T.; Yoshikawa, et Al. A novel drug delivery system for type 1 diabetes: Insulin-mimetic vanadyl-poly(γ -glutamic acid) complex. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **2006**, 100, 1535-1546.
- 79- Neuse, E. W; Perlwitz, A. Amine-Functionalized, Water-Soluble Polyamides as Drug Carriers, *Water-soluble Polymers*, 1991, 394-403.
- 80- Matsubara, K.; Nakato, T.; et Al. ^1H and ^{13}C NMR Characterization of Poly(succinimide) prepared by Thermal Polycondensation of L-Aspartic Acid. *Macromolecules*, **1997**, 30, 2395-2312.
- 81- Potts, P. J; West, M; et Al. Quantification and Correction Procedures. En “*Portable X-ray Fluorescence Spectrometry, Capabilities for In Situ Analysis*”; RSC Publishing: Cambridge, Reino Unido; **2008**; 14.
- 82- Cuenca Salas, L. Complejos de oxovanadio (IV) con arilhidrazinas y aroilhidrazonas. Tesis para optar el grado de Doctor en Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, **1994**.
- 83- Ballhausen, C.J.; Gray, Harry B. The Electronic Structure of the Vanadyl, *Ion. Inorganic Chemistry*. 1, 111-122, **1962**.

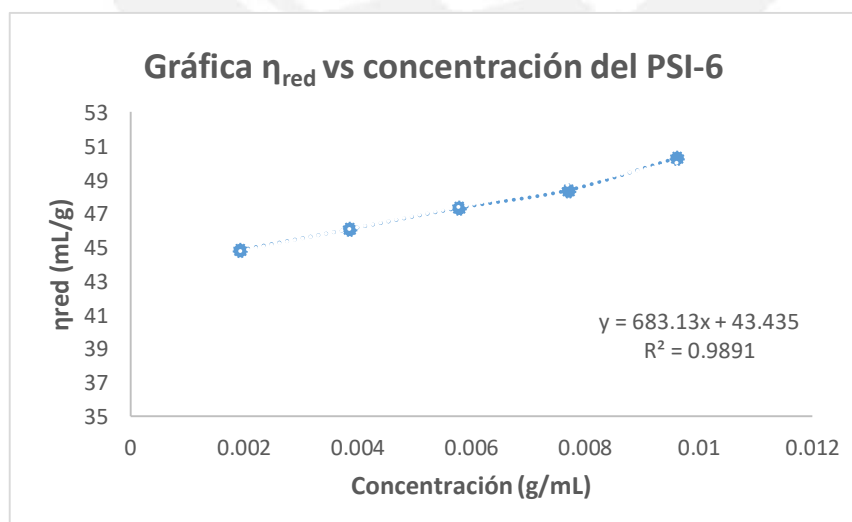
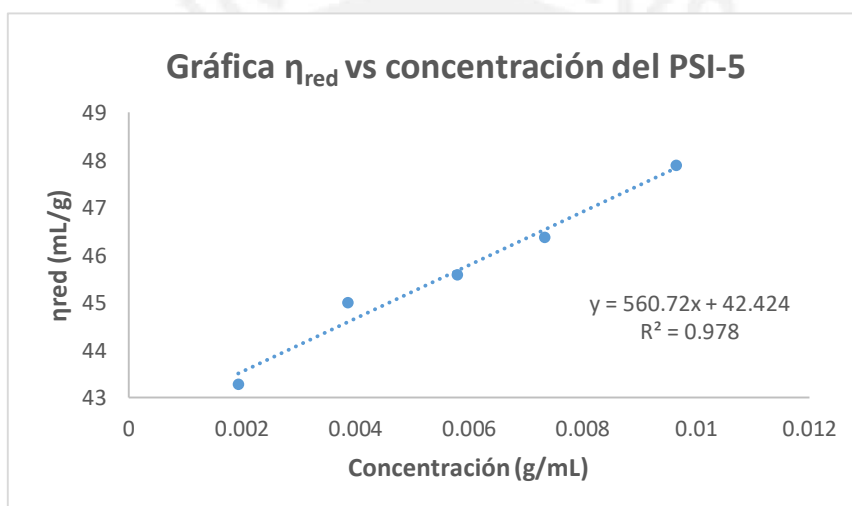
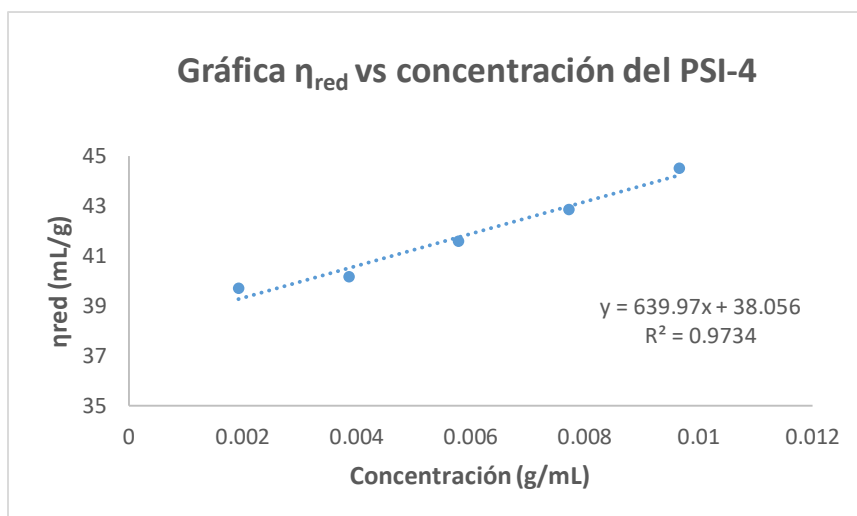
- 84- Deacon, G; Phillips, R. Relationships between the Carbo-Oxygen Stretching Frequencies of Carboxylato Complexes and the Type of Carboxylate Coordination. *Coordination Chemistry Reviews*. 33, 227-250, **1980**.

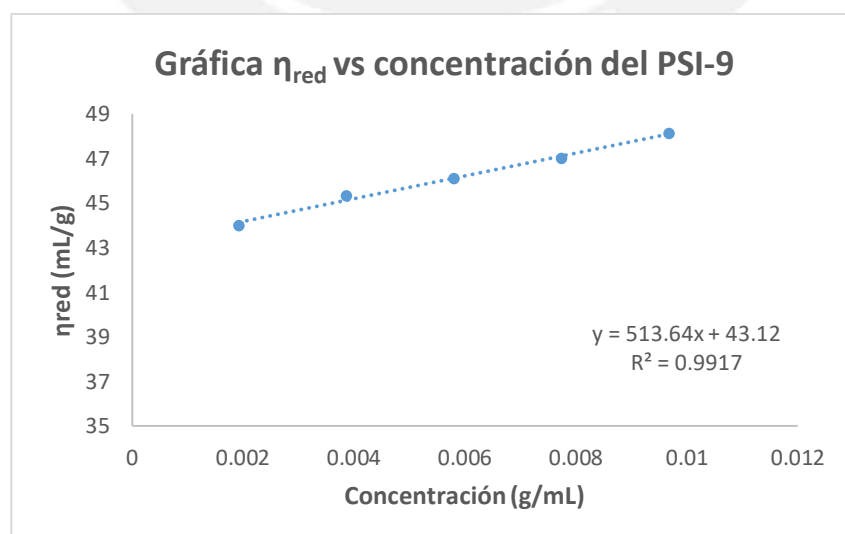
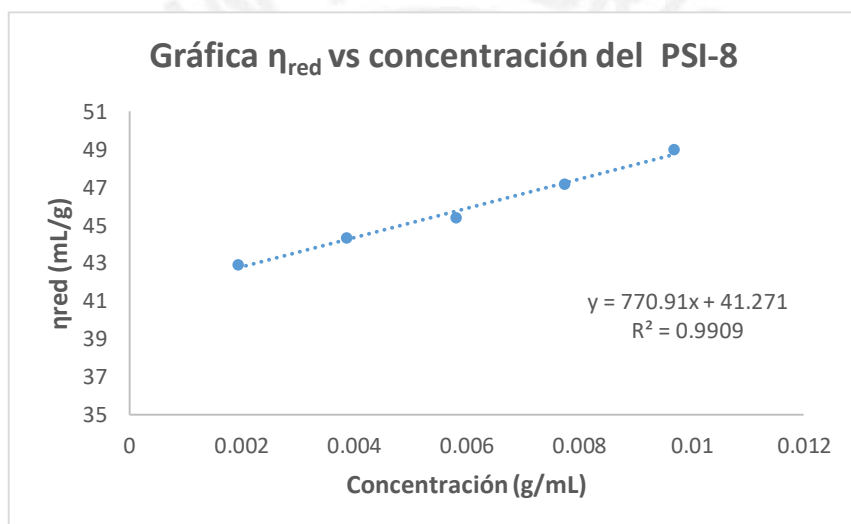
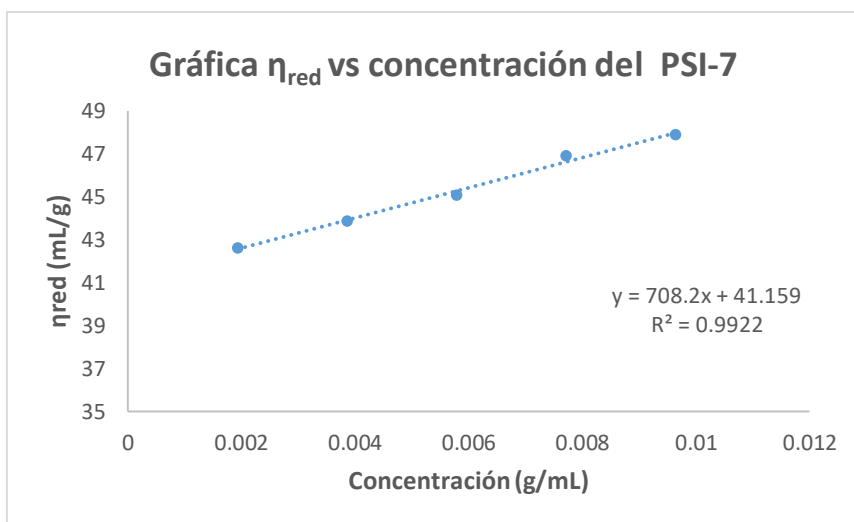


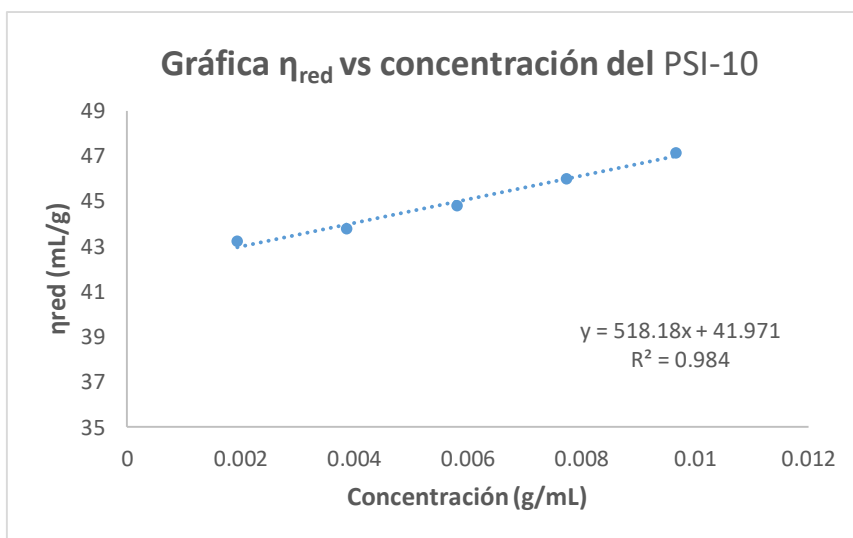
10. Anexos

10.1. Gráficas de η_{red} vs concentración de las polisuccinimidas sintetizadas

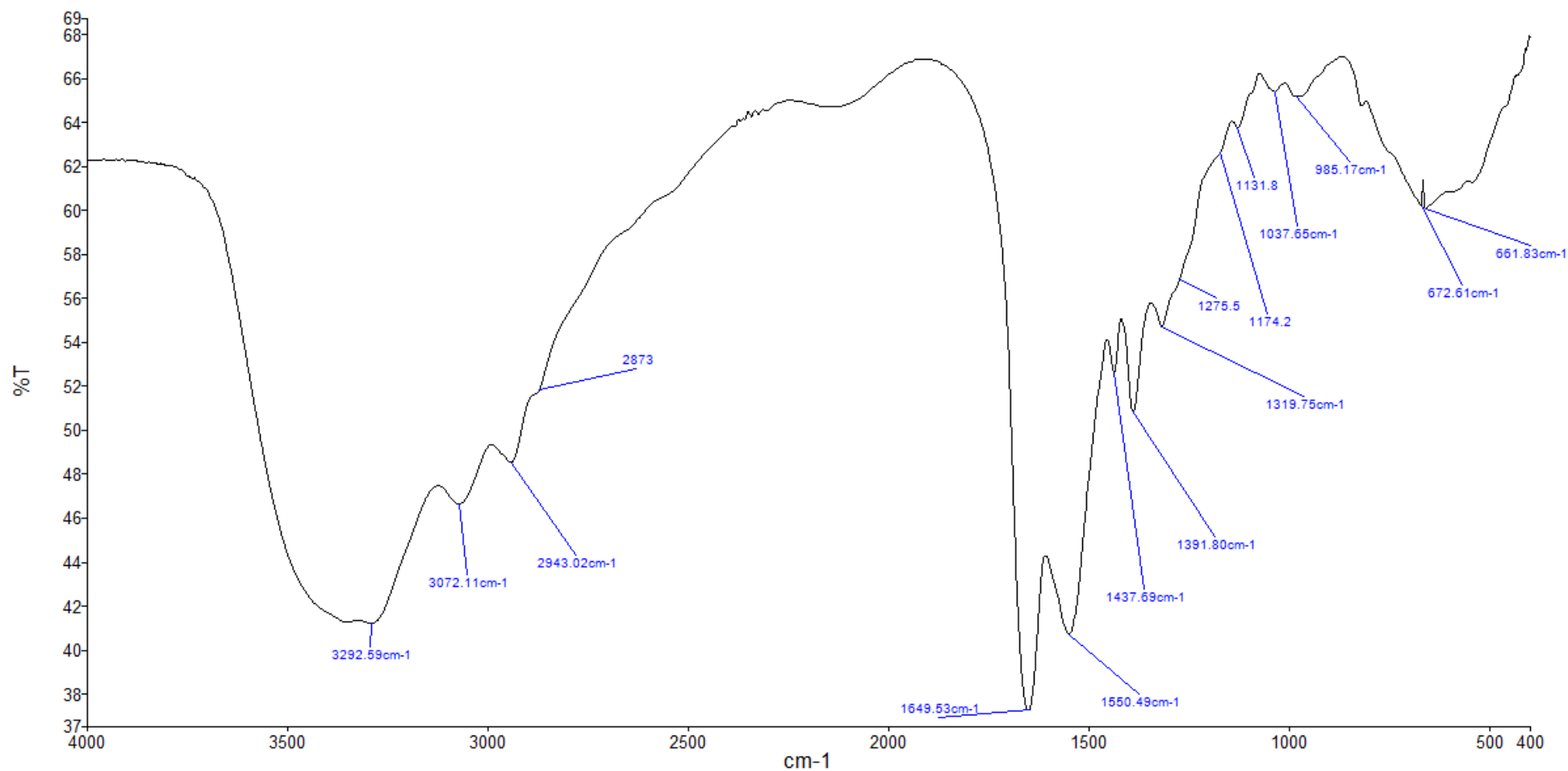




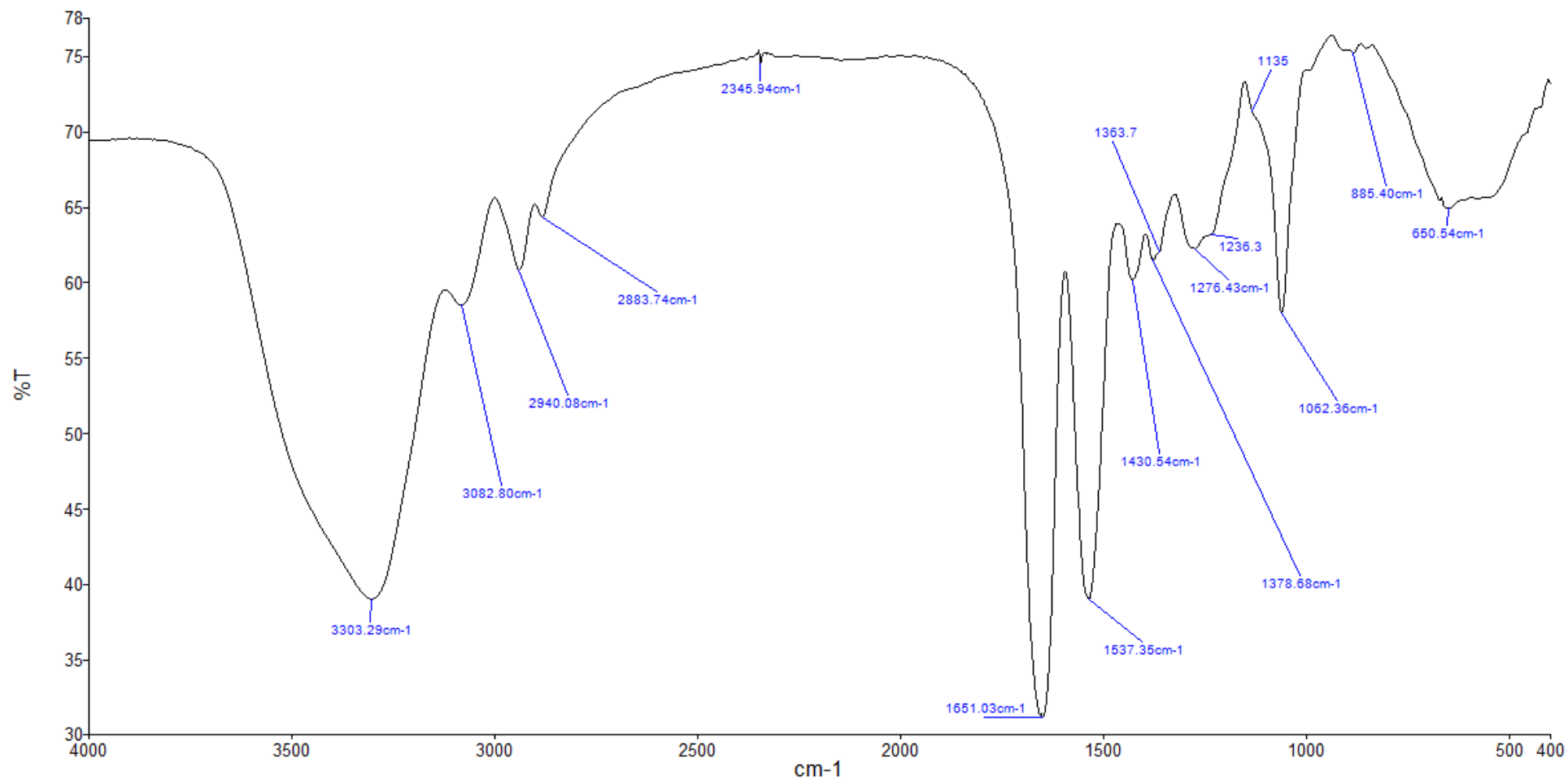




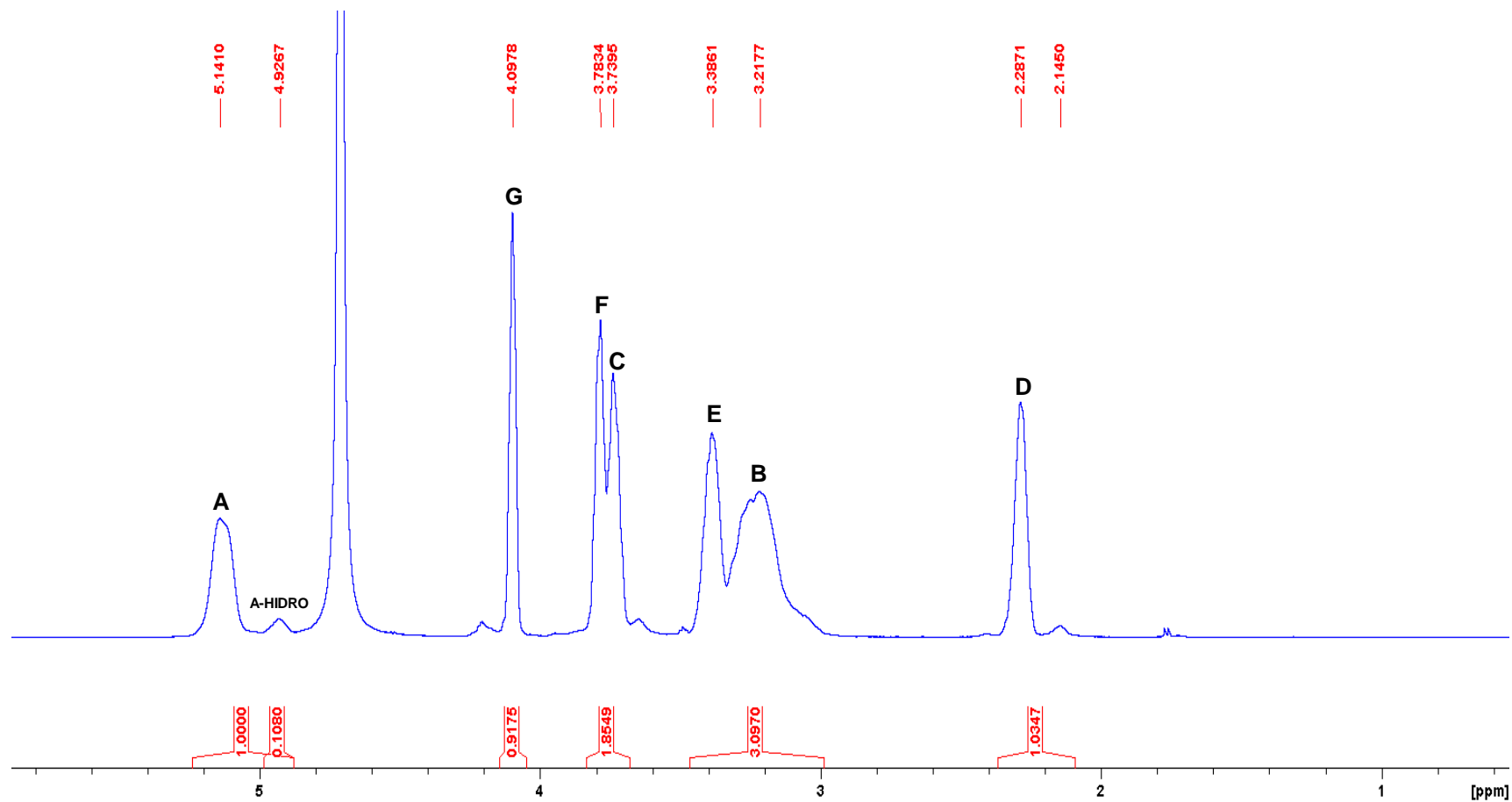
10.2. Espectro IR del PASP-MA-1 en KBr



10.3. Espectro IR del PASP-MH-1 en KBr



10.4. Cálculo de proporción de cadenas laterales en el PASP-MA-MH



Espectro ^1H -RMN del PASP-MA-MH-21 a 75 °C

Para calcular las proporciones es necesario tomar en cuenta que se trabaja con un copolímero formado por 3 tipos de secciones poliméricas distintas: PASP-MA, PASP-MH y PASP-HIDRO. Las 3 fracciones poseen una característica en común, la presencia de los hidrógenos A y B. De esta manera, la suma de la integración de cada fracción (tomada para un solo hidrógeno) debería de sumar lo más cercano a 1:

Integraciones:

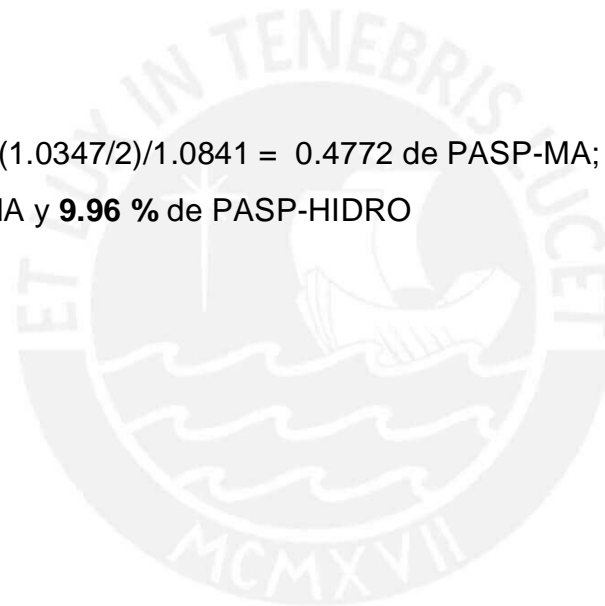
“A” de PASP-HIDRO: 0.1080 ; “A” de PASP-MH: 0.9175/2 ; “A” de PASP-MA: 1.0347/2

$$0.1080 + 0.9175/2 + 1.0347/2 = 1.0841$$

Proporción:

$(0.9175/2)/1.0841 = 0.4232$ de PASP-MH; $(1.0347/2)/1.0841 = 0.4772$ de PASP-MA; $0.108/1.0841 = 0.0996$ de PASP-HIDRO

42,32 % de PASP-MH, **47.72 %** de PASP-MA y **9.96 %** de PASP-HIDRO



10.5. Cálculo del peso molecular del PASP-MA-MH

Para obtener el peso molecular promedio de un copolímero es necesario conocer el peso molecular de cada sección polimérica de la macromolécula y la proporción teórica de las secciones que lo conforman.

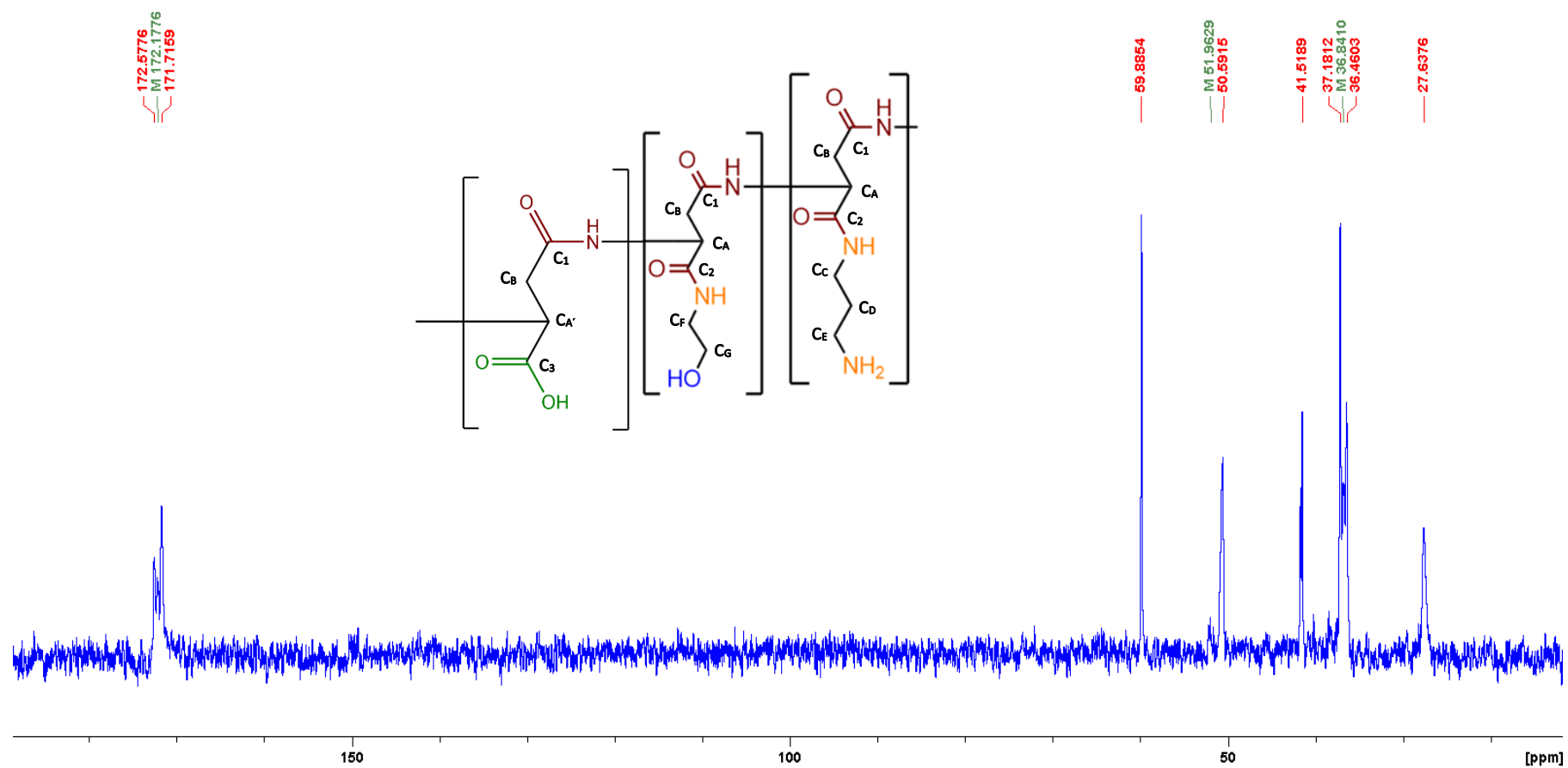
Para el caso del **PASP-MA-MH-21**:

42,32 % de PASP-MH, **47,72 %** de PASP-MA y **9,96 %** de PASP-HIDRO

PASP-MH: 158 g/mol PASP-MA: 171 g/mol PASP-HIDRO: 115 g/mol

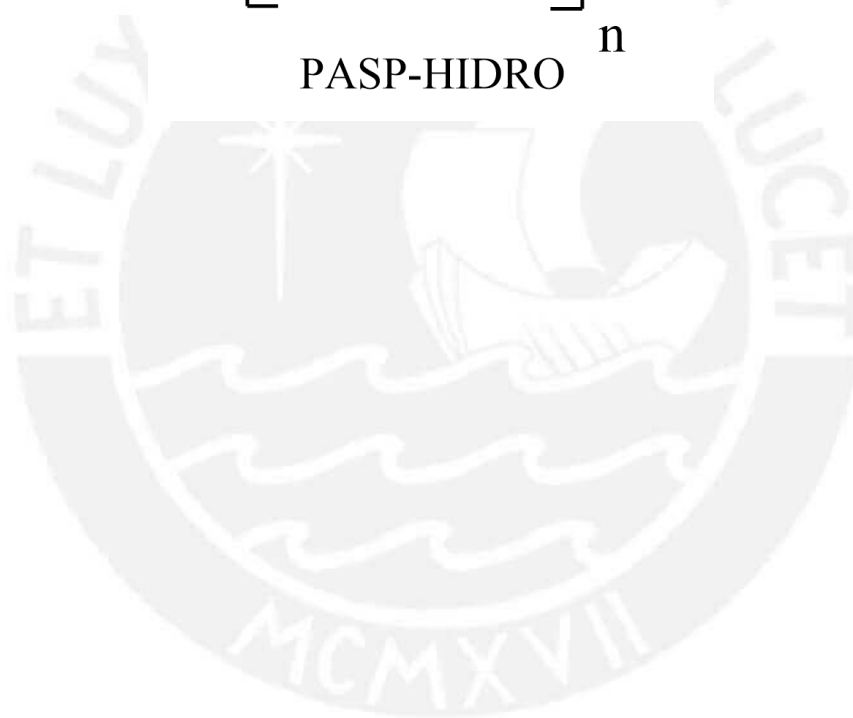
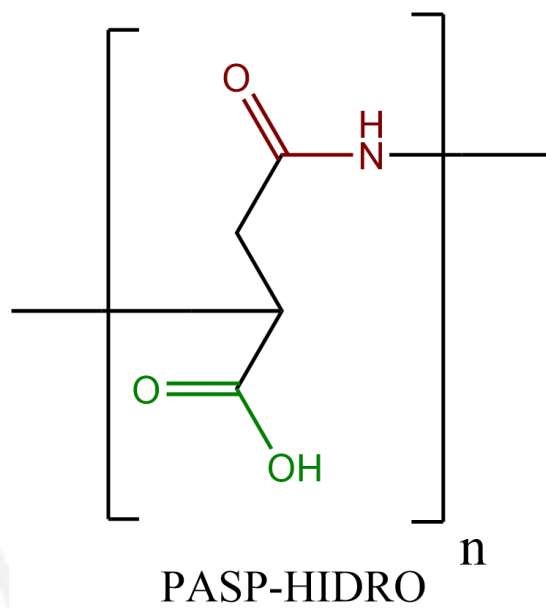
$$PM_{PASP-MA-MH-56} = \frac{\left(42.32 \% * 158 \frac{g}{mol} + 47.72 \% * 171 \frac{g}{mol} + 9.96 \% * 115 \frac{g}{mol}\right)}{100} = 159.92 \frac{g}{mol} \text{ de mero promedio}$$

10.6. Espectro ^{13}C -RMN del PASP-MA-MH-21 en D_2O a 25°C y sus asignaciones

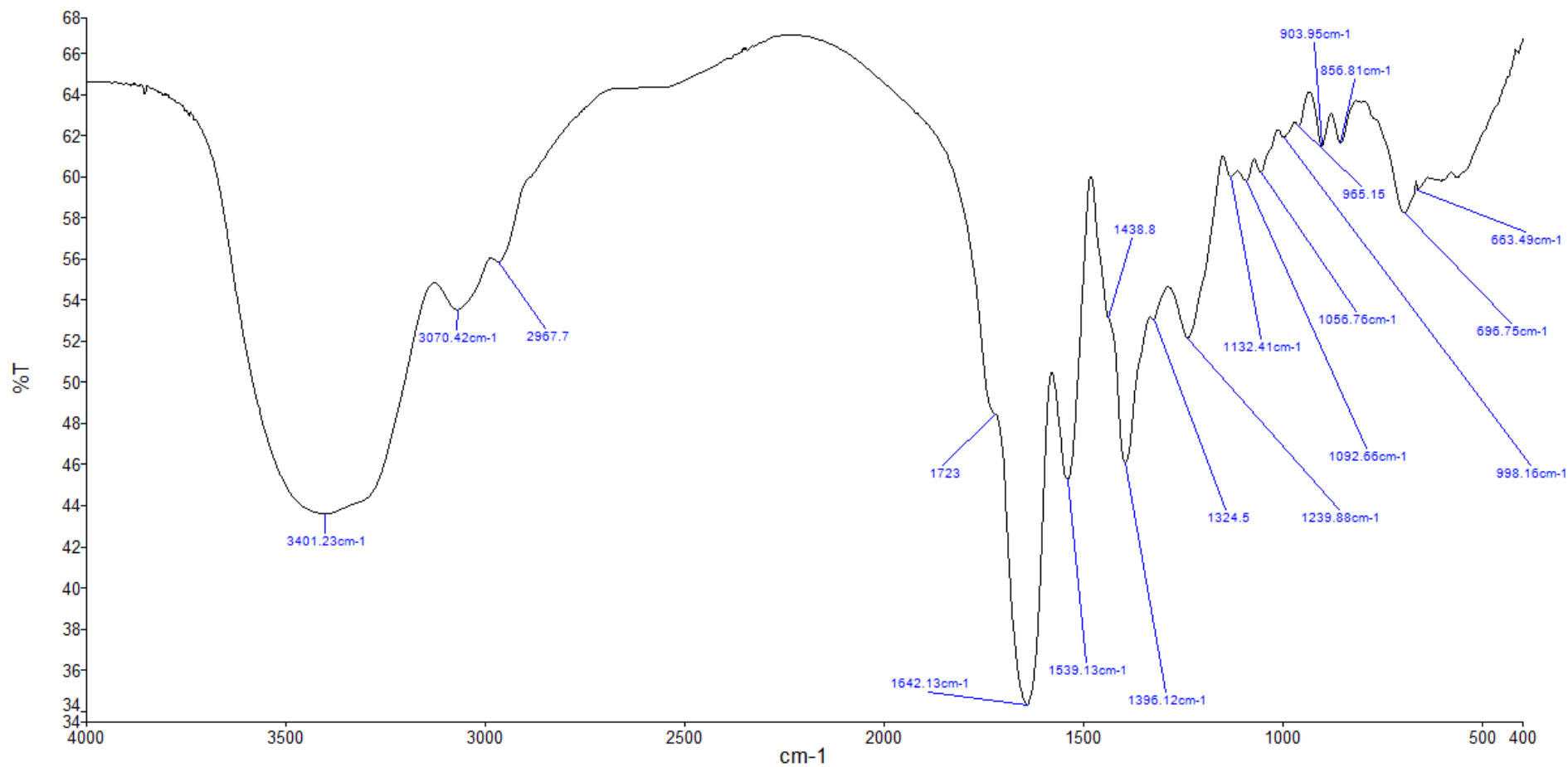


Asignación	Señal (ppm)
C ₁ , C ₂ , C ₃	171,72 – 172,58
C _A	50,59
C _A -hidro	51,96
C _B	36,84
C _c	36,46
C _D	27,64
C _E	37,18
C _F	41,52
C _G	59,89

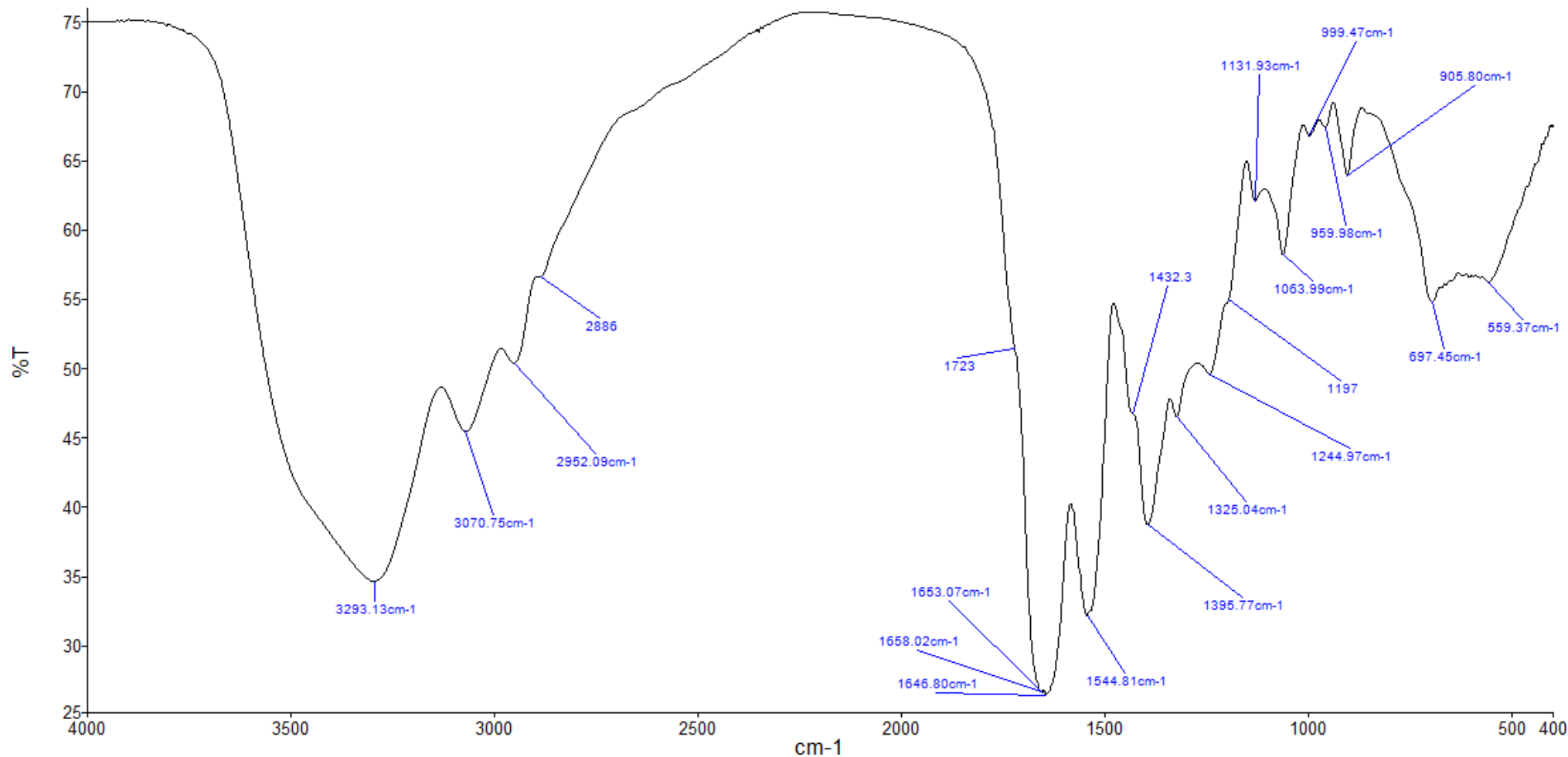
10.7. Estructura de la sección polimérica PASP-HIDRO



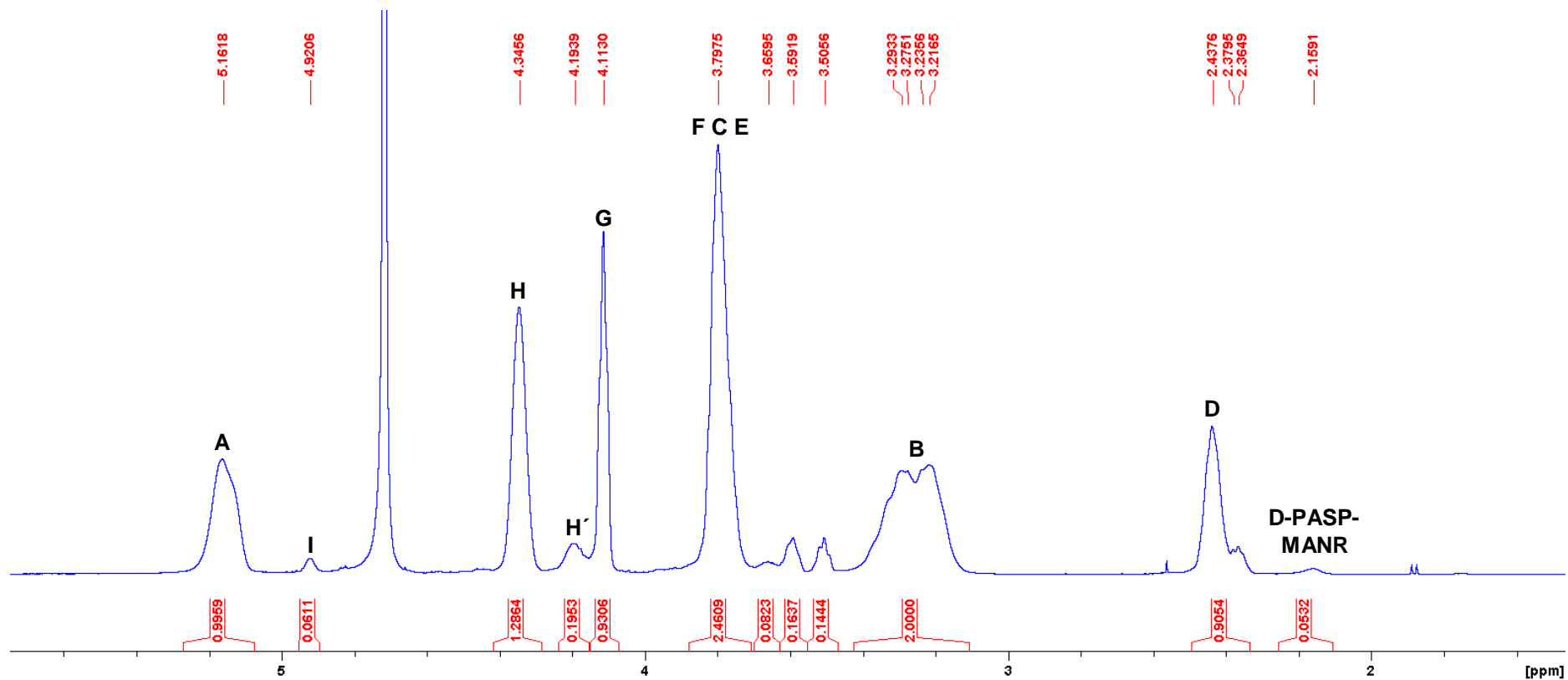
10.8. Espectro IR del PASP-DC-MC-1 en KBR



10.9. Espectro IR del PASP-DC-MC-MH-4 en KBr



10.10. Cálculo de proporción de cadenas laterales en el PASP-DC-MC-MH



Espectro ^1H -RMN del PASP-DC-MC-MH-6 a 75 °C

Para calcular las proporciones es necesario tomar en cuenta que se trabaja con un copolímero formado por 5 tipos de secciones poliméricas distintas: PASP-DC, PASP-MC, PASP-MH, PASP-MANR, PASP-HIDRO. Las 5 fracciones poseen una característica en

común, la presencia de los hidrógenos metileno B. De esta manera, la suma de la integración de cada fracción (tomada para dos hidrógeno) debería de sumar lo más cercano a 2. Para el PASP-DC-MC-MH-6 el cálculo sería:

Integraciones:

PASP-DC: $1.2864/2 = 0.6432$

PASP-MC: 0.1953

PASP-MA-NR: 0.0532

PASP-MH: 0.9306

PASP-HIDRO: $0.0775 * 2 = 0.155$ (Los hidrógenos de esta sección se encuentran traslapados con otras señales, por lo cual debe de emplearse la integración obtenida en el PASP-MA-MH-16)

Suma de integraciones de todas las secciones: 1.9773

Proporción de secciones poliméricas:

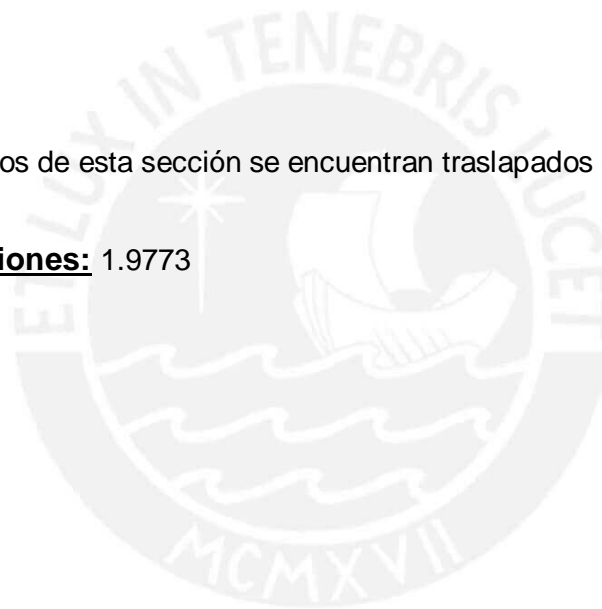
PASP-DC: $0.6432/1.9773 * 100\% = 32.53 \%$

PASP-MC: $0.1953/1.9773 * 100\% = 9.88 \%$

PASP-MANR: $0.0532/1.9973 * 100\% = 2.69 \%$

PASP-MH: $0.9306/1.9973 * 100\% = 47.06 \%$

PASP-HIDRO: $0.155/1.9973 * 100\% = 7.84 \%$



10.11. Cálculo del peso molecular del PASP-DC-MC-MH

Para obtener el peso molecular promedio de un copolímero es necesario conocer el peso molecular de cada sección polimérica de la macromolécula y la proporción teórica de las secciones que lo conforman:

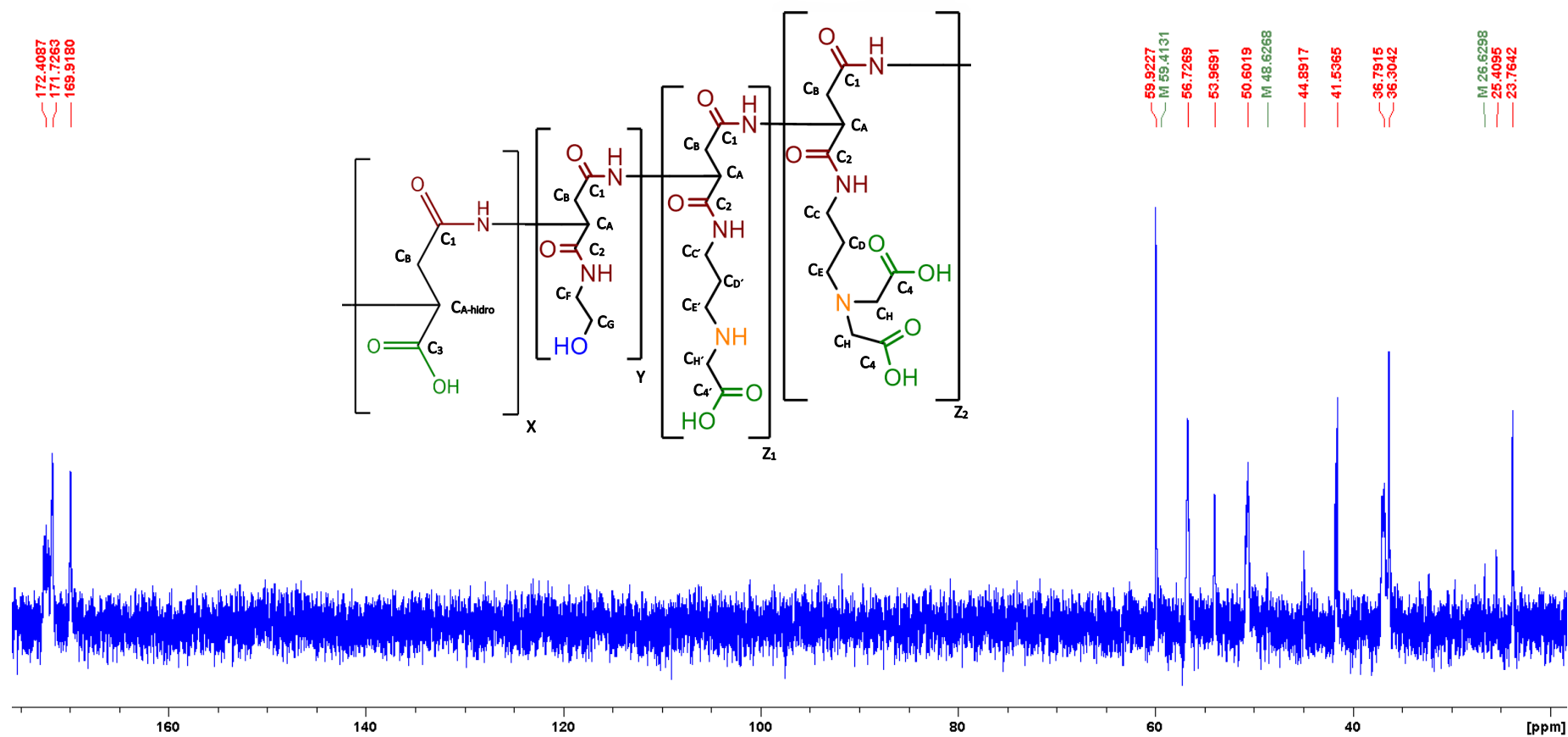
Para el caso del **PASP-DC-MC-MH-6**:

PASP-DC: **32.53%** ; PASP-MC: **9.88%** ; PASP-MANR: **2.69%** ; PASP-MH: **47.06 %**; PASP-HIDRO: **7.84 %**

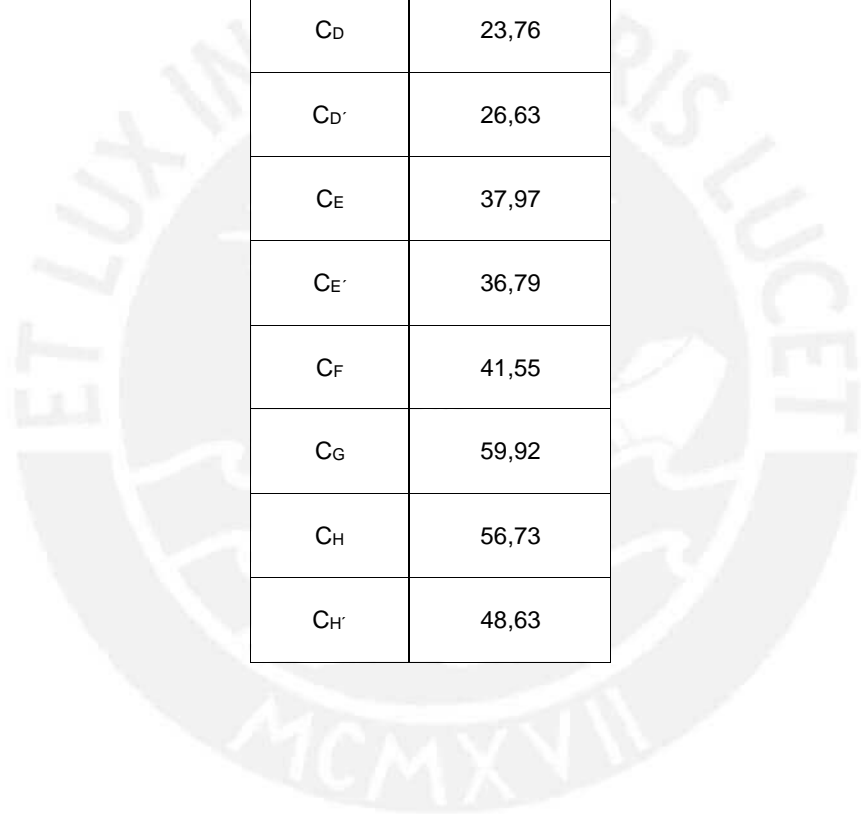
PASP-DC: 287 g/mol; PASP-MC: 229 g/mol; PASP-MANR: 171g/mol; PASP-MH: 158 g/mol; PASP-HIDRO: 115 g/mol

$$PM_{PASP-DC-MC-MH-14} = \frac{\left(32.53\% * 287 \frac{g}{mol} + 9.88\% * 229 \frac{g}{mol} + 2.69\% * 171 \frac{g}{mol} + 47.06\% * 158 \frac{g}{mol} + 7.84\% * 115 \frac{g}{mol}\right)}{100} = 203.96 \frac{g}{mol} \text{ de mero promedio}$$

10.12. Espectro ^{13}C -RMN del PASP-DC-MC-MH-6 en D_2O a 25°C y sus asignaciones

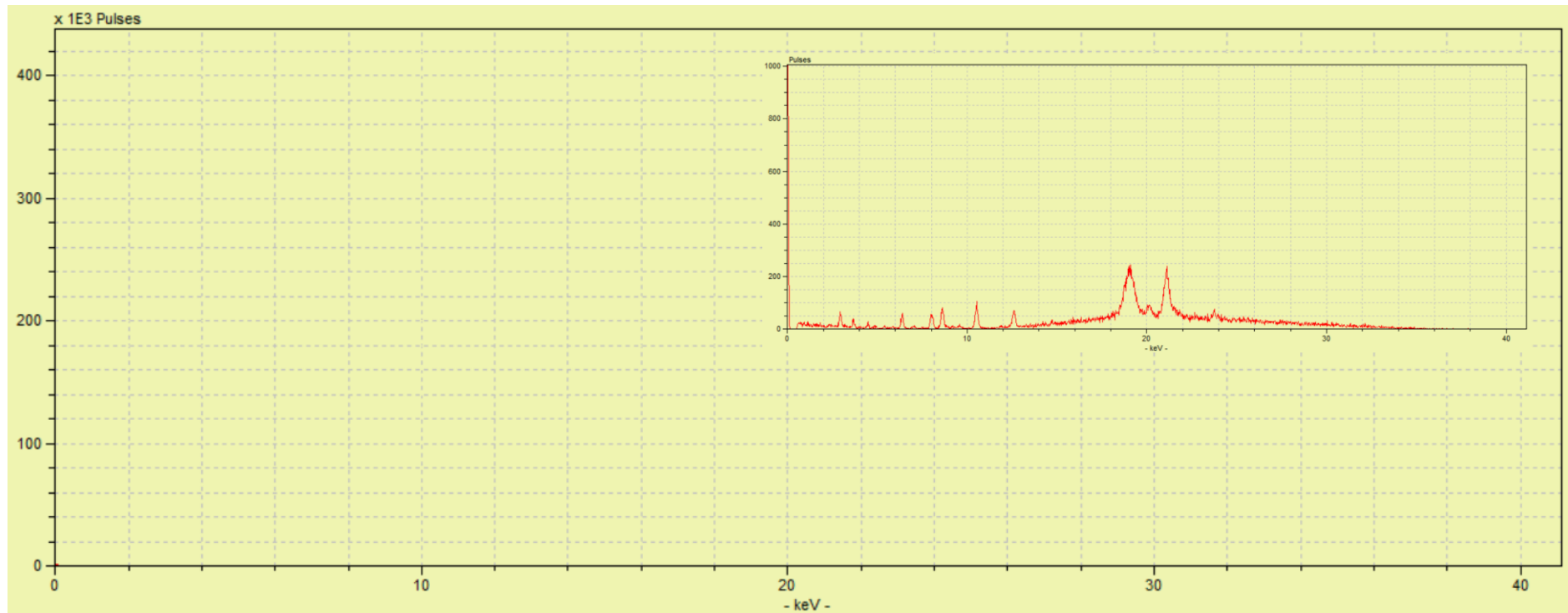


Asignación	Señal (ppm)
C ₁ , C ₂ , C ₃	171,73 – 172,41
C ₄ , C _{4'}	169,92
C _A , C _A -hidro	50,60
C _B	36,79
C _C , C _{C'}	36,30
C _D	23,76
C _{D'}	26,63
C _E	37,97
C _{E'}	36,79
C _F	41,55
C _G	59,92
C _H	56,73
C _{H'}	48,63



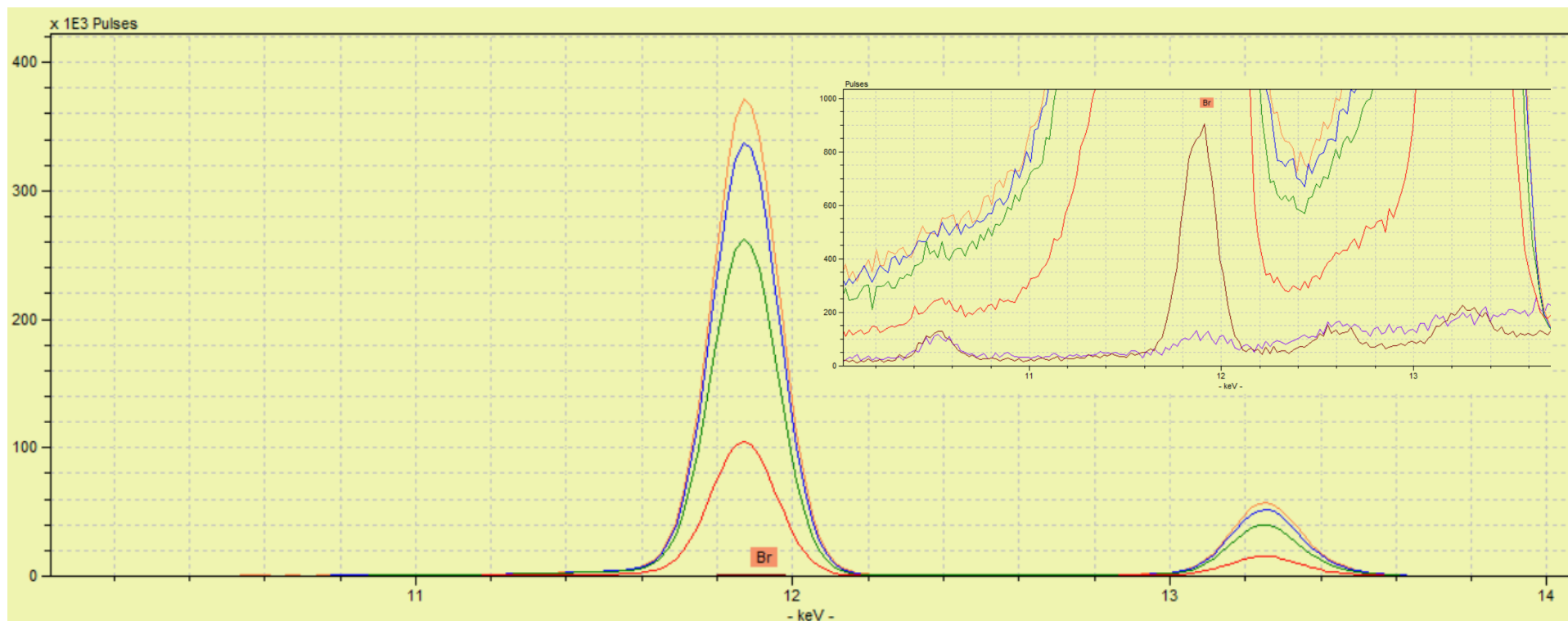
10.13. Espectros XRF obtenidos para la determinación cualitativa de Br en el PASP-DC-MC-MH-2







10.13.1. Espectro XRF de fondo del equipo



— : Línea de fondo del equipo

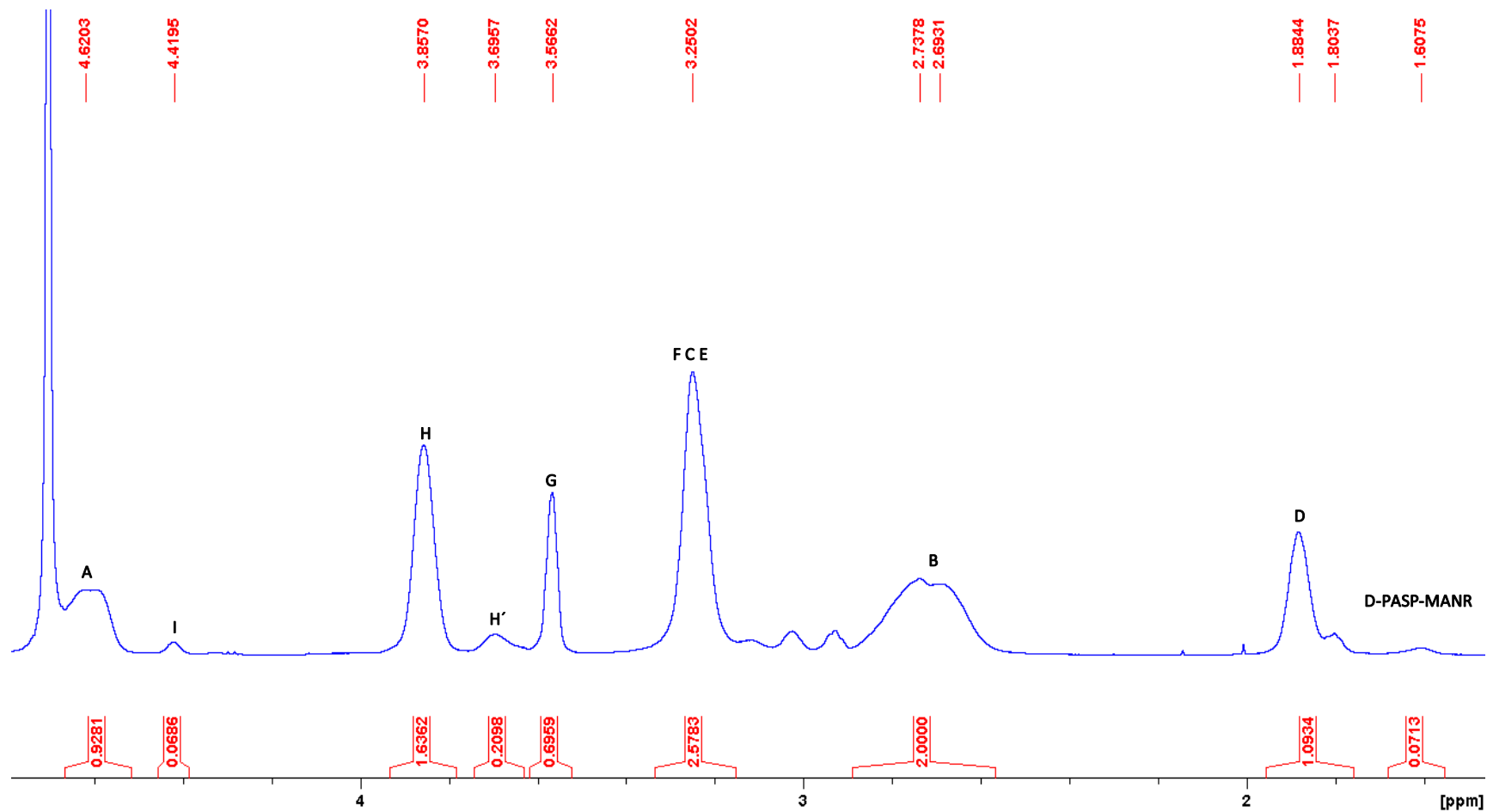
10.13.2. Espectro XRF del PASP-MA-MH-10 al 0, 1, 3, 8 y 10 % en peso de Br y del PASP-DC-MC-MH-2



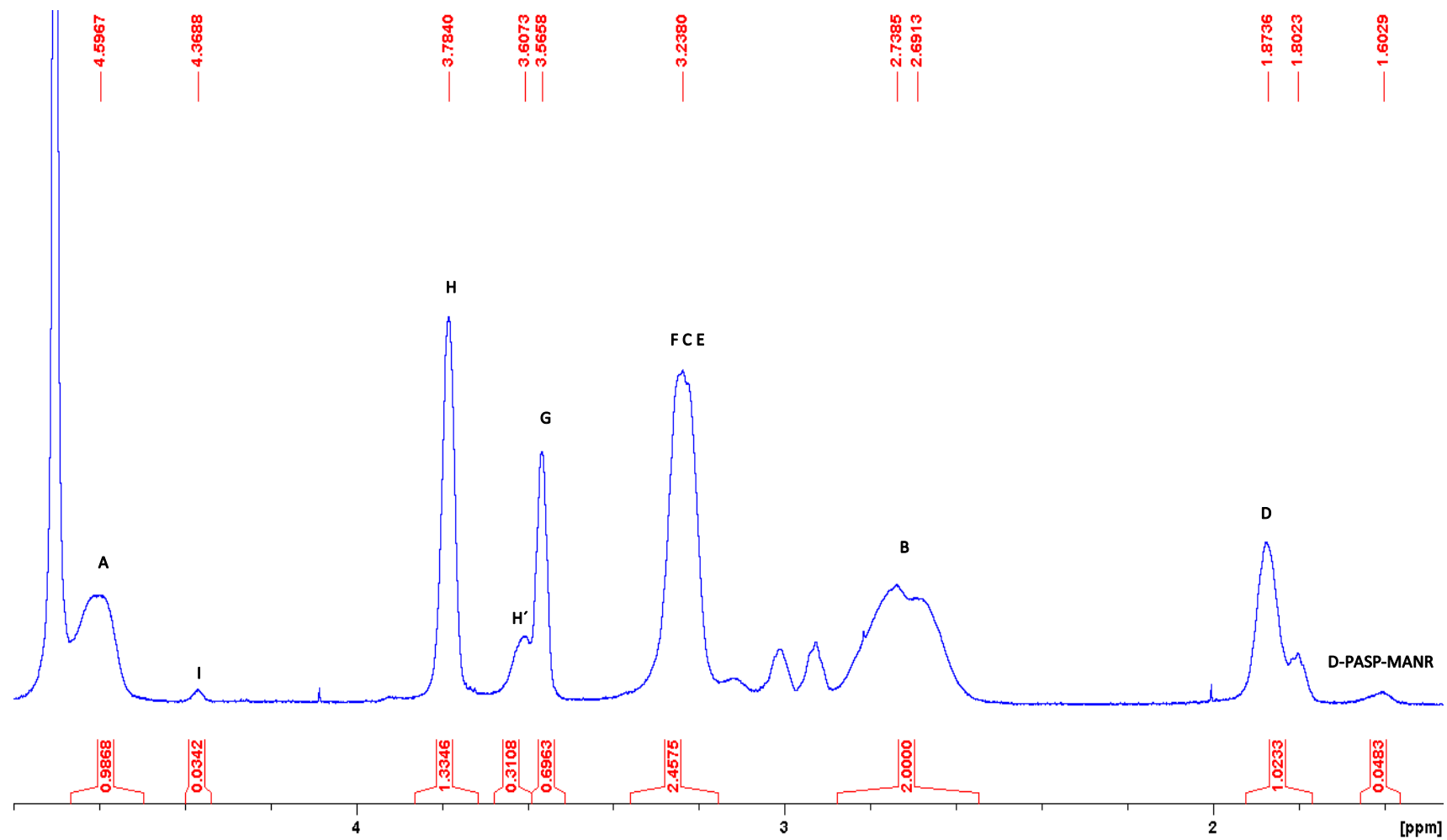
- | | | | |
|---|------------------------------|--|----------------------------|
|  | : PASP-MA-MH-10 al 0% de Br |  | :PASP-MA-MH-10 al 1% de Br |
|  | : PASP-MA-MH-10 al 3% de Br |  | :PASP-MA-MH-10 al 8% de Br |
|  | : PASP-MA-MH-10 al 10% de Br |  | :PASP-DC-MC-MH-2 |

10.14. Espectros ^1H -RMN a 25°C de los PASP-DC-MC-MH-3 al 7

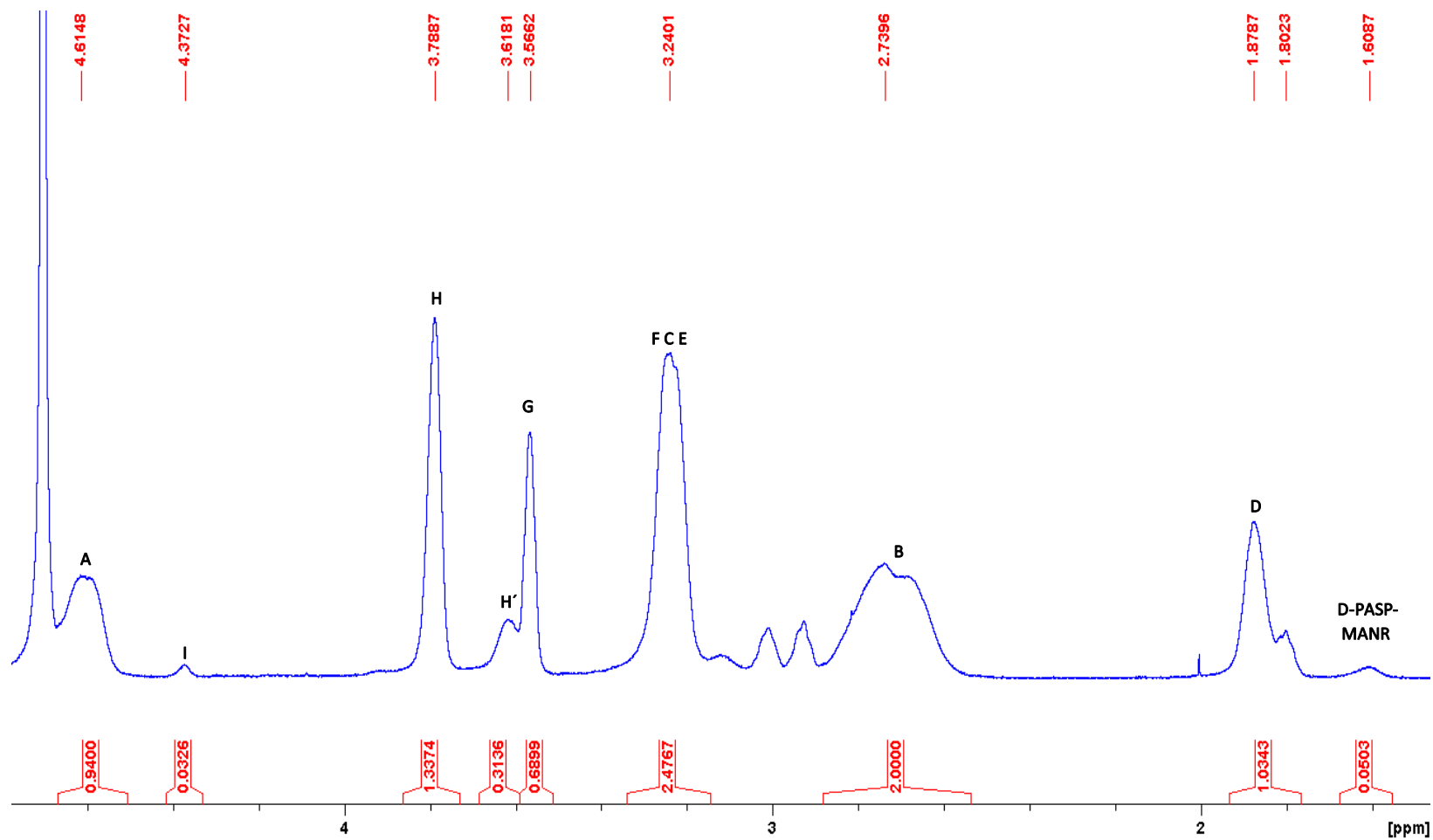
10.14.1. Espectro ^1H -RMN del PASP-DC-MC-MH-3 en D_2O a 25°C



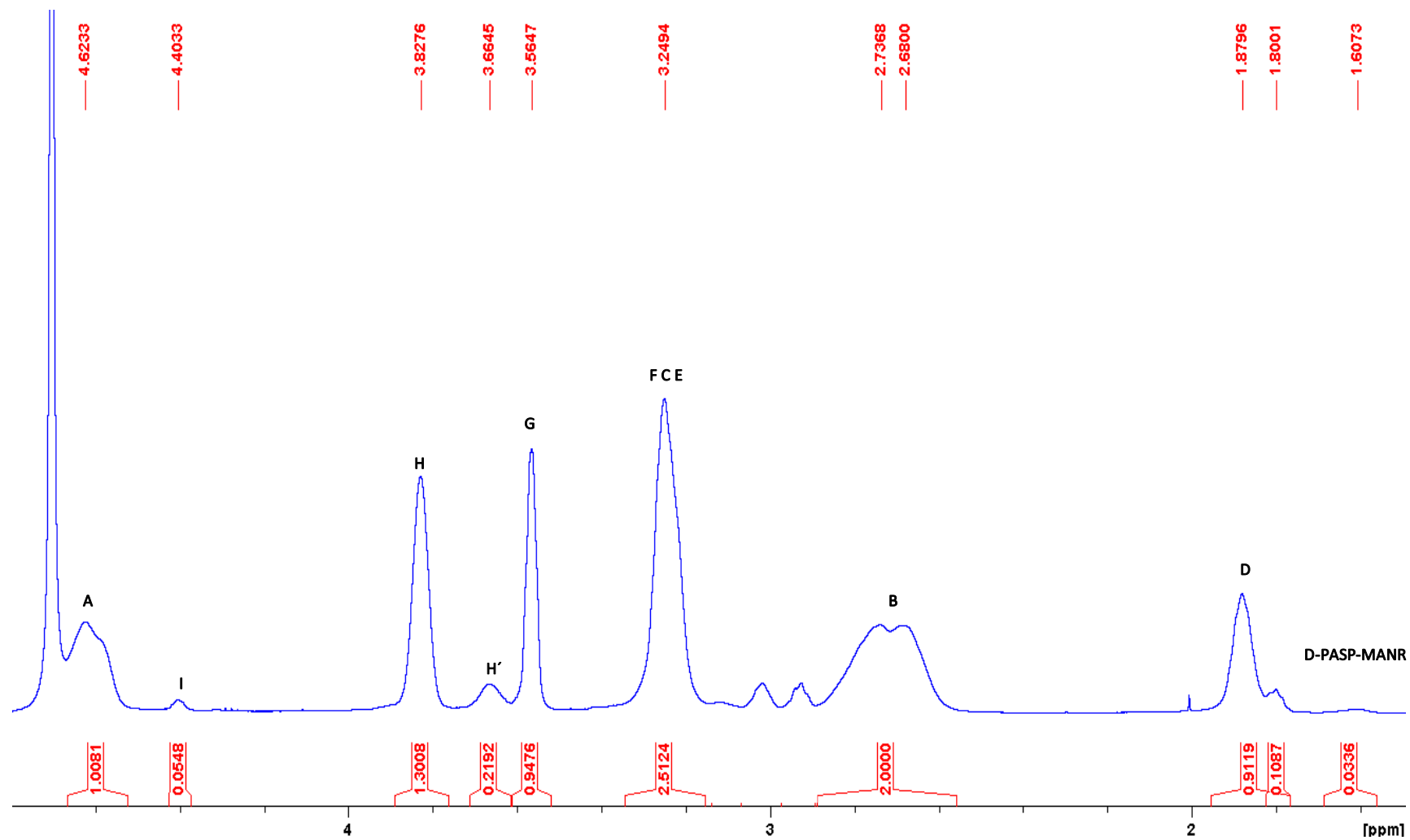
10.14.2. Espectro ^1H -RMN del PASP-DC-MC-MH-4 en D_2O a 25°C



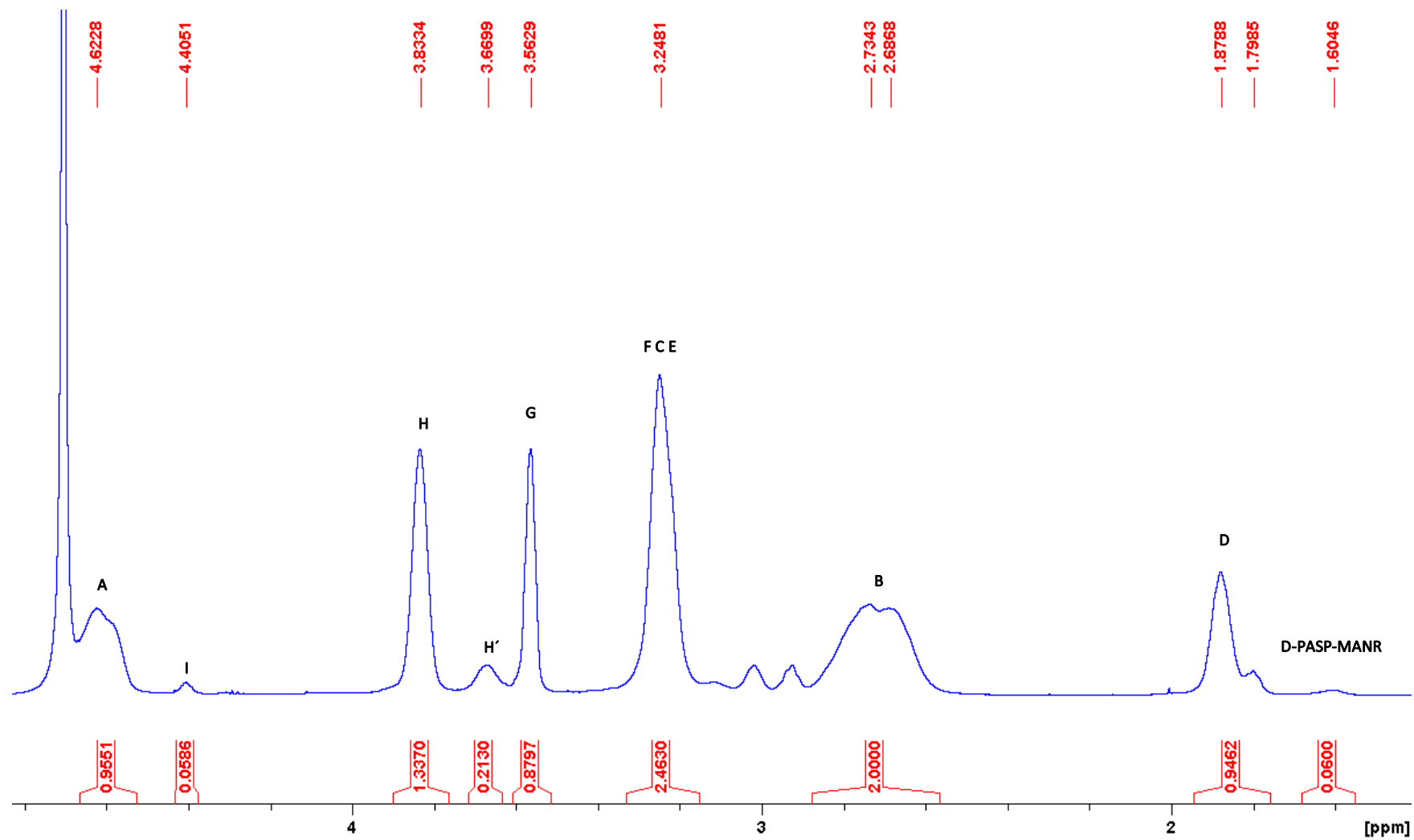
10.14.3. Espectro ^1H -RMN del PASP-DC-MC-MH-5 en D_2O a 25°C



10.14.4. Espectro ¹H-RMN del PASP-DC-MC-MH-6 en D₂O a 25°C

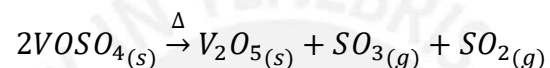
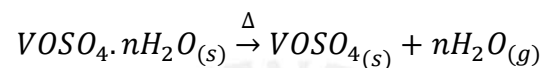


10.14.5. Espectro ¹H-RMN del PASP-DC-MC-MH-7 en D₂O a 25°C



10.15. Ejemplo del cálculo para la obtención del número de aguas de hidratación por cada mol de sulfato de vanadilo

El número de moles de aguas de hidratación en el reactivo sulfato de vanadilo se obtiene mediante calcinación de esta sal y oxidación del metal de +4 a +5 según las siguientes reacciones:



Entonces, para calcular el valor de 'n', se utiliza la siguiente fórmula:

$$masa(g)_{V_2O_5} * \frac{1mol_{V_2O_5}}{182(g)_{V_2O_5}} * \frac{2mol_V}{1mol_{V_2O_5}} * \frac{1mol_{VOSO_4 \cdot nH_2O}}{1mol_V} * \frac{(163 + 18n)g_{VOSO_4 \cdot nH_2O}}{1mol_{VOSO_4 \cdot nH_2O}} = masa(g)_{VOSO_4 \cdot nH_2O}$$

Donde la masa de V_2O_5 se obtiene de la calcinación y la masa de $VOSO_4 \cdot nH_2O$ es la pesada inicialmente.

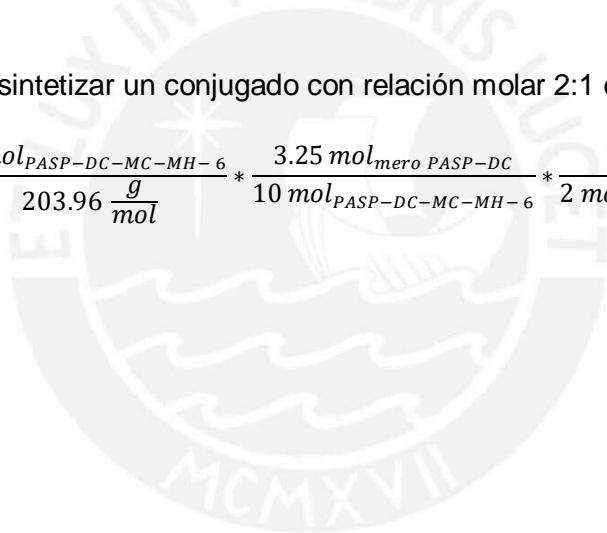
10.16. Ejemplo de cálculo de la masa de $VOSO_4 \cdot 3H_2O$ a utilizar en las síntesis de los complejos PASP-DC-MC-MH-VO

Para 12.5 mg del PASP-DC-MC-MH-6 y una relación molar 1:1 entre los meros di-carboximetilados del copolímero y el catión VO^{2+} , la cantidad de $VOSO_4 \cdot 3H_2O$ a utilizar en la síntesis sería de:

$$m_{VOSO_4 \cdot 3H_2O} = 0.0125 \text{ g}_{PASP-DC-MC-MH-6} * \frac{1 \text{ mol}_{PASP-DC-MC-MH-6}}{203.96 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} * \frac{3.25 \text{ mol}_{\text{mero PASP-DC}}}{10 \text{ mol}_{PASP-DC-MC-MH-6}} * \frac{1 \text{ mol}_{VO^{2+}}}{1 \text{ mol}_{\text{mero PASP-DC}}} ** \frac{1 \text{ mol}_{VOSO_4 \cdot 3H_2O}}{1 \text{ mol}_{VO^{2+}}} * \frac{216.94 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{1 \text{ mol}_{VOSO_4 \cdot 3H_2O}}$$

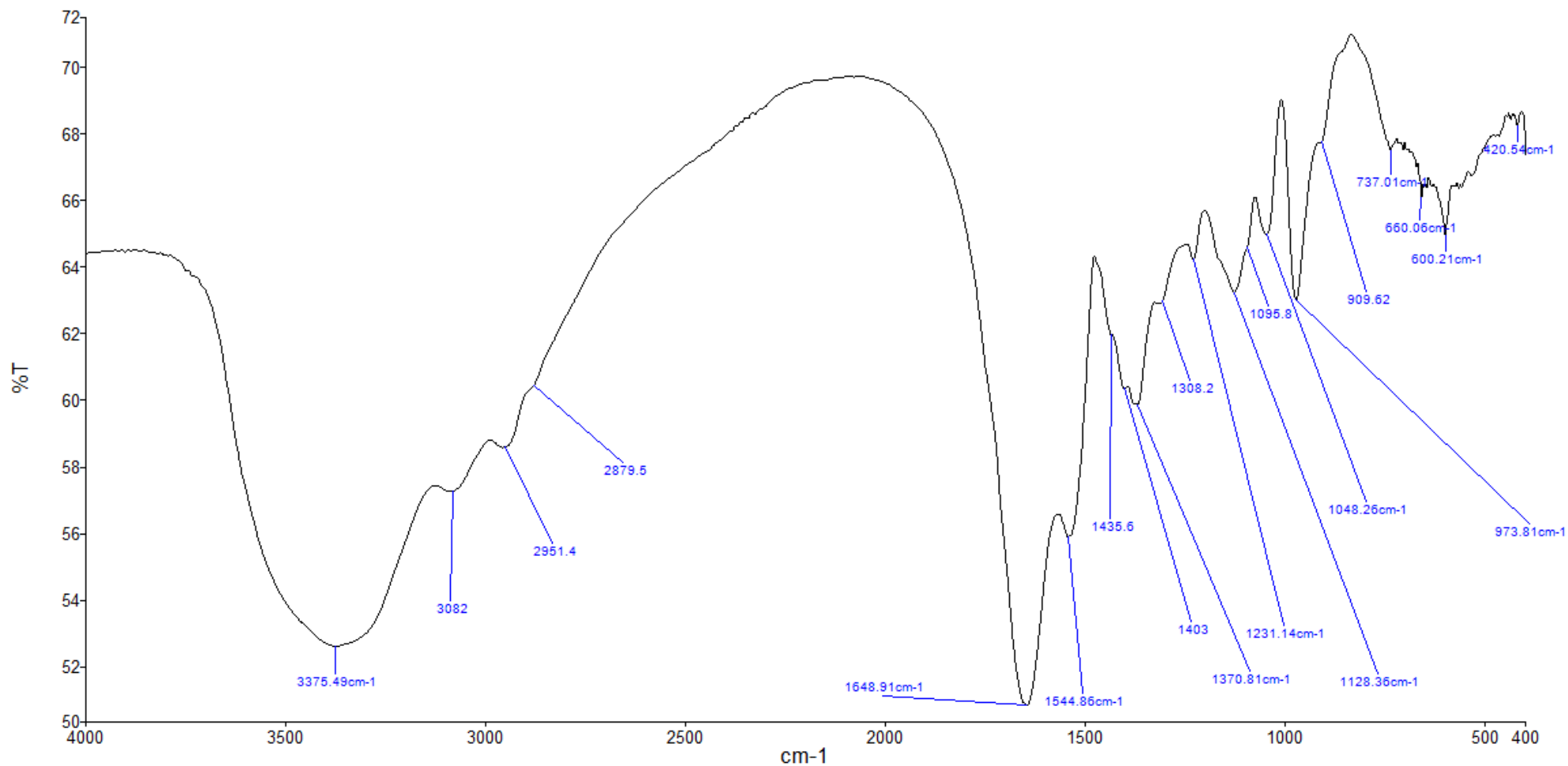
De la misma manera se trabajaría si se quisiera sintetizar un conjugado con relación molar 2:1 empleando 12.5 mg del PASP-DC-MC-MH-6

$$m_{VOSO_4 \cdot 3H_2O} = 0.0125 \text{ g}_{PASP-DC-MC-MH-6} * \frac{1 \text{ mol}_{PASP-DC-MC-MH-6}}{203.96 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} * \frac{3.25 \text{ mol}_{\text{mero PASP-DC}}}{10 \text{ mol}_{PASP-DC-MC-MH-6}} * \frac{1 \text{ mol}_{VO^{2+}}}{2 \text{ mol}_{\text{mero PASP-DC}}} ** \frac{1 \text{ mol}_{VOSO_4 \cdot 3H_2O}}{1 \text{ mol}_{VO^{2+}}} * \frac{216.94 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{1 \text{ mol}_{VOSO_4 \cdot 3H_2O}}$$

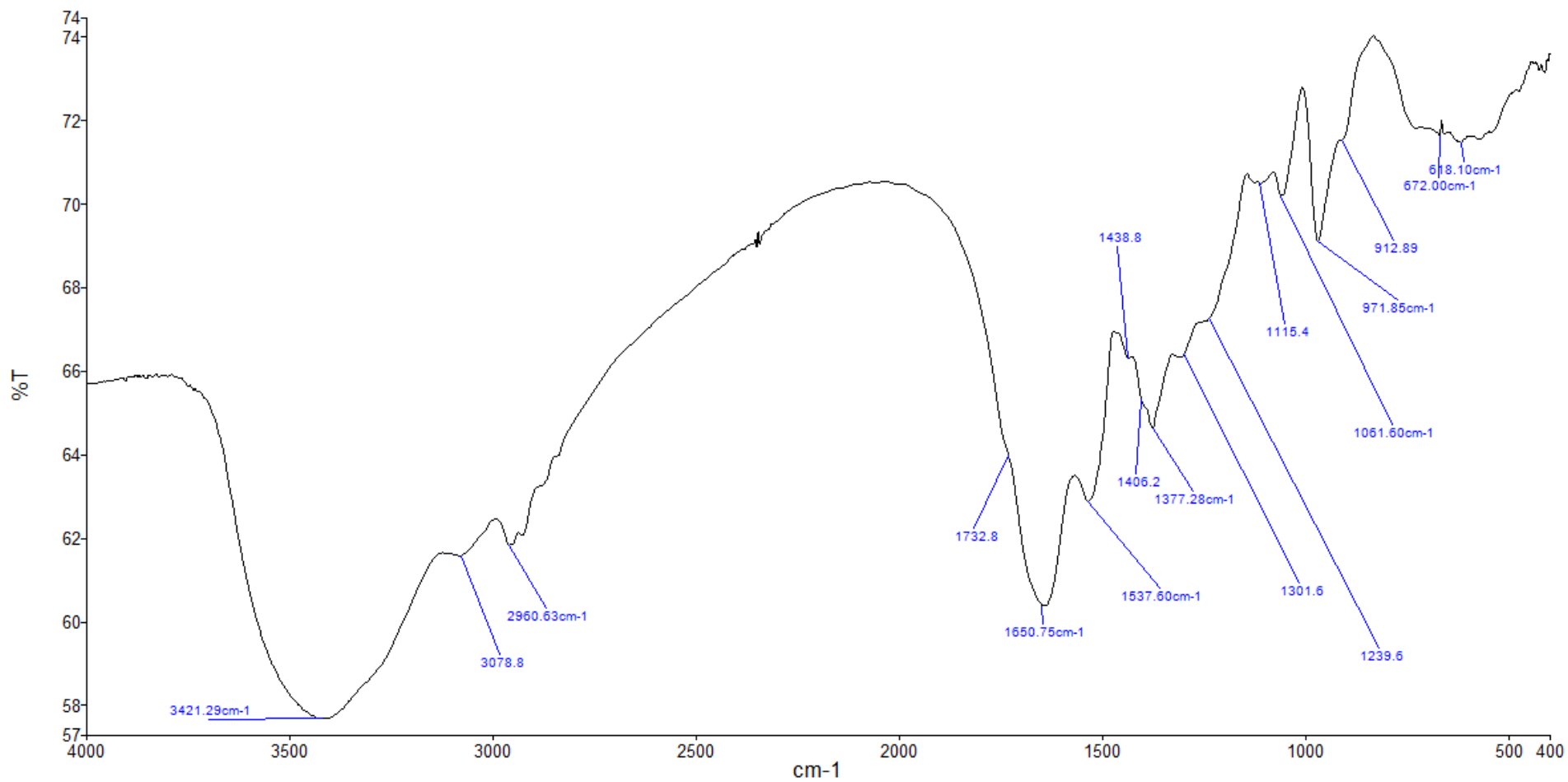


10.17. Espectros IR de los conjugados sintetizados en base al copolímero PASP-DC-MC-MH-3

10.17.1. Espectro IR del sólido precipitado con acetona de la síntesis 3C sintetizado a partir del PASP-DC-MC-MH-3 con un porcentaje teórico de 60% de PASP-MA y relación molar 1:1 DC:VO en KBr.



10.17.2. Espectro IR del sólido insoluble de la síntesis 3C sintetizado a partir del PASP-DC-MC-MH-3 con un porcentaje teórico de 60% de PASP-MA y relación molar 1:1 DC:VO en KBr.



10.17.3. Espectro IR del sólido precipitado con acetona de la síntesis 4C sintetizado a partir del PASP-DC-MC-MH-3 con un porcentaje teórico de 60% de PASP-MA y relación molar 2:1 DC:VO en KBr.

