

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN QUÍMICA



**“SÍNTESIS DE UN NUEVO VEHÍCULO POLIMÉRICO
 α,β -POLI(DL-ÁCIDO ASPÁRTICO) DEL AGENTE
ANTIDIABÉTICO OXOVANADIO(IV)”**

Tesis para optar el grado de

Magíster en Química

Presentado por:

Carmen Luz Zegarra Urquia

Asesora:

MSc. Carla Galli Rigo-Righi

Lima - Perú

2012

RESUMEN

El presente trabajo se basa en el diseño y síntesis de un complejo de oxovanadio (IV) con el ligando polimérico α,β -poli(DL-ácido aspártico). Esta macromolécula sintética reúne las características apropiadas para fungir como un vehículo polimérico del agente insulino mimético oxovanadio(IV). Es biodegradable, biocompatible, no tóxica, hidrosoluble y posee grupos carboxílicos capaces de coordinar al metal. La idea de usar un polímero como agente quelante en lugar de los usuales ligandos orgánicos resulta atractiva puesto que el aumento del peso molecular produce un cambio radical en la farmacocinética de la droga. El carácter hidrosoluble del polímero permite una rápida y eficaz distribución del agente activo en los fluidos corporales y gracias a su efecto protector estabiliza al agente activo, aumenta su concentración y tiempo de permanencia en el sistema circulatorio, liberándolo de modo lento y controlado.

El complejo polimérico vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) ha sido sintetizado por reacción de metátesis entre el polímero parcialmente desprotonado y sulfato de vanadilo en solución acuosa diluida.

El ligando polimérico, fue sintetizado a partir de la polisuccinimida (PSI) según una combinación de los métodos reportados por Shinoda, Neuse y Kim, mientras que el polímero precursor fue sintetizado por una modificación del método de Neri y colaboradores, basado en una policondensación térmica del monómero DL-ácido aspártico, catalizada por ácido fosfórico.

El rendimiento de la síntesis del PSI y del ligando es 85 a 89 % y 84 a 94 %, respectivamente. Por otro lado, el rendimiento de la síntesis del complejo es 9 a 12 %. Además, el polímero precursor fue caracterizado por resonancia magnética nuclear y por espectroscopía infrarroja; mientras que, el ligando y el complejo fueron caracterizados además de las técnicas mencionadas por UV-visible. Por otro lado, el peso molecular del PSI (61,5 - 68 kDa) y del ligando (27 - 30 kDa) fue determinado por cromatografía de permeación por gel (GPC) y por viscosimetría intrínseca, respectivamente. Por último, la estructura octaédrica del complejo en solución fue determinada por UV-visible y su contenido de vanadio, determinado por ICP, se encuentra en el rango de 12,45 a 16,79 %.

AGRADECIMIENTOS

A Dios porque me llena de mucha bendición y fortaleza cada día de mi vida.

A mis maravillosos y queridos padres por su gran amor y por ser ambos un gran ejemplo de independencia, justicia, perseverancia, honestidad, dignidad, fortaleza, lucha y bondad.

A la MSc. Carla Galli por la oportunidad otorgada para la ejecución de la presente tesis, por su gran apoyo y aporte en la revisión de la misma y por su ejemplo de lucha.

A la Dirección General de Investigación (DGI) por el financiamiento otorgado en el 2010.

Al Dr. Juan Carlos Rueda por su apoyo en el área de Polímeros.

Al Dr. Christian Samanamú por su gran amistad, sus consejos, su empuje, su gran disposición, por su tiempo valioso que invirtió para apoyarme con el envío de un gran número de artículos científicos y por su inmenso apoyo en el área de Inorgánica.

Al Dr. Daniel Rabinovich y al Dr. Alfredo Ángeles por sus consejos, amistad, cariño, por el envío de artículos científicos y por su apoyo en el campo de Inorgánica.

Al Dr. Richard Korswagen por su gran disposición y apoyo en el tema de Inorgánica.

Al Dr. Javier Nakamatsu por su gran disposición, por sus aportes en el área de Polímeros y, como miembro de jurado, por su gran preocupación por la pronta revisión de la tesis.

Al Dr. Luis Ortega, como miembro de jurado, por su preocupación por la pronta revisión de la tesis y por su contribución a la misma en el área de inorgánica.

Al Dr. Roberto Gil por su apoyo en la técnica de Resonancia Magnética Nuclear.

Al Dr. Eric Cosio por su gran disposición y apoyo en el tema de diálisis.

A la Dra. Helena Maruenda por sus enseñanzas en Síntesis Orgánica que tuvieron lugar en su grupo de investigación y por su ejemplo de perseverancia y esfuerzo constante.

A la Prof. Isabel Díaz, al Prof. Pablo Cárdenas y a la Ing. Qco. Ilse Acosta por las lecturas del ICP realizadas en el Instituto de Corrosión.

Al MSc. Hans Pederson, al Dr. Juan Sáñez, a la Dra. Betty Galarreta, a la MSc. Angélica Naka, al MSc. Jean Weng, a la Dra. Paloma Salas y a Luis Mori por su amistad, confianza y apoyo en el envío de artículos científicos.

A Alex Nieva por su gran apoyo en las lecturas por RMN.

A Milka Cajahuanca por su apoyo en las medidas de FT-IR y UV-Visible.

Al Dr. Julio Santiago, a la Dra. Paula Olivera y al Qco. Pablo Mendoza por su gran apoyo en las lecturas por Análisis de Activación Neutrónica y Fluorescencia de Rayos X realizadas en el Departamento de Química de la Dirección de Investigación y Desarrollo del Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN).

Al Instituto de Investigación de Polímeros de Dresden, Alemania, por las lecturas de peso molecular por Cromatografía de Permeación por Gel (GPC).

A los profesores responsables de los cursos de la maestría por todas sus enseñanzas.

A las profesoras Beatriz Flores, Victoria Landa, Juana Robles y Vilma Ulco por su gran cariño y apoyo.

A mis amigos y compañeros de la maestría Marycarmen Misol, Zelmira De la Cruz, Karim Ramos, Yuliana Enciso, Gloria Delgadillo, Roxana Sifuentes, Ana Gonzales, Olesya Gromova, Flor Montenegro, Jacqueline Peralta, Nidia Recuay, Lina Fuentes, Luz Mendoza, Golfer Muedas, John Jauregui e Yván Olortiga por su inmenso cariño y por los gratos momentos compartidos.

A Betty Flores, a Zoila Moreano y a Martín Cruzado por su amistad y por el grato ambiente que siempre me brindaron en el laboratorio mientras realizaba la tesis.

A mis valiosos amigos, Sandra Vargas, Claudia Toledo, Sara Córdova, Vanessa Estrada, Gisella Lucero, Gustavo Bonilla, Ana María Yépez, Luis Ángeles y a mi prima Graciela por su gran cariño y confianza que siempre han depositado en mi.

A mis hermanos Nilo y Elena por su gran amor.

A mi gran amiga Vanessa Vásquez por su inmenso cariño.

Finalmente, a mi alma mater, mi gran orgullo, Universidad Nacional Mayor de San Marcos por haberme formado en base de lucha, esfuerzo, dignidad, integridad, honestidad y justicia.

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ATP	adenosin trifosfato
acetil-CoA	acetil-coenzima A
BEOV	bis(etilmaltolato)oxovanadio (IV)
Cp(t)	concentración del polímero en el compartimiento de la sangre
DM	Diabetes mellitus
D₀	dosis inicial
Dh	diámetro hidrodinámico
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	dimetil sulfóxido
DCC	1,3-diciclohexilcarbodiimida
GSK3	glucógeno sintasa quinasa 3
GS	glucógeno sintasa
GLUT4	transportador de glucosa tipo 4
GPC	cromatografía de permeación por gel
IDDM	Diabetes mellitus dependiente de la insulina
NIDDM	Diabetes mellitus no dependiente de la insulina
RI	receptor de la insulina
IRS-1	substrato del receptor insulínico-1
ICP	espectroscopía de plasma acoplado inductivamente
K_{p,t}	constante de velocidad del plasma al tejido
K_{t,p}	constante de velocidad del tejido al plasma
K_{elim}	constante de velocidad de eliminación
M_v	peso molecular promedio en viscosidad
M_n	peso molecular promedio en número
M_w	peso molecular promedio en peso
PSI	polisuccinimida
PI-3K	proteína fosfoinositida-3-quinasa
PIP₂	fosfatidilinositol-4,5-difosfato
PIP₃	fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PTEN	fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PDK1	piruvato deshidrogenasa quinasa 1
PKB	proteína quinasa B

PTPasa	proteínas tirosina fosfatasas
PP-1	proteína fosfatasa-1
V	volumen de distribución
Vh	volumen hidrodinámico
VO(γ-pga)	vanadilo-poli(γ -ácido glutámico)
VO²⁺	catión vanadilo
DCU	diciclohexilurea
MWCO	Molecular Weight Cut Off
ESR	Resonancia de Spin Electrónico
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
COSY	Correlation Spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Simple Quantum Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation



ÍNDICE GENERAL

1. DIABETES	
1.1 Diabetes mellitus.....	1
1.2 Insulina.....	2
1.2.1 Acción reguladora de la insulina.....	4
2. VANADIO.....	7
3. SISTEMA POLÍMERO – DROGA.....	12
4. DISEÑO Y SÍNTESIS DEL COMPLEJO VANADILO-α,β-POLI(DL-ÁCIDO ASPÁRTICO)	
4.1 Diseño.....	19
4.2 Síntesis del polímero precursor, polisuccinimida (PSI).....	23
4.3 Síntesis de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico).....	25
4.4 Síntesis del α,β -poli(DL-ácido aspártico).....	26
4.5 Determinación del peso molecular de la polisuccinimida y de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico).....	26
4.6 Síntesis del complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico).....	28
5. PARTE EXPERIMENTAL	
5.1 Materiales, Equipos y Reactivos.....	29
5.2 Metodología	
5.2.1 Polisuccinimida (PSI) – Polímero Precursor	
5.2.1.1 Síntesis.....	32
5.2.1.2 Determinación del peso molecular de la polisuccinimida (PSI) por cromatografía de permeación por gel (gel permeation chromatography, GPC).....	35
5.2.1.3 Incremento del peso molecular de la polisuccinimida...	35

5.2.2	Ligando polimérico : sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico)	
5.2.2.1	Síntesis.....	37
5.2.2.2	Determinación del peso molecular de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) por viscosimetría intrínseca o capilar.....	39
5.2.2.3	Ensayos previos de síntesis de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico).....	41
5.2.3	Síntesis del α,β -poli(DL-ácido aspártico)	41
5.2.4	Análisis gravimétrico de la determinación de moléculas de agua en el reactivo sulfato de vanadilo hidratado ($\text{VOSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) por calcinación.....	42
5.2.5	Complejo de vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico)	
5.2.5.1	Primer método (2 moles de meros del polímero: 1 mol de VO^{2+}).....	43
5.2.5.2	Segundo método (3 moles de meros del polímero: 1 mol de VO^{2+}).....	45
5.2.6	Determinación del contenido de vanadio en el complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) por el método de plasma acoplado inductivamente (ICP).....	48
5.2.7	Liofilización de la solución acuosa vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico).....	48
5.2.8	Análisis del sólido azulino.....	49
5.2.9	Ensayos de síntesis del complejo variando las condiciones de reacción.....	50

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1	Polisuccinimida (Polímero Precursor)	
6.1.1	Síntesis.....	55
6.1.2	Rendimiento.....	57
6.1.3	Determinación del peso molecular por cromatografía de permeación por gel (GPC).....	58
6.1.4	Caracterización	
6.1.4.1	Espectroscopía infrarroja.....	59

6.1.4.2	Resonancia magnética nuclear.....	62
6.1.5	Determinación de la estructura de la cadena polimérica de la polisuccinimida : lineal, ramificada o anillo abierto.....	66
6.1.6	Incremento del peso molecular de la polisuccinimida (PSI).....	68
6.1.7	Comparación de las polisuccinimidias purificadas con una y dos precipitaciones.....	78
6.2	Ligando polimérico : sal de sodio del α,β -poli(ácido aspártico)	
6.2.1	Síntesis.....	79
6.2.2	Rendimiento.....	80
6.2.3	Determinación del peso molecular de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) por el método de viscosimetría intrínseca.....	81
6.2.4	Caracterización	
6.2.4.1	Espectroscopía infrarroja.....	85
6.2.4.2	Resonancia magnética nuclear.....	86
6.2.5	Ensayos previos de síntesis de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico).....	90
6.3	α,β -poli(DL-ácido aspártico)	
6.3.1	Síntesis.....	91
6.3.2	Caracterización	
6.3.2.1	Espectroscopía infrarroja.....	91
6.3.2.2	Resonancia magnética nuclear.....	92
6.4	Determinación del número de moléculas de agua en el reactivo sulfato de vanadilo hidratado ($\text{VO}\text{SO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$).....	96
6.5	Complejo polimérico : vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico)	
6.5.1	Síntesis.....	98
6.5.2	Caracterización	
6.5.2.1	Espectroscopía infrarroja.....	102
6.5.2.2	Contenido de vanadio en los complejos.....	107
6.5.2.3	Ultravioleta-visible.....	108
6.5.2.4	Resonancia magnética nuclear.....	113
6.5.3	Solubilidad y cambio de color del complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) en solución.....	116
6.6	Sólido azulino.....	118

6.7 Ensayos de síntesis del complejo variando las condiciones de reacción.....	122
7. CONCLUSIONES	132
8. RECOMENDACIONES.....	134
9. BIBLIOGRAFÍA.....	135
10. ANEXOS.....	147



LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura de la insulina.....	3
Figura 2.	Cascada enzimática de activación de la glicógeno sintasa.....	5
Figura 3.	Transporte de la glucosa en la célula.....	6
Figura 4.	Posible acción insulino-mimético de los compuestos de vanadio.....	10
Figura 5.	Representación esquemática del modelo de dos compartimientos.....	14
Figura 6.	Paso de un polímero lineal (a) y globular (b) a través de los poros, ambos con volumen hidrodinámico (Vh) aproximadamente equivalentes.....	15
Figura 7.	Distribución intracelular del conjugado polímero-droga.....	17
Figura 8.	Distribución de los polímeros sintéticos después de la administración por diferentes vías al organismo.....	18
Figura 9.	Estructura del γ -poli(ácido glutámico).....	20
Figura 10.	Modo de complejación del γ -poli(ácido glutámico) a la unidad vanadilo (estado sólido).....	20
Figura 11.	Estructura del α,β -poli(DL-ácido aspártico).....	21
Figura 12.	Síntesis de la polisuccinimida (PSI).....	24
Figura 13.	Síntesis de la sal del α,β -poli(DL-ácido aspártico).....	25
Figura 14.	PSI formado después de tres horas de reacción (a) ; PSI disuelto en DMF (b) ; Precipitación del PSI en agua (c) y PSI (producto final) (d).....	34
Figura 15.	Viscosímetro Ubbelohde.....	40
Figura 16.	Mecanismo de reacción de la síntesis de la polisuccinimida.....	55
Figura 17.	Peso molecular de la polisuccinimida determinado por GPC.....	58
Figura 18.	Estructuras del poli(propileno-co-anhídrido maleico) (a) y de la polisuccinimida (b).....	59

Figura 19. Comparación de los espectros IR de la polisuccinimida diluída en KBr (a) y reportado en la literatura ⁶⁵ (b) y la polisuccinimida concentrada en KBr (c) y reportado en la literatura ⁶⁶ (d).....	61
Figura 20. ¹ H-RMN en DMSO- <i>d</i> ₆ de la polisuccinimida.....	62
Figura 21. COSY en DMSO- <i>d</i> ₆ de la polisuccinimida.....	63
Figura 22. ¹³ C-RMN en DMSO- <i>d</i> ₆ de la polisuccinimida.....	64
Figura 23. Designación de los átomos de carbono en la estructura de la polisuccinimida.....	65
Figura 24. HSQC en DMSO- <i>d</i> ₆ de la polisuccinimida.....	65
Figura 25. Estructura lineal de la polisuccinimida.....	66
Figura 26. Estructura ramificada de la polisuccinimida.....	67
Figura 27. Estructura de anillo abierto de la polisuccinimida.....	67
Figura 28. Reacción entre la polisuccinimida y la DCC.....	69
Figura 29. Mecanismo de reacción entre la polisuccinimida y la DCC.....	71
Figura 30. Peso molecular del PSI, tratado con 20 mg de DCC por gramo de polímero, determinado por GPC.....	72
Figura 31. Posibles productos no deseados formados durante la reacción de la polisuccinimida con la DCC y DMF como solvente.....	74
Figura 32. ¹ H-RMN en DMSO- <i>d</i> ₆ de la polisuccinimida sintetizada con el doble del número de moles del H ₃ PO ₄ 85 %.....	77
Figura 33. Mecanismo de reacción de la síntesis de la sal de sodio del α,β-poli(DL-ácido aspártico).....	80
Figura 34. Estructuras de la sal de sodio del α,β-poli(DL-ácido aspártico) (a) y de la sal de sodio del poli(DL-ácido acrílico) (b).....	82
Figura 35. Gráfica de la viscosidad reducida versus concentración de la sal de sodio del α,β-poli(DL-ácido aspártico).....	84
Figura 36. IR (KBr) de la sal de sodio del α,β-poli(DL-ácido aspártico).....	86

Figura 37. Espectros ^1H -RMN (a) y ^{13}C -RMN (b) en D_2O de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico).....	88
Figura 38. IR (KBr) del α,β -poli(DL-ácido aspártico).....	92
Figura 39. Espectros ^1H -RMN a temperatura ambiente (a) y a $60\text{ }^\circ\text{C}$ (b) en D_2O del α,β -poli(DL-ácido aspártico).....	94
Figura 40. Espectro ^{13}C -RMN (b) en D_2O del α,β -poli(DL-ácido aspártico).....	95
Figura 41. Síntesis del complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) empleando la relación molar de meros del polímero y catión vanadilo 2 : 1 ó 3 : 1 (a) ; complejo sólido húmedo lavado con agua y acetona helada (b) ; complejo secado bajo vacío a temperatura ambiente (c) ; sólido azulino húmedo lavado con agua y acetona helada (d) ; sólido azulino secado bajo vacío y a temperatura ambiente (e).....	101
Figura 42. Comparación de los espectros IR (KBr) del complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) sintetizado empleando la relación 2 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo en la reacción 1 (a), de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) (b) y del complejo vanadilo-poli(γ -ácido glutámico) obtenido por Hu y colaboradores ⁵⁴ (c).....	103
Figura 43. Comparación de los espectros UV-visible en solución acuosa del complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) correspondiente a una relación molar 3 : 1 de meros del polímero por mol de vanadilo, 9,5 mg/mL (pH =3) (a) y de $\text{VO}\text{SO}_4 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ 0,049 M (pH =3) (b)	109
Figura 44. Desdoblamiento de los niveles de energía del ion VO^{2+} en un campo cristalino de geometría octaédrica distorsionada.....	111
Figura 45. Equilibrio de las geometrías pirámidal cuadrada y <i>trans</i> -octaédrica existente en la solución del complejo (solución amarilla).....	112
Figura 46. Comparación de los espectros ^1H -RMN en D_2O de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) (a) y del complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) sintetizado empleando la relación 2 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo (b).....	114
Figura 47. Comparación de los espectros ^{13}C -RMN en D_2O de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) (a) y del complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) sintetizado empleando 3 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo (b).....	115

- Figura 48.** Comparación de los espectros IR (KBr) del sólido amarillo (producto liofilizado de la solución amarilla) (a) y del α,β -poli(DL-ácido aspártico) (b)..... 118



LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ensayos del incremento del peso molecular del PSI variando las condiciones de reacción.....	37
Tabla 2. Condiciones de síntesis de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico).....	41
Tabla 3. Síntesis del complejo a diferentes pH finales.....	51
Tabla 4. Condiciones de reacción y concentraciones iniciales y finales del polímero y del catión vanadilo en las síntesis a mayor dilución.....	52
Tabla 5. Condiciones de reacción para la síntesis del complejo a 65 °C.....	53
Tabla 6. Condiciones de reacción de la síntesis del complejo a diferentes relaciones molares.....	54
Tabla 7. Resultados de la síntesis de las polisuccinimidias variando las condiciones de reacción.....	76
Tabla 8. Peso molecular y viscosidad intrínseca de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico).....	83
Tabla 9. Datos de la gráfica de la viscosidad reducida versus concentración de la sal de sodio del α,β -poli(ácido aspártico).....	84
Tabla 10. Peso molecular de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) después de la hidrólisis básica de la polisuccinimida a condiciones fuertes.....	90
Tabla 11. Datos para la determinación del N^0 de moles de moléculas de H_2O por mol de moléculas de $VO_4 \cdot xH_2O$	97
Tabla 12. Rendimiento de la síntesis del complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico).....	100
Tabla 13. Señales del espectro IR de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico), de los complejos vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) sintetizados empleando la relación 2 moles de meros de polímero por mol de catión vanadilo de las reacciones 1 y 2 y del complejo vanadilo-poli(γ -ácido glutámico).....	104

Tabla 14. Valores de $\Delta[v_{as}(COO^-) - v_s(COO^-)]$ de los complejos vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico).....	106
Tabla 15. Contenido de vanadio, determinado por ICP, en los complejos vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico).....	108
Tabla 16. Máxima absorción en el visible del $VOSO_4$ y de los complejos vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) y vanadilo-poli(γ -ácido glutámico) (medidos en H_2O y a $pH = 3$).....	110
Tabla 17. Porcentaje de sólido azulino formado durante la síntesis del complejo.....	119
Tabla 18. Porcentaje de vanadio, azufre y cloro en el sólido azulino determinado por análisis de activación neutrónica, fluorescencia de rayos X e ICP.....	121
Tabla 19. Porcentaje de rendimiento y contenido de vanadio de dos de los productos sintetizados a menores concentraciones finales de los reactantes.....	126

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 10.1	Caracterización de la polisuccinimida tratada con DCC.....	148
ANEXO 10.2	Síntesis y caracterización por IR del PSI a mayor temperatura	151
ANEXO 10.3	Caracterización de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) mediante espectroscopía RMN.....	153
ANEXO 10.4	Caracterización por UV-visible del complejo y del α,β -poli(DL-ácido aspártico)	159
ANEXO 10.5	Caracterización del sólido azulino por IR y UV-Visible.....	160
ANEXO 10.6	Síntesis, caracterización por IR y resultados de los productos obtenidos por síntesis del complejo a diferentes pH finales.....	163
ANEXO 10.7	Resultados y caracterización por IR de los productos obtenidos por síntesis del complejo a menores concentraciones.....	167
ANEXO 10.8	Resultados y caracterización por IR de los productos obtenidos por síntesis del complejo a mayor temperatura.....	169
ANEXO 10.9	Síntesis, caracterización y resultados de los productos obtenidos a diferentes relaciones molares de meros de polímero a VO^{2+}	171

1. DIABETES

1.1 Diabetes mellitus

La Diabetes mellitus, referida simplemente como diabetes, consiste de un grupo de enfermedades metabólicas crónicas en que una persona tiene altos niveles de azúcar en la sangre porque el cuerpo no produce suficiente insulina o porque las células no responden a la insulina que es producida. Este alto contenido de azúcar en la sangre produce síntomas clásicos de poliúrea (micción frecuente), polidipsia (aumento de la sed), polifagia (aumento del apetito)¹ y glucosuria (alto contenido de azúcar en la orina).²

La Diabetes mellitus es una de las enfermedades no transmisibles más comunes en el mundo. Aunque no es mortal en si misma, es la cuarta o quinta causa de muerte en los países desarrollados, principalmente a causa de sus graves complicaciones micro- y macro- vasculares a largo plazo como infarto, derrame cerebral, ceguera, amputación de los miembros inferiores y otros^{3,4}, y neurológicas como mononeuritis y polineuritis (pérdida sensorial y alteración de los reflejos motores y sensitivos).⁵

Según cifras de la Federación Internacional de Diabetes (FID), hay más de 366 millones de personas que padecen de diabetes en el mundo, la cual representa el 8,3 % de la población adulta global, y se espera que esta cifra alcance los 552 millones (9,9 %) para el 2030.⁶ Tan solo en el Perú son casi dos millones de personas las que sufren esta enfermedad, es decir, alrededor del 8 % de la población, encontrándose a Lima y a Piura como los más afectados.^{7,8}

Existen tres tipos principales de diabetes:

a. Diabetes mellitus tipo 1 (DM tipo 1): Este tipo resulta de una deficiencia en la secreción de la insulina, hormona reguladora del nivel de glucosa en la sangre. También se le llama diabetes dependiente de la insulina, IDDM, y diabetes juvenil.¹

b. Diabetes mellitus tipo 2 (DM tipo 2): Este tipo resulta de una resistencia a la acción de la insulina; una condición en que las células fallan para usar apropiadamente a la

insulina, a pesar de no existir déficit de la misma. También se le llama diabetes no dependiente de la insulina, NIDDM, y diabetes de edad adulta.¹

c. Diabetes mellitus gestacional: Este tipo se produce cuando una mujer embarazada, quien nunca ha tenido diabetes, presenta altos niveles de azúcar en la sangre durante el embarazo. Esto puede preceder al desarrollo de la DM tipo 2.¹

Otras formas de Diabetes mellitus incluyen a la diabetes congénita, la cual resulta de defectos genéticos en la secreción de la insulina, la diabetes relacionada con la fibrosis quística, la diabetes esteroide inducida por altas dosis de glucocorticoides y varias formas de diabetes monogénica.¹

Hasta la fecha, no existe otro tratamiento clínico para la DM tipo 1 que inyecciones diarias de insulina o análogos de insulina. El tratamiento de la DM tipo 2, que afecta al 90 - 95% de los pacientes con diabetes, requiere, aparte de una dieta adecuada y ejercicio, la administración de algún fármaco oral con efecto hipoglicemiante. En la última década el avance ha sido grande y actualmente existen cinco tipos de medicamentos orales de origen orgánico disponibles en el mercado: sulfonilúreas, glinidas, biguanidas, tiazolidinedionas e inhibidores de alfa-glucosidasa, cada uno de los cuales posee un mecanismo particular de acción. Sin embargo, ninguno de ellos, por separado o combinados, es capaz de reemplazar el efecto múltiple de la insulina y presentan en mayor o menor grado efectos secundarios adversos. Otro problema es que suelen disminuir su efectividad cuando la enfermedad progresa, por lo que se suele recurrir en estos casos a una terapia combinada (con una droga complementaria) e incluso a dosis de insulina.^{9,10}

1.2 Insulina

La insulina es una pequeña proteína anabólica de 5800 Da de peso molecular formada por dos cadenas de polipéptidos, A y B, (**Figura 1**) unidas por dos enlaces disulfuro.¹¹ En muchas especies, la cadena A consiste de 21 aminoácidos y la cadena B de 30 aminoácidos.¹²

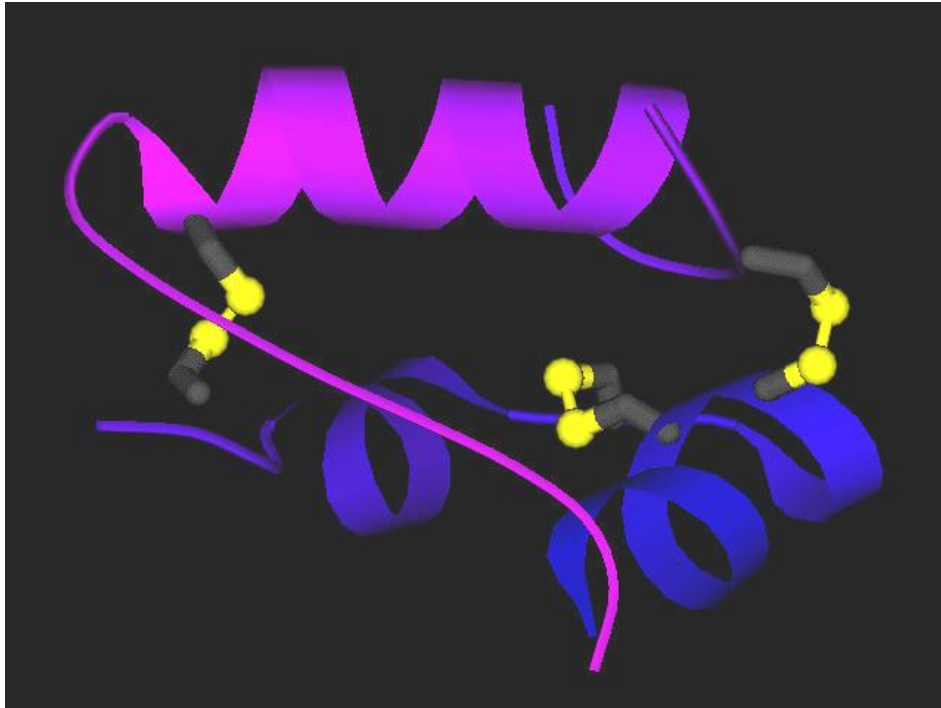


Figura 1. Estructura de la insulina

Adaptada de la referencia 13

La insulina es sintetizada en el páncreas como un precursor inactivo de una sola cadena (preproinsulina) con un grupo amino terminal, secuencia de señal, que direcciona su pasaje dentro de vesículas secretoras. La remoción proteolítica de esta secuencia de señal y la formación de tres enlaces disulfuro producen la proinsulina. Esta es almacenada en gránulos secretores en las células pancreáticas β en los Islotes de Langerhans donde proteasas específicas rompen dos enlaces peptídicos de dicha proinsulina para formar la molécula de insulina. El incremento de los niveles de glucosa en la sangre estimula la secreción de la insulina.¹¹

A pesar que la secuencia de aminoácidos de la insulina varía entre especies, ciertos segmentos de la molécula son altamente conservados, incluida la posición de los enlaces disulfuro, ambos extremos de la cadena A y los residuos C-terminales de la cadena B. Estas similitudes en la secuencia de aminoácidos de la insulina conducen a tres conformaciones dimensionales de la insulina que son muy similares entre las especies. Así, es muy probable que la insulina de un animal sea biológicamente activa en otras especies, de hecho, la insulina porcina ha sido ampliamente utilizada para tratar a pacientes humanos.¹²

La insulina estimula la toma de glucosa por el músculo y por el tejido adiposo, donde la glucosa es convertida a glucosa-6-fosfato, siendo en el hígado donde la glucosa-6-fosfato se convierte en glicógeno cuando la insulina activa a la enzima glicógeno sintasa e inactiva a la fosforilasa glicógeno. Además, la insulina estimula el almacenamiento de la glucosa como grasa en el tejido adiposo. Esto ocurre cuando, en el hígado, la insulina activa la oxidación de la glucosa-6-fosfato a piruvato vía glicólisis y la oxidación de piruvato a acetil-CoA; si no toda la CoA ha sido oxidada, se usa la energía (ATP) para la síntesis de ácidos grasos (triacilgliceroles), los cuales son liberados del hígado y almacenados en el tejido adiposo. En resumen, la insulina convierte el exceso de glucosa sanguínea en dos formas de almacenamiento: como glicógeno en el hígado y en el músculo y como triacilgliceroles en el tejido adiposo.¹⁴

La insulina, también, inhibe la secreción y los efectos del glucagón^{15,16} y estimula la inhibición de la gluconeogénesis hepática.^{16, 17}

1.2.1 Acción reguladora de la insulina

El receptor de la insulina (RI) es un heterotetrámero que consiste de dos subunidades alfa (α), ubicadas en el compartimiento extracelular, las cuales se encuentran enlazadas a dos subunidades β , transmembrana, mediante enlaces disulfuro.¹⁸

En la **Figura 2** se muestra la cascada enzimática de la activación del glicógeno sintasa por la insulina. Esta se inicia cuando la insulina se enlaza a la subunidad alfa del receptor, activando a un residuo de tirosina de la proteína quinasa de la subunidad beta¹⁹, el cual ahora fosforila a la proteína del sustrato del receptor insulínico-1 (IRS-1). Luego, el IRS-1 activa a la proteína fosfoinositida-3-quinasa (PI-3K). La activación del PI-3K involucra un enlace de esta proteína con el IRS-1 por medio del dominio SH2 del PI-3K. El PI-3K activado fosforila al fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP₂) de la membrana lipídica convirtiéndolo a fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃). Por otro lado, la fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa (PTEN) puede convertir al PIP₃ de regreso a PIP₂.²⁰

El PIP₃ activa a la proteína piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1), que a su vez activa a la proteína quinasa B (PKB) también llamada Akt. Luego, la PKB fosforila residuos de serina y treonina de proteínas específicas como la glicógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) la cual se convierte así a su forma inactiva, fosforilada. De esta

manera, finalmente la glicógeno sintasa (GS) es activada y por lo tanto estimula la síntesis del glicógeno.^{19, 20}

En la **Figura 3** se muestra como la PKB también acelera la translocación del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) de las vesículas intracelulares hacia la membrana plasmática, en el tejido adiposo y muscular, estimulando la toma de la glucosa de la sangre.²⁰ Además, como la concentración intracelular de la glucosa es baja debido a la fosforilación de la glucosa a glucosa-6-fosfato, la presencia de transportadores activos en la membrana plasmática (GLUT4) favorece el movimiento de la glucosa del espacio extracelular al interior de la célula.¹⁷

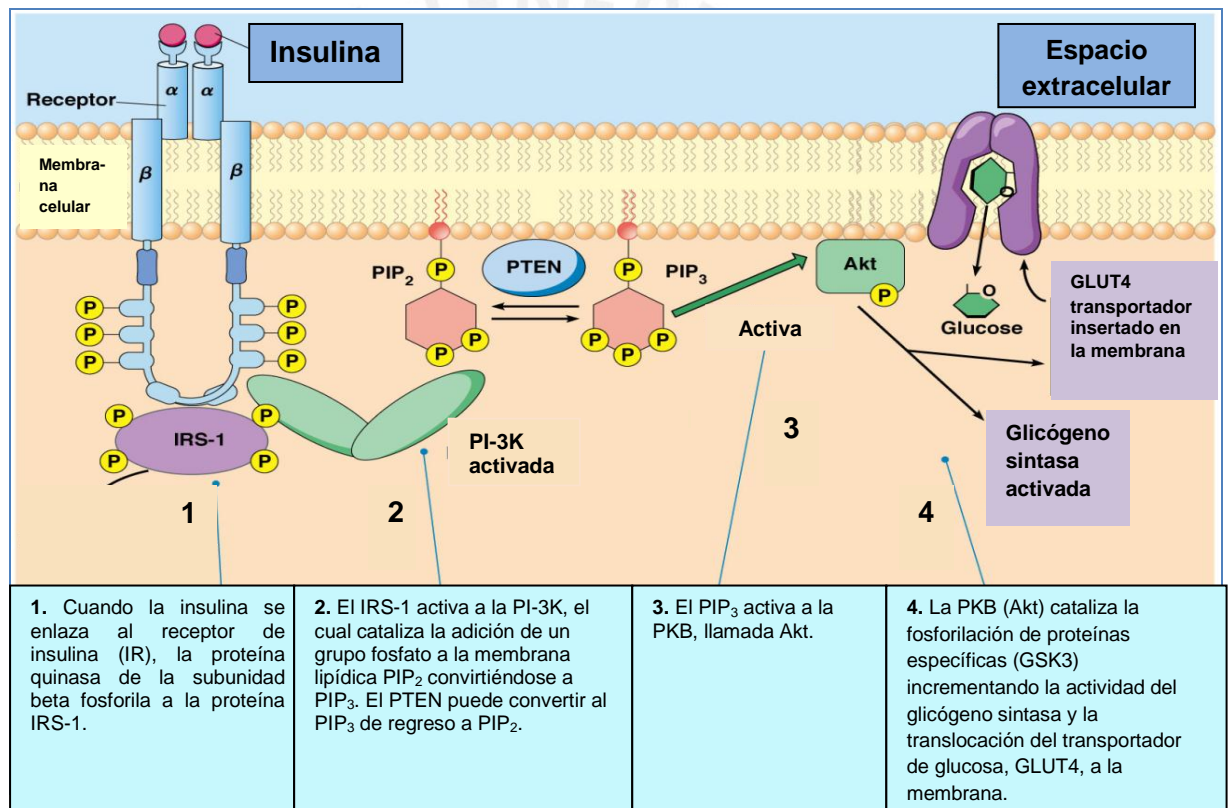


Figura 2. Cascada enzimática de activación de la glicógeno sintasa.

Traducida y adaptada de referencia 21

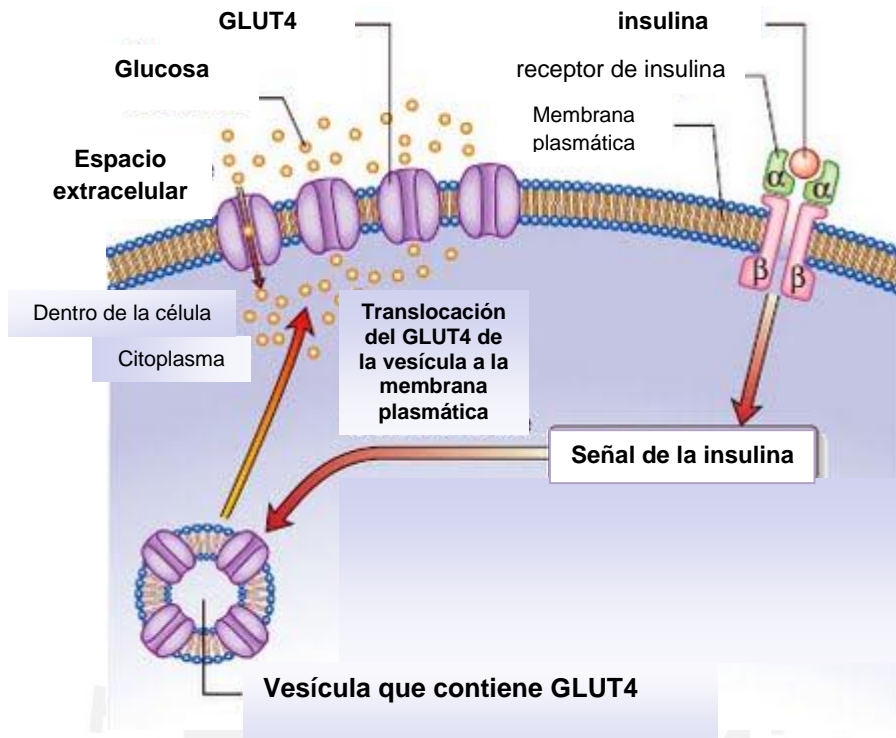


Figura 3. Transporte de la glucosa en la célula

Traducida y adaptada de referencia 22

2. VANADIO

Vanadio es un elemento traza que está presente en muchos alimentos y puede ser esencial en el cuerpo en pequeñas cantidades.¹ El contenido total de vanadio en el cuerpo humano es de aproximadamente 100 a 200 μg .²³ Además, se cree que este elemento puede estar involucrado en el crecimiento normal de los huesos.¹ También, el vanadio se encuentra en bajas concentraciones ($< 10^{-8}$ M) en todas las células de plantas y animales²⁴ y es relativamente abundante (aproximadamente 0,02%) en la naturaleza. Por otro lado, ha sido demostrada la importancia del vanadio para el crecimiento y desarrollo de cabras, ratas y pollos.²³

El vanadio tiene un número atómico de 23 y un peso atómico de 50,94 uma; es un metal de transición de la primera serie que muestra un amplio rango de estados de oxidación (-I, 0, +II, +III, +IV y +V) en especies monoméricas, oligoméricas y poliméricas en solución. Los estados de oxidación IV y V son estables en solución a pH fisiológico como vanadilo (VO^{+2}) y vanadato (H_2VO_4^-), respectivamente.¹ La forma aniónica se asemeja en su comportamiento al fosfato, mientras que el catión vanadilo se asemeja al Mg^{2+} .²³

En sistemas biológicos, el vanadio se encuentra complejoado con proteínas de transporte como transferrinas, albúmina, hemoglobina y con compuestos de bajo peso molecular como el glutatión.²³

El vanadio ha sido estudiado como posible fármaco para el tratamiento de la sífilis, para la reducción del colesterol y la prevención de caries, entre otros; sin embargo, el enfoque actual se orienta a la creación de fármacos con propiedades anticancerígenas, insulino-miméticas y antidiabéticas.²⁵

Si bien el vanadio como agente antidiabético despertó un temprano interés, en 1899, en la comunidad científica internacional²⁵, las investigaciones en este campo se interrumpieron tras el descubrimiento de la insulina en 1922.¹⁰ En la década de los 80's se reiniciaron los estudios con sales inorgánicas de vanadio como el sulfato de vanadilo (VOSO_4), demostrándose mediante numerosos estudios que los compuestos de vanadio son capaces de imitar y/o potenciar la mayoría de los efectos metabólicos de la insulina tanto *in vitro* como *in vivo*.

Los efectos insulino miméticos del vanadio en modelos animales de la DM tipo 1 se relacionan con una restauración de niveles adecuados de glucosa en el plasma sanguíneo y corrección de la hiperlipidemia, sin afectar los niveles de insulina. Asimismo, el efecto hipoglicemiante se debe a un marcado incremento en la utilización de glucosa por el tejido muscular y a una completa normalización de una elevada producción hepática de glucosa. En modelos experimentales de diabetes tipo 2, resistentes a la insulina, se demostró que el tratamiento con compuestos de vanadio conducía a una disminución en los niveles de glucosa e insulina en el plasma, así como a un incremento en la sensibilidad hacia esta última.¹⁶

En los ensayos iniciales con sales de vanadio, se observaron efectos colaterales dañinos al organismo como trastornos gastrointestinales y deshidratación. Estudios posteriores demostraron que los complejos de vanadio (IV) con ligandos orgánicos son más efectivos en su acción hipoglicemiante, menos tóxicos y mejor tolerados por el organismo, disminuyendo así los efectos secundarios. Para una buena absorción y permeabilidad en el organismo se requiere que estos posean, además de un peso molecular relativamente bajo y un alto contenido de oxígeno y nitrógeno, un buen balance lipofílico-hidrofílico. Este aspecto resulta clave puesto que estos compuestos deben ser capaces de atravesar membranas biológicas, en general, por un mecanismo de difusión pasiva. Por otro lado, se busca además que los complejos sean relativamente estables en los fluidos corporales y permanezcan en el organismo por un tiempo lo suficientemente prolongado como para ejercer de modo efectivo su acción y llegar hasta sitios claves de la acción de la insulina como son el hígado, tejido adiposo, óseo y muscular.^{24, 26, 27}

El primer ensayo en humanos usando un complejo de vanadio, el bis(etilmaltolato)oxovanadio (IV), BEOV, completó en el año 2000 la fase 1 de las pruebas clínicas. En un estudio farmacocinético comparativo con VOSO_4 , se encontró que el BEOV es absorbido más rápido y que alcanza una mayor concentración plasmática máxima que el VOSO_4 . Además, mostró una biodisponibilidad tres veces mayor que para una dosis equivalente de VOSO_4 , corroborando resultados anteriores en animales. No se observaron efectos adversos sobre ninguno de los individuos de la población en estudio.¹⁰

Estudios recientes del mecanismo de acción del vanadio a nivel molecular concluyeron que, al igual que la insulina, el vanadio estimula la degradación de la glucosa en los tejidos participando tanto en la toma de la glucosa como en la síntesis de glicógeno y en la inhibición de la producción hepática de la glucosa (HGP).^{16, 28}

En la **Figura 4**, se presentan las posibles acciones insulino-miméticas de los compuestos de vanadio. Estos podrían directamente inhibir a las proteínas tirosina fosfatasa (PTPasa) y por lo tanto indirectamente activarían, es decir fosforilan, a la proteína del sustrato del receptor insulínico-1 (IRS-1), conduciendo a la activación del PI3K y del PKB (Akt) lo que permitiría la señalización y estimulación de la translocación del GLUT4 a la membrana plasmática para la toma de la glucosa.²⁹ Además, la actividad del vanadio no se debe solamente a la inhibición de las PTPasas sino que, además, estudios in vivo demostraron que el vanadio estimularía la síntesis del glicógeno favoreciendo directamente en la actividad de la proteína fosfatasa-1 (PP-1) la cual desfosforila (activa) a la enzima glicógeno sintasa. Contrariamente a la insulina, el vanadio en dosis terapéuticas no tiene efecto sobre el PI3-K, PKB (Akt) y el GSK-3, siendo estas las tres enzimas importantes que median los efectos estimulatorios de la insulina sobre la síntesis del glicógeno.¹⁶

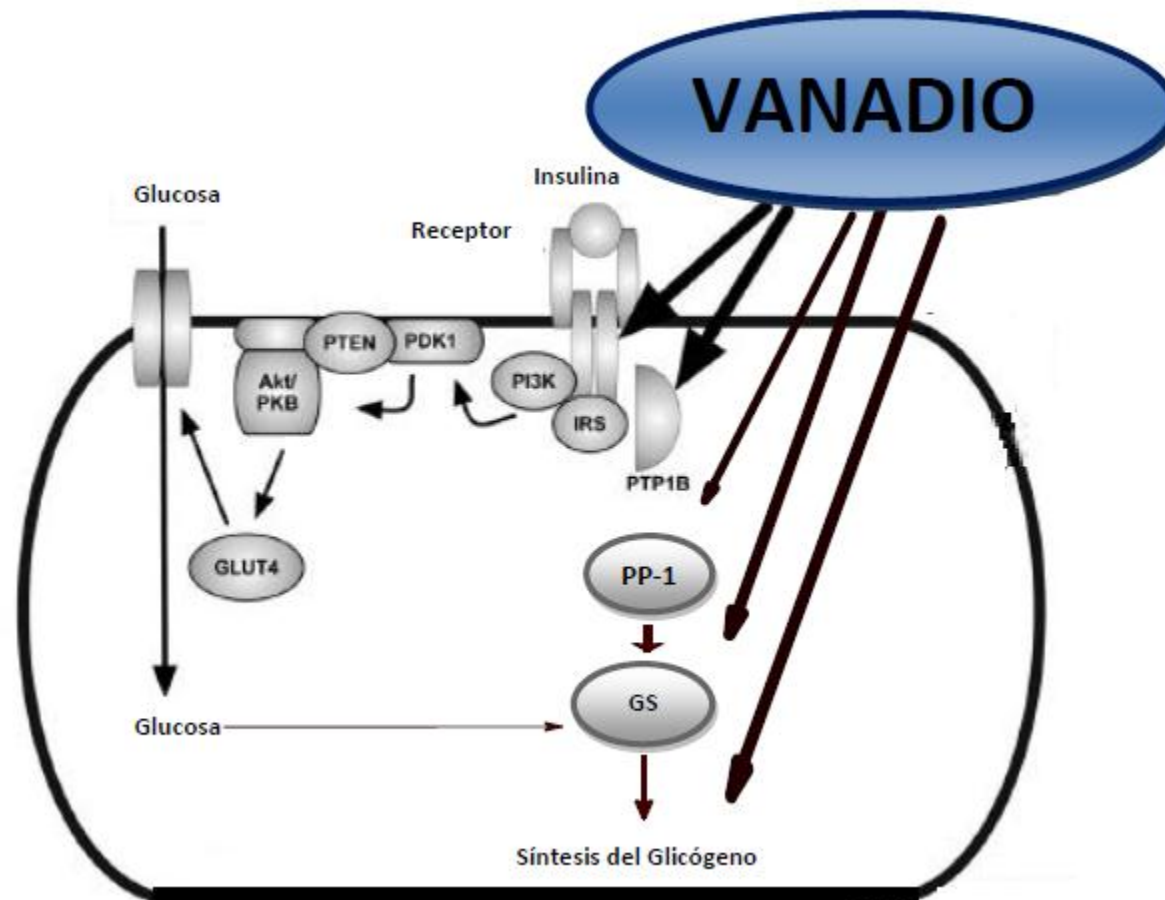


Figura 4. Posible acción insulino-mimética de los compuestos de vanadio.

Traducida y adaptada de la referencia 29

Por otro lado, el incremento de la producción hepática de la glucosa (HGP) es el factor de mayor contribución al desarrollo de hiperglicemia en ambos tipos de diabetes, DM1 y DM2. La insulina inhibe la gluconeogénesis (síntesis de glucosa a partir de precursores no glucosídicos como aminoácidos, lactato, piruvato, glicerol y cualquiera de los intermediarios del ciclo de Krebs) en el hígado, por lo tanto una deficiencia de esta hormona conduce a un incremento en la producción endogénica de glucosa en el hígado diabético. Un incremento en la HGP está asociado con un incremento en la expresión y actividad de dos enzimas claves en la gluconeogénesis, siendo estas la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y la glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa). En consecuencia, un posible mecanismo de la actividad insulino-mimética del vanadio podría darse en la inhibición directa de estas dos enzimas. El mecanismo del efecto inhibitorio del vanadio sobre estas enzimas parece que es independiente del sistema P13-K/PKB, de acuerdo a estudios in vivo realizados en ratas diabéticas STZ.¹⁶

Además, el vanadio podría corregir los altos niveles de glucagón en la sangre (hiperglucagonemia). Como el glucagón estimula la gluconeogénesis en el hígado, un segundo mecanismo del vanadio para inhibir a la HGP sería corregir la hiperglucagonemia afectando el mecanismo de señalización del receptor del glucagón.¹⁶

Finalmente, el glucagón media sus efectos estimulatorios sobre las enzimas PEPCK y G-6-Pasa por la activación de su G-proteína acoplada a su receptor, ubicado sobre la superficie de la célula, conduciendo de esta manera a la activación del adenilato ciclasa y un incremento intracelular de los niveles de cAMP (monofosfato adenosina cíclica), el cual luego activa a la proteína quinasa cAMP dependiente. Por lo tanto, se sugiere que el vanadio interfiere con los niveles o acciones del cAMP debido a que la insulina puede contrarrestar los efectos del glucagón disminuyendo los niveles de cAMP por medio de la activación de la cAMP fosfodiesterasa.¹⁶

3. SISTEMA POLÍMERO – DROGA

Los fármacos actuales para el tratamiento de las diversas enfermedades, incluida la diabetes, adolecen en mayor o menor grado de ciertas deficiencias que limitan su efectividad e introducen efectos colaterales adversos. Entre ellas destacan: i) pobre solubilidad en agua, lo que obstaculiza una rápida y eficaz distribución de la droga en los fluidos corporales, ii) reducido tiempo de permanencia en el aparato circulatorio como consecuencia de una rápida degradación, acelerada excreción renal y/o enlace a proteínas específicas que facilitan su eliminación por el hígado y bazo, iii) falta de especificidad celular, que conduce a una igual distribución entre tejidos enfermos y sanos con la consiguiente necesidad de dosis elevadas, iv) excesiva toxicidad.³⁰

Esta serie de deficiencias en los agentes terapéuticos convencionales ha promovido las investigaciones dirigidas al desarrollo de diversas matrices poliméricas para la liberación lenta y controlada del agente activo en el plasma sanguíneo, manteniéndolo un tiempo prolongado por encima de la concentración mínima efectiva, pero por debajo del nivel tóxico.³⁰ En este contexto, destacan los conjugados poliméricos tales como polímero-proteína, micelas poliméricas y polímero-droga.³¹

Un conjugado polímero-droga involucra una unión simbiótica 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.³⁰

El diseño y construcción del vehículo polimérico representa un punto clave para el desarrollo de un conjugado polímero-droga, ya que la actividad terapéutica del mismo dependerá críticamente de una serie de características estructurales y químicas del polímero. Específicamente, el polímero debe estar compuesto de: i) una cadena principal flexible, no tóxica y biodegradable, ii) cadenas laterales que contengan, en general, una o más de los siguientes tipos de unidades:

a. Solubilizante : debe contener grupos hidrofílicos que garanticen la solubilidad del polímero en agua.

b. Ligante : debe contener grupos funcionales apropiados para una unión biorreversible (conjugación) del tipo covalente o iónico a la droga.

c. Sitio-específica : debe contener grupos directores hacia células o tejidos específicos.³⁰

La accesibilidad estérica de los sitios de unión a la droga se ve favorecida por inserción de un espaciador, es decir, una cadena de longitud apropiada entre el sitio de anclaje y la cadena principal, lo que reduce un eventual impedimento estérico por la vecindad a la cadena principal.³⁰

Un conjugado polímero-droga que cumpla con estas especificaciones será un agente terapéutico más efectivo por las siguientes razones.³⁰

- a. Alta solubilidad en los fluidos corporales.
- b. Aumento del tiempo de vida media de circulación en sangre y de biodisponibilidad de la droga por efecto protector del polímero.
- c. Fácil ingreso a la célula por un mecanismo activo (pinocitosis), que evita el problema usual de una difusión pasiva no satisfactoria de solutos no poliméricos.
- d. Alta especificidad hacia células y tejidos enfermos.
- e. Disminución de los efectos tóxicos debido a la ausencia de droga libre por unión estable al polímero durante su tránsito por el sistema circulatorio.
- f. Biodegradabilidad, lo que permite su eliminación gradual del cuerpo como fragmentos de tamaño adecuado para permitir su excreción por los mecanismos de excreción normal del cuerpo.

Por otro lado, el lograr una concentración adecuada del polímero-droga en la sangre resulta de un balance entre su recepción por los tejidos y su velocidad de remoción en la sangre por una combinación de excreción renal y remoción metabólica por el hígado y otros componentes del retículo endotelial según el modelo del doble compartimiento

(Figura 5). La concentración del polímero en el compartimiento de la sangre está dada por la expresión $C_p(t)$, en el que las variables A , B , α y β son funciones de la dosis inicial D_0 , del volumen de distribución V y de las tres constantes de velocidad : $K_{p,t}$ (del plasma al tejido) ; $K_{t,p}$ (del tejido al plasma) y K_{elim} (eliminación).³²

Inyección intravenosa

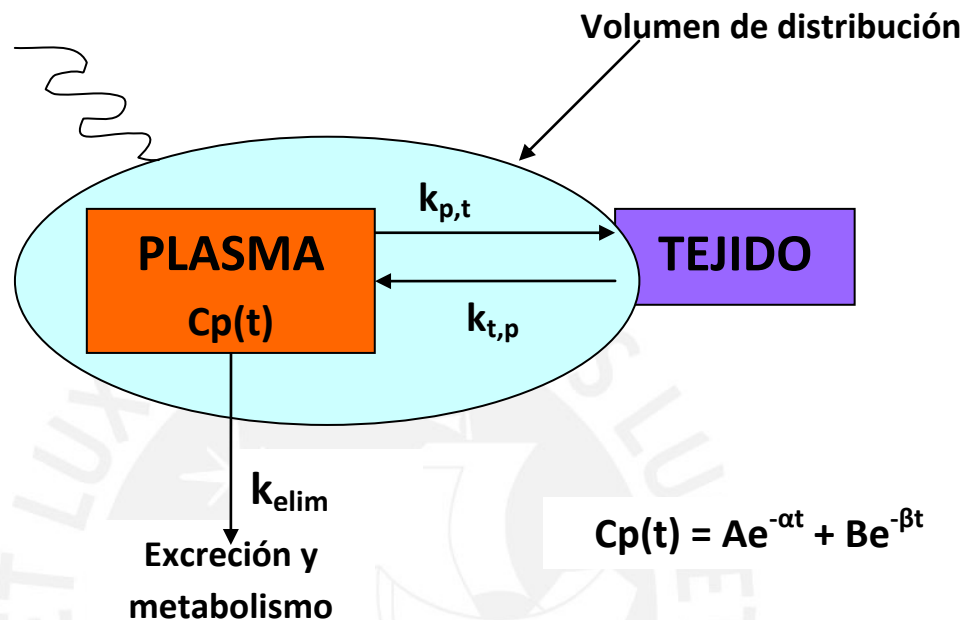


Figura 5. Representación esquemática del modelo de dos compartimientos

Traducida y adaptada de la referencia 32

En este contexto, es clave papel de la “arquitectura molecular” del polímero, que comprende su tamaño, conformación molecular en solución, flexibilidad y ramificación, sobre el comportamiento *in vivo* de los vehículos macromoleculares.³²

El volumen hidrodinámico (V_h) y por consiguiente el peso molecular del polímero influyen de modo crítico en los mecanismos de excreción del mismo con el consiguiente efecto sobre su farmacocinética y biodistribución. Teniendo en cuenta que la eliminación renal constituye el mecanismo principal de excreción del polímero del cuerpo, una regla referencial aproximada es que su peso molecular debe estar por encima de los 25 kDa para que su paso por los poros glomerulares de los riñones no sea demasiado rápido, de manera que el conjugado polímero-droga permanezca el tiempo suficiente en el aparato circulatorio que le permita ejercer su acción.³² Sin embargo, el hígado y los componentes del retículo endoplasmático (bazo) también son

capaces de remover polímeros de la sangre en un proceso llamado opsonización, cuando el diámetro hidrodinámico (D_h) supera los 200 nm. Las proteínas opsonina presentes en la sangre se enlazan al polímero para incrementar su reconocimiento por las células fagocíticas. Las proteínas opsonina tienden a enlazarse y eliminar a los polímeros hidrofóbicos o cargados más que a los polímeros hidrofílicos y neutros. Adicionalmente, el retículo endoplasmático puede eliminar a los polímeros indirectamente por degradación, siempre y cuando contengan enlaces peptídicos o éster.³²

La forma y flexibilidad de una macromolécula también juegan un papel crucial sobre su velocidad de eliminación renal y tiempo de vida media en la sangre, al influenciar de modo decisivo, a igual que el V_h , su permeabilidad glomerular en los riñones. En este sentido, un polímero lineal se filtra a mayor velocidad que uno de forma globular (**Figura 6**).³²

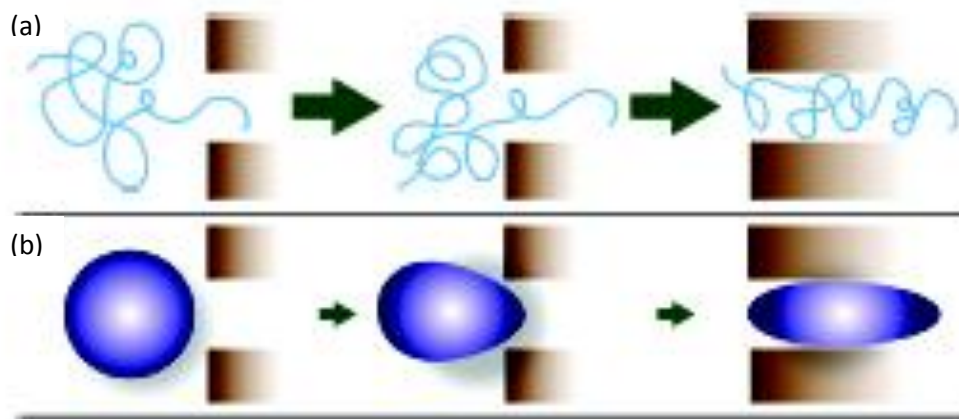


Figura 6. Paso de un polímero lineal (a) y globular (b) a través de los poros, ambos con volumen hidrodinámico (V_h) aproximadamente equivalentes

Adaptada de la referencia 32

El polímero lineal con conformación helicoidal al azar fácilmente penetra y reptar a través del poro. Por otro lado, el polímero con conformación rígida globular tiene que deformarse para pasar a través del poro, sin embargo, si su peso molecular es mayor del umbral tanto la entrada como el pasaje a través del poro podrían ser difíciles.³²

En relación al mecanismo de difusión activa que caracteriza el ingreso intracelular del polímero, existen dos variantes dependientes de la solubilidad y el peso molecular del

mismo: fagocitosis y pinocitosis. La Fagocitosis consiste en la captura de material particulado, usualmente con un diámetro hidrodinámico mayor a 200 nm, como se ha mencionado anteriormente, por células especializadas del sistema retículoendotelial incluidos macrófagos del hígado, pulmón, bazo y monocitos.³² Mediante este mecanismo la unión de las partículas a la membrana celular es esencial para activar la inmersión. Una vez que se establece una interacción firme entre el polímero con la superficie de la célula, la membrana celular comienza a moverse hacia afuera para rodear a la partícula utilizando el mecanismo de cierre. Finalmente, la partícula es inmersa dentro de una vacuola fagocítica.³³

La pinocitosis, por su parte, describe la inmersión de la membrana celular para formar pequeñas vesículas llamadas pinosomas, las cuales durante su formación capturan fluido extracelular, a todos los solutos disueltos y a cualquier material adherido a la superficie de la membrana plasmática. Las vesículas formadas presionan y migran dentro del citoplasma celular donde ocurre una serie de eventos de fusión. Los pinosomas se pueden fusionar entre ellos para formar vesículas más grandes o se fusionan con lisosomas primarios o secundarios con liberación de la membrana para ser nuevamente usada en la superficie. Los lisosomas son pequeñas vesículas de origen intracelular que contienen enzimas hidrolíticas capaces de degradar macromoléculas. La hidrólisis del material capturado se lleva a cabo dentro del lisosoma secundario y los productos de bajo peso molecular liberados pasan a través de la membrana lisosomal hacia el citoplasma para su reutilización o remoción de la célula. Las macromoléculas que no son biodegradables se acumulan dentro de los lisosomas secundarios los cuales son liberados lentamente por exocitosis o como consecuencia de la muerte celular.³³

Las macromoléculas pueden ser capturadas por el mecanismo de pinocitosis por dos caminos diferentes: por fase fluida y por adsorción. El primero resulta de una toma al azar de todo el material extracelular, mientras que el segundo, se caracteriza por una cierta especificidad celular de la membrana hacia determinadas moléculas.³³

DeDuve y colaboradores fueron los primeros en señalar que la importancia de la conversión de drogas a especies macromoleculares radica en que estas penetran a las células principalmente por pinocitosis.³³ Algunas ventajas de este mecanismo son las siguientes:

- La captura pinocítica de macromoléculas parece ser común en todos los tipos de células lo que permite liberar agentes quimioterapéuticos para combatir una multitud de diferentes enfermedades.
- El uso de sistemas receptores conocidos de células específicas permitiría la focalización de agentes farmacéuticos para las células en cuestión.
- El diseño de los enlaces polímero-droga, los cuales se rompen únicamente dentro del lisosoma, permite desarrollar un transportador polimérico el cual sería estable en el ambiente extracelular, pero capaz de liberar drogas activas dentro de la célula.³³

Otra consideración importante en el diseño de un conjugado polímero-droga es el mecanismo de liberación de la droga por biofisión en el interior de la célula, específicamente en los lisosomas. El interior de los lisosomas por naturaleza tiene un pH usualmente de 5 y contiene enzimas que catalizan a dicho pH la biofisión.³³

La ruptura del enlace polímero-droga en el lisosoma puede ocurrir por un mecanismo enzimático o por un cambio de pH; este último involucra una liberación más rápida de la droga, **(Figura 7)**.³¹

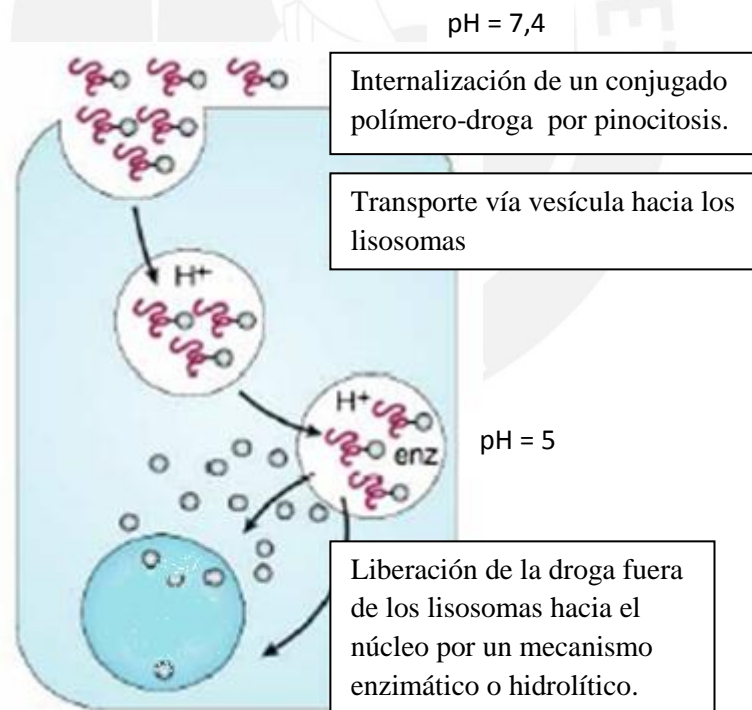


Figura 7. Distribución intracelular del conjugado polímero- droga

Traducida y adaptada de la referencia 31.

Por otro lado, el cuerpo humano se divide en diferentes compartimientos y la habilidad de un polímero de acceder a cada compartimiento, es decir a las células de esa área, depende de muchos factores incluida su habilidad para penetrar barreras intracompartimentales.³³ En la **Figura 8** se muestran algunas de las interrelaciones entre los diferentes compartimientos y algunos de los procesos que influyen en la migración de los polímeros de un área a otra.

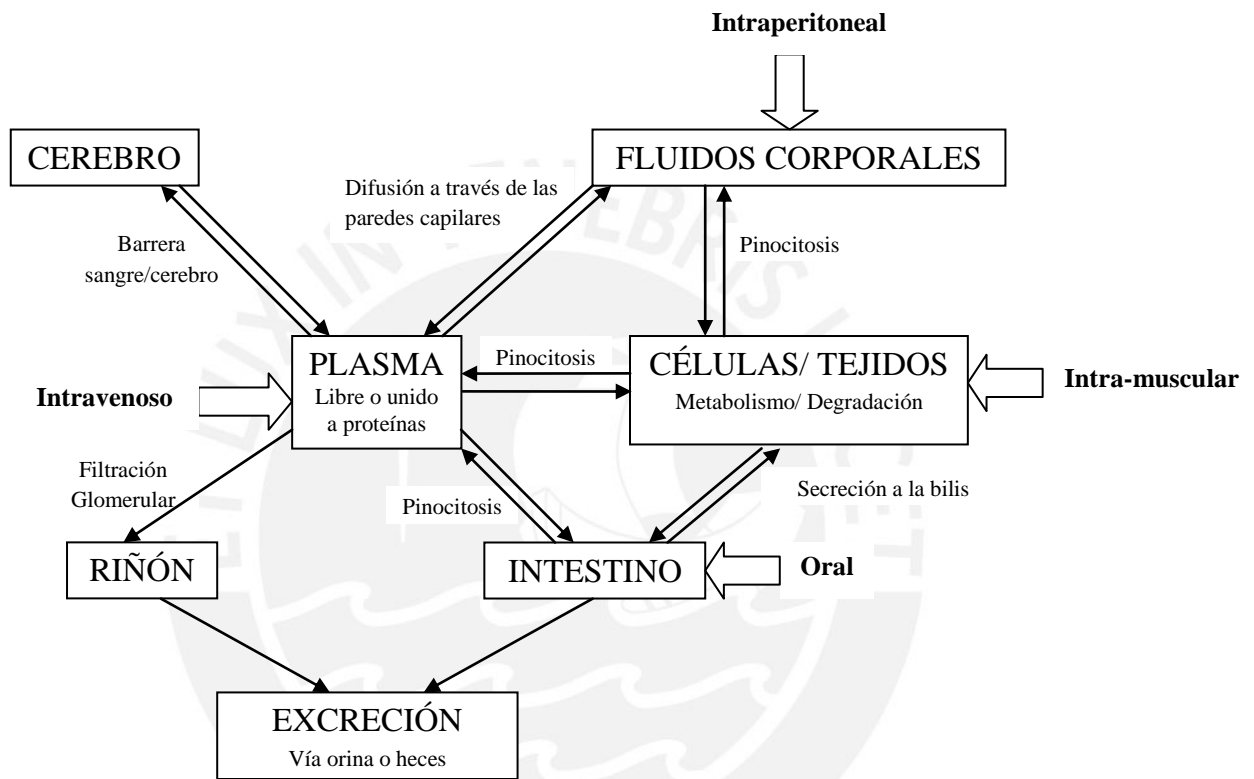


Figura 8. Distribución de los polímeros sintéticos después de la administración por diferentes vías al organismo

Traducida y adaptada de la referencia 33

Se ha desarrollado un gran número de conjugados de polímeros con drogas orgánicas, varios de los cuales con acción anticancerígena se encuentran incluso en fases avanzadas de ensayos clínicos.³¹

En el campo particular de vehículos poliméricos asociados a metalofármacos, las investigaciones se han centrado en aquellos basados en drogas anticáncer de la familia del cisplatino y del tipo ferroceno, mientras que trabajos con otros metales, tales como titanio y rutenio, continúan teniendo un papel marginal hasta ahora.³¹

4. DISEÑO Y SÍNTESIS DEL COMPLEJO VANADILLO- α,β -POLI(DL-ÁCIDO ASPÁRTICO)

4.1 Diseño

La limitada eficacia y efectos colaterales adversos de los fármacos orales comercialmente disponibles de origen orgánico para el tratamiento de la diabetes tipo 2 han estimulado la búsqueda de nuevas drogas antidiabéticas orales de alta potencia y con mínimos efectos adversos. En este contexto, juega un papel importante actualmente la investigación orientada al desarrollo de metalofármacos antidiabéticos basados en vanadio complejado con ligandos orgánicos.

Si bien la investigación en el campo de complejos de oxovanadio (IV) con ligandos orgánicos de bajo peso molecular continúa activa y en nuestro grupo se está trabajando en introducir variaciones en el balance hidrofílico-lipofílico de los ligandos base mediante variaciones en los sustituyentes, la alternativa de usar un ligando polimérico que confiera carácter hidrosoluble al complejo metálico y cumpla un papel estabilizante y protector del mismo en los fluidos corporales resulta particularmente atractiva.

El ligando polimérico debe actuar como un vehículo transportador de la sustancia activa, en este caso el catión vanadilo, por medio de los fluidos corporales de base acuosa, estabilizándolo y protegiéndolo de los agentes biológicos externos capaces de degradarlo y aumentando así su tiempo de vida media de circulación en sangre lo suficiente para propiciar una toma efectiva por los tejidos de los órganos de interés, lo que le permite ejercer eficientemente su acción terapéutica. Sin embargo, no debe permanecer luego por mucho tiempo, sino ser eliminado para minimizar efectos tóxicos.²⁹

Recientemente fue reportada la síntesis de algunos conjugados polímero-droga con el catión vanadilo: vanadilo-poli(acrilamida-co-ácido acrílico) empleado en inmunoensayos³⁴, vanadilo-quitosano³⁵ y el de mayor interés para el presente trabajo, el vanadilo-poli(γ -ácido glutámico), VO(γ -pga), el cual involucra un polímero pseudosintético no tóxico, biodegradable, hidrosoluble y biocompatible (**Figura 9**). En este complejo, en estado

sólido, se determinó por resonancia de spin electrónico que el catión VO^{2+} se enlaza mediante dos grupos carboxilatos de la cadena lateral del biopolímero completándose la coordinación pirámide cuadrada con dos moléculas de agua (**Figura 10**).³⁶

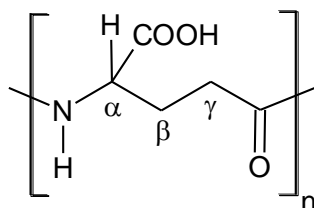


Figura 9. Estructura del γ -poli(ácido glutámico)

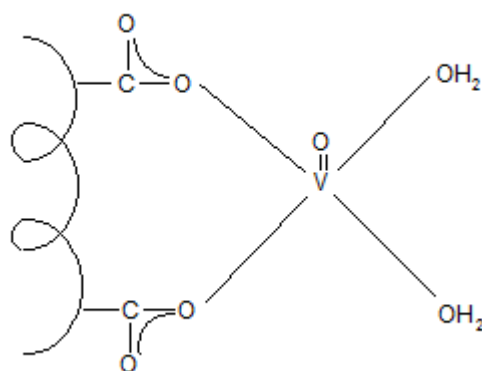


Figura 10. Modo de complejación del γ -poli(ácido glutámico) a la unidad vanadilo (estado sólido)³⁶

Estudios metalocinéticos en modelos animales de diabetes tipo 1 indicaron una biodisponibilidad para este conjugado polímero-droga, $\text{VO}(\gamma\text{-pga})$, mucho mayor que para VOSO_4 . Además, se observó una normalización de la hiperglicemia en pocos días de administración oral.³⁷ Resultados similares se obtuvieron con modelos animales de DM tipo 2.³⁸

En base a estos antecedentes, se plantea la síntesis y caracterización de un nuevo conjugado poliaminoácido-vanadilo utilizando en este caso como vehículo polimérico al α,β -poli(DL-ácido aspártico) (**Figura 11**), con un peso molecular definido y ubicado dentro de un rango conveniente para una posible aplicación como fármaco antidiabético. Este polímero pseudosintético reúne, a semejanza del reportado, las características de ser biodegradable, biocompatible, hidrosoluble y no tóxico, además de poseer capacidad ligante hacia centros metálicos. Además, el polímero seleccionado es muy versátil y ofrece muchas posibilidades de derivatización. Entre los numerosos polímeros derivados del α,β -poli(DL-ácido aspártico) se encuentran : las poliaspartamidas, que pueden contener cadenas laterales con objetivos definidos como especificidad celular, sitios de anclaje con espaciadores que podrían optimizar la coordinación del vanadio o también grupos funcionales que permitan coordinar con otros metales^{30, 39} ; las micelas poliméricas, por ejemplo, el poli(ácido aspártico)-block-poli(etilenglicol)^{40, 41} y poli(ácido aspártico)-block-poli(oxazolin)⁴² ; hidrogeles de poli(ácido aspártico)⁴³ y finalmente reticulaciones solubles de poli(ácido aspártico)⁴⁴.

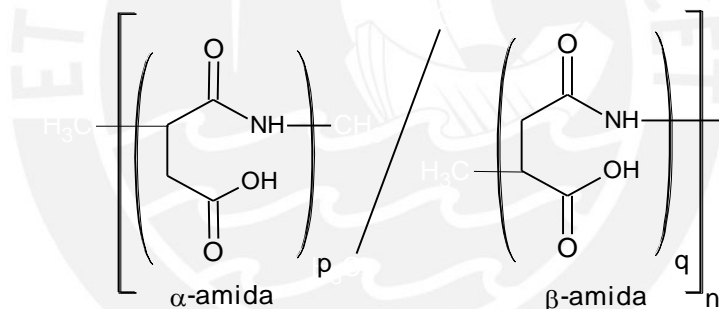


Figura 11. Estructura del α,β -poli(DL-ácido aspártico)

El α,β -poli(DL-ácido aspártico) es un polímero lineal y flexible que contiene grupos carboxílicos hidrofílicos, lo cual le confiere el carácter hidrosoluble, requisito vital para el desarrollo de un conjugado polímero-droga efectivo.

La ventaja de usar el poliaminoácido sintético α,β -poli(DL-ácido aspártico) radica en que este, a diferencia de su contraparte natural (poli(L-ácido aspártico)), que sufre una degradación demasiado rápida como consecuencia de la actividad de la enzima alfa-peptidasa presente en el plasma sanguíneo, es mucho más resistente a dicha degradación

gracias a la presencia de grupos CH de configuración D y unidades beta-péptidos (β) en la cadena principal que son inertes al ataque de dicha enzima.³⁰

Numerosos polímeros naturales extraídos de plantas, algas y animales que presentan actividad biológica, en particular antiviral y antitumoral, son polianiónicos.³¹ Este hecho propició la búsqueda de drogas poliméricas aniónicas, encontrándose en ellas una relación entre el peso molecular y la toxicidad. Se determinó que esta última aumenta grandemente cuando el peso molecular supera los 50 kDa porque podría ocasionar anemia, inhibición de la enzima oxidasa microsomal hepática, disminución de las células de la médula ósea y la involución de la glándula timo.^{31, 33}

Por otro lado, para que un polímero lineal pueda fungir como un vehículo polimérico efectivo su diámetro hidrodinámico debe ser del mismo orden de magnitud que los poros y aperturas presentes en el sistema vascular y excretorio del organismo. Esto exige, como se discutió en el capítulo anterior, un peso molecular superior a los 25 kDa.³²

En conclusión, el rango ideal de peso molecular para un vehículo polimérico lineal y polianiónico como el α, β -poli(DL-ácido aspártico) sintetizado en el presente trabajo está entre los 25 y 50 kDa.^{30, 31, 33, 39}

En este sentido, otra ventaja de que el polímero en cuestión sea un poliaminoácido sintético, es que esto permite un control adecuado de su peso molecular, dado que los naturales generalmente poseen un peso molecular muy alto, mayor que 200 kDa y son particularmente polidispersos ($M_w / M_n > 2$).³¹

En este contexto, conviene hacer referencia a que el conjugado polímero-vanadilo reportado por Sakurai y colaboradores^{36, 37}, VO(γ -pga), se preparó a partir de γ -poli(ácido glutámico) con un peso molecular de 500 kDa, lo que a nuestro criterio explica que aunque la mejora en propiedades antidiabéticas haya sido relativamente buena con respecto a una sal de vanadio; sin embargo, resultó modesta respecto a un complejo molecular como el bis(etilmaltolato)oxovanadio (IV), BEOV.

En la selección de un vehículo polimérico para el desarrollo de un conjugado polímero-droga, otro factor importante a considerar es la capacidad ligante del mismo hacia una sustancia activa. En nuestro caso, el agente activo será el catión vanadilo, el cual posee una gran afinidad por oxígeno formando un enlace V-O particularmente fuerte con los grupos carboxilato COO^- en la cadena del α,β -poli(DL-ácido aspártico). Este es un ligando polidentado vía dichos grupos COO^- , los que son capaces de una complejación muy efectiva al catión oxovanadio (IV) por efecto quelato. Esto confiere una gran estabilidad al conjugado vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico). Además, el alto número de grupos carboxílicos del polímero le otorga una gran capacidad de transporte de la droga a través del organismo.

La presencia de unidades α - y β -amida en la cadena principal del α,β -poli(DL-ácido aspártico) da lugar a diversas posibilidades de coordinación con el ion vanadilo, por lo cual podrán formarse anillos quelato de diversos tamaños. Sin embargo, gracias al fuerte enlace V-O no resulta determinante en nuestro caso particular la formación de un anillo de 5 a 7 miembros sobre la estabilidad del complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico). Por otro lado, el hecho de que el complejo similar ya reportado $\text{VO}(\gamma\text{-PGA})$ exhiba una coordinación piramidal cuadrada formada por dos carboxilatos y dos moléculas de agua (**Figura 10**), en estado sólido, sugeriría que el polímero sintetizado en el presente trabajo poseería esta misma coordinación en dicho estado sólido.

Por último, el conjugado polimérico a desarrollarse en esta investigación es hidrosoluble, en consecuencia, ingresaría a la célula por un mecanismo activo del tipo pinocitosis, en contraste con la difusión pasiva de los compuestos moleculares vanadilo. Además, el carácter parcialmente iónico de los enlaces del agente activo VO^{2+} a los grupos carboxilato COO^- conduciría a un mecanismo hidrolítico de biofisión del agente antidiabético en el interior del lisosoma por cambio de pH, permitiendo que la ruptura enzimática sea más rápida en comparación a la enzimática de una unión covalente.

4.2 Síntesis del polímero precursor, polisuccinimida (PSI)

En el presente trabajo la polisuccinimida (PSI) será preparada siguiendo el método de Neri y colaboradores^{45, 46} con ciertas modificaciones. Se realizará la polimerización térmica del

monómero DL-ácido aspártico en presencia de H_3PO_4 como catalizador ácido entre 160 – 180 °C por tres horas de reacción.

El proceso de polimerización ocurre por reacciones de condensación en dos etapas. Primero, una intermolecular entre un grupo amino de una molécula de ácido aspártico y un hidroxilo de los grupos carboxílicos de otra molécula de ácido aspártico, formando los enlaces amida. Este paso es catalizado por el H_3PO_4 (**Figura 12, (1)**). La segunda reacción intermolecular involucra la pérdida de otra molécula de agua por reacción del nitrógeno amida y el hidroxilo de un grupo carboxílico conduciendo a la formación de la succinimida (**Figura 12, (2)**).⁴⁷

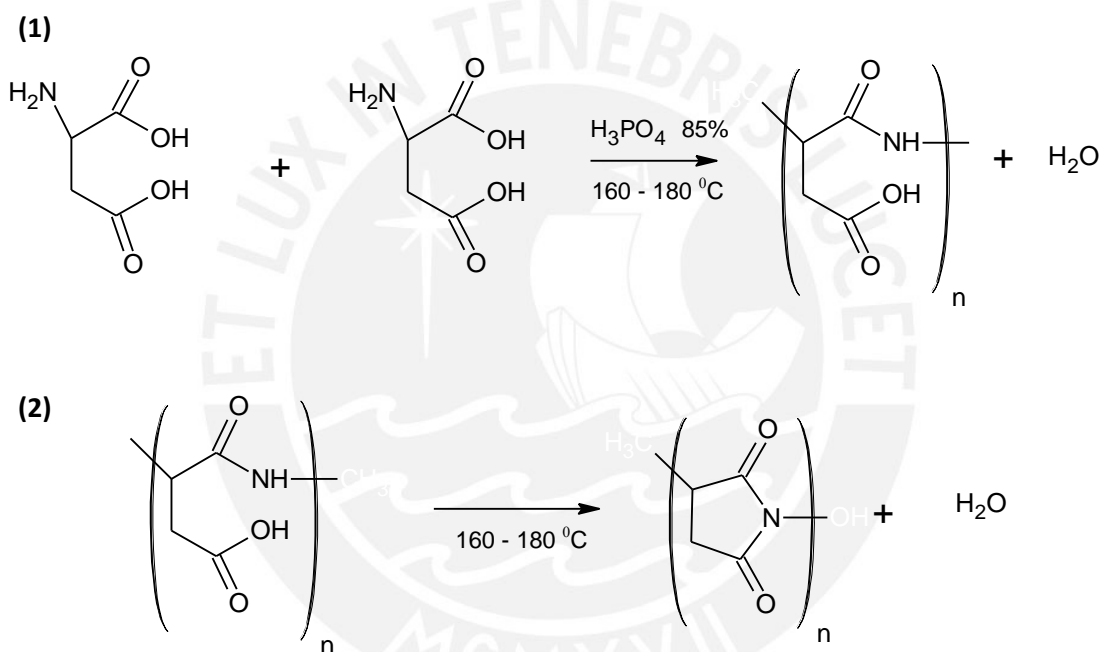


Figura 12. Síntesis de la polisuccinimida (PSI)

En el presente trabajo la polisuccinimida será caracterizada por espectroscopía FT-IR, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HSQC y HMBC.

Se realizarán modificaciones del método ejecutado en cuanto al número de moles del H_3PO_4 85%, la temperatura y el tiempo de reacción. Además, se realizará una reacción particular de la polisuccinimida con el reactivo N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC).

4.3 Síntesis de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico)

En este trabajo se va a realizar la síntesis de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) a partir de la hidrólisis básica de la polisuccinimida con NaOH 2 M, pH 11,5 – 12,5. La reacción se realizará con agitación por tres horas y a temperatura ambiente como ha sido reportado por Shinoda y colaboradores para una hidrólisis alcalina de una muestra de PSI.⁴⁸ La solución polimérica será finalmente dializada y liofilizada.

En la **Figura 13** se presenta la reacción de síntesis de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico). Mediante la hidrólisis alcalina de la polisuccinimida ocurre la apertura del anillo para formar unidades α -amida y β -amida.

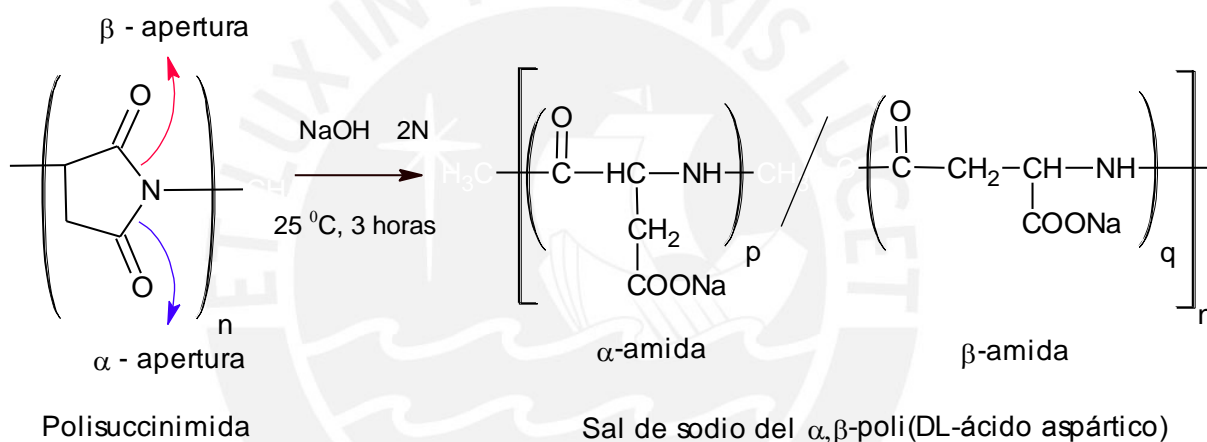


Figura 13. Síntesis de la sal del α,β -poli(DL-ácido aspártico)

En el presente trabajo la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) será caracterizada por espectroscopía FT-IR, ^1H -RMN (temperatura ambiente y a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$), ^{13}C -RMN, COSY (temperatura ambiente y a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$), HSQC y HMBC.

Se realizarán variaciones al método desarrollado en cuanto al pH de la hidrólisis básica y la temperatura de reacción.

4.4 Síntesis del α,β -poli(DL-ácido aspártico)

El α,β -poli(DL-ácido aspártico) se sintetizará a partir de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico). La solución polimérica de la sal, pH 9 - 10, será ajustada a pH 3 con HCl 35 %. Este pH garantiza que el polímero esté completamente protonado dado que el pKa de esta macromolécula es 4,87.⁴⁹ Finalmente, la solución ácida del polímero será dializada para obtener el producto α,β -poli(DL-ácido aspártico).

El α,β -poli(DL-ácido aspártico) será caracterizado por FT-IR, ¹H-RMN (temperatura ambiente y a 60 °C) y ¹³C-RMN.

4.5 Determinación del peso molecular de la polisuccinimida y de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico).

El peso molecular de la polisuccinimida será determinada por cromatografía de permeación por gel (GPC) en el Instituto de Investigación de Polímeros de Dresden, Alemania y de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) se determinará por viscosimetría intrínseca o capilar.

El método GPC involucra la permeación de una solución polimérica a través de una columna empacada con esferas de poliestireno entrecruzado de diferentes diámetros de poro. Las moléculas pasan a través de la columna, a través de las esferas y a través del volumen entre las esferas (volumen intersticial). El transporte por el volumen intersticial es más rápido que a través de los poros de las esferas. Las moléculas más pequeñas, en la columna, penetran todas las esferas debido a que su volumen hidrodinámico es más pequeño que el tamaño del poro de dichas esferas. Por otro lado, las moléculas de polímero más grandes no penetran todas las esferas porque su tamaño molecular es más grande que el tamaño del poro de algunas de ellas. Por lo tanto, el transporte será más rápido a través del volumen intersticial. El tiempo que las moléculas de polímero pasan a través de la columna disminuye con el incremento del peso molecular. Además, mediante el uso de un apropiado detector (índice de refracción, dispersión de la luz y otros) se puede medir la cantidad de polímero que pasa a través de la columna como una función del tiempo. Esta información y una calibración de la columna con muestras de polímero

estándar de peso molecular conocido permiten obtener la distribución del peso molecular, a partir del ploteo fracción de peso w_x y peso molecular M_x , obteniéndose los valores de peso molecular promedio en número (M_n) y de peso molecular promedio en peso (M_w).⁵⁰

El peso molecular promedio en número, M_n , es el peso total de todas las moléculas poliméricas contenidas en una muestra, dividido por el número total de moléculas poliméricas en dicha muestra. El peso molecular promedio en peso, M_w , está más bien dominado por las moléculas de mayor tamaño que aportan la mayor parte de la masa total de la muestra polimérica. Por lo tanto, M_w es siempre mayor que M_n .

La relación de los dos pesos moleculares M_w/M_n , la cual depende de la amplitud de la curva de distribución, se usa como una medida de la polidispersidad en un polímero. El valor de M_w/M_n de uno indica que el polímero es monodisperso. Sin embargo, si es mayor a la unidad indica que el polímero es polidisperso.

El método de viscosimetría intrínseca o capilar se basa en la relación directa existente entre el peso molecular de un polímero y su viscosidad intrínseca. A partir de las medidas de la viscosidad relativa de una serie de soluciones diluídas del polímero en cuestión en un solvente apropiado, se determina la viscosidad intrínseca, $[\eta]$, de la solución polimérica. Dada la influencia no solo del tamaño sino también de la forma, del solvente y de la temperatura, sobre la $[\eta]$, no existe una relación simple para el cálculo directo del peso molecular promedio real a partir de las medidas de viscosidad. Sin embargo, la ecuación de Mark-Houwink permite calcular un peso molecular promedio, M_v , a partir de la viscosidad intrínseca:

$$[\eta] = K \cdot M_v^a$$

Las constantes K y a son específicas para cada combinación de polímero y solvente. En este trabajo se tomarán para K y a los valores 0,0506 g/mL y 0,656, respectivamente, a 25 °C, correspondientes a la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico).^{51, 52}

Por otro lado, el peso molecular obtenido por viscosidad, M_v , se acerca más al promedio en peso que al promedio en número. Este peso, M_v , dista en un 10 a 20 % del peso molecular promedio real (M_w). Además, en general se cumple que $M_w < M_v < M_n$.⁵⁰

4.6 Síntesis del complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico)

En este trabajo el complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) será sintetizado por combinación de una solución diluida del polímero con soluciones de $\text{VOSO}_4 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$, ambas de diferentes concentraciones. El reactivo $\text{VOSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ fue adquirido comercialmente y previamente a su uso para la síntesis del complejo se requerirá determinar el número de moléculas de agua gravimétricamente por calcinación del reactivo. Se emplearán las relaciones 2 : 1 y 3 : 1 moles de meros (unidad repetitiva) del polímero por mol de catión vanadilo (VO^{2+}), las cuales son fundamentadas por las investigaciones de los autores Hu y Daniel.^{34, 53} Además, la técnica de la síntesis del complejo será desarrollada en base al trabajo de Sakurai y colaboradores.^{36, 37} Por otro lado, la caracterización del conjugado vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) será por espectroscopía FT-IR, $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$, UV-Visible y para la determinación del contenido de vanadio se usará el método de tratamiento de la muestra y análisis por espectroscopía de plasma acoplado inductivamente (ICP) reportado por Sakurai y colaboradores.^{36, 37} Finalmente, la síntesis del complejo será sometida a variaciones en cuanto al pH final de la mezcla de reacción, a las relaciones molares de moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo, a diferentes diluciones de las soluciones del polímero y de la sal de vanadio ($\text{VOSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) y, por último, a la temperatura de reacción.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Materiales, Equipos y Reactivos

Materiales y Equipos

Los espectros UV-Visible fueron medidos en un espectrofotómetro Perkin Elmer, Modelo Lambda 2 (Shelton, Connecticut, EE.UU).

Los espectros infrarrojo fueron medidos en los espectrofotómetros FT-IR Perkin Elmer, Modelos : Serie 1600 y Spectrum 100 (Shelton, Connecticut, EE.UU).

Los espectros de resonancia magnética nuclear han sido medidos en el espectrómetro Bruker de 300 MHz, Modelo: UltraShield™ (Rheinstetten, Baden-Württemberg Alemania).

La calcinación del $\text{VO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ fue realizada en una mufla no electrónica.

La determinación del contenido de vanadio fue hecha mediante con un espectrómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP) OPTIMA 3000 Perkin Elmer, Modelo : DV (Shelton, Connecticut, EE.UU).

La determinación del contenido de vanadio también se realizó por análisis de activación neutrónica utilizando el detector semiconductor Canberra, Modelo: GC7019 (Concord, Ontario, Canadá) y por fluorescencia de rayos X en el Departamento de Química de la Dirección de Investigación y Desarrollo del Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN).

La liofilización de las muestras fue realizada en un liofilizador Labconco, Modelo: LYPH LOCK 4.5 (Kansas, Missouri, EE.UU.)

Las medidas de pH fueron determinados con un pH-metro y conductímetro Metler-Toledo, Modelo: Seven Multi pH (mV/ORP) (Columbus, Ohio, EE.UU).

La síntesis del polímero precursor fue realizado sobre una plancha Fisher Scientific Type 2200, Modelo: HP-A223 OM. Temperatura máxima: 300 °C; potencia : 1600 watts; voltaje : 240 voltios (Hampton, New Hampshire, EE.UU).

La síntesis del polímero precursor se llevó a cabo bajo vacío usando una bomba de vacío Leybold AG, Modelo DIVAC 2.2L. Presión máxima: 1 bar; potencia: 0,230 Kw; voltaje:

115 voltios; frecuencia: 60 Hz; amperaje: 3,2 amperios (Cologne, North Rhine-Westphalia, Alemania).

El secado del polímero precursor a 110 °C tuvo lugar en una estufa Ecocell 55, Modelo LSIS-B2V / EC 55 (Planegg, Bavaria, Alemania).

Las viscosidades del polímero precursor y del ligando polimérico fueron medidas en el viscosímetro Schott, Modelo: Ubbelohde tipo I. Capacidad: 15 a 20 mL y longitud aproximada: 290 mm (Mainz, Renania-Palatinato, Alemania).

Las medidas de viscosidad fueron realizadas a una temperatura de 25 °C, la cual fue regulada con un baño termostático FisherBrand, modelo: FBH-604. Precisión: +/- 0.1 °C (Waltham, Massachusetts, EE.UU.).

La diálisis del ligando polimérico fue realizada a través de las membranas de Spectrum Laboratories Inc., Spectra/Por® Membranas MWCO poro 4 de 12-14 KDa (Rancho Domínguez, California, EE.UU.)

La determinación del peso molecular del polímero precursor por cromatografía de permeación por gel (Gel Permeation Chromatography, GPC) fueron determinados en el Instituto de Dresden en Alemania. Se usó la columna 2 Zorbax PSM Trimodal-S y el detector de índice de refracción.

El secado de las muestras de complejos, en un desecador bajo vacío y a temperatura ambiente, fue llevado a cabo con una bomba de vacío KNF NEUBERGER, modelo UN 726.3 FTP. Voltaje: 230 voltios; frecuencia: 50 HZ y amperaje : 1 amperio (Trenton, New Jersey, EE.UU.)

La síntesis del polímero precursor requirió el uso del gas nitrógeno (UHP), de Praxair (Callao, Perú).

El congelamiento de las muestras se realizó mediante nitrógeno líquido, de AGA (Callao, Perú).

Reactivos

De Sigma-Aldrich (Steinheim, North Rhine-Westphalia, Alemania):

D,L- ácido aspártico 99 % TLC

Sulfato de vanadilo hidratado 97 % ($\text{VOSO}_4 \cdot \text{XH}_2\text{O}$)

De Aldrich (Milwaukee, Wisconsin, EE.UU.):

1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC)

De Merck (Darmstadt, Hesse, Alemania):

Hidróxido de sodio (NaOH)

Ácido acético glacial

Ácido clorhídrico fumante 37 % (HCl)

De Sigma-Aldrich (Seelze, Baja Sajonia, Alemania):

Ácido fosfórico 85 % (H_3PO_4)

Cloruro de litio (LiCl)

De J.T. Baker (Phillipsburg, New Jersey, EE.UU.):

Bromuro de sodio (NaBr)

Los solventes empleados fueron los que se mencionan a continuación:

De J.T. Baker (Phillipsburg, New Jersey, EE.UU.)

N,N-dimetilformamida (DMF)

Acetona p.a.

Acetato de etilo

Éter de petróleo

Cloroformo

Etanol absoluto

Anhidrido acético

Tetrahidrofurano (THF)

Acetonitrilo

De Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, New Jersey, EE.UU.)

Dimetil sulfóxido (DMSO)

De Tedia (Fairfield, Ohio, EE.UU)

Metanol

De Merck (Darmstadt, Hesse, Alemania)

Hexano

Diclorometano

De Sigma-Aldrich (Steinheim, North Rhine-Westphalia, Alemania)

Tolueno

De Riedel-de Haën (Seelze, Lower Saxony, Alemania)

1,4-Dioxano

5.2 Metodología**5.2.1 Polisuccinimida (PSI) – Polímero Precursor****5.2.1.1 Síntesis**

En un balón de 500 mL (parte del equipo de policondensación) calentado en un baño de aceite de silicona a 170 a 180 °C por 5 minutos, se añade 10 gramos del monómero DL-ácido aspártico ($7,5159 \times 10^{-2}$ moles) y 3,2 mL de H_3PO_4 85 % (5,3920g; $5,5020 \times 10^{-2}$ moles). Luego de agitar con una espátula y de calentar por 5 minutos, se aplica un vacío de 10,5 mmHg. La reacción se detiene al cabo de tres horas (**Figura 14, a**) y en caliente se agrega 100 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) bajo atmósfera de nitrógeno. Se deja en agitación, a temperatura ambiente, de un día para otro hasta disolución completa del polímero. La solución resultante se filtra (**Figura 14, b**) y, para la purificación del polímero se aplica una técnica de precipitación sucesiva (**Figura 14, c**). Esta consiste en verter lentamente la solución polimérica en 500 mL de agua. El precipitado obtenido es filtrado y enjuagado con abundante agua hasta pH neutro. Se seca a 60 °C, y se muele

hasta obtener un polvo muy fino. Nuevamente, se disuelve este producto en 100 mL de DMF y se realiza una segunda precipitación en 500 mL de agua, seguida de la correspondiente filtración y lavado con aproximadamente 3 litros de agua. El producto es secado a 110 °C por aproximadamente 72 horas. Se obtiene 6,2 a 6,5 gramos del producto, un sólido beige (**Figura 14, d**). Rendimiento: 85 – 89 %. El producto es caracterizado por espectroscopía IR en pastilla de KBr y por resonancia magnética nuclear ¹H-RMN, ¹³C-RMN, COSY, HSQC y HMBC en el solvente DMSO.

Solubilidad :

A altas temperaturas (cercana al punto de ebullición) es soluble en DMF y DMSO.

A temperatura ambiente es ligeramente soluble en DMF y en DMSO e insoluble en agua, tetrahidrofurano y en etanol.

IR (KBr) cm⁻¹ :

3597,9 – 3489,72 - 3425,5 (νO-H del COOH terminal ; νO-H del H₂O y νN-H, de la amina terminal) ; 2994,7 (ν_{as}CH₂ del C-H) ; 2952,35 (ν_sCH₂, C-H del grupo CH₂) ; 1801 (ν_sC=O del anillo imida) ; 1710,33 (ν_{as}C=O del anillo imida) ; 1632 (δO-H del H₂O) ; 1393,35 (t_sCH₂, C-H del CH₂) ; 1360,8 (t_{as}CH₂, C-H del CH₂) ; 1289,21 (ν_{as}C-N-C del anillo imida) ; 1258,5 (ν_sC-N-C del anillo imida) ; 1218,16 - 1164,82 (δCH₂, C-H en el plano del CH₂) ; 1051,8 (δCH₂, C-H en el plano del CH₂ y δanillo imida fuera del plano) ; 1031,3 (νC-C de los grupos metino y metileno del anillo imida y δCH₂, C-H en el plano del CH₂) ; 935,52 - 912,3 – 877,46 (δanillo imida en el plano) ; 807,79 - 775,86 - 763,83 (δCH₂, C-H en el plano del CH₂ y δanillo imida fuera del plano) ; 701,91 – 637,76 (δ_{as}(C=O)-N fuera del plano del anillo imida) ; 582,81 (ν_sC-N-C del anillo imida y ν_sC=O del anillo imida) ; 563,95 (δ_s(C=O)-N fuera del plano del anillo imida y δCH₂, C-H en el plano del CH₂) ; 508,51 (δ(C=O)-N en el plano del anillo imida y δanillo imida en el plano).

ν : estiramiento ; ν_{as} : estiramiento asimétrico ; ν_s : estiramiento simétrico ; δ : flexión ;

δ_s : flexión simétrico ; δ_{as} : flexión asimétrico ; t_s : tijereteo simétrico ; t_{as} : tijereteo asimétrico

¹H-RMN (DMSO) δ (ppm) :

2,70 - 3,22 (s, 1H, CH₂) ; 5,27 (s, 1H, CH)

^{13}C -RMN (DMSO) δ (ppm) :

33,22 (s,1C, CH_2) ; 47,77 (s,1C, CH) ; 172,63 - 173,95 (s,1C, C=O)

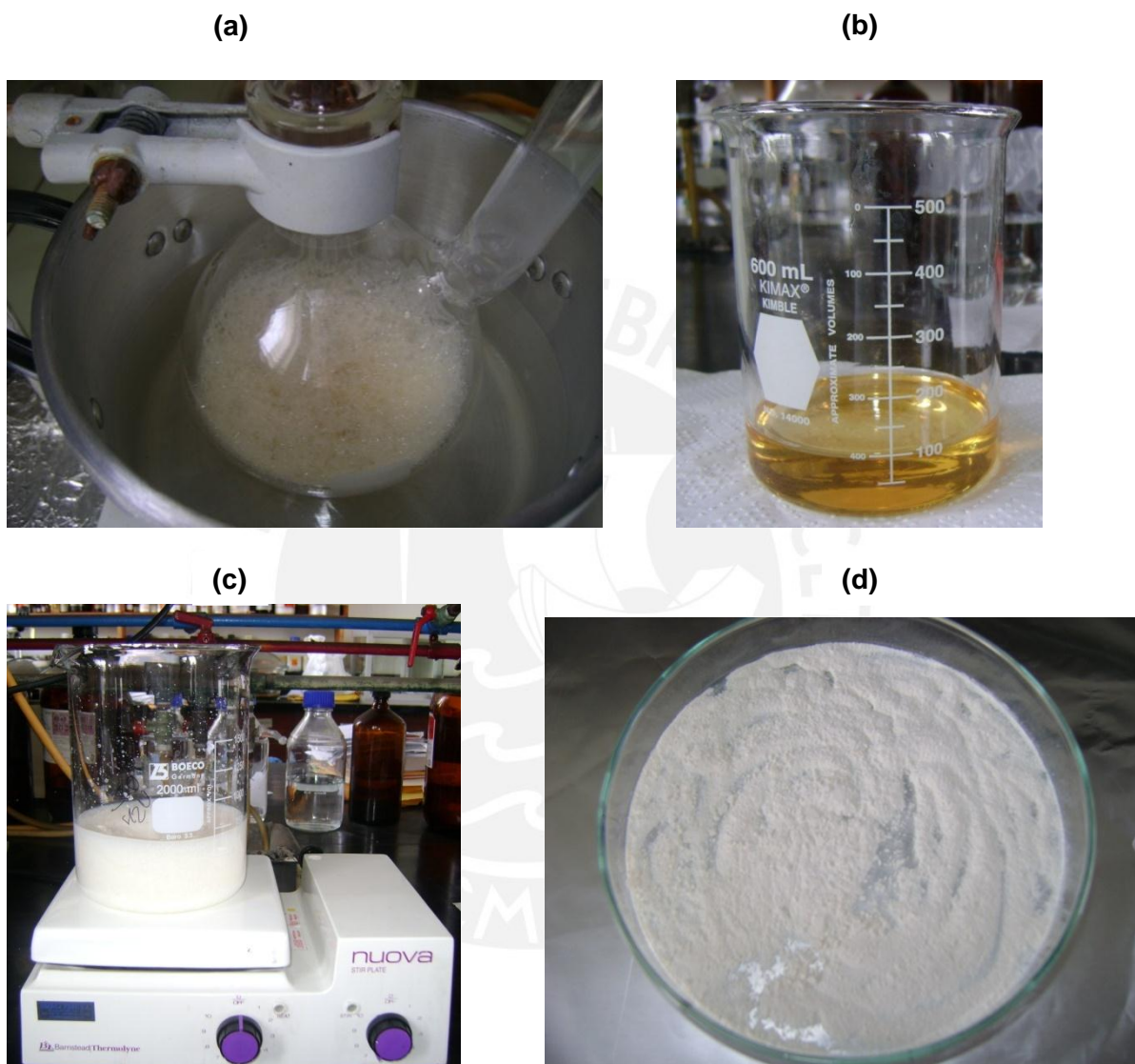


Figura 14. PSI formado después de tres horas de reacción (a) ; PSI disuelto en DMF (b) ; Precipitación del PSI en agua (c) y PSI (producto final) (d)

5.2.1.2 Determinación del peso molecular de la polisuccinimida por cromatografía de permeación por gel (Gel Permeation Chromathography, GPC)

Se realizó en el Instituto de Investigación de Polímeros de Dresden, Alemania.

Condiciones:

Columna : 2 Zorbax PSM Trimodal-S

Eluyente : Dimetilacetamida (DMA) conteniendo 2 % v/v H₂O y 3 g/L LiCl

Velocidad de flujo : 0,5 mL/min

Detector : Índice de refracción

Concentración del polímero : 2 mg/mL

Estándar : poli (propileno-co-anhídrido maleico)

5.2.1.3 Incremento del peso molecular de la polisuccinimida

Incremento del peso molecular de la polisuccinimida con 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC)

Se realizaron ocho reacciones con la relación 20 mg de DCC por gramo de polímero partiendo de diferentes pesos de PSI y con diferente peso molecular. A continuación se detalla la síntesis de reacción para una polisuccinimida de partida de 61,5 kDa.

Síntesis

Se pesan 5 gramos de polisuccinimida de 61,5 kDa. La muestra es disuelta en 25 mL de DMF y se mantiene en agitación por 14 horas a temperatura ambiente. Esta solución es luego filtrada y precipitada en agua. El precipitado obtenido se filtra y se enjuaga con abundante agua y etanol. El producto es secado a 110 °C por 72 horas. Se obtiene un polvo de color blanco, cuya solubilidad es igual a la del PSI de partida. El rendimiento se encuentra en el rango de 90 a 94 %. La caracterización es realizada por espectroscopía FT-IR en pastilla de KBr y por resonancia magnética nuclear ¹H-RMN, ¹³C-RMN y COSY en el solvente DMSO.

Determinación del peso molecular de la polisuccinimida tratada con DCC por Cromatografía de Permeación por Gel (Gel Permeation Chromathography, GPC)

Se realizó en el Instituto de Investigación de Polímeros de Dresden, Alemania.

Condiciones:

Columna : 2 Zorbax PSM Trimodal-S

Eluyente : Dimetilacetamida (DMA) conteniendo 2 % v/v H₂O y 3 g/L LiCl

Velocidad de flujo : 0,5 mL/min

Detector : Índice de refracción

Concentración del polímero : 2 mg/mL

Estándar : poli (propileno-co-anhídrido maleico)

Incremento del peso molecular de la polisuccinimida variando las condiciones de reacción de la síntesis

Se ensayaron tres nuevas síntesis de la polisuccinimida variando las condiciones de reacción respecto al número de moles del ácido fosfórico (H₃PO₄ 85 %), tiempo de reacción y temperatura.

En la **Tabla 1**, en los cuadros sombreados, se puede observar las variaciones de la reacción original de la síntesis de la polisuccinimida.

Tabla 1. Ensayos del incremento del peso molecular del PSI variando las condiciones de reacción

Condiciones de reacción	Síntesis original	Síntesis 1	Síntesis 2	Síntesis 3
Peso del DL-ácido aspártico (g)	10	10	10	10
Moles del DL-ácido aspártico (mol)	0,0751	0,0751	0,0751	0,0751
Peso del H ₃ PO ₄ (g)	5,3920	10,1764	10,4397	5,2220
Moles del H ₃ PO ₄ 85% (mol)	0,0550	0,1038	0,1065	0,0533
Temperatura de reacción (°C)	180	180	180	239
Tiempo de calentamiento antes de aplicar el vacío (min)	5	5	5	5
Tiempo de reacción (h)	3	1,5	3	3
Tiempo de secado a 110 °C (h)	72	72	72	72

5.2.2 Ligando polimérico : sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico)

5.2.2.1 Síntesis

Se agregan a 1,5 gramos de polisuccinimida la cantidad de agua apropiada para formar una pasta, luego se basicifica con NaOH 2 M hasta pH 11,5 -12,5 y se deja reaccionar por tres horas bajo agitación a temperatura ambiente. La solución es filtrada para eliminar cualquier impureza. Esta solución filtrada es dializada a través de la membrana de diálisis (Spectra/Poro 4 con MWCO 12 – 14 kDa) en agua destilada por dos días haciendo cambios de agua en intervalos de tres a cuatro horas, con el fin de eliminar impurezas,

restos de solvente, monómero sin reaccionar, así como la fracción de polímeros de bajo peso molecular. Luego, la solución dializada es liofilizada. Se obtiene un polvo de color blanco. Rendimiento: 84 – 94 %. El producto es caracterizado por FT-IR en pastilla de KBr y por resonancia magnética nuclear ^1H -RMN (temperatura ambiente y a 60 $^{\circ}\text{C}$), ^{13}C -RMN, COSY (temperatura ambiente y a 60 $^{\circ}\text{C}$), HMBC, y HSQC en el solvente D_2O .

Solubilidad :

A temperatura ambiente es soluble en agua e insoluble en etanol y metanol.

IR (KBr) cm^{-1} :

3405,37 ($\nu_{\text{N-H}}$ del grupo amida) ; 3076,5 ($\nu_{\text{as}}\text{C-H}$ del CH_2) ; 2937,5 ($\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$, C-H del CH_2) ; 1671,4 ($\nu\text{C=O}$ de la amida I) ; 1595,73 ($\nu_{\text{as}}\text{C=O}$ del COO^-) ; 1527,4 ($\delta_{\text{N-H}}$ en el plano de la amida II y $\nu\text{C-N}$ de la amida III) ; 1397,43 ($\nu_{\text{s}}\text{C=O}$ del COO^- y $t_{\text{s}}\text{CH}_2$, C-H en el plano del CH_2) ; 1317,21 ($\nu_{\text{s}}\text{C=O}$ del COO^- y ωCH_2 , C-H del CH_2) ; 1283,9 (τCH_2 , C-H del CH_2) ; 1245,2 ($\nu\text{C-O}$ del COO^-) ; 1195,76 ($\delta\text{C-H}$ en el plano) ; 1124,29 ($\nu\text{C-N}$) ; 1062,6 - 1000,40 - 932,7 ($\nu\text{C-C}$) ; 873,41 (ρCH_2 , C-H fuera del plano del CH_2) ; 804,25 – 658,53 ($\omega_{\text{N-H}}$ fuera del plano de la amida II) ; 533,04 ($\delta\text{C=O}$ fuera del plano del grupo amida).

ν : estiramiento ; ν_{as} : estiramiento asimétrico ; ν_{s} : estiramiento simétrico ; δ : flexión ;
 $\bar{\delta}_{\text{s}}$: flexión simétrico ; $\bar{\delta}_{\text{as}}$: flexión asimétrico ; t_{s} : tijereteo simétrico ; t_{as} : tijereteo asimétrico
 ρ : balanceo ; τ : torsión ; ω : meneo

^1H -RMN (D_2O) δ (ppm) :

2,64 - 2,58 - 2,50 - 2,44 - 2,42 (s, 2H, CH_2) ; 4,33 - 4,35 (s, 1H $_{\beta}$, CH) ; 4,53 (s, 1H $_{\alpha}$, CH)

^1H -RMN (D_2O) δ (ppm) a 60 $^{\circ}\text{C}$:

3,08 - 3,01 - 2,95 - 2,91 - 2,89 (s, 2H, CH_2) ; 4,80 (s, 1H $_{\beta}$, CH) ; 4,99 (s, 1H $_{\alpha}$, CH)

^{13}C -RMN (D_2O) δ (ppm) :

37,58 - 39,06 (s, 1C, CH_2) ; 51,60 – 52,04 (s, 1C, CH) ; 171,92 - 173,36 (s, 1C, C=O de la amida) ; 177,50 - 178,06 (s, 1C, C=O del grupo $-\text{COONa}$).

5.2.2.2 Determinación del peso molecular de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) por el método de viscosimetría intrínseca o capilar.

Se preparan 0,5 litros de una solución acuosa de NaBr 0,5 M. Luego, en esta solución se disuelve la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico). Se preparan cinco soluciones de diferentes concentraciones de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) en el rango de 0,002 - 0,01 g/mL. Estas concentraciones son: 0,002; 0,004; 0,006; 0,008 y 0,01 g/mL, ajustando a cada concentración a un pH de 7,3. Se determina el tiempo de flujo, t_o , del solvente NaBr 0,5 M a 25 °C. Luego se continúa con los siguientes pasos:

1. Se enjuaga el viscosímetro con el solvente y se llena el bulbo grande con este solvente (por uno de los orificios de la parte superior) hasta que el nivel del solvente se iguale en ambos brazos a la altura de las marcas (**Figura 15**).
2. Se introduce el viscosímetro de Ubbelohde dentro de la chaqueta de vidrio con agua, previa estabilización de la temperatura del baño a 25 °C.
3. Se coloca, con cuidado y en posición vertical, el viscosímetro dentro de la chaqueta de vidrio con agua, y se deja por 15 minutos hasta que se equilibre a la temperatura de trabajo a 25 °C.
4. Para hacer subir al solvente por el capilar, se tapan los dos orificios de la parte superior del viscosímetro y se succiona la muestra con una propipeta por el orificio que queda libre. Se continúa la operación hasta que el líquido se ubique por encima de la parte superior de la línea de tiempo. Se debe evitar que la solución llegue a la boca de la propipeta porque esto podría contaminar el solvente. Asimismo es muy importante que no existan burbujas en el capilar o en los bulbos.
5. Después se libera la succión, y se mide el tiempo que demora en pasar el fluido del solvente desde la línea de tiempo superior a la línea de tiempo inferior. Se repite el procedimiento hasta que los valores de tiempo sean muy cercanos.

6. Se retira el viscosímetro de la chaqueta de vidrio, eliminando el solvente y se procede a determinar los tiempos de flujo, t , de las soluciones poliméricas. Se llena primero el viscosímetro con aproximadamente 5 mL de la solución menos concentrada para enjuagar. Luego se llena con la solución en cuestión y se sigue el mismo procedimiento del punto 5.

7. Cuando se termina de trabajar con la solución menos concentrada, se retira el viscosímetro de la chaqueta de vidrio y se elimina la solución. Se enjuaga el viscosímetro primero con el solvente y luego con unos 5 mL de la segunda solución, de mayor concentración que la primera. Se llena el viscosímetro con esta solución y se procede a trabajar como en el punto 5.

8. De manera análoga se trabaja con la tercera, cuarta y quinta solución, siendo esta última la de mayor concentración.

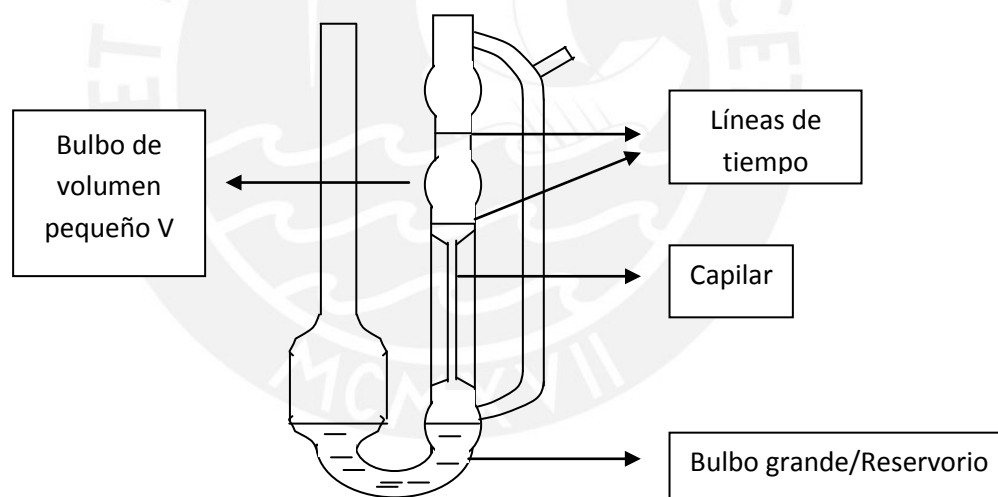


Figura 15. Viscosímetro Ubbelohde

5.2.2.3 Ensayos previos de síntesis de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico)

Antes de utilizar el método de Shinoda y colaboradores⁴⁸ para la síntesis de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) y establecer el rango de pH 11,5 – 12,5 como el óptimo del PSI para la hidrólisis básica, se ensayaron otras condiciones de reacción. Se realizaron dos síntesis, ambas a pH 14, una a 0 °C^{54, 55, 56} y otra a temperatura ambiente. Las condiciones específicas de reacción y el rendimiento se muestran en la **Tabla 2**. Los productos obtenidos son caracterizados por ¹H-RMN y ¹³C-RMN en el solvente D₂O.

Tabla 2. Condiciones de síntesis de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico)

Tipo de hidrólisis básica	Peso del PSI (g)	Moles Del PSI (mol)	Peso de NaOH (g)	Moles De NaOH (mol)	Tiempo De Reacción (h)	Temperatura (°C)	pH	%Rendimiento
1	2	0,0206 (1 eq.)	0,9359	0,0234 (1,13 eq.)	1	0 (baño de hielo)	14 ó más	89,13
2	1,1364	0,0117	-	-	3	25	14	91,09

5.2.3 Síntesis del α,β -poli(DL-ácido aspártico)

A un gramo de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) se le agrega la mínima cantidad de agua hasta disolución, el pH de esta solución es de 9 a 11, luego se le lleva a pH 3 con HCl 35 % y se liofiliza. Se obtiene 0,78 gramos de un polvo blanco. Rendimiento: 42,1 %. El producto es caracterizado por espectroscopía FT-IR en pastilla de KBr y por ¹H-RMN (temperatura ambiente y a 60 °C) y ¹³C-RMN en el solvente D₂O.

Solubilidad :

A temperatura ambiente es soluble en agua e insoluble en etanol y metanol.

IR (KBr) cm^{-1} :

3354,48 (ν N-H del grupo amida y ν O-H del grupo COOH) ; 3074,49 ($\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$, C-H del CH_2) ; 2942,58 ($\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$, C-H del CH_2) ; 1728,17 ($\nu\text{C}=\text{O}$ del COOH) ; 1661,79 ($\nu\text{C}=\text{O}$ de la amida I) ; 1531,84 (δ N-H en el plano de la amida II) ; 1402,09 (δ O-H en el plano del COOH) ; $\nu\text{C}-\text{N}$ de la amida III y $t_{\text{s}}\text{CH}_2$, C-H en el plano del CH_2) ; 1340,2 (ωCH_2 , C-H del CH_2) ; 1281,8 ($\nu\text{C}-\text{O}$ del COOH y τCH_2 , C-H del CH_2) ; 1227,54 ($\nu\text{C}-\text{O}$ del COOH) ; 1190 ($\nu\text{C}-\text{O}$ del COOH y $\delta\text{C}-\text{H}$ en el plano) ; 1130,59 ($\nu\text{C}-\text{N}$) ; 1053,1 – 997,03 ($\nu\text{C}-\text{C}$) ; 913,15 (δ O-H fuera del plano del COOH) ; 847,84 (ρCH_2 , C-H fuera del plano del CH_2) ; 799,77 ($\nu\text{C}-\text{C}$ y $\omega\text{N}-\text{H}$ fuera del plano de la amida II) ; 762,73 - 639,10 ($\omega\text{N}-\text{H}$ fuera del plano de la amida II) ; 531,60 ($\delta\text{C}=\text{O}$ fuera del plano del grupo amida).

$^1\text{H}-\text{RMN}$ (D_2O) δ (ppm) :

2,76 (s, 2H, CH_2) ; 4,62 (s, 1H $_{\beta}$, CH)

$^{13}\text{C}-\text{RMN}$ (D_2O) δ (ppm) :

35,84 - 36,87 (s, 1C, CH_2) ; 49,94 (s, 1C, CH) ; 171,68 - 172,25 (s, 1C, C=O de la amida) ; 174,29 - 174,88 (s, 1C, C=O del grupo -COOH).

5.2.4 Análisis gravimétrico de la determinación de moléculas de agua en el reactivo sulfato de vanadilo hidratado ($\text{VOSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) por calcinación

Curado de los crisoles

Se colocan tres crisoles de porcelana en la mufla no electrónica a la temperatura de 150 °C por quince minutos. Luego, la temperatura asciende de 150 a 250 °C y permanece así por media hora. A continuación, la temperatura asciende progresivamente a 350; 450; y 550 °C, manteniéndose para cada una de estas temperaturas por media hora. Después, la temperatura asciende de 550 a 600 °C y permanece en este valor por dos horas. Por

último, se retiran los crisoles y se dejan enfriar en un desecador por media hora, al final de la cual los crisoles son pesados.

Calcinación del reactivo sulfato de vanadilo hidratado ($\text{VOSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$)

Una cantidad de 60 mg de $\text{VOSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ se coloca en cada crisol de porcelana curado y se trata en la mufla no electrónica. El procedimiento de calcinación es el mismo que se realiza para el curado de los crisoles.

5.2.5 Complejo de vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico)

5.2.5.1 Primer método (2 moles de meros del polímero : 1 mol de VO^{2+})

a. Variaciones en la concentración de la solución polimérica y de la solución de $\text{VOSO}_4 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$

a.1 Concentración de la solución polimérica 1 % y de la solución de $\text{VOSO}_4 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ 36,5 mM.

Sobre 20 mL de una solución acuosa (1 %) de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) (PM = 27 - 30 kDa) a pH 4 se agrega gota a gota 20 mL de una solución acuosa de 36,5 mM de sulfato de vanadilo ($\text{VOSO}_4 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$), pH 3, la mezcla final tiene un pH de 2,5 y por adición de NaOH 1 M se ajusta el pH a 3. Se observa desde el inicio de la adición, la formación de una cantidad relativamente alta de un sólido azulino completamente insoluble, la que se incrementa al ajustar el pH a 3. Se deja en agitación a temperatura ambiente por 20 horas. Luego, se filtra, se separa el sólido insoluble y, a la solución, bajo un baño de hielo, se le agrega abundante acetona para precipitar el complejo. Se filtra y se lava con agua y acetona helada. El producto es secado en un desecador bajo vacío y a temperatura ambiente. Se obtiene 20 - 24 mg de un sólido de color gris-celeste. Rendimiento: 8,76 – 10,51 %. El producto es caracterizado por espectroscopía FT-IR en pastilla de KBr, UV-visible (H_2O), ^1H -RMN (D_2O) y por ICP.

Solubilidad :

Es soluble en agua produciéndose una solución de color amarillo.

Es insoluble en DMF, acetona, DMSO, acetonitrilo, metanol, etanol, etilenglicol, acetato de etilo, ácido acético, anhídrido acético, cloroformo, tolueno, diclorometano, dioxano, hexano, éter etílico, éter de petróleo y tetrahidrofurano.

IR (KBr) cm^{-1} :

3359,55 (ν N-H del grupo amida y ν O-H del H_2O) ; 3102,1 ($\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$, C-H del CH_2) ; 2941,2 ($\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$, C-H del CH_2) ; 1721,6 ($\nu\text{C}=\text{O}$ del COOH , residuo) ; 1640,64 ($\nu\text{C}=\text{O}$ de la amida I y la superposición $\nu_{\text{as}}\text{C}=\text{O}$ del COO^-) ; 1565,9 (δ N-H de la amida II y la superposición $\nu\text{C}-\text{N}$ de la amida III) ; 1403,82 ($\nu_{\text{s}}\text{C}=\text{O}$ del COO^- y la superposición de $t_{\text{s}}\text{CH}_2$, C-H en el plano del CH_2) ; 1316,7 ($\nu_{\text{s}}\text{C}=\text{O}$ del COO^- y la superposición ωCH_2 , C-H del CH_2) ; 1285,6 (τCH_2 , C-H del CH_2) ; 1244 ($\nu\text{C}-\text{O}$ del COO^-) ; 1197,4 (δ C-H en el plano) ; 1129,66 ($\nu\text{C}-\text{N}$) ; 1052,18 ($\nu\text{C}-\text{C}$) ; 981,82 ($\nu\text{V}=\text{O}$) ; 891,15 (ρCH_2 , C-H fuera del plano del CH_2) ; 792,54 - 667,98 (ω N-H fuera del plano de la amida II) ; 575,64 ($\delta\text{C}=\text{O}$ fuera del plano del grupo amida).

UV-visible (H_2O): Absorbe a 778 nm y a 614,80 nm. La solución tiene una concentración de 2 mg/mL y un pH 3.

$^1\text{H-RMN}$ (D_2O) δ (ppm):

2,742 (s, 2H, CH_2)

Contenido de vanadio por ICP:

%V : 16,79 % \pm 0,01

a.2 Concentración de la solución polimérica 2 % y de la solución de $\text{VOSO}_4 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ 73 mM.

Sobre 10 mL de una solución acuosa (2 %) de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) (PM = 27 - 30 kDa) a pH 4 se agrega gota a gota 10 mL de una solución acuosa de 73 mM de sulfato de vanadilo ($\text{VOSO}_4 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$), pH 3, la mezcla tiene un pH de

2,5 y por adición de NaOH 1 M se ajusta el pH a 3. Se prosigue de manera análoga al procedimiento descrito anteriormente en pág. 43 (empleando la mitad de la concentración de ambos reactivos), obteniéndose como producto el sólido de color gris celeste y con el mismo rendimiento. El producto es caracterizado por espectroscopía FT-IR en pastilla de KBr y por ICP.

No se observó ninguna variación en solubilidad con respecto al complejo anterior ni en el color de la solución acuosa.

El espectro IR indica que se obtuvo el mismo producto que en el caso anterior (pág. 43). Sin embargo, el análisis ICP mostró un contenido de vanadio ligeramente menor, de $16,55 \% \pm 0,01$.

5.2.5.2 Segundo método (3 moles de meros del polímero : 1 mol de VO²⁺)

a. Variaciones en el pH de la solución polimérica

a.1 pH del polímero igual a 4.

Sobre 10 mL de una solución acuosa (2 %) de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) (PM = 27 - 30 kDa) a pH 4 se agrega gota a gota 10 mL de una solución acuosa de 48,7 mM de sulfato de vanadilo (VOSO₄·2,5H₂O), pH 3, la mezcla tiene un pH de 2,5 y por adición de NaOH 1 M se ajusta el pH a 3. Se prosigue de manera análoga al procedimiento descrito anteriormente (pág. 43). Se obtiene 20 – 25 mg del sólido de color gris-celeste. Rendimiento: 9,24 – 11,55 %. El producto es caracterizado por espectroscopía FT-IR en pastilla de KBr, UV-visible (H₂O), ¹H-RMN (D₂O), ¹³C-RMN (D₂O) y por ICP.

No se observó ninguna variación en solubilidad con respecto a los complejos anteriores ni en el color de la solución acuosa.

El espectro IR y ^1H -RMN indica que se obtuvo el mismo producto que en el caso anterior (pág. 43).

Para este caso se realizó el análisis UV-Visible en agua a una concentración mayor que en el punto 5.2.5.1 a 9,6 mg/mL (pH 3) donde el complejo absorbe a 774,13 nm y a 601,41 nm.

Por otro lado, también se realizó un análisis de ^{13}C -RMN.

^{13}C -RMN (D_2O) δ (ppm) :

34,56 - 36,61 (s, 1C, CH_2) ; 49,76 (s, 1C, CH) ; 171,92 - 174,15 (s, 1C, C=O de la amida) ; 176,56 (s, 1C, C=O del grupo $-\text{COONa}$).

El análisis ICP mostró un contenido de vanadio de 12,65 - 13,71 % \pm 0,01.

a.2 pH del polímero igual a 6.

Sobre 10 mL de una solución acuosa (2 %) de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) (PM = 27 - 30 kDa) a pH 6 se agrega gota a gota 10 mL de una solución acuosa de 48,7 mM de sulfato de vanadilo ($\text{VOSO}_4 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$), pH 3, la mezcla tiene un pH de 4,5 y por adición de NaOH 1 M se ajusta el pH a 3. Se prosigue de manera análoga al procedimiento descrito anteriormente (pág. 43). Se obtiene 10,5 – 11,5 mg del sólido de color gris-celeste. Rendimiento: 4,85 – 5,31 %. El producto es caracterizado por FT-IR en pastilla de KBr y por ICP.

No se observó ninguna variación en solubilidad con respecto a los complejos anteriores ni en el color de la solución acuosa. Por otro lado, el espectro IR indica que se obtuvo el mismo producto que en el caso de la reacción llevada a cabo bajo las mismas condiciones pero a pH final 4. Sin embargo, el análisis ICP mostró un contenido de vanadio mayor 14,46 % \pm 0,01.

b. Variación en la concentración inicial del $\text{VOSO}_4 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ (24,4 mM) y de la solución polimérica (1,68 %)

Sobre 10 mL de solución acuosa (1,68 %) de la sal de sodio del α, β -poli(DL-ácido aspártico) (PM = 27 - 30 kDa) a pH 4 se agrega gota a gota 20 mL de una solución acuosa de 24,4 mM de sulfato de vanadilo ($\text{VOSO}_4 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$), pH 3, la mezcla tiene un pH de 2,5 y por adición de NaOH 1 M se ajusta el pH a 3. Se prosigue de manera análoga al procedimiento descrito anteriormente (pág. 43), obteniéndose 17,6 mg como producto el sólido de color gris celeste. Rendimiento: 9,68 %. El producto es caracterizado por FT-IR en pastilla de KBr y por ICP.

No se observó ninguna variación en solubilidad con respecto a los complejos anteriores ni en el color de la solución acuosa.

El espectro IR indica que se obtuvo el mismo producto que en el caso de la reacción llevada a cabo a mayores concentraciones (2 % y 48,7 mM del polímero y $\text{VOSO}_4 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$, respectivamente) y las mismas condiciones. Sin embargo, el análisis ICP mostró un contenido de vanadio ligeramente menor $12,45 \% \pm 0,01$.

c. Adición de la solución polimérica (2 %) sobre la solución del sulfato de vanadilo $\text{VOSO}_4 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ (48,7 mM).

Sobre 10 mL de una solución acuosa de 48,7 mM de sulfato de vanadilo ($\text{VOSO}_4 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$), pH 3, se agrega gota a gota 10 mL de 2 % de la sal de sodio del α, β -poli(DL-ácido aspártico) (PM = 28 - 30 kDa), pH 4, la mezcla tiene un pH de 2,5 y por adición de NaOH 1 M se ajusta el pH a 3. Se prosigue de manera análoga al procedimiento descrito anteriormente (pág. 43). Se obtiene 20 – 25 mg del sólido de color gris-celeste. Rendimiento: 9,24 – 11,55 %. El producto es caracterizado por FT-IR en pastilla de KBr y por ICP.

No se observó ninguna variación en solubilidad con respecto a los complejos anteriores ni en el color de la solución acuosa.

El espectro IR indica que se obtuvo el mismo producto que en el caso de la reacción llevada a cabo bajo exactamente las mismas condiciones pero con un orden invertido de adición de los reactantes. Sin embargo, el análisis ICP mostró un contenido de vanadio ligeramente mayor $13,90 \% \pm 0,01$.

5.2.6 Determinación del contenido de vanadio en el complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) por el método de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP)

Se usa una curva de calibración hasta 50 mg/L de la sal vanadato de amonio (NH_4VO_3) en medio ácido nítrico.

Preparación de la muestra:

Se pesan 10 mg de cada uno de los complejos sintetizados, se agrega 1 mL de HNO_3 concentrado y se evapora a sequedad. Se agrega HNO_3 6 % para disolver el sólido y para enrasar a 50 mL. Luego, para la réplica del análisis y dada la limitada cantidad de muestras, se pesan 5 mg de cada uno de los complejos, se agregan 0,5 mL de HNO_3 concentrado y se evapora a sequedad. Se agrega HNO_3 6 % para disolver el material y para enrasar a 25 mL. Por otro lado, para la preparación del blanco reactivo, se coloca en un vaso 1 mL de HNO_3 concentrado y se evapora a sequedad. Se agrega HNO_3 6 % para enjuagar el vaso y enrasarlo a 50 mL.

5.2.7 Liofilización de la solución acuosa vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico)

Se disuelven 24 mg del complejo sólido vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) en 2,5 mL de agua a temperatura ambiente. Después de aproximadamente siete días se puede observar la disolución completa produciéndose una solución amarilla. Esta solución es liofilizada y se obtiene un producto de color amarillo. Este producto es caracterizado por espectroscopía FT-IR en pastilla de KBr.

Solubilidad:

Es insoluble en DMF, acetona, DMSO, acetonitrilo, metanol, etanol, etilenglicol, acetato de etilo, ácido acético, anhídrido acético, cloroformo, tolueno, diclorometano, dioxano, hexano, éter etílico, éter de petróleo, tetrahidrofurano.

IR (KBr) cm^{-1}

3456,2 – 3354,84 (ν N-H del grupo amida, ν O-H del COOH y del H_2O) ; 3078,6 ($\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$, C-H del CH_2) ; 2947,7 ($\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$, C-H del CH_2) ; 1722,17 ($\nu\text{C}=\text{O}$ del COOH) ; 1659,85 ($\nu\text{C}=\text{O}$ de la amida I) ; 1537,25 (δ N-H en el plano de la amida II y $\nu\text{C}-\text{N}$ de la amida III) ; 1403,99 (δ O-H en el plano del COOH y $\text{t}_\text{s}\text{CH}_2$, C-H en el plano del CH_2) ; 1285,3 ($\nu\text{C}-\text{O}$ del COOH y τCH_2 , C-H del CH_2) ; 1228,22 ($\nu\text{C}-\text{O}$ del COOH) ; 1195,8 ($\nu\text{C}-\text{O}$ del COOH ; $\delta\text{C}-\text{H}$ en el plano) ; 1132,5 ($\nu\text{C}-\text{N}$) ; 1054 ($\nu\text{C}-\text{C}$) ; 974,26 ($\nu\text{V}=\text{O}$) ; 839,99 (ρCH_2 , C-H fuera del plano del CH_2) ; 766,93 ($\omega\text{N}-\text{H}$ fuera del plano de la amida II).

5.2.8 Análisis del sólido azulino

Este producto se separa de la reacción de la síntesis del complejo, se lava con agua y acetona helada y se seca bajo vacío y a temperatura ambiente. El porcentaje de este sólido representa el 71 – 93 %. Este producto es caracterizado por espectroscopía FT-IR en pastilla de KBr, activación neutrónica, fluorescencia de rayos X, UV-Visible (H_2O) y por ICP.

Solubilidad

Es soluble en agua en un tiempo muy prolongado. Sin embargo, es insoluble en DMF, acetona, DMSO, acetonitrilo, metanol, etanol, etilenglicol, acetato de etilo, ácido acético, anhídrido acético, cloroformo, tolueno, diclorometano, dioxano, hexano, éter etílico, éter de petróleo, tetrahidrofurano.

IR (KBr) cm^{-1}

3356,34 (ν N-H del grupo amida, ν O-H del COOH y del H_2O) ; 3088,4 ($\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$, C-H del CH_2) ; 2945,3 ($\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$, C-H del CH_2) ; 1729,64 ($\nu\text{C}=\text{O}$ del COOH) ; 1653,95 ($\nu\text{C}=\text{O}$ de la amida I) ; 1529,96 (δ N-H en el plano de la amida II y $\nu\text{C}-\text{N}$ de la amida III) ; 1399,53

(δ O-H en el plano del COOH y t_s CH₂, C-H en el plano del CH₂) ; 1276,7 (ν C-O del COOH y τ CH₂, C-H del CH₂) ; 1228,79 (ν C-O del COOH) ; 1189,3 (ν C-O del COOH ; δ C-H en el plano) ; 1128,88 (ν C-N) ; 1068 (ν C-C) ; 983,04 (ν V=O)

Activación Neutrónica:

%V = 7,87 – 8,2 % \pm 0,4 ; %Cl = 0,029 – 0,057 % \pm 0,007

Fluorescencia de rayos X:

%V = 7,6 % \pm 0,2 – 10,6 % \pm 0,3 ; %S = 0,055 % \pm 0,0024 – 0,521 % \pm 0,0224

ICP:

%V = 9,19 – 9,28 % \pm 0,01

UV-visible (H₂O) : Absorbe a 769 nm y a 614,80 nm. La solución tiene una concentración de 9,6 mg/mL y un pH 3.

5.2.9 Ensayos de síntesis del complejo variando las condiciones de reacción.

Se llevó a cabo ensayos para aumentar el rendimiento de la reacción de la formación del complejo a través de numerosos ensayos. Se realizaron modificaciones en el pH final de la reacción, en las concentraciones de las soluciones del polímero y del sulfato de vanadilo, en la temperatura de reacción y, finalmente, la relación de moles de meros del polímero a moles del catión vanadilo.

5.2.9.1 Síntesis del complejo vanadilo - α,β -poli(DL-ácido aspártico) a diferentes pH finales

En la **Tabla 3** se muestran las reacciones empleando una relación molar 3 : 1, manteniendo las mismas condiciones de la síntesis del correspondiente complejo y variando únicamente el pH final. Los productos son caracterizados por FT-IR en pastilla de KBr.

Tabla 3. Síntesis del complejo a diferentes pH finales

R E A C C I Ó N	Solución polimérica			VOSO ₄ ·2,5H ₂ O			pH Final de la solución
	Concentración (%)		pH	Concentración (mM)		pH	
	Inicial	Final*		Inicial	Final*		
1	2	1	4	48,7	24,4	3	2
2	2	1	4	48,7	24,4	3	2,5
3	2	1	4	48,7	24,4	3	4
4	2	1	6	48,7	24,4	3	4
5	2	1	6	48,7	24,4	3	4,5
6	2	1	6	48,7	24,4	3	5

Nota : Se usan volúmenes de 10 mL de soluciones de los reactivos y un tiempo de reacción de 24 horas a temperatura ambiente

*Se refiere a la concentración final esperada de ambos reactantes si todo permaneciera en solución antes de la precipitación con acetona.

5.2.9.2 Síntesis del complejo a menores concentraciones de la solución polimérica y del catión vanadilo

Se ensayaron tres síntesis a menores concentraciones finales del ligando polimérico y del catión vanadilo que las empleadas anteriormente para la síntesis del complejo. La relación molar empleada en los 3 casos fue de 3 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo y las síntesis son llevadas a cabo a temperatura ambiente por 24 horas. En las tres reacciones se forma el sólido azulino. En la **Tabla 4** se detallan las concentraciones de reactantes y condiciones de reacción para las tres síntesis. Los productos son caracterizados por FT-IR en pastilla de KBr y por ICP.

Tabla 4. Condiciones de reacción y concentraciones iniciales y finales del polímero y del catión vanadilo en las síntesis a mayor dilución

R E A C C I Ó N	Mol de meros del polímero ----- mol de VO ²⁺	Solución Polimérica				VOSO ₄ ·2,5H ₂ O			pH Final de la solución	
		Concentración (%)		Volumen (mL)	pH	Concentración (mM)		Volumen (mL)		pH
		Inicial	Final*			Inicial	Final*			
		1	3 : 1	2	0,5	10	4	16,2		12,2
2	3 : 1	0,4	0,33	50	4	48,7	8,1	10	3	3
3	3 : 1	2	0,33	10	4	9,7	8,1	50	3	3

*Se refiere a la concentración final esperada de ambos reactantes si todo permaneciera en solución antes de la precipitación con acetona.

5.2.9.3 Síntesis del complejo a una temperatura de 65 °C

Se realizaron dos ensayos de síntesis del complejo empleando las relaciones molares 2 y 3 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo a una temperatura mayor a la temperatura ambiente. En la literatura, se encuentra reportado por el autor Hu y colaboradores la síntesis del complejo vanadilo-poli(γ -ácido glutámico) a 65 °C para una hora de reacción.⁵³ Este mismo procedimiento fue desarrollado para la síntesis del complejo en estudio. Los productos obtenidos fueron caracterizados por FT-IR en pastilla de KBr.

Las condiciones de las dos reacciones se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Condiciones de reacción para la síntesis del complejo a 65 °C

R E A C I Ó N	Mol de meros del polímero mol de VO ²⁺	Solución Polimérica				VOSO ₄ ·2,5H ₂ O				T (°C)	t (h)	pH Final de la solución
		Concentración (%)		Volumen (mL)	pH	Concentración (mM)		Volumen (mL)	pH			
		Inicial	Final*			Inicial	Final*					
1	2 : 1	2	1	10	4	72,9	36,5	10	3	65	1	3
2	3 : 1	2	1	10	4	48,7	24,4	10	3	65	1	3

*Se refiere a la concentración final esperada de ambos reactantes si todo permaneciera en solución antes de la precipitación con acetona.

5.2.9.4 Síntesis del complejo a diferentes relaciones molares de moles de meros del polímero y moles de catión vanadilo (VO^{2+})

En la **Tabla 6** se muestran las diferentes condiciones de reacción, ensayadas, para diferentes relaciones molares de moles de meros del polímero por moles de VO^{2+} . Los productos fueron caracterizados por FT-IR en pastilla de KBr.

Tabla 6. Condiciones de reacción de la síntesis del complejo a diferentes relaciones molares

R E A C C I Ó N	Mol de meros del polímero : mol de catión vanadilo (VO^{2+})	Solución Polimérica				$\text{VOSO}_4 \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$			T ($^{\circ}\text{C}$)	T (h)	pH Final de la solución	
		Concentración (%)		Volumen (mL)	pH	Concentración (M)		Volumen (mL)				pH
		Inicial	Final*			Inicial	Final*					
1	1 : 1	2	1	10	4	146	73	10	3	25	24	3
2	4 : 1	2	1	10	4	36,5	18,25	10	3	25	24	3
3	5,85 : 1	2	1	10	4	24,9	12,45	10	3	25	24	3
4	6 : 1	2	0,57	10	4	9,7	6,93	25	3	25	24	3
5	6 : 1	2	1	10	6	24,3	12,15	10	3	25	24	3
6	6 : 1	2	1	10	6	24,8	12,4	10	3	25	24	5
7	6 : 1	2	1	10	6	24,8	12,4	10	3	25	24	4,5
8	10 : 1	2	1	10	6	14,6	7,3	10	3	25	24	3
9	10 : 1	2	1	10	4	14,6	7,3	10	3	25	24	3

*Se refiere a la concentración final esperada de ambos reactantes si todo permaneciera en solución antes de la precipitación con acetona.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Polisuccinimida

6.1.1 Síntesis

La síntesis del polímero precursor, polisuccinimida, ha sido preliminarmente descrita en la literatura.^{45, 46} En el presente trabajo se utilizaron las condiciones descritas por Neri y colaboradores sometidas a modificaciones obteniéndose un producto de alto grado de pureza y un adecuado rendimiento.

En el presente trabajo se propone el siguiente mecanismo de reacción para la síntesis de la polisuccinimida empleando el monómero DL-ácido aspártico y H_3PO_4 como catalizador (**Figura 16**).

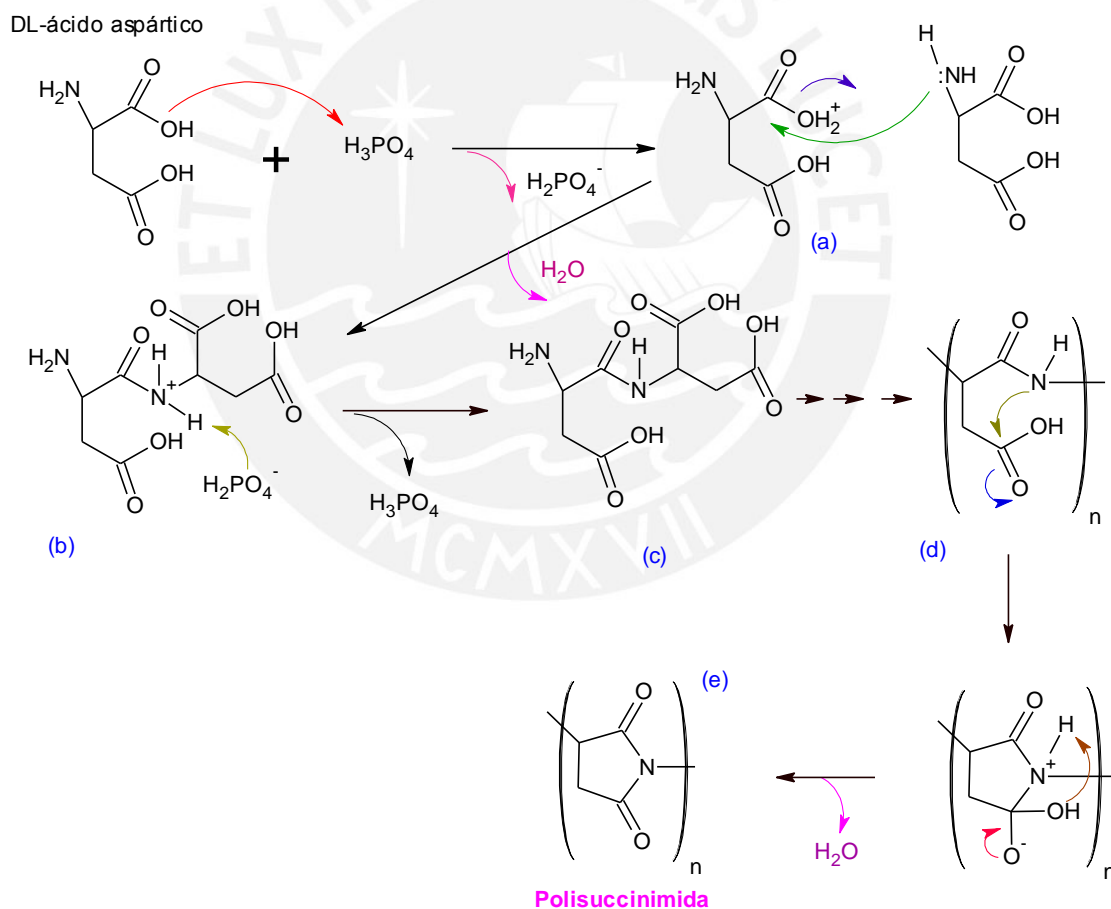


Figura 16. Mecanismo de reacción de la síntesis de la polisuccinimida

El mecanismo de esta reacción consiste en la desprotonación del H_3PO_4 por el monómero DL-ácido aspártico. El monómero protonado (a) es atacado por el grupo amina de otro monómero para formar la especie intermediaria (b), la cual es desprotonada por la especie H_2PO_4^- para formar el dímero (c), el cual sigue reaccionando con H_3PO_4 y el monómero DL-ácido aspártico hasta formar el polímero (d) en el cual ocurre una reacción intramolecular por ataque del nitrógeno amida al carbono carbonilo del grupo ácido carboxílico, liberándose agua y formándose de esta manera la polisuccinimida (e).

El equipo de policondensación utilizado en este trabajo fue construido basándose en el diseño reportado en la literatura.⁵⁷

Por otro lado, con ayuda de un trabajo reportado en la literatura se estableció el volumen del balón de reacción (500 mL) que formaría parte del equipo de policondensación y la cantidad de monómero a utilizar (10 g).⁵⁸ Se puede comentar que para una masa de 10 g de monómero es necesario utilizar un volumen de 500 mL con el fin de que la masa polimérica no se propague por el tubo de conexión entre el balón de reacción y el condensador ayudado del alto vacío.

El equipo de policondensación utilizado en el presente trabajo permitió que la síntesis de la polisuccinimida se lleve a cabo de manera estática. Además, no fue posible utilizar agitación porque el producto formado en un inicio tenía una consistencia muy viscosa y luego, cuando se completaron las tres horas de reacción, se obtuvo un producto totalmente vítreo. Cabe mencionar que se obtuvieron los mismos resultados que Neri y colaboradores, quienes utilizaron un rotaevaporador bajo vacío.^{45, 46}

Además, se debe precalentar el equipo antes de introducir los reactivos, puesto que, de lo contrario, se obtiene un producto de baja viscosidad reducida.⁴⁵ Nuestro precalentamiento fue de cinco minutos.

Se utilizó ácido fosfórico (H_3PO_4) como catalizador de la reacción porque, de acuerdo a lo reportado, en caso de no estar presente este catalizador se obtendrían pesos moleculares un orden de magnitud más bajos que en el caso de la reacción catalizada. Esto último, es consecuencia de una ruptura de la cadena del PSI para formar grupos maleimida y succinimida terminales y de reacciones de deaminación según lo reportado por Matsubara y colaboradores.⁵⁹

Una observación interesante es que a pesar de que la temperatura de ebullición del H_3PO_4 85 % es de 158°C y la temperatura de reacción es de 180°C , este ácido no llega a evaporarse durante la reacción. Esto se sustenta con estudios de análisis termogravimétrico (TGA) realizado por Wang y colaboradores.⁴⁷ El autor señala que después de que se seca el ácido aspártico impregnado con el H_3PO_4 85 %, a 80°C el agua se evapora completamente, sin embargo el H_3PO_4 queda en la muestra. Además, señala que el hecho de que el producto final, después de la precipitación, contenga H_3PO_4 significa que este ácido interacciona fuertemente primero con el ácido aspártico y luego con el producto de la polimerización y por lo tanto, no se llega a evaporar.⁴⁷

El tiempo de reacción utilizado en este trabajo, 3 horas, fue mayor al que utilizó Neri (2,5 horas). Al cabo de este tiempo, se observó que el tubo de conexión del equipo de policondensación estaba completamente seco, indicio de que la reacción de condensación había culminado.

La disolución del PSI en DMF caliente se realizó bajo atmósfera de nitrógeno por 5 a 10 minutos para evitar la precipitación parcial del PSI según lo reportado por Neri y colaboradores.⁴⁵ Además, es necesario dejarlo luego en agitación de un día para otro a temperatura ambiente porque se trata de un producto polimérico y la completa separación de las cadenas poliméricas así lo requiere.

6.1.2 Rendimiento

En el presente trabajo se realizaron once síntesis de la polisuccinimida donde se obtiene un peso del producto en el rango algo menor que el reportado en la literatura.^{45, 46} El rendimiento obtenido fue por consiguiente algo menor al reportado por Neri y colaboradores (% $R_{\text{Exp. tesis}}$: 85 – 89 % ; % $R_{\text{Exp. Neri}}$: 96 %). Esto se debe a que en nuestro caso se realizaron dos precipitaciones del polímero con fines de purificación en vez de una. Además, para la eliminación efectiva de restos de solventes resultó necesario el lavado del producto, luego de cada una de las dos precipitaciones sucesivas, con abundante agua (aprox. 3L), lo que conllevó una disminución adicional del rendimiento. Por otro lado, el rendimiento sin una segunda precipitación fue de 97 %, ligeramente superior al reportado por Neri y colaboradores (96 %).^{45, 46}

6.1.3 Determinación del peso molecular por cromatografía de permeación por gel (GPC)

El peso molecular por cromatografía de permeación por gel (GPC) fue determinado en el Instituto de Investigación de Polímeros de Dresden, Alemania.

En la **Figura 17** la curva de color azul corresponde a la polisuccinimida sin ser tratada con DCC y la curva de color rojo a la polisuccinimida tratada con DCC la cual se discutirá más adelante. De la gráfica azul se puede observar que se obtuvo un M_n de 23,5 kDa y un M_w de 61,5 kDa. Además, el promedio de las dispersiones es 2,62, **Figura 17**.

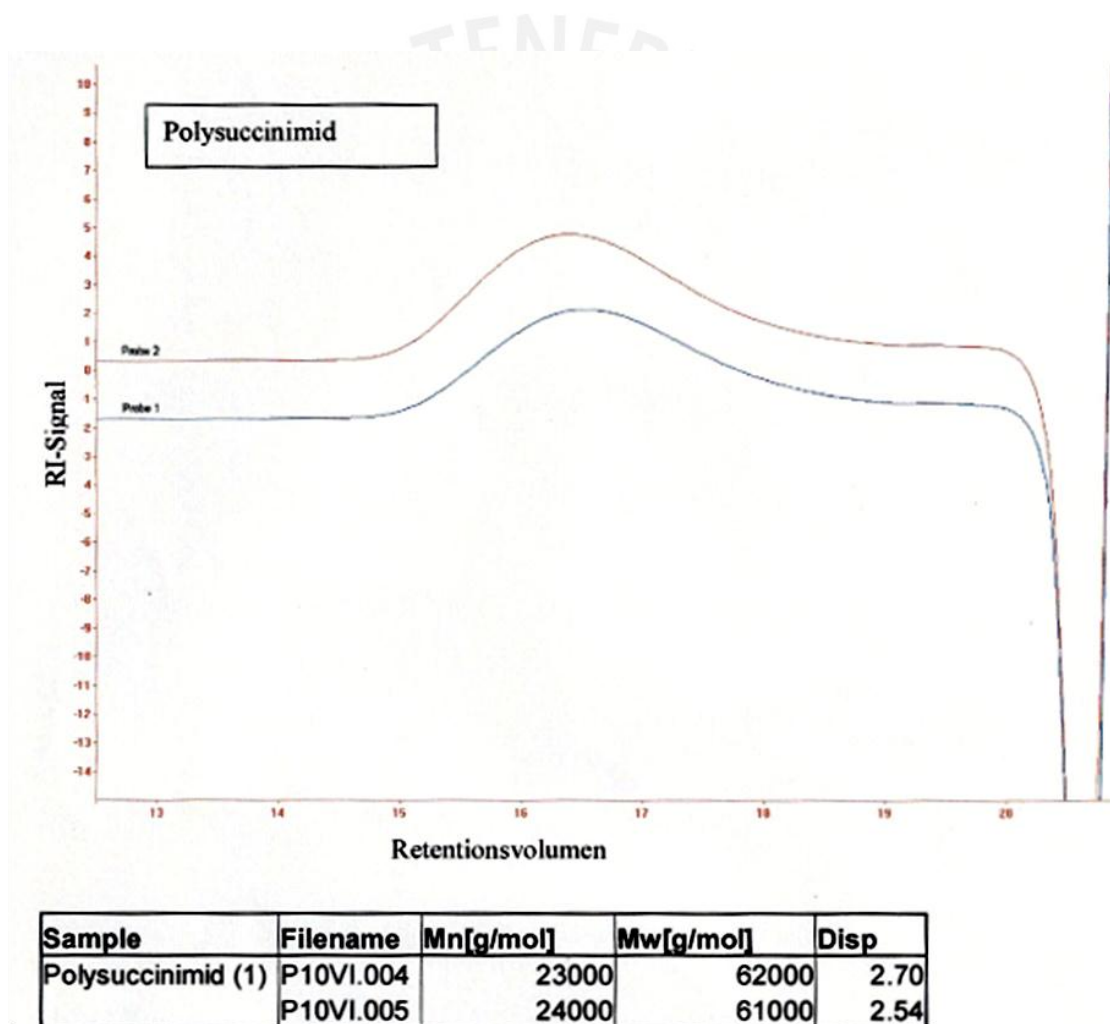


Figura 17. Peso molecular de la polisuccinimida determinado por GPC

Los valores de M_n y M_w obtenidos son valores referenciales ya que para su determinación usaron como estándar poli(propileno-co-anhídrido maleico) de una estructura muy diferente a la polisuccinimida, **Figura 18**.

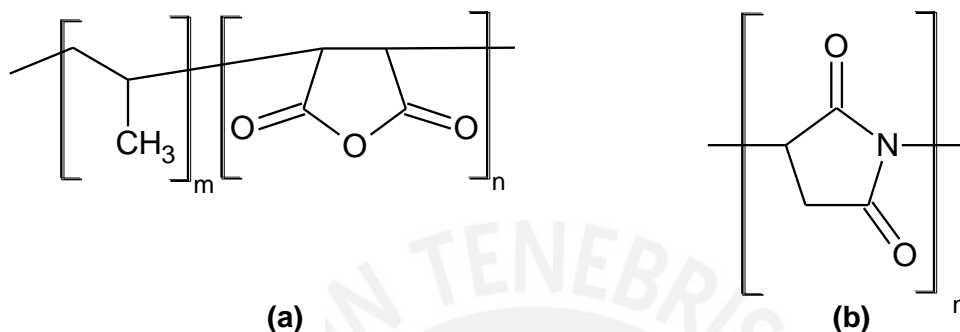


Figura 18. Estructuras del poli(propileno-co-anhídrido maleico) (a) y de la polisuccinimida (b)

Por otro lado, el valor de 2,62 obtenido para la dispersión ($M_w/M_n > 1$) indica que la polisuccinimida sintetizada es un polímero polidisperso.

El valor obtenido 61,5 kDa es conveniente para la hidrólisis posterior, ya que esta involucra una ruptura del PSI y consiguiente disminución del peso molecular.

6.1.4 Caracterización

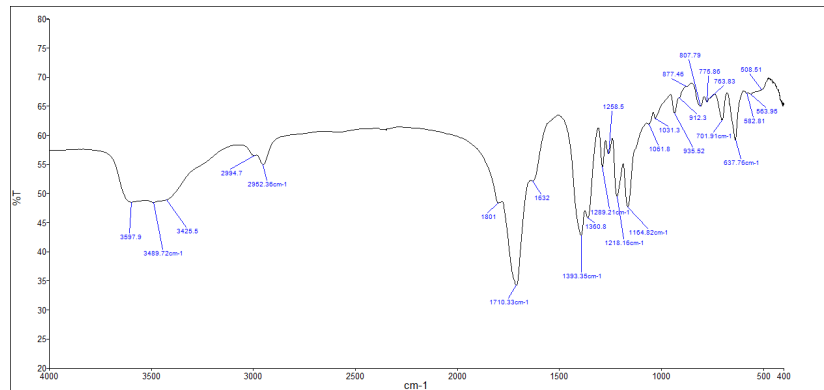
6.1.4.1 Espectroscopía infrarroja

La caracterización de la polisuccinimida nos confirma que sí se obtiene el producto de acuerdo a lo reportado en la literatura.^{54, 60 - 65} Se pudo observar que el espectro IR reportado es idéntico al espectro IR de la polisuccinimida obtenida en el presente trabajo. En la **Figura 19** se muestra el espectro IR de la polisuccinimida medido en pastilla de KBr, mezcla diluida y concentrada y se hace la comparación con lo reportado en la literatura para muestras diluida y concentrada.^{54, 65}

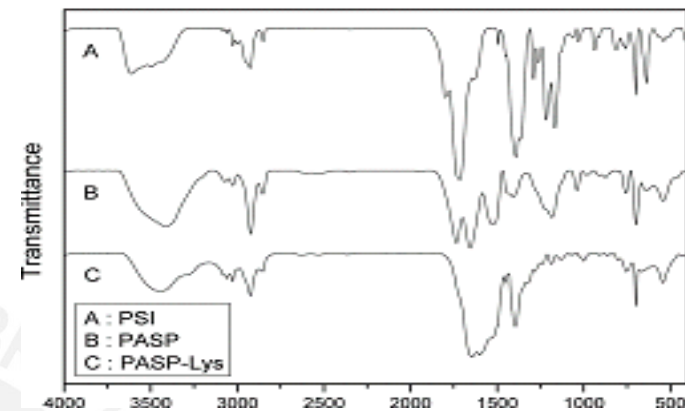
Por otro lado, la asignación completa de los picos del espectro infrarrojo de la polisuccinimida, reportados en el capítulo anterior (5.2.1.1), se logró en base a los criterios

teóricos y a una serie de publicaciones de los autores Piatkowski, Masiala, Chiriac, Kim S., Gaina, Mansuri y Kim J-H^{66 - 73}, quienes han reportado la asignación parcial del espectro IR de la polisuccinimida, además de a dos publicaciones por Krishnakumar y Stamboliyska quienes realizaron estudios teóricos del ab initio de orbital molecular realizado a la succinimida.^{74, 75}

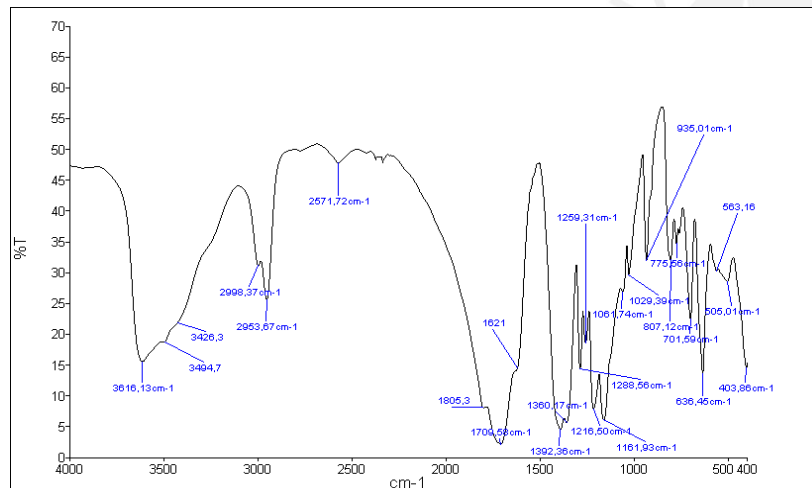
A continuación se describe el espectro IR de la polisuccinimida en pastilla de KBr (**Figura 19**) en el rango por encima de 1000 cm^{-1} . Se observa una banda ancha en el rango de $3597,9 - 3425,5\text{ cm}^{-1}$ que corresponde a la vibración de estiramiento O-H del grupo COOH terminal de la cadena de polisuccinimida, a la vibración de estiramiento O-H del H_2O y al estiramiento NH del grupo NH_2 terminal. Los dos picos de menor intensidad a $2994,7$ y $2952,36\text{ cm}^{-1}$ se asignan a los estiramientos asimétrico y simétrico C-H del CH_2 del anillo imida, respectivamente. Una banda de absorción a 1801 cm^{-1} y una muy intensa a $1710,33\text{ cm}^{-1}$ corresponden a los estiramientos simétrico y asimétrico del C=O del anillo imida, respectivamente. Además, la presencia de un tercer pico de baja intensidad a 1632 cm^{-1} se asigna a la flexión O-H del H_2O . Por otro lado, las dos absorciones intensas a $1393,36$ y $1360,8\text{ cm}^{-1}$ son asignadas al tijereteo simétrico y asimétrico del C-H del grupo CH_2 del anillo imida, respectivamente, mientras que los dos $1289,21$ y $1258,5\text{ cm}^{-1}$ de baja intensidad pertenecen a la vibración de estiramiento asimétrico y simétrico C-N-C del anillo imida, respectivamente. Los picos de moderada intensidad a $1218,16 - 1164,82\text{ cm}^{-1}$ corresponden a la flexión C-H en el plano del grupo CH_2 .



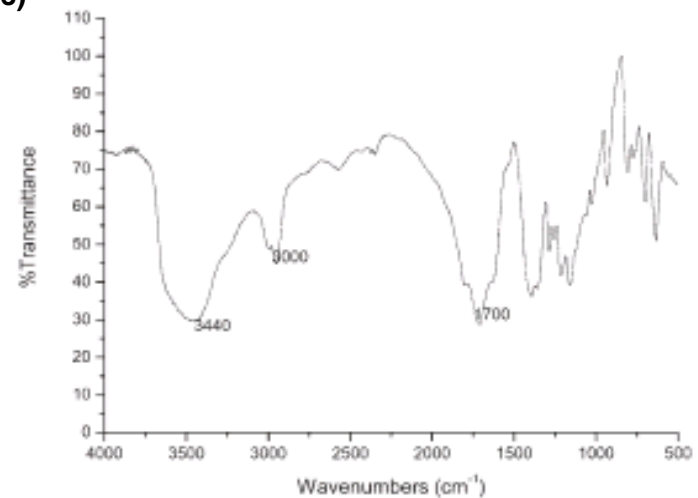
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 19. Comparación de los espectros IR de la polisuccinimida diluída en KBr (a) y reportado en la literatura⁵⁴ (b) y la polisuccinimida concentrada en KBr (c) y reportado en la literatura⁶⁵ (d).

6.1.4.2 Resonancia magnética nuclear

La caracterización del PSI por ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HSQC Y HMBC nos confirma, de acuerdo a lo reportado en la literatura⁷⁶, que en el presente trabajo si se logró obtener la polisuccinimida de alto grado de pureza para las once síntesis desarrolladas.

En la **Figura 20** se observa el espectro ^1H -RMN de la polisuccinimida en $\text{DMSO-}d_6$. El protón metino es observado como una intensa resonancia singulete a 5,3 ppm. Los protones metileno son vistos como dos picos de casi igual intensidad a 3,2 y 2,7 ppm. Estas señales están sobrepuestas parcialmente con el pico del protón residual del DMSO ($\text{CD}_3(\text{S}=\text{O})\text{CD}_2\text{H}$) a 2,5 ppm y por el pico del protón del agua a 3,4 ppm. Este último pico del agua aparece porque se ha usado este solvente para remover al ácido fosfórico (H_3PO_4) y al solvente (DMF).

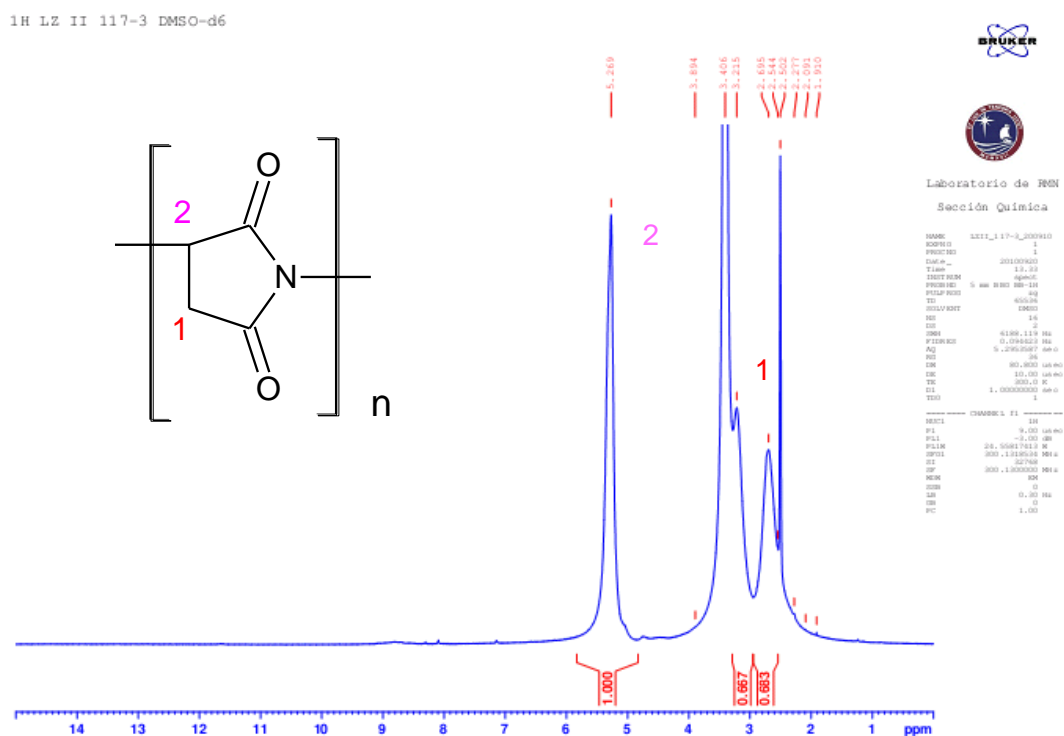


Figura 20. ^1H -RMN en $\text{DMSO-}d_6$ de la polisuccinimida

En el espectro ^1H -RMN de la polisuccinimida también se observa que no hay presencia de H_3PO_4 ya que estos protones aparecen entre 7 a 8 ppm.⁷⁶ Además, no aparecen los picos de los protones del DMF, los cuales aparecen a 7,95; 2,89 y 2,73 ppm en el solvente $\text{DMSO-}d_6$.

En el espectro ^1H -RMN tampoco se observan las señales de los protones de los grupos dicarboxílico terminal y/o amino terminal de la cadena de polisuccinimida. De acuerdo a la literatura los protones del grupo dicarboxílico terminal aparecen entre 12,48 y a 13,22 ppm y los del grupo amino terminal entre 11,22 y 11,60 ppm. Si los picos en cuestión no son observados es debido a que los protones ácido y amino se intercambian a una velocidad muy rápida llegando a ser invisibles en el RMN.⁷⁶

Por último, es importante mencionar que las señales de los grupos terminales en general son mucho menos intensas que las de las unidades repetitivas de las cadenas. Por esta razón tampoco son observadas.

En el espectro COSY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$), **Figura 21**, no se observa un acoplamiento entre los protones de la polisuccinimida.

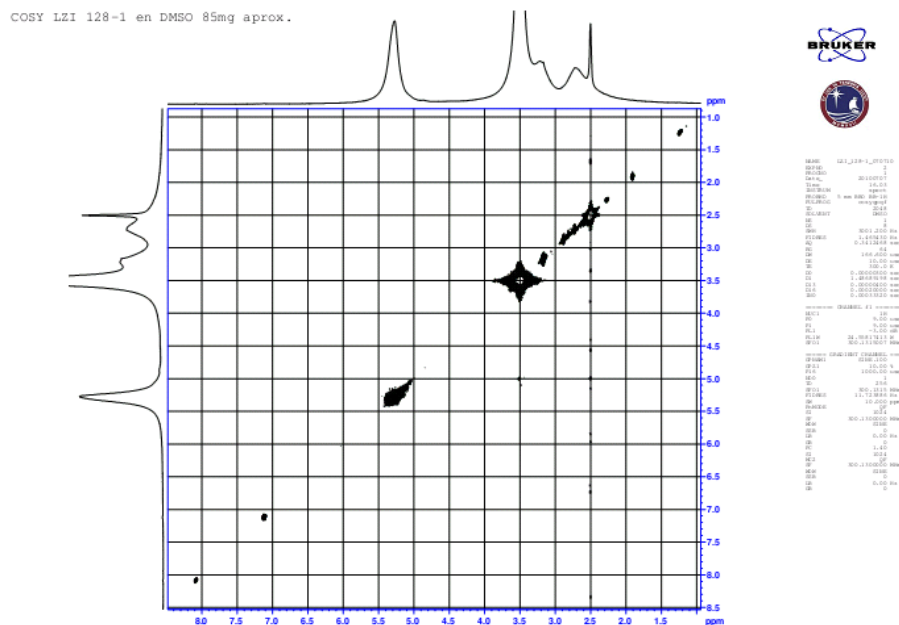


Figura 21. COSY en $\text{DMSO-}d_6$ de la polisuccinimida

En el espectro ^{13}C -RMN de la polisuccinimida, mostrado en la **Figura 22** se observa que los dos picos carbonilo no equivalentes de la unidad repetitiva de succinimida (**Figura 23**) aparecen a 172,63 (**1**) y a 173,95 ppm (**2**). Además, los carbonos metileno (**3**) y metino (**4**) son observados a 33,22 y a 47,77 ppm, respectivamente.

La asignación de los picos de los carbonos carbonilo inequivalentes del anillo imida (**1 y 2**) fueron confirmados por el espectro INADEQUATE (^{13}C - ^{13}C) de la polisuccinimida reportado en la literatura.⁸⁸

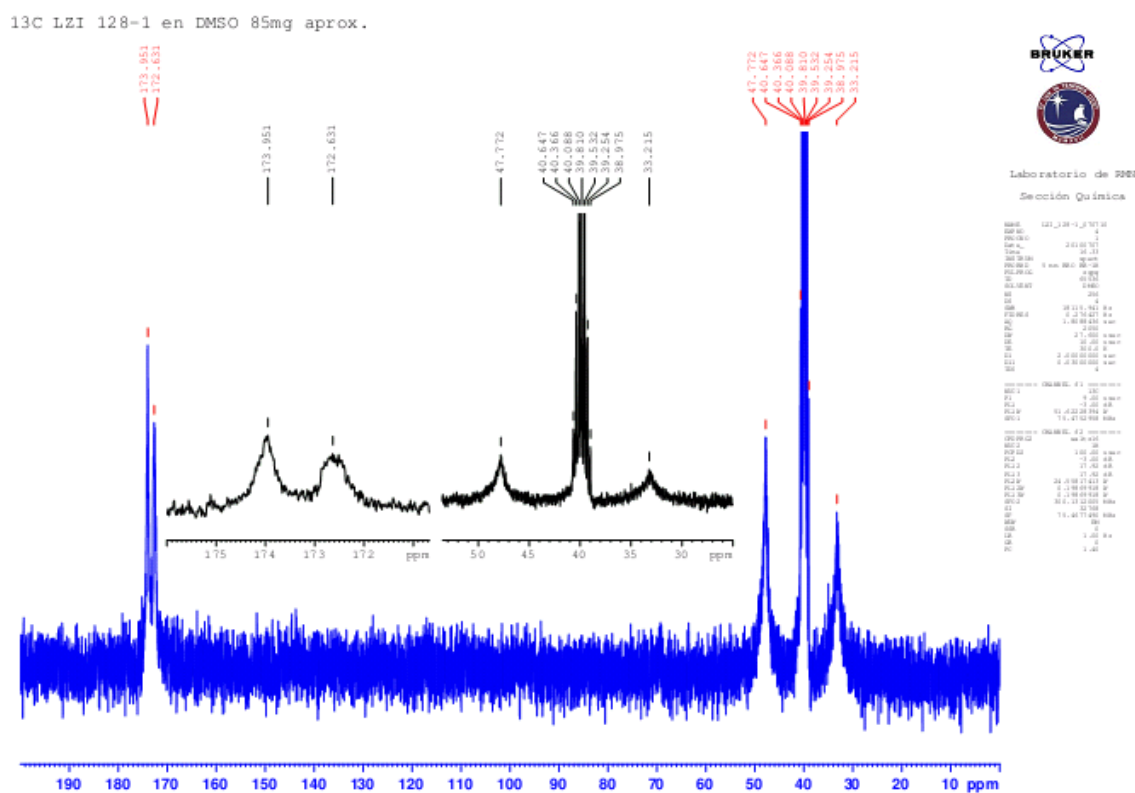


Figura 22. ^{13}C -RMN en $\text{DMSO}-d_6$ de la polisuccinimida

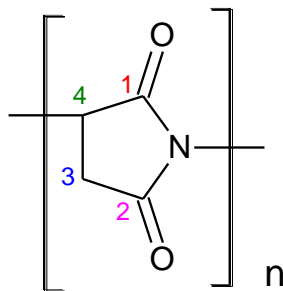


Figura 23. Designación de los átomos de carbono en la estructura de la polisuccinimida

Por otro lado, la asignación de los picos del carbono metino y metileno es confirmada por el espectro HSQC (^1H - ^{13}C ; corto alcance), **Figura 24**. En este espectro se puede observar que los protones metileno que aparecen a 2,7 y 3,2 ppm se encuentran directamente enlazados al carbono que resuena a 33,22 ppm. Además, el protón metino el cual aparece a 5,3 ppm se encuentra enlazado al carbono que resuena a 47,77 ppm. Por otro lado, se confirma que los dos carbonos carbonilo no equivalentes que resuenan a 172,63 y a 173,95 ppm no se encuentran enlazados a ningún protón.

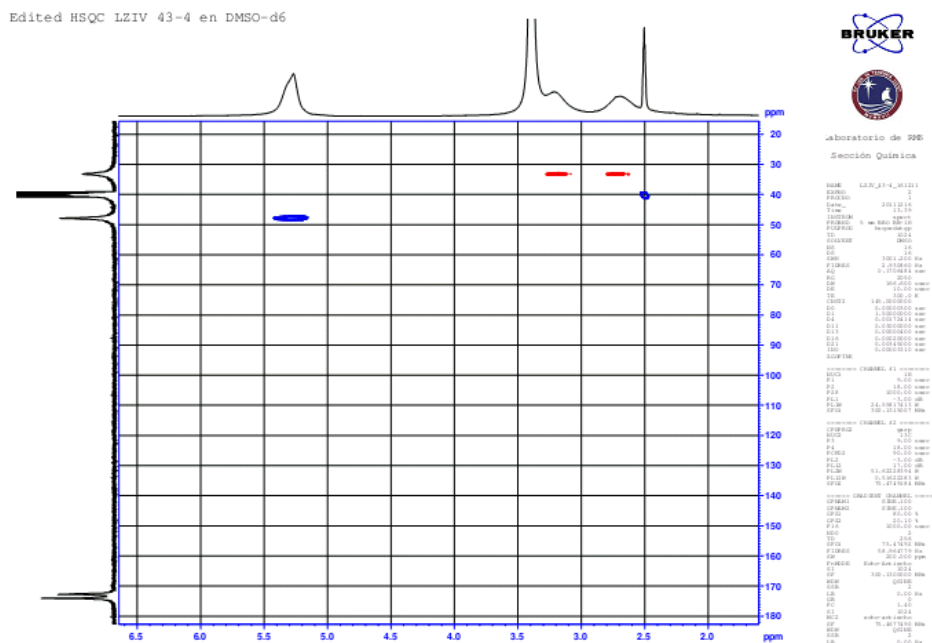


Figura 24. HSQC en DMSO- d_6 de la polisuccinimida

6.1.5 Determinación de la estructura de la cadena polimérica de la polisuccinimida: lineal, ramificada o anillo abierto

De acuerdo a lo reportado, se espera que la polisuccinimida sintetizada en el presente trabajo por el método de policondensación térmica del DL-ácido aspártico, catalizada por H_3PO_4 , posea una estructura lineal (**Figura 25**).^{76, 77} Sin embargo, dado que el PSI determina la estructura del ligando polimérico α,β -poli(DL-ácido aspártico), resultó importante confirmar mediante técnicas espectroscópicas la estructura lineal de dicho polímero.

Asimismo, según lo reportado, los espectros IR y 1H -RMN nos ayudarían a determinar si la polisuccinimida obtenida en este trabajo tiene una estructura lineal, ramificada o de anillo abierto (**Figuras 25, 26 y 27**). De acuerdo a la literatura si la polisuccinimida tuviera una estructura ramificada o de anillo abierto, primero, se deberían observar en el espectro IR los picos a 1524; 1525,3 y 1529 cm^{-1} consistentes con la estructura amida (δNH del grupo amida II). Luego, debería observarse el pico a 3400 cm^{-1} correspondiente al νOH de los grupos dicarboxílicos terminales.^{62, 63, 77, 78} Por otro lado, en el espectro 1H -RMN debería observarse el protón metino de los sitios ramificados y del anillo abierto (**Figuras 26 y 27**) a 4,6 ppm.⁷⁷ Además, en el espectro 1H -RMN los protones amida de los sitios ramificados y de la estructura de anillo abierto deberían resonar como señales anchas entre 8 y 9,5 ppm, específicamente a 8,6 ppm.^{76, 59, 55}

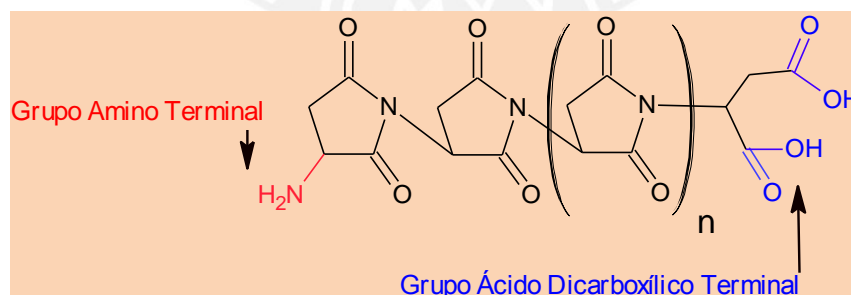


Figura 25. Estructura lineal de la polisuccinimida
Adaptada de la referencia 77

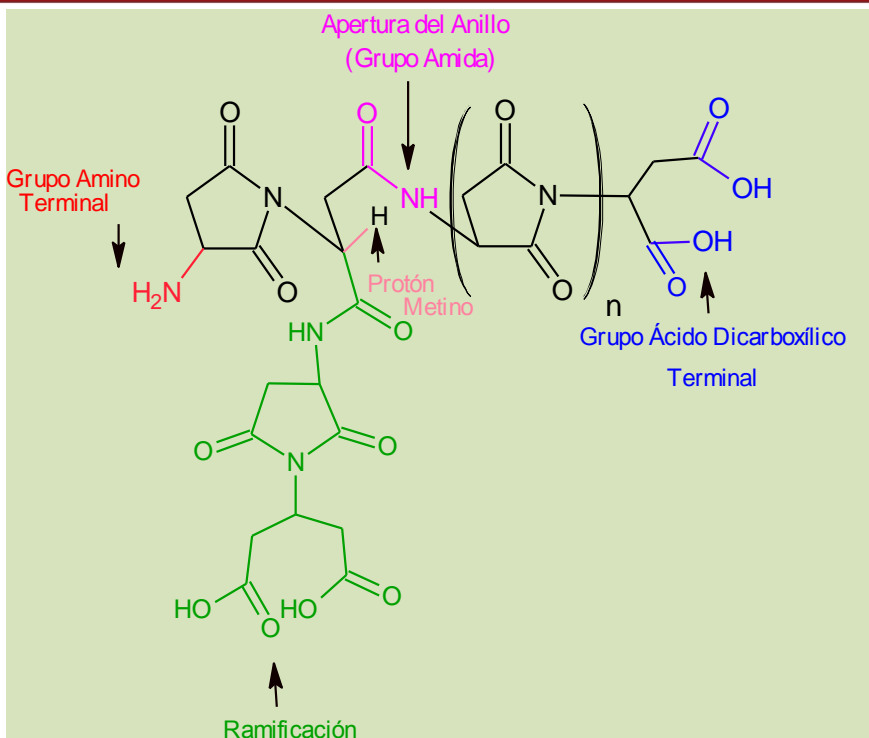


Figura 26. Estructura ramificada de la polisuccinimida
Adaptada de la referencia 77

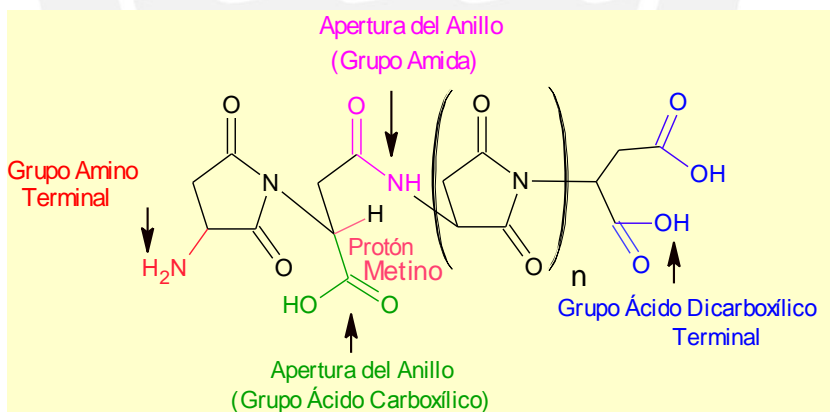


Figura 27. Estructura de anillo abierto de la polisuccinimida
Adaptada de la referencia 77

En el presente trabajo, en el IR de la polisuccinimida (**Figura 19**), se puede observar que no aparecen picos en el rango de 1524 a 1529 cm^{-1} sugiriendo que no hay sitios de

ramificación ni anillos abiertos en la cadena de la polisuccinimida. Sin embargo, el hecho de que en el IR del PSI aparezca un pico a 1630 cm^{-1} podría indicar que corresponde al νCO , estiramiento $\text{C}=\text{O}$ de la amida I de los sitios ramificados o del anillo abierto, pero al no aparecer los picos a $1524 - 1529\text{ cm}^{-1}$ se concluye que más bien tiene que corresponder al δOH , flexión O-H del agua. También, en el espectro $^1\text{H-RMN}$, **Figura 20**, no se observa un pico a 4,6 ppm, ni uno a 8,6 ppm sugiriendo nuevamente que la polisuccinimida sintetizada en este trabajo posee una estructura lineal.

6.1.6 Incremento del peso molecular de la polisuccinimida (PSI)

Se intentó incrementar el peso molecular de la polisuccinimida, al tratarla con 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y variando las condiciones de síntesis. La necesidad de incrementar el peso molecular del PSI radica en que durante la hidrólisis de este polímero, para obtener el ligando polimérico α,β -poli(DL-ácido aspártico), se rompen las cadenas poliméricas obteniéndose pesos moleculares del ligando menores a los que tenía inicialmente la polisuccinimida. En este caso se corre el riesgo que el peso molecular del α,β -poli(DL-ácido aspártico) se encuentre por debajo de 25 kDa cuando el rango deseado es de 25 a 50 kDa.

6.1.6.1 Incremento del peso molecular con 1,3-Diciclohexilcarbodiimida (DCC)

El incremento del peso molecular de la polisuccinimida con DCC fue realizado como lo describen Neri y colaboradores.^{45, 46} Una observación práctica de interés en este contexto es que la polisuccinimida tratada con DCC precipitó en forma de hojuelas blancas a diferencia de la no tratada, que lo hace como un polvo fino blanco, y mantuvo este color después del secado, en vez de adoptar el tono beige usual de la no tratada.

En la **Figura 28**, donde se muestra la reacción entre la polisuccinimida y la DCC, reactivo de acoplamiento, se puede observar que además de formarse polisuccinimida de mayor peso molecular se forma el subproducto diciclohexilurea (DCU) el cual es insoluble en agua. La DCU es eliminada por filtración y utilizando gran cantidad de etanol para el lavado del producto, el cual se usa después del lavado con abundante agua para eliminar el resto del solvente DMF.

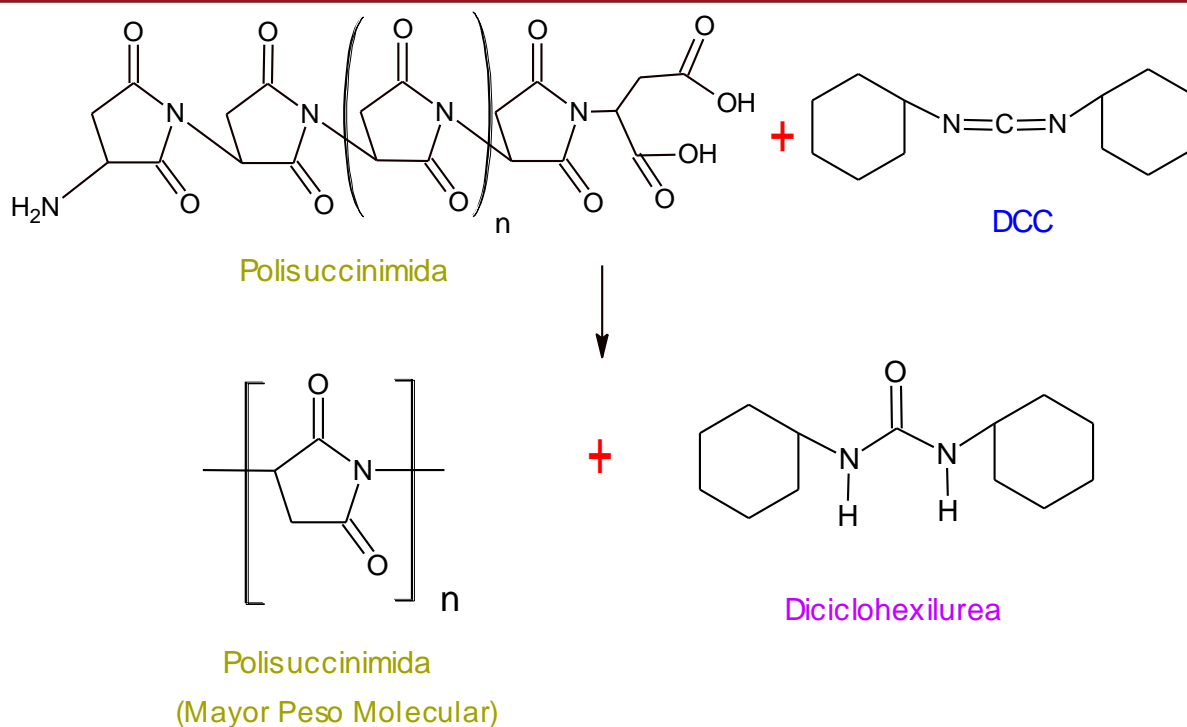
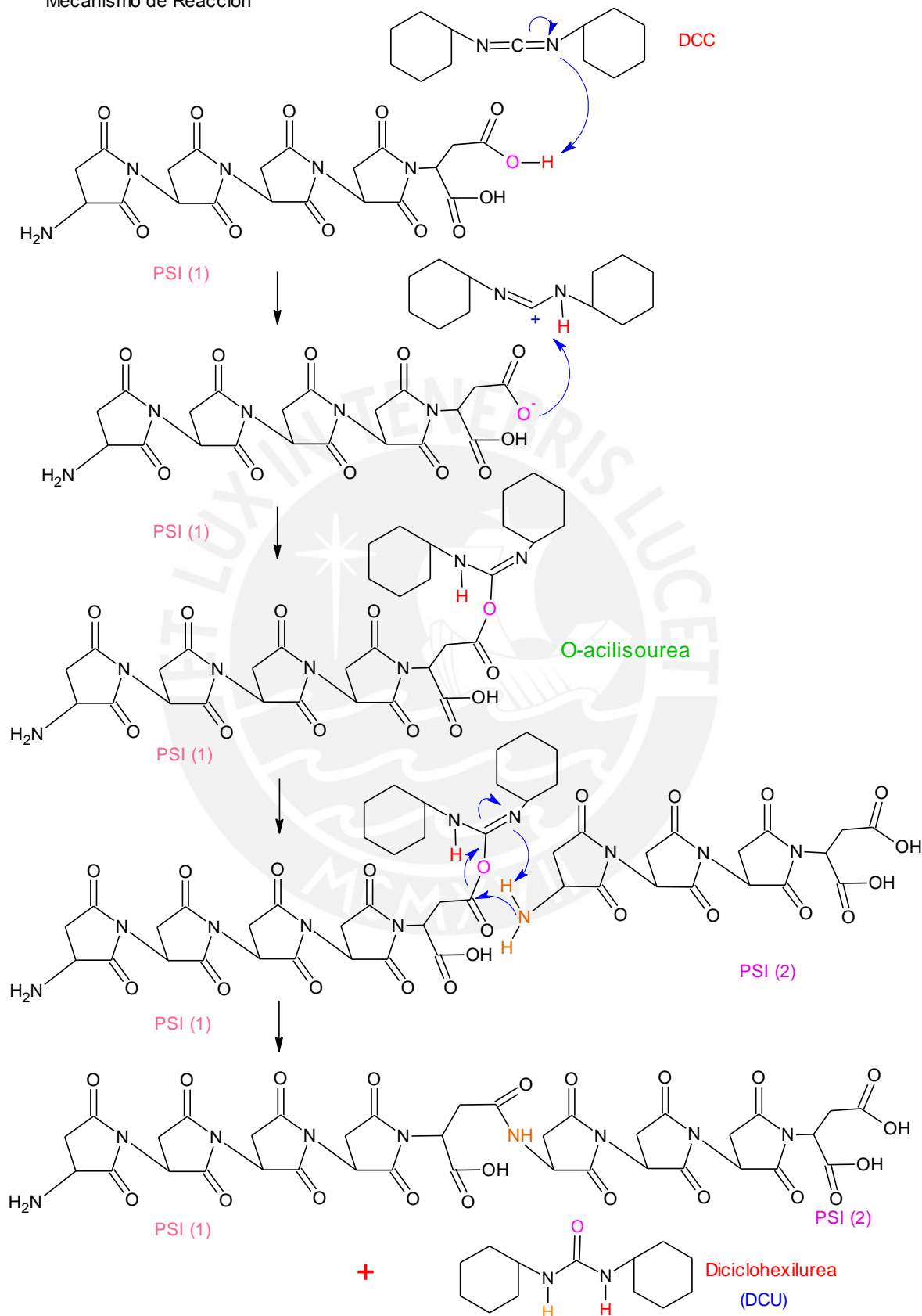


Figura 28. Reacción entre la polisuccinimida y la DCC

Un mecanismo de reacción probable que ocurre entre la polisuccinimida y la DCC de acuerdo a lo reportado por la literatura sobre reactivos de acoplamiento en la formación de enlaces peptídicos (enlaces amida)^{79, 80} es la que se presenta en la **Figura 29**. Se observa que la DCC activa al ácido carboxílico, el grupo terminal de una de las cadenas de polisuccinimida (PSI 1), formándose el intermediario muy reactivo *O*-acilisoúrea, el cual es atacado por una amina, grupo terminal de otra cadena de polisuccinimida (PSI 2), formándose así el enlace amida entre las dos cadenas poliméricas PSI 1 y PSI 2. Además, se forma el subproducto diciclohexilurea. Luego, sobre esta nueva estructura, la DCC activa al grupo ácido carboxílico terminal, el cual se encuentra adyacente al primer grupo carboxílico ya activado por la DCC, formándose otra vez el intermediario *O*-acilisoúrea, el cual ahora es atacado por una amida formada dando lugar a la ciclación intramolecular para formar el anillo imida y a la formación nuevamente del subproducto diciclohexilurea.

Mecanismo de Reacción



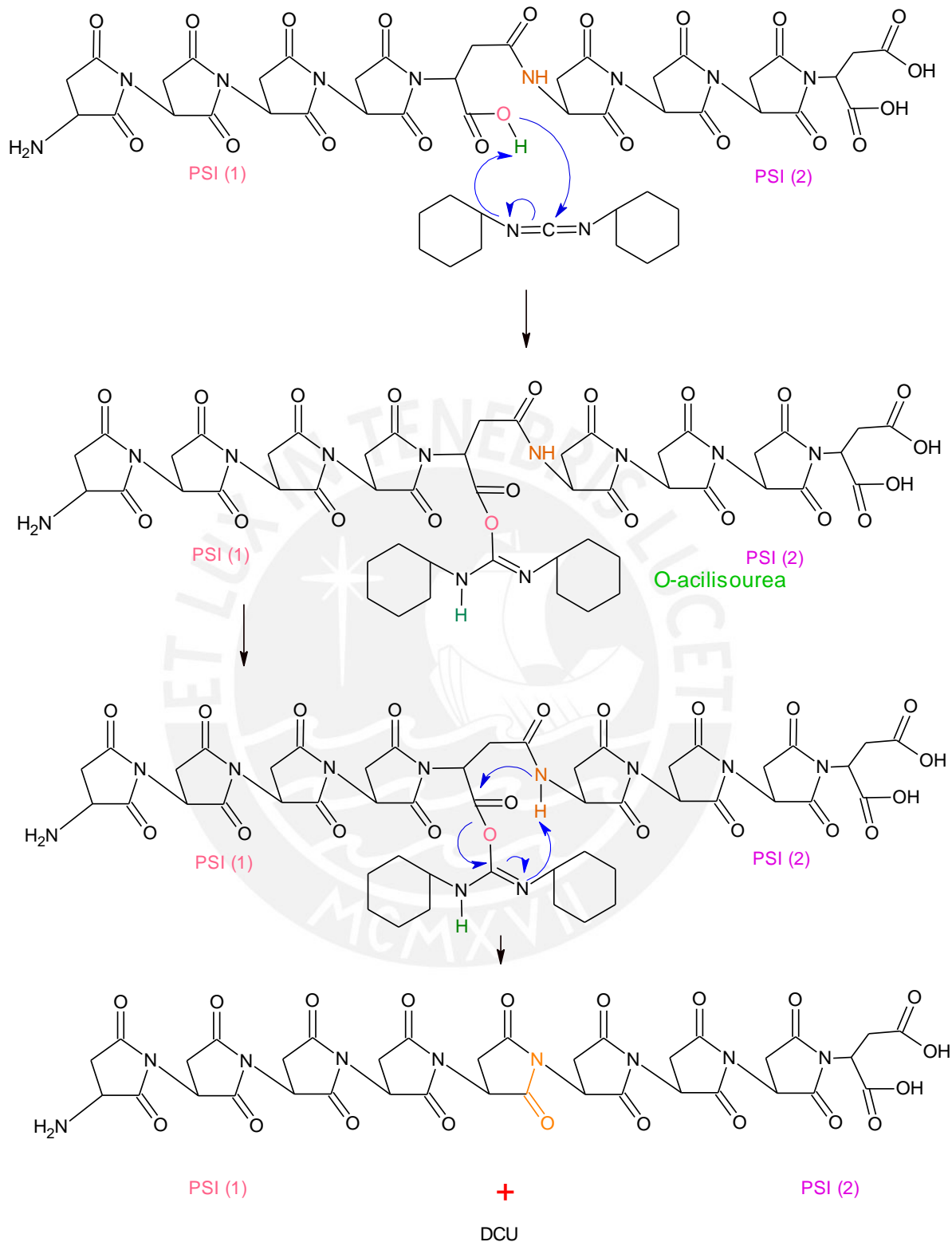
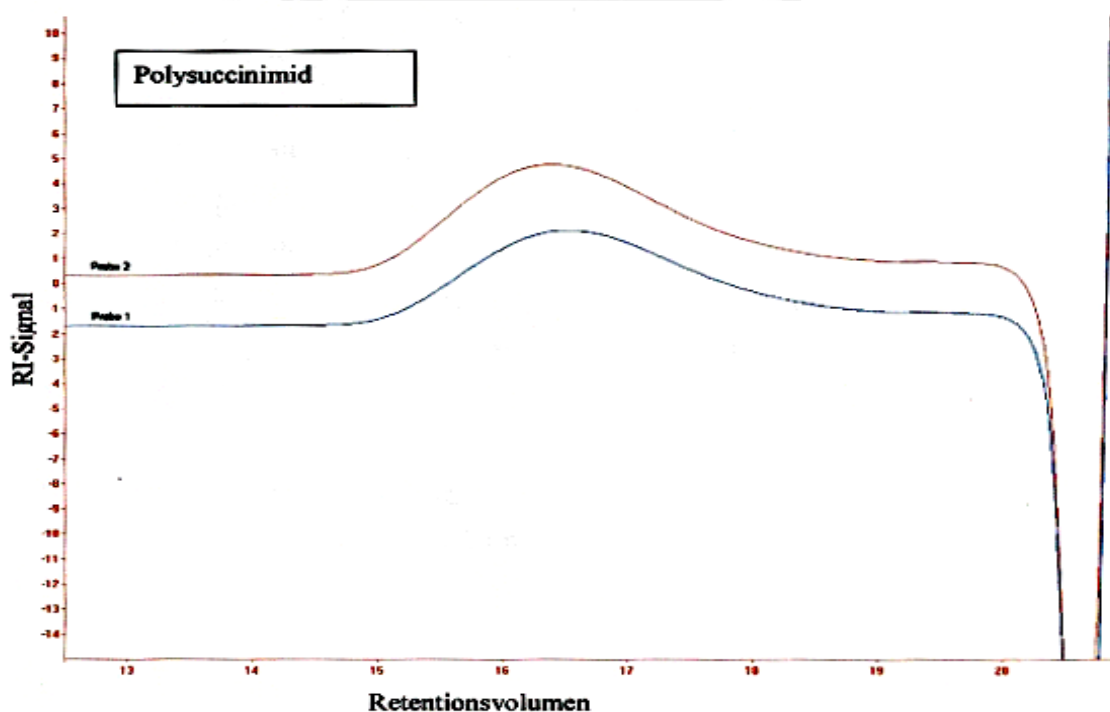


Figura 29. Mecanismo de reacción entre la polisuccinimida y la DCC

Se realizaron ocho reacciones y los resultados obtenidos del rendimiento se ubican en el rango de 90 a 94 %.

El incremento del peso molecular de una muestra de polisuccinimida de 61,5 kDa al ser tratada con DCC fue de 6,5 kDa determinado por GPC (**Figura 30**), en el instituto de Investigación de Polímeros de Dresden, Alemania, a las mismas condiciones que fue determinada la polisuccinimida de partida.

En la **Figura 30**, la curva de color **rojo** corresponde a la polisuccinimida tratada con DCC y se puede observar que se obtuvo valores referenciales de M_n de 27 kDa y un M_w de 68 kDa. Por otro lado, se observa que el promedio de las dispersiones es de 2,52, la cual indica que la polisuccinimida tratada con DCC también se caracteriza por ser un polímero polidisperso.



Sample	Filename	Mn[g/mol]	Mw[g/mol]	Disp
Polysuccinimid (2)	P10VI.006	27000	68000	2.52
	P10VI.007	27000	68000	2.52

Figura 30. Peso molecular del PSI, tratado con 20 mg de DCC por gramo de polímero, determinado por GPC

Se puede observar, como es de esperarse, que la polisuccinimida tratada con DCC tiene similar comportamiento que la polisuccinimida de partida en la determinación del peso molecular por GPC.

Además, para cinco muestras de las ocho llevadas a cabo, usando las mismas condiciones y proporción de DCC, los incrementos de peso molecular obtenidos por viscosimetría intrínseca fueron muy diferentes entre sí, variando de bajos a muy bajos. No ha sido posible encontrar una explicación para la no reproducibilidad de los ensayos en cuestión.

Para explicar el modesto incremento en el peso molecular logrado, resulta de interés considerar lo reportado sobre DCC como agente de acoplamiento en péptidos en la literatura.^{79, 80} Cuando la reacción entre un ácido carboxílico, una amina y la DCC, se lleva a cabo en un solvente de baja constante dieléctrica como CH_2Cl_2 y CHCl_3 que estabilizan el intermediario O-acilisourea, la formación del enlace amida propiciada por la DCC es instantánea. Sin embargo, cuando la reacción es realizada en un solvente más polar como DMF, se obtiene, además del producto principal, una mezcla compleja de otros productos como anhídridos simétricos (anhídrido acíclico y anhídrido succínico) y N-acilurea.

Dado que en nuestro caso, la reacción fue realizada en DMF, solvente en el cual el PSI es soluble, es posible sugerir que el bajo incremento del peso molecular esté relacionado con el efecto desfavorable de un solvente polar sobre la reacción de acoplamiento.

El la **Figura 31**, la cual muestra la formación de los anhídridos y PSI con grupo terminal N-acilurea, productos no deseados, fue elaborado en base a la teoría reportada sobre reactivos de acoplamiento en la formación de enlaces peptídicos.^{79,80}

R y R* : Cadenas de Polisuccinimida

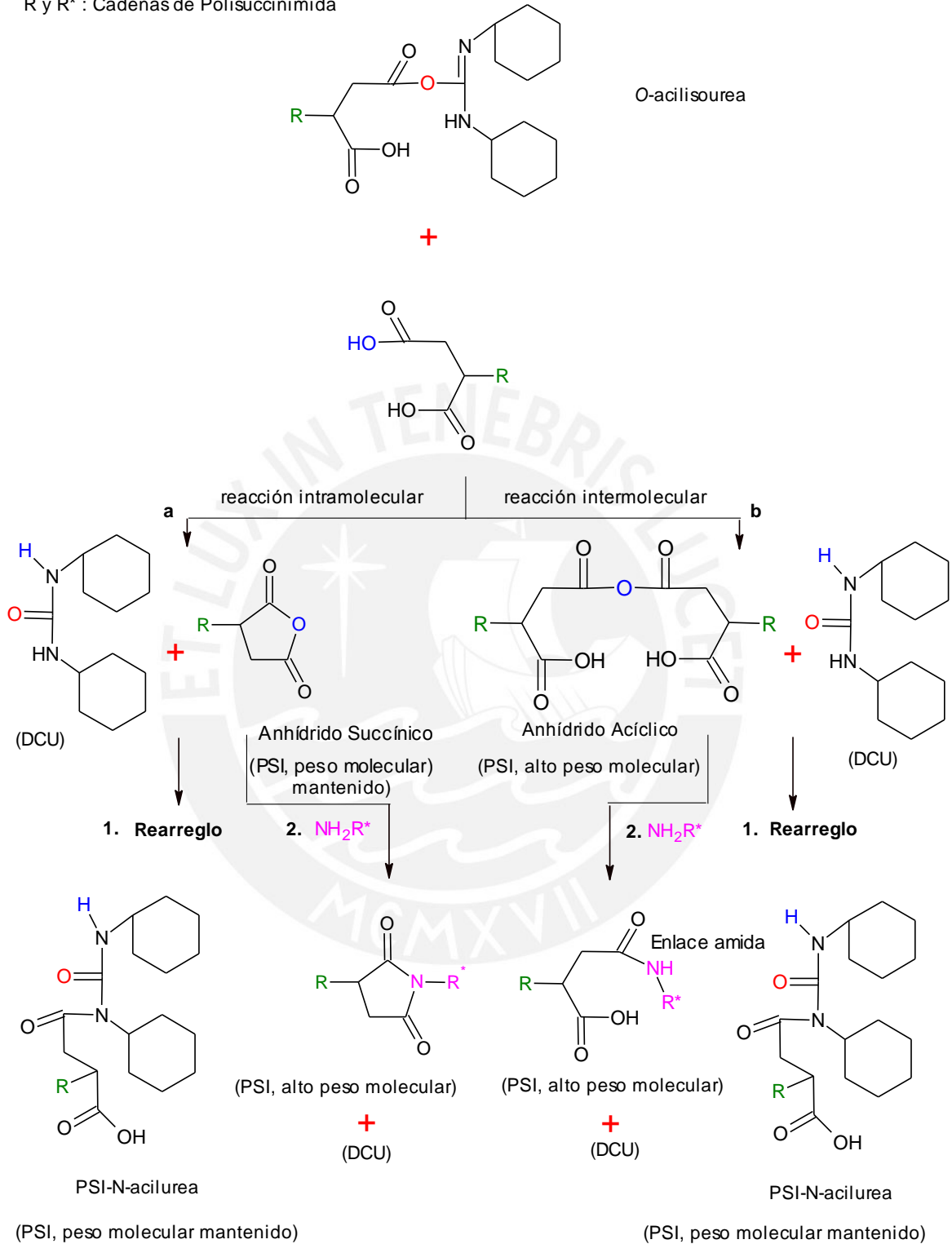


Figura 31. Posibles productos no deseados formados durante la reacción de la polisuccinimida con la DCC y DMF como solvente

Este esquema describe cómo el intermediario O-acilisourea reacciona con otra cadena de polisuccinimida (**R**), específicamente con su grupo ácido dicarboxílico terminal, formándose un anhídrido acíclico y dicitclohexilurea y/o un anhídrido succínico y dicitclohexilurea. Luego, se observa que pueden ocurrir dos reacciones, una de ellas (1) es la de la dicitclohexilurea con el anhídrido acíclico y/o con el anhídrido succínico para formar PSI con un grupo terminal N-acilurea. La otra posible reacción (2) consiste en la reacción del anhídrido acíclico y/o anhídrido succínico con otra cadena de polisuccinimida (**R'**), específicamente con su grupo amino terminal, para formar un enlace amida entre dos cadenas de polisuccinimida y/o el anillo imida, respectivamente. Además, en ambos casos se forma dicitclohexilurea como subproducto.

Por tanto, se concluye que como dos de las cuatro posibles rutas que se observan en la **Figura 31** conducen a polisuccinimidias con un grupo terminal N-acilurea que mantienen el peso molecular del PSI de partida, esto conduce a un menor incremento neto en el peso molecular promedio de las muestras tratadas con DCC cuando se trabaja en un solvente polar como DMF.

Las polisuccinimidias tratadas con DCC fueron caracterizadas por espectroscopía IR y ^1H -RMN. En los **Anexos 10.1.2 y 10.1.3** se muestra la comparación de los espectros ^1H -RMN e IR, respectivamente, representativos de las polisuccinimidias tratadas con DCC y de la polisuccinimida de partida.

El espectro IR de la polisuccinimida tratada con DCC no muestran diferencias significativas con los respectivos PSI de partida. Por otro lado, el espectro ^1H -RMN de las polisuccinimidias ensayadas con DCC mantiene, como es de esperar, las señales características de la polisuccinimida de partida. Sin embargo, presentan una ligera diferencia en el rango de 1 a 2 ppm, donde resuenan picos de baja intensidad que no se observan del todo en el PSI de partida (**Figura 20**). Estos picos son prácticamente imperceptibles.

Esta observación sugirió que podrían deberse a restos de DCC que no ha reaccionado y/o a los productos no deseados formados en DMF como solvente.

De acuerdo al ^1H -RMN de la DCC, los protones metileno del ciclohexilo aparecen de 1 a 2 ppm mientras que el protón metino aparece a 3,2 ppm. Este último no sería observado pues se solaparía con una señal muy intensa del PSI.

Por otro lado, aunque los anhídridos acíclico y succínico poseen también señales a 2,4 y 1,4 ppm respectivamente (correspondientes a sus protones CH_2 y CH no solapables con las del PSI)⁸¹, se debe tener en cuenta que las funciones anhídrido en cuestión se encontrarían en nuestro caso incorporadas a cadenas poliméricas de polisuccinimida, cuyas señales obviamente serán ordenes de magnitud más intensas y dominarán el espectro ^1H -RMN.

Por la misma razón, la señal entre 8 y 9 ppm correspondiente al protón amida del grupo terminal N-acilurea de las cadenas poliméricas del PSI que habrían mantenido su peso molecular original tampoco sería observable en el ^1H -RMN.

6.1.6.2 Síntesis de la polisuccinimida variando las condiciones de reacción

Se ensayaron tres nuevas síntesis de la polisuccinimida variando las condiciones de reacción respecto al número de moles del ácido fosfórico (H_3PO_4 85 %), tiempo de reacción y temperatura (5.2.1.3).

En la **Tabla 7**, se muestra un resumen de los resultados obtenidos variando las condiciones de reacción de la síntesis de la polisuccinimida.

Tabla 7. Resultados de la síntesis de las polisuccinimidias variando las condiciones de reacción

Síntesis	Original	Síntesis 1	Síntesis 2	Síntesis 3
% Rendimiento	85 - 89	89	88	58
Color del producto final	beige	crema	amarillo pálido	marrón
Observaciones	-	Los espectros IR y ^1H -RMN tienen las mismas características que los espectros IR y ^1H -RMN del PSI de partida.	El espectro IR es idéntico que el espectro IR del PSI de partida.	Los espectros IR y ^1H -RMN presentan las mismas señales que los espectros IR y ^1H -RMN del PSI de partida.

Para la **síntesis 1**, se pudo observar que la mezcla de reacción presentó un color anaranjado más intenso que en la síntesis original y mayor fluidez. Además, durante la precipitación se forma un sólido muy fino que requiere de un tiempo moderado para su completa precipitación. Se obtuvo un producto crema (rendimiento: 89,16 %). Por otro lado, los espectros IR y $^1\text{H-RMN}$ de este polímero poseen las mismas características que los del PSI obtenido en la síntesis original.

Para la **síntesis 2**, se observó nuevamente que el color de la mezcla de reacción fue un color anaranjado más intenso que la síntesis original. El producto formado durante la precipitación es un sólido muy fino que también requiere de un tiempo moderado para su completa precipitación. Se obtuvo un producto amarillo pálido (rendimiento: 87,79 %).

Con respecto a su caracterización espectroscópica, el espectro IR no muestra diferencia alguna con el del PSI de la síntesis original. Por otro lado, en el espectro $^1\text{H-RMN}$ (**Figura 32**) de este polímero se observa que se mantienen las características señales de la polisuccinimida. Sin embargo, ha aparecido una nueva señal no identificada de baja intensidad a 4,07 ppm que no está presente en el PSI de partida.

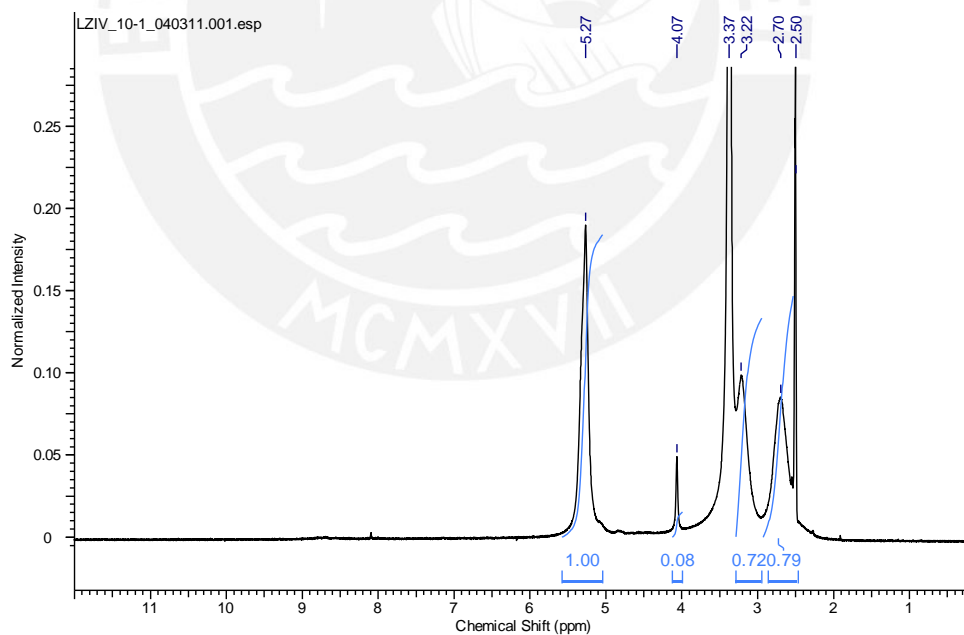


Figura 32. $^1\text{H-RMN}$ en $\text{DMSO-}d_6$ de la polisuccinimida sintetizada con el doble del número de moles del H_3PO_4 85 %

Finalmente, en la **síntesis 3**, se observó que la mezcla de reacción adquirió un color marrón oscuro a diferencia del típico color anaranjado de aquella de la síntesis original. Se obtuvo un producto marrón (rendimiento: 57,61 %). El hecho de que la muestra haya adquirido un color marrón oscuro podría indicar una descomposición parcial de la polisuccinimida al trabajar a 239 °C por tres horas de reacción. Sin embargo, los espectros IR y ¹H-RMN del producto indican que se trata del PSI puro.

Por otro lado, si la temperatura de la reacción se incrementa a 300 – 450 °C el monómero DL-ácido aspártico y la masa polimérica llegarían a descomponerse completamente. La descomposición del monómero produciría los gases de NH₃, C₂H₄, CO y H₂O.⁸²

En la literatura se encuentra reportado que la descomposición de la polisuccinimida se inicia a 230 °C, donde el producto adquiere un color más oscuro que cuando se realiza la síntesis a menor temperatura; además menciona que ocurre una disminución del peso molecular. También, se indica que a 200 °C el peso molecular aumenta considerablemente, sin embargo a 220 °C el peso molecular de la polisuccinimida se mantiene constante.⁵¹

En el **Anexo 10.2.1** se muestra fotos de las diversas etapas de esta síntesis y en el **Anexo 10.2.2** los correspondientes espectros IR y ¹H-RMN.

El peso molecular del producto de la síntesis 1 es menor respecto al peso molecular del producto de la síntesis 3 determinado por viscosimetría intrínseca.

6.1.7 Comparación de las polisuccinimidias purificadas con una y dos precipitaciones

Se observa, para las dos síntesis, que el rendimiento de la reacción con una sola precipitación es de 97 % y con la segunda precipitación disminuye a 85 - 89 %.

El rendimiento que reportan Neri y colaboradores al utilizar un rotaevaporador es de 96 %^{45, 46}, por lo que se puede afirmar que la síntesis de la polisuccinimida realizada en el presente trabajo con un equipo de policondensación estático, además de ser cuantitativamente reproducible, da un resultado similar e incluso ligeramente superior (97,4 %) al reportado cuando se realiza una sola precipitación.

Los espectros IR, ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de las polisuccinimidas purificadas mediante una sola precipitación poseen las mismas características que los correspondientes espectros de aquellas con dos precipitaciones, por lo que se concluye que basta la primera para obtener un producto puro.

6.2 Ligando polimérico : sal de sodio del α,β -poli(ácido aspártico)

6.2.1 Síntesis

Se realizaron ocho síntesis de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) por medio de una hidrólisis básica de la polisuccinimida. De acuerdo a lo reportado por Shinoda y colaboradores, se encontró que el pH adecuado para que ocurra la disolución completa de la polisuccinimida, durante las tres horas de reacción con agitación y a temperatura ambiente, es de 11,5 a 12,5.⁴⁵ La idea de dializar y liofilizar la solución polimérica fue tomada de otras fuentes bibliográficas.^{54, 76, 77, 83, 84, 85}

La diálisis de la solución polimérica fue realizada a través de la membrana de diálisis (Spectra/Poro 4 con MWCO 12 – 14 kDa) tomando en cuenta los diámetros de poro reportados por Kim y Neuse para la síntesis de poliaspartamidas que fungen como vehículos poliméricos.^{54, 39} Con el uso de estas membranas de 12 a 14 kDa se obtendrían en la práctica productos de doble peso molecular es decir de 24 a 28 kDa⁸⁶ dentro del rango deseado.

En este trabajo se propone el siguiente mecanismo de reacción de la síntesis de la sal de sodio del α,β -poli(ácido aspártico), **Figura 33**.

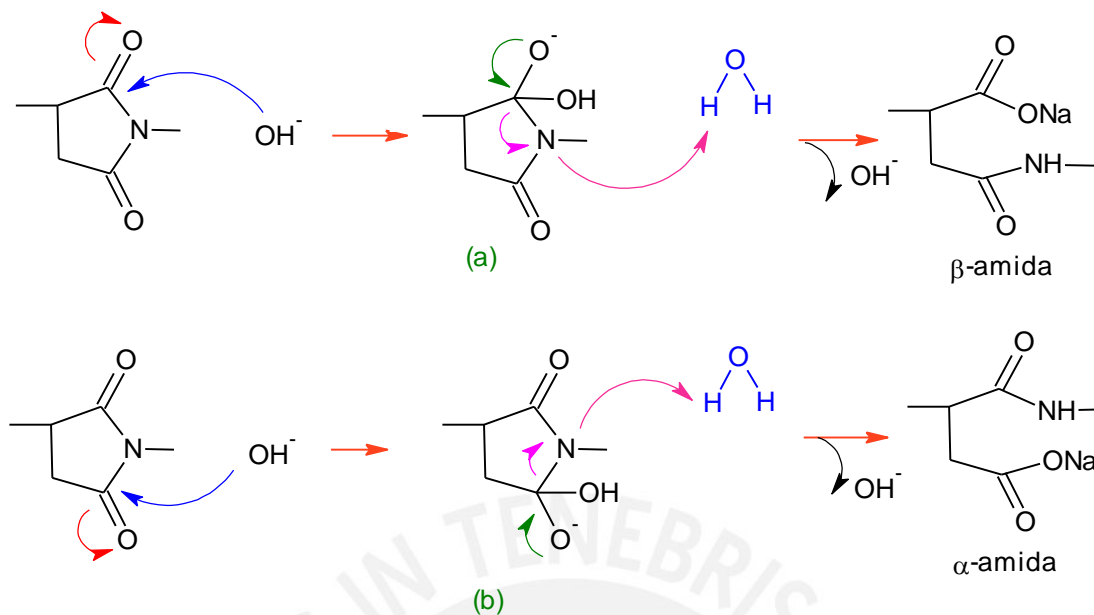


Figura 33. Mecanismo de reacción de la síntesis de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico)

De acuerdo a este mecanismo, se puede observar que los iones OH^- atacan al grupo carbonilo del anillo imida para formar (a) o (b), los cuales sufren una hidrólisis, liberándose iones OH^- y formándose el respectivo poliaspartato. Dependiendo del ataque de los iones OH^- a los carbonos carbonilo inequivalentes se formarán las unidades α -amida ó β -amida.

6.2.2 Rendimiento

El porcentaje del rendimiento obtenido para cada una de las ocho síntesis de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) es cuantitativamente alto 89 - 92 %.

Se observa que, además de ser alto, se ubica dentro de un rango relativamente estrecho; esto último indica una buena reproducibilidad de la síntesis en cuestión.

6.2.3 Determinación del peso molecular de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) por el método de viscosimetría intrínseca

Para determinar el peso molecular de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) se prepararon soluciones de la misma en NaBr 0,5 M en medio acuoso a pH 7,3 en el rango de 0,002 a 0,01 g/mL y para las medidas de viscosidad se utilizó el viscosímetro de Ubbelohde.^{51, 83} El procedimiento para determinar el peso molecular por viscosidad, está descrito en el capítulo anterior .

Las medidas de viscosidad reducida deben realizarse en presencia de NaBr, puesto que de no ser así las gráficas de viscosidad reducida versus concentración de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) no serían lineales sino que mostrarían las curvaturas usualmente encontradas para polielectrolitos en soluciones de baja fuerza iónica.⁸⁷ Esto podría deberse a que los grupos ácido carboxílico de las cadenas de α,β -poli(DL-ácido aspártico) se ionizan conllevando a que las cadenas poliméricas ahora cargadas se repelan entre sí y se expandan produciéndose un cambio de conformación de helicoidal a una conformación donde las cadenas adoptan la forma de varillas rígidas⁸⁸ afectando de esta manera las medidas de viscosidad. Para evitar este problema, se agregó la sal de NaBr donde los iones de esta sal neutralizarían a los grupos iónicos de la cadena polimérica permitiendo que el polímero ahora adopte la conformación de un polímero neutro en un buen solvente y de esta manera se obtendrían medidas correctas de viscosidad.

Los cálculos para determinar el peso molecular por viscosimetría intrínseca se basa en que a partir de los resultados de tiempo de flujo obtenidos para el solvente y la solución del polímero, t_0 y t respectivamente, y la concentración de cada solución, C , se calculan las viscosidades reducidas, η_{red} , para cada solución de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) según la siguiente ecuación:

$$\eta_{red} = \frac{t - t_0}{C \cdot t_0}$$

Luego, se construye una gráfica de viscosidad reducida versus concentración. Se extrapolan las concentraciones a cero y de la ecuación de la gráfica se calcula la viscosidad intrínseca, $[\eta]$.

A partir del valor de $[\eta]$, utilizando la ecuación de Mark-Houwink (1) se puede calcular el peso molecular promedio, M_v , a partir de la ecuación en su forma logarítmica (2) se puede realizar el cálculo de manera directa. Se tomarán para K y a los valores de 0,0506 mL/g y 0,656, respectivamente.

$$[\eta] = K \cdot M_v^a \quad \dots\dots\dots (1)$$

$$M_v = \text{Anti log} \left[\frac{\log[\eta] - \log K}{a} \right] \quad \dots\dots\dots (2)$$

Los valores de K y a considerados para la sal de sodio del α, β -poli(DL-ácido aspártico) son 0,0506 mL/g y 0,656, respectivamente, y corresponden a los de la sal de sodio del poli(ácido acrílico).^{51, 52} En la bibliografía se reporta que los poli(acrilatos) de sodio lineales tienen similar tamaño, forma y densidad de carga que los poliaspartatos de sodio lineales en solución y por lo tanto muestran una buena correlación para las determinaciones de pesos moleculares.^{44, 89} En la **Figura 34** se muestra la estructura de la sal de sodio del α, β -poli(DL-ácido aspártico) y de la sal de sodio del poli(DL-ácido acrílico).

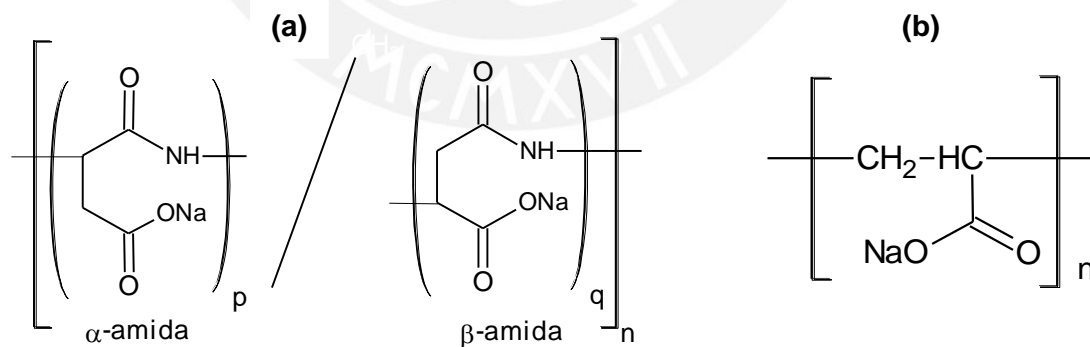


Figura 34. Estructuras de la sal de sodio del α, β -poli(DL-ácido aspártico) (a) y de la sal de sodio del poli(DL-ácido acrílico) (b)

En la **Tabla 8** se pueden observar la ecuación de la gráfica : viscosidad reducida versus concentración de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico), la viscosidad intrínseca y el peso molecular para ocho reacciones.

Tabla 8. Peso molecular y viscosidad intrínseca de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico)

Número de Síntesis	Ecuación de la gráfica	Viscosidad Intrínseca (mL/g)	Peso Molecular (kDa)
1	$\eta = 468 C + 41,34$ $\eta = 555,9 C + 40,85$ $\eta = 410,2 C + 41,69$	41,34 40,85 41,69	27,5 26,9 27,5
2	$\eta = 412,6 C + 41,67$	41,67	27,5
3	$\eta = 466,9 C + 41,35$	41,35	27,5
4	$\eta = 739,1 C + 42,02$	42,02	28,2
5	$\eta = 355,6 C + 44$	44	30,2
6	$\eta = 350,8 C + 44,03$	44,03	30,2
7	$\eta = 790 C + 41,81$	41,81	28,2
8	$\eta = 739,7 C + 42,02$	42,02	28,2

A la primera muestra de sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) se le determinó el peso molecular por triplicado y los valores fueron : 27,5 kDa (2 veces) y 26,9 kDa, lo que indica una reproducibilidad aceptable, siendo el valor promedio de 27,3 kDa.

A continuación, como ejemplo, se muestra en la **Tabla 9** los datos de la gráfica viscosidad reducida versus concentración de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) de la síntesis número 5 (**Tabla 8**) y en la **Figura 35** la gráfica de viscosidad reducida versus concentración de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico).

Tabla 9. Datos de la gráfica de la viscosidad reducida versus concentración de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico)

Concentración de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) (g/mL)	Viscosidad Reducida (mL/g)
0,002	45,02
0,004	45,14
0,006	46,09
0,008	46,57
0,01	47,86

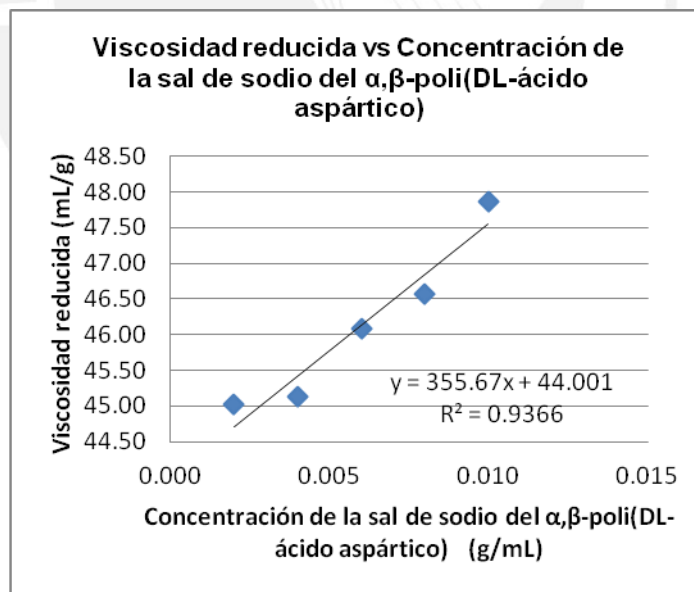


Figura 35. Gráfica de la viscosidad reducida versus concentración de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico)

Se puede comentar que, partiendo de polisuccinimidas de peso molecular de 61,5 a 68 kDa y bajo las condiciones suaves de hidrólisis básica utilizadas se produce la disminución esperada en el peso molecular de la sal. Se logran así valores muy convenientes entre, 27,3 y 30,2 kDa, y por tanto dentro del rango deseado para fungir como vehículo polimérico efectivo del agente activo.

Se intentó determinar el índice o grado de dispersión de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) por GPC en el Instituto de Investigación de Polímeros de Dresden, Alemania, pero no fue posible por no estar operativa la columna para muestras solubles en medio acuoso.

6.2.4 Caracterización

6.2.4.1 Espectroscopía infrarroja

La asignación completa de los picos del espectro infrarrojo de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) (indicada ya en 5.2.2.1) fue lograda en base a la teoría y a estudios de caracterización realizados por diferentes autores Sumayya, Sikes, Ho, Sun y Mrvčič.⁹⁰⁻⁹⁴

En este acápite se comentan solo las bandas de absorción más importantes del espectro infrarrojo, mostrado en la **Figura 36**, que caracteriza a esta macromolécula.

La banda ancha y muy intensa a $3405,37\text{ cm}^{-1}$ corresponde al estiramiento N-H del grupo amida, mientras que los picos que aparecen como hombros de la misma a $3076,5$ y $2937,5\text{ cm}^{-1}$ se asignan a los estiramientos asimétrico y simétrico C-H del grupo CH_2 , respectivamente.

En la zona de $1700 - 1300\text{ cm}^{-1}$ aparecen varias bandas de absorción intensas características del grupo amida y del grupo carboxilato. Los picos a $1671,4$ y $1527,4\text{ cm}^{-1}$ pertenecen al estiramiento C=O de la amida I y a la flexión N-H en el plano de la amida II, respectivamente; esta última se superpone con el estiramiento C-N de la amida III. Por otro lado, las absorciones a $1595,7$ y $1397,4$ corresponden a los estiramientos asimétrico y simétrico, respectivamente, del grupo funcional COO^- .

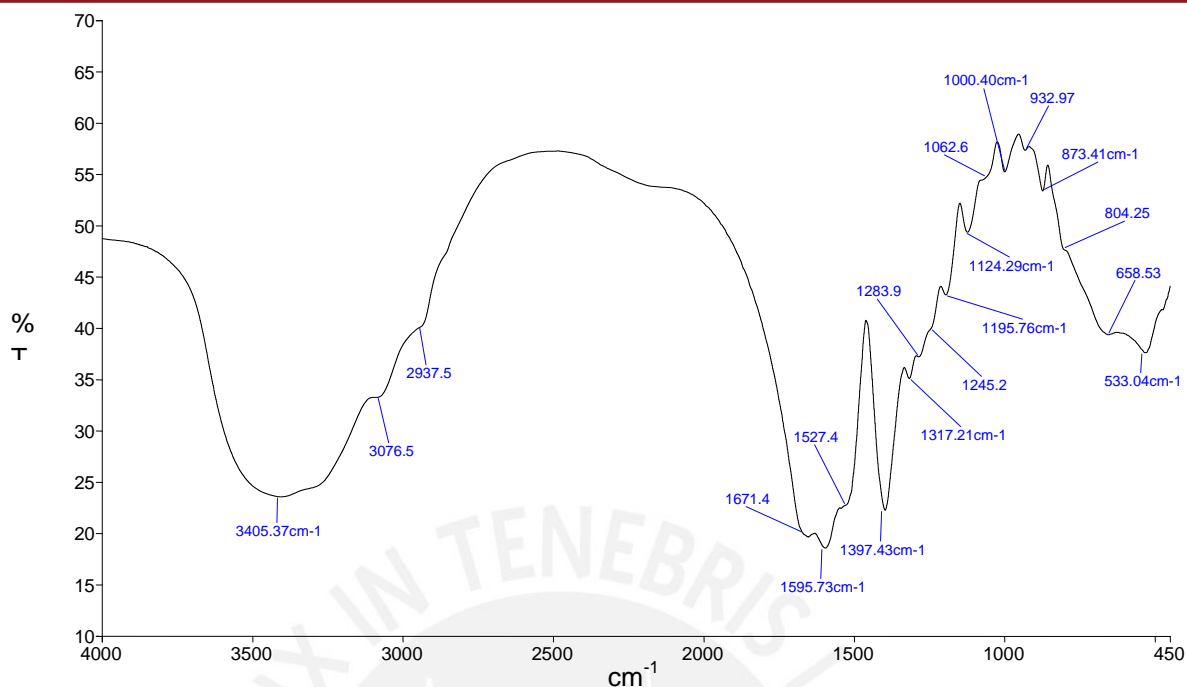


Figura 36. IR (KBr) de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico)

6.2.4.2 Resonancia magnética nuclear

En el espectro ^1H -RMN de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) medido a pH 8 – 9 en D_2O (**Figura 37**) se observa que aparecen dos resonancias para el protón metino, una a 4,53 ppm, y otra a 4,33 - 4,35 ppm. Los protones metileno son observados como cinco resonancias a 2,42 - 2,64 ppm. Los protones amida ó cualquier protón ácido no se observan porque se intercambian con el deuterio del D_2O .

Según la literatura, la señal menos intensa a 4,53 ppm corresponde al protón metino de la unidad α , mientras que aquella de más alta intensidad a 4,33 - 4,35 ppm es asignada a la unidad β .^{76, 55, 95}

A partir de las intensidades relativas de ambas señales es posible calcular el % de unidades α y β . Se encontró que, considerando los ^1H -RMN de las ocho síntesis realizadas, el % promedio de unidades β es muy superior al de las α (71,5 % vs 28,5 %).

Esta relación β/α de 2,5 : 1 corresponde a un pH de hidrólisis básica de 11,5 – 12,5 de la polisuccinimida. De acuerdo, a lo reportado en la literatura, la relación β/α es afectada por las condiciones de hidrólisis, siendo el factor predominante el pH del medio. El peso molecular de la polisuccinimida de partida, la fuerza iónica y la temperatura no afectan la relación de las unidades β/α .⁹⁶

En el espectro ^{13}C -RMN de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) a pH 8 – 9 (**Figura 37**) se observa que el carbono metileno es visto como dos picos a 37,58 y a 39,06 ppm que corresponden a las unidades β y α , respectivamente. La resonancia del carbono metino aparece como un multiplete centrado en 51,83 ppm. Por otro lado, el carbono del grupo carbonilo de la amida se presenta como tres multipletes de decreciente intensidad a 171,92 – 172,04; 172,63 – 172,74 y 173,36 ppm. Por último, el C del grupo carboxilato aparece como dos señales no bien resueltas, la primera a 177,5 ppm y la segunda más intensa a 177,95 ppm.

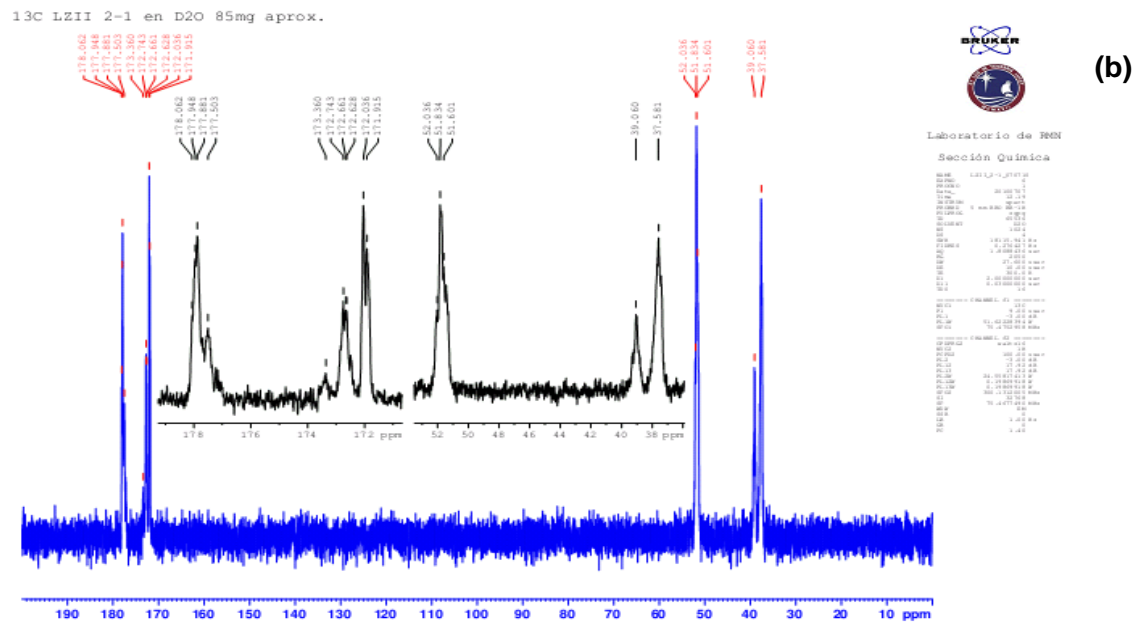
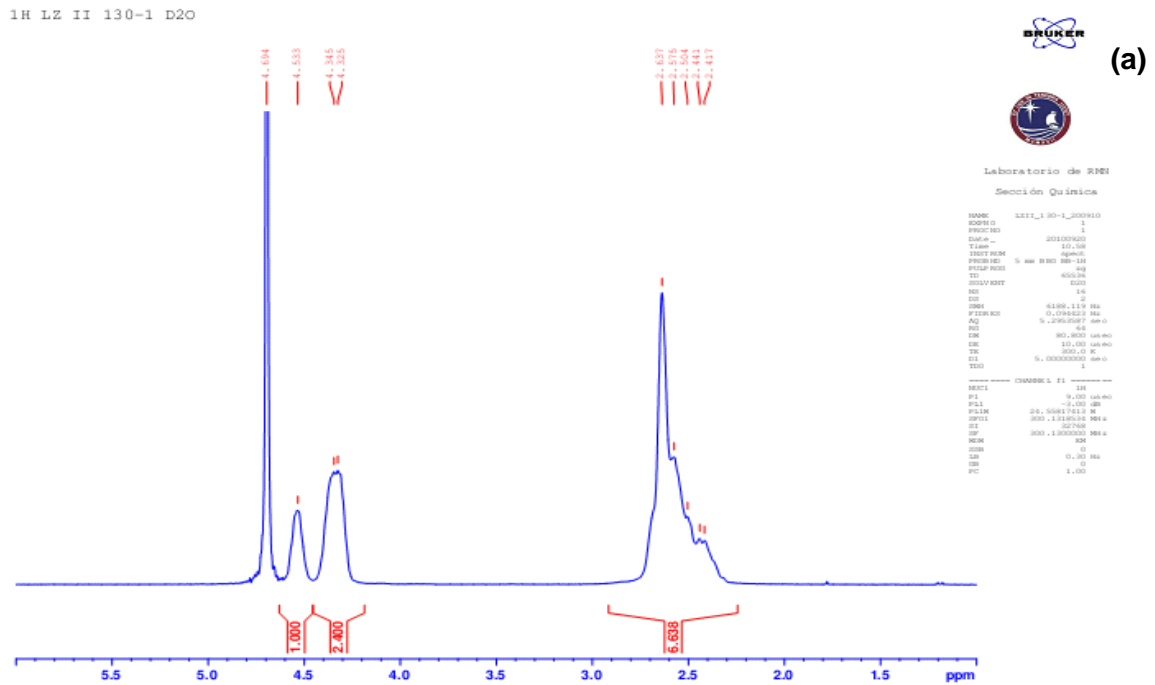


Figura 37. Espectros ^1H -RMN (a) y ^{13}C -RMN (b) en D_2O de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico)

El espectro HSQC (^1H - ^{13}C , corto alcance), **Anexo 10.3.1**, del polímero en cuestión (analizados igualmente a pH 8 – 9) confirma que, de acuerdo al acoplamiento de los protones metileno (**mancha roja**) y metino (**mancha azul**), el carbono metileno efectivamente resuena a 37,58 y a 39,06 ppm y el carbono metino a 51,60 - 52,04 ppm.

En el espectro HMBC (^1H - ^{13}C , largo alcance) en el rango completo (**Anexo 10.3.2, a**), se puede observar que el protón metino acopla con el carbono metileno y el protón metileno acopla con el carbono metino. Se observa, además, que los protones metino y metileno acoplan con el carbono carbonilo de la amida y del grupo carboxilato.

Mediante el espectro HMBC ampliado en la zona 0 a 60 ppm (**Anexo 10.3.2, b**) se logró designar las unidades α y β para los carbonos metileno. Se puede observar que el protón metino β (4,33 – 4,35 ppm) acopla con el carbono metileno a 37,58 ppm y el protón metino α (4,53 ppm) acopla con el carbono metileno a 39,06 ppm. Por lo tanto, el carbono metileno a 37,58 ppm corresponde a la unidad β y el carbono metileno a 39,06 ppm corresponde a la unidad α . Por otro lado, se observa que los hidrógenos metileno alrededor de 2,4 – 2,6 ppm acoplan con el carbono metino a ca. 51,8 ppm.

En el espectro COSY, **Anexo 10.3.3**, se puede observar que el protón metino α acopla con los protones metileno de campo alto y el protón metino β acopla con los protones metileno de campo bajo.

Por último, pueden existir tres posibles secuencias de las unidades en la cadena polimérica en cuestión : $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ ($\beta\alpha$) y $\beta\beta$ de acuerdo a lo reportado en la literatura (**Anexo 10.3.4**). A partir del análisis del espectro HMBC, expandido en la zona de interés (160 – 182 ppm), ver **Anexo 10.3.5**, se observó acoplamientos entre el carbono carbonilo del grupo amida y los protones metino α y β que, de acuerdo a lo reportado a la literatura, corresponden a una secuencia al azar de las unidades α y β en la cadena polimérica de la sal sintetizada.⁷⁶

Con el fin de detectar y cuantificar la posible presencia de succinimida residual en el producto de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) se utilizó el espectro ^1H -RMN a 60 $^{\circ}\text{C}$ (**Anexo 10.3.6, a**).⁷⁶

La ausencia de las señales características de los grupos CH_2 y CH del PSI a 3,2 y 5,3 ppm, respectivamente, indican que, bajo las condiciones suaves de hidrólisis básica, se logró una conversión completa al α,β -poli(DL-aspartato).

6.2.5 Ensayos previos de síntesis de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico)

El rendimiento de las dos reacciones (89 – 91 %), **Tabla 2**, es alto y comparable al que se obtuvo para la hidrólisis básica a condiciones suaves de la polisuccinimida (90 – 94 %).

Sin embargo, como se observa en la **Tabla 10**, los pesos moleculares obtenidos de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) se encuentran por debajo del límite inferior del rango deseado, 25 kDa. El primer tipo de hidrólisis básica produce un polímero de 18,2 kDa y el segundo uno de 24,6 kDa, mientras que con la hidrólisis básica a condiciones suaves se obtuvieron pesos moleculares de 27 a 30 kDa, respectivamente, para las mismas muestras de polisuccinimidias.

Tabla 10. Peso molecular de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) después de la hidrólisis básica de la polisuccinimida a condiciones fuertes

Tipo de hidrólisis básica	Peso molecular de la polisuccinimida de partida (kDa)	Peso molecular de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) (kDa)
1	55,0	18,2
2	49,9	24,6

Finalmente, los espectros ^1H -RMN de ambos productos son idénticos al espectro ^1H -RMN de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) sintetizada bajo las condiciones suaves de hidrólisis básica. La relación α / β de estos dos productos es 27,70 y 72,30 % para el

primer tipo de hidrólisis y 27,10 y 72,90 % para el segundo, mientras que para la hidrólisis básica a condiciones suaves es de 28,5 y 71,5 % (6.2.4.2). De acuerdo a este resultado se puede comentar que cuando el pH de la hidrólisis aumenta, la proporción de unidades β parece que aumenta como se observa en la literatura.⁹⁶

6.3 α,β -poli(DL-ácido aspártico)

6.3.1 Síntesis

Este polímero fue sintetizado a partir de su sal de sodio, llevando una solución de esta última a pH 3, con una posterior liofilización. El rendimiento de la reacción es de 42,01%. Se puede afirmar que, dado su valor de pK_a de 4,87, a un pH igual o menor a 3 el polímero está completamente protonado.⁴⁹

6.3.2 Caracterización

6.3.2.1 Espectroscopía Infrarroja

La asignación completa del espectro IR del α,β -poli(DL-ácido aspártico), incluida en 5.2.3, se basó también en la teoría y publicaciones especializadas en el estudio de este polímero por Sumayya, Sikes, Ho, Sun y Mrvčič.⁹²⁻⁹⁶

El espectro IR del α,β -poli(DL-ácido aspártico) sintetizado, **Figura 38**, muestra las absorciones características del grupo amida aunque algo desplazadas respecto a la sal. Los estiramientos N-H y C=O de la amida I aparecen a 3354,5 y 1661,8 cm^{-1} respectivamente, mientras que la flexión N-H en el plano de la amida II (superpuesta con el estiramiento C-N de la amida III) lo hace a 1531,8 cm^{-1} .

Sin embargo, surgen notables e importantes diferencias con el espectro IR de la sal. Se observa la desaparición de la banda muy intensa a 1596 cm^{-1} debida al estiramiento asimétrico del grupo COOH desprotonado en la sal y la aparición de una nueva e intensa banda a 1728 cm^{-1} correspondiente al estiramiento C=O del grupo COOH. Otras bandas propias del grupo carboxílico son el estiramiento O-H, que se encuentra superpuesto con el estiramiento N-H de la amida ya mencionado y la flexión O-H en el plano a 1402 cm^{-1} .

Esta última aparece en posición muy similar al estiramiento simétrico del COO^- en la sal. Además, observamos una banda ancha, aún más intensa que la flexión O-H, centrada en 1227 cm^{-1} , asignada al estiramiento C-O del grupo COOH, que obviamente está ausente en la sal. Por último, el pico pequeño a 913 cm^{-1} se asigna a la flexión O-H fuera del plano del grupo COOH.

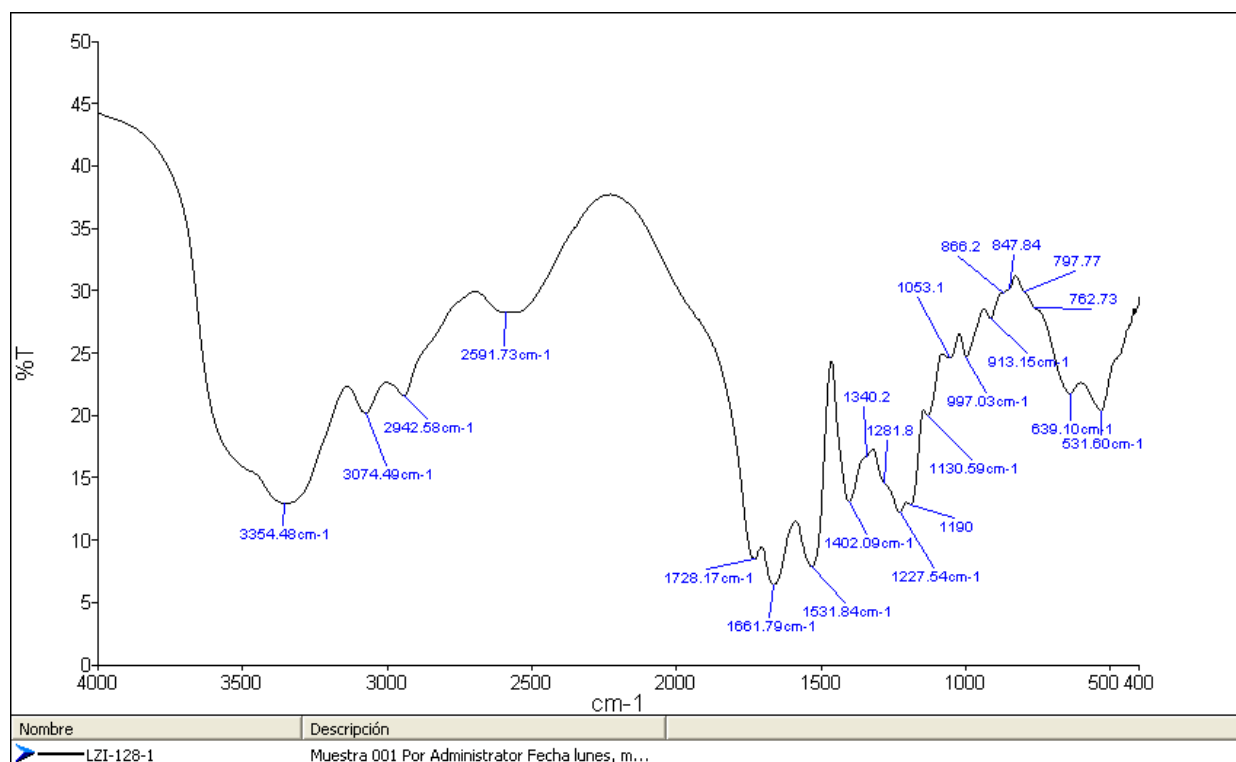


Figura 38. IR (KBr) del α,β -poli(DL-ácido aspártico)

6.3.2.2 Resonancia magnética nuclear

En el espectro ^1H -RMN (**Figura 39**) se puede observar que hay un desplazamiento de las señales de los protones metileno y metino a campo bajo respecto a la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico). Los protones metileno aparecen a 2,76 ppm y sólo un protón metino es observado, de la unidad β , a 4,62 ppm, mientras que el protón metino de la unidad α no se observa ya que se sobrelapa con el pico del agua.

En el espectro ^1H -RMN a $60\text{ }^\circ\text{C}$ (**Figura 39**) se observa el esperado desplazamiento de las señales hacia campo bajo, lo que permite apreciar claramente las señales correspondientes a los protones metino α y β .

En el espectro ^{13}C -RMN (**Figura 40**) se observa más bien lo contrario, los picos se desplazan a campo alto respecto a la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico). El carbono metileno de las unidades β y α resuena a 35,84 y a 36,87 ppm, respectivamente. Se observa además que el carbono metino aparece a 49,99 ppm. El carbono carbonilo de la amida aparece entre 171,68 – 172,25 ppm y el carbono carbonilo del grupo ácido carboxílico resuena entre 174,29 y 174,88 ppm.



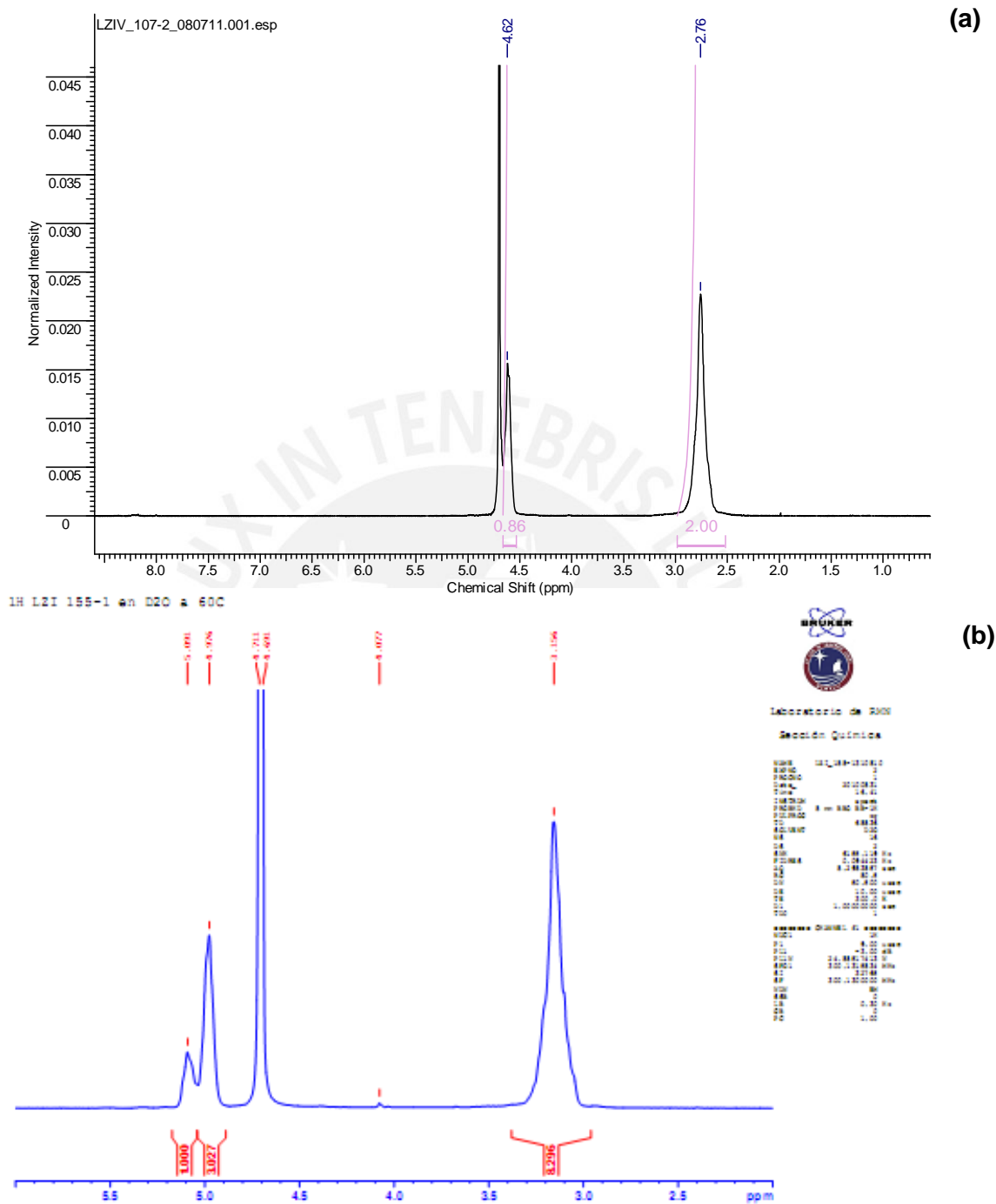


Figura 39. Espectros ^1H -RMN a temperatura ambiente (a) y a 60°C (b) en D_2O del α,β -poli(DL-ácido aspártico)

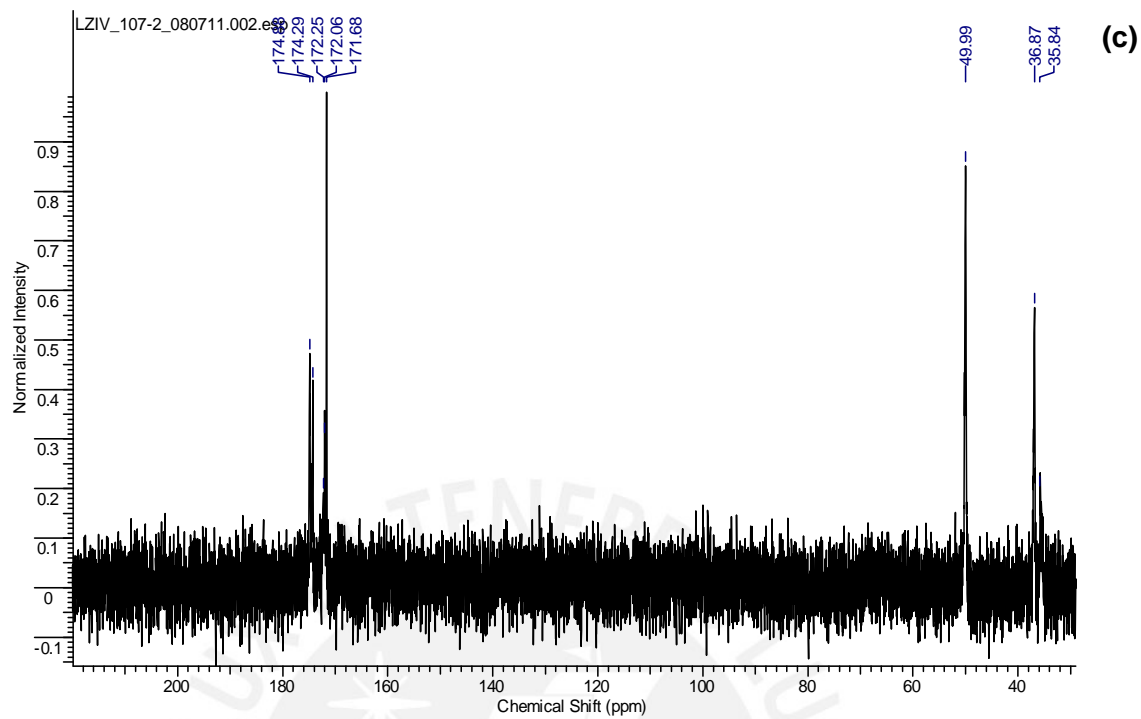
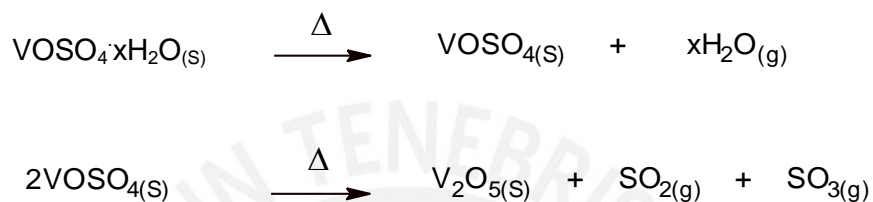


Figura 40. Espectro ^{13}C -RMN (b) en D_2O del α,β -poli(DL-ácido aspártico)

6.4 Determinación del número de moléculas de agua en el reactivo sulfato de vanadilo hidratado ($\text{VOSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$)

El número de moléculas de agua en el reactivo sulfato de vanadilo hidratado fue determinado gravimétricamente por calcinación.^{97, 98} El procedimiento fue descrito en el capítulo anterior (5.2.4).

La reacción llevada a cabo fue la siguiente:



Se realizaron tres ensayos. Luego, con el número de moles del óxido V_2O_5 residual hallado experimentalmente se pudo calcular por estequiometría el número de moles del sulfato de vanadilo hidratado. A partir de dicho número de moles es posible calcular el número de moles de moléculas de H_2O por mol de VOSO_4 , según se muestra en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Datos para la determinación del N^o de moles de moléculas de H₂O por mol de moléculas de VOSO₄.xH₂O

Número de ensayo	Peso de VOSO ₄ .xH ₂ O antes de la calcinación (g)	Peso de V ₂ O ₅ encontrado al final de la calcinación (g)	Moles de VOSO ₄ .xH ₂ O calculados por estequiometría (mol)	Peso molecular del VOSO ₄ .xH ₂ O experimental (g/mol)	Peso molecular del VOSO ₄ (g/mol)	Peso del H ₂ O por mol de VOSO ₄ .xH ₂ O (g)	N ^o de moles de moléculas de H ₂ O en una mol de VOSO ₄ .xH ₂ O
1	0,0601	0,0263	2,8920 x 10 ⁻⁴	207,81	162,94	44,87	2,49
2	0,0601	0,0263	2,8920 x 10 ⁻⁴	207,81	162,94	44,87	2,49
3	0,0602	0,0264	2,9030 x 10 ⁻⁴	207,37	162,94	44,43	2,47

6.5 Complejo polimérico : vanadilo - α,β -poli(DL-ácido aspártico)

6.5.1 Síntesis

Como se ha mencionado anteriormente la síntesis del complejo vanadilo del presente trabajo fue desarrollada en base a investigaciones previas realizadas por Sakurai y colaboradores quienes desarrollaron el complejo vanadilo-poli(γ -ácido glutámico).^{36, 37} El ligando polimérico, α,β -poli(DL-ácido aspártico), se diferencia del γ -poli(ácido glutámico) en que la cadena principal contiene un grupo más de CH_2 .

Como estructuralmente ambos polímeros son similares, se pensó inicialmente realizar la síntesis de nuestro complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) con la relación de polímero y catión vanadilo usada por Sakurai y colaboradores para la síntesis de su complejo. Sin embargo, la relación de un mol de vanadio a 0,8 moles de polímero usada por estos autores conllevaría al empleo de demasiada cantidad de vehículo polimérico para una mínima cantidad del agente activo. En nuestro caso, considerando un peso molecular promedio de 30 kDa para el poliaspartato se tendría una relación en peso de 6,7 mg de VO^{2+} por cada 2,4 g del polímero, de donde resulta un porcentaje en peso de solo 0,28 % del agente activo, mientras que para los autores citados que trabajaron con un polímero de 500 kDa fue aun menor (0,017 %). Esto no conduciría definitivamente a un transporte satisfactorio del agente activo, condición necesaria para el desarrollo de un potencial fármaco antidiabético efectivo.

Por esta razón, y consultando los trabajos de otros investigadores, se decidió utilizar más bien la relación de número de moles de unidades repetitivas del polímero (meros) por moles del catión vanadilo o sulfato de vanadilo hidratado. Así, Daniel Salman y colaboradores sintetizaron el complejo vanadilo-poli(acrilamida-co-ácido acrílico) utilizando la relación una mol de meros del polímero por una mol de catión vanadilo³⁴, mientras que Rongzhang Hu, preparó el complejo de Sakurai, pero con una relación muy distinta de 3 moles de meros del γ -poli(ácido glutámico) por una mol de catión vanadilo.⁵³

En relación al modo de coordinación del policarboxilato al catión vanadilo, Sakurai y colaboradores establecieron mediante un estudio espectroscópico ESR (Resonancia de Spin Electrónico) del complejo poli(ácido glutámico), que este se unía al metal vía los átomos de oxígeno de dos grupos carboxilato, completando la coordinación pirámide

cuadrada con dos moléculas de agua.^{36, 37} Dada la similitud arriba mencionada entre ambos vehículos poliméricos, dicho estudio ayudó también a definir la relación de moles de meros del polímero y moles de catión vanadilo a emplearse en la síntesis del complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) del presente trabajo.

Las relaciones de moles de meros del polímero por moles de catión vanadilo ensayadas con éxito en el presente trabajo fueron 2 : 1 y 3 : 1, lográndose con estas relaciones la formación del complejo; sin embargo, existen diferencias en el rendimiento y en el contenido de vanadio.

Las síntesis de los complejos fueron llevadas a cabo agregando la solución del catión vanadilo a la solución polimérica. Sin embargo, se comprobó que una adición invertida conduce al mismo resultado.

En el capítulo anterior, se indicó que para la relación de 2 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo se realizaron dos modalidades de ensayos, las cuales se diferencian en la concentración de las soluciones del polímero y del $\text{VOSO}_4 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ usadas. Por otro lado, para la relación de 3 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo, se realizaron cuatro diferentes tipos de ensayos. Estos se diferencian en la concentración del $\text{VOSO}_4 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ y polímero iniciales, en el pH de la solución polimérica y en un orden invertido de los reactantes.

El color del complejo formado empleando ambas relaciones 2 : 1 y 3 : 1 de moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo es celeste cuando se encuentra húmedo y lavado con agua helada y acetona helada, sin embargo, adquiere un tono celeste-gris cuando se ha secado en un desecador bajo vacío y a temperatura ambiente (**Figura 41**).

Por otro lado, en la **Tabla 12** se observan los rendimientos alcanzados de la síntesis del complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico).

Tabla 12. Rendimiento de la síntesis del complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico)

Reacción	2 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo	3 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo
	% Rendimiento	% Rendimiento
1	8,8 a 10,5	9,2 a 11,5
2	8,8 a 10,5	4,9 a 5,3
3	-	9,7
4*	-	9,2 a 11,6

En primer lugar, en la **Tabla 12** se puede observar que el rendimiento del complejo obtenido con ambas proporciones 2 : 1 y 3 : 1 de moles de meros / catión VO^{2+} es bajo.

Este hecho se relaciona principalmente a la formación en gran proporción durante la etapa de síntesis de un precipitado azulino muy insoluble como subproducto. Luego de separar este sólido, lavarlo con agua helada y acetona helada y secarlo se obtiene un producto azul oscuro vítreo, el cual se muele para análisis posteriores (**Figura 41**). Otro factor que disminuye el rendimiento aunque en menor medida, se da durante la etapa de lavado, ya que con el fin de eliminar completamente los iones sulfato absorbidos por el complejo sólido, resulta necesario lavar este exhaustivamente con agua helada, lo que conlleva cierta pérdida del producto.

Además, se observa que, con una única excepción, los porcentajes de rendimiento de las reacciones realizadas son similares, siendo ligeramente mayores para la proporción 3 : 1. Los rendimientos idénticos de las reacciones 1 y 2 empleando una relación 2 : 1, muestran que manteniéndose dentro de un cierto rango de concentraciones iniciales del polímero (1 – 2 %) y de catión vanadilo (37 – 73 mM) eventuales cambios no afectan los

resultados. Por otro lado, un aumento del pH de la solución polimérica de 4 a 6, disminuye fuertemente el rendimiento como se observa en la reacción 2 a una relación 3 : 1.

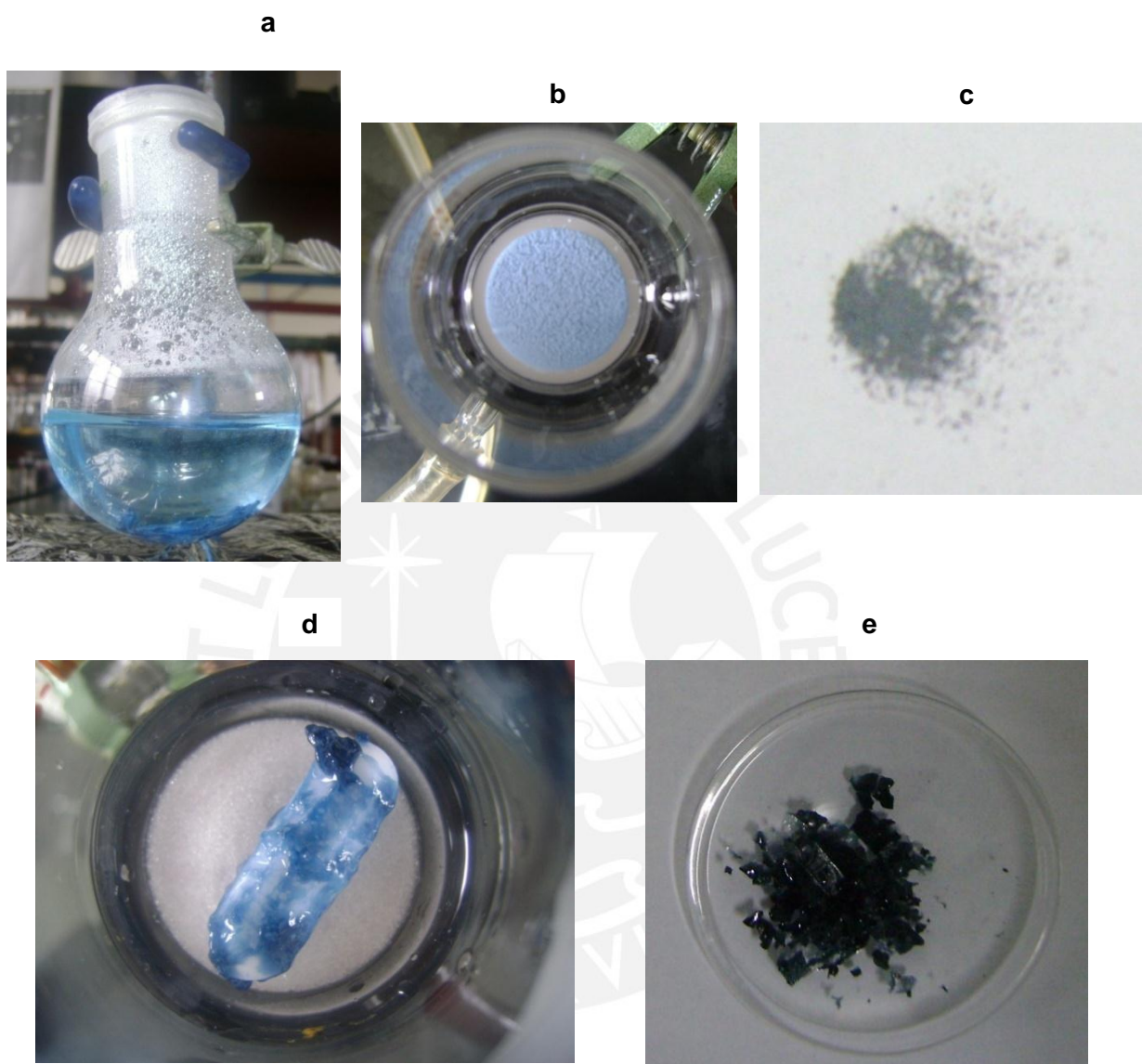


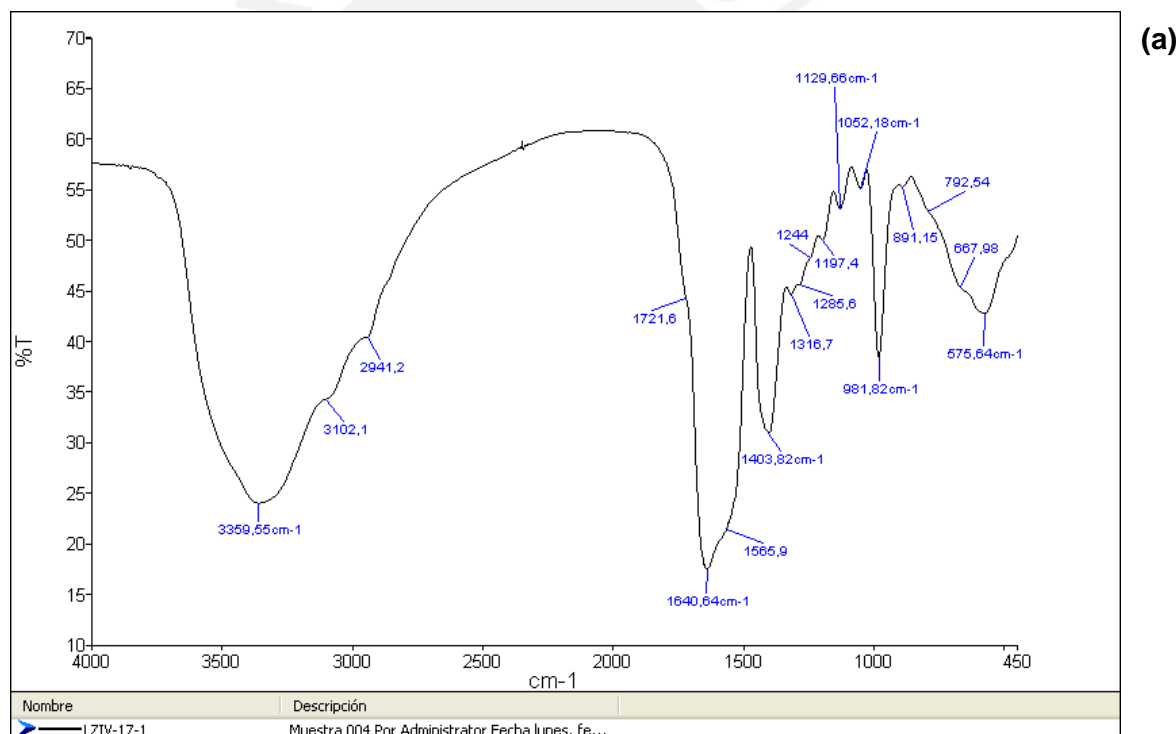
Figura 41. Síntesis del complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) empleando la relación molar de meros del polímero y catión vanadilo 2 : 1 ó 3 : 1 (a) ; complejo sólido húmedo lavado con agua y acetona helada (b) ; complejo secado bajo vacío a temperatura ambiente (c) ; sólido azulino húmedo lavado con agua y acetona helada (d) ; sólido azulino secado bajo vacío y a temperatura ambiente (e)

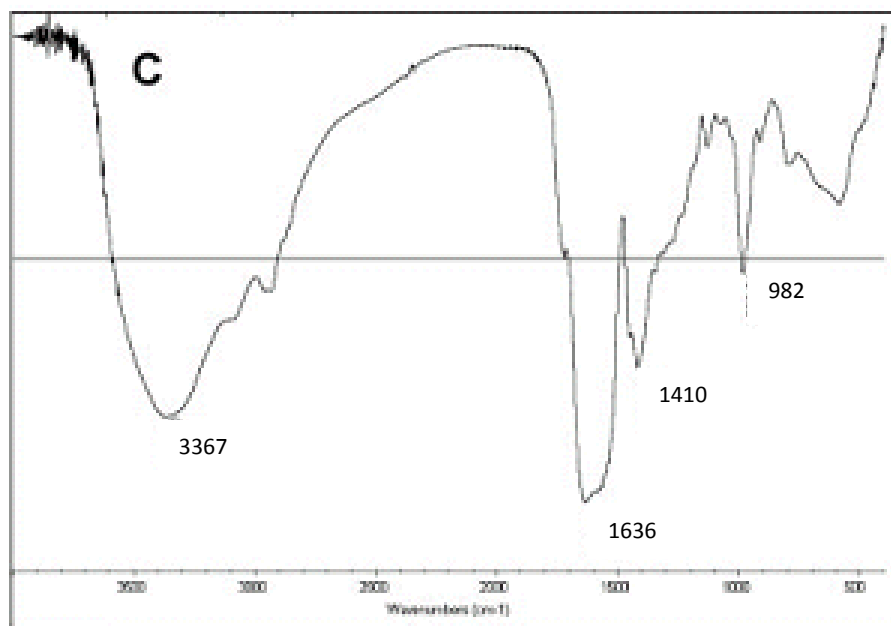
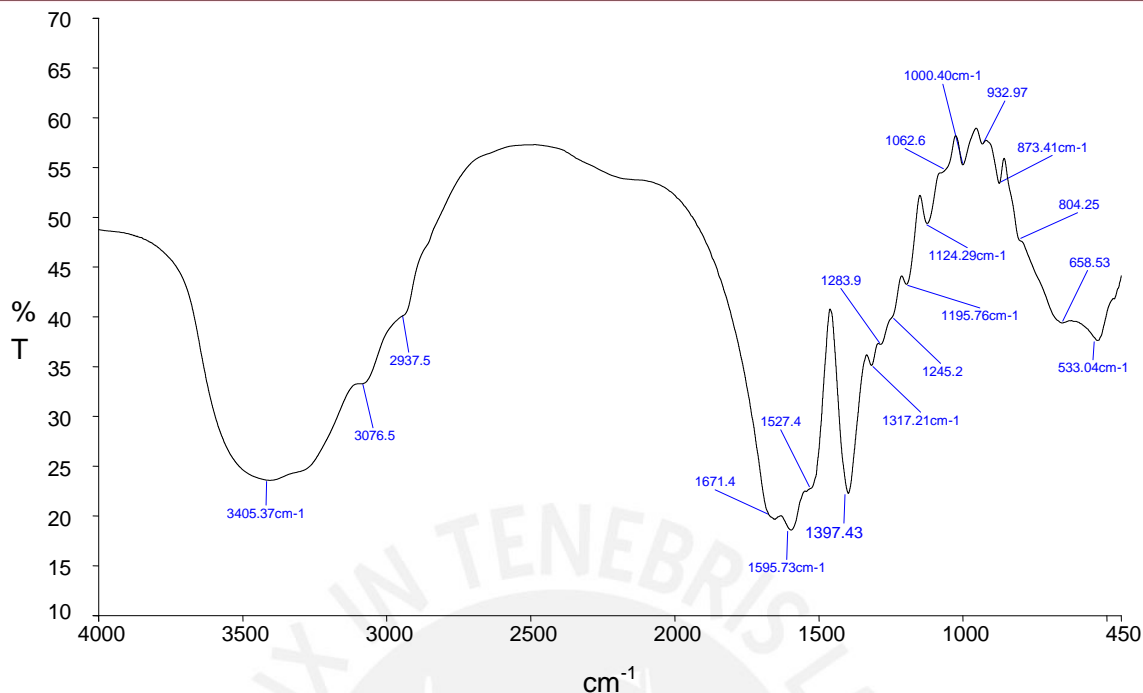
6.5.2 Caracterización

6.5.2.1 Espectroscopía infrarroja

En la **Figura 42** se muestra un espectro IR representativo de los complejos sintetizados empleando relaciones de moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo 2 : 1 y 3 : 1. Se incluyen con fines comparativos los espectros IR de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) y del complejo estructuralmente similar vanadilo-poli(γ -ácido glutámico) obtenido por Hu y colaboradores.⁵³

Asimismo, en la **Tabla 13** se reportan las frecuencias de las bandas de absorción más importantes para los tres espectros de la **Figura 42**.





(C) FT-IR spectra of VO-γ-PGA

Figura 42. Comparación de los espectros IR (KBr) del complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) sintetizado empleando la relación 2 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo en la reacción 1 (a), de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) (b) y del complejo vanadilo-poli(γ -ácido glutámico) obtenido por Hu y colaboradores⁵³ (c)

Tabla 13. Señales del espectro IR de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico), de los complejos vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) sintetizados empleando la relación 2 moles de meros de polímero por mol de catión vanadilo de las reacciones 1 y 2 y del complejo vanadilo-poli(γ -ácido glutámico)*

cm ⁻¹ Muestra	ν_{NH} , Vibración de estiramiento N-H del grupo amida	ν_{asCH_2} , Vibración de estiramiento asimétrico C-H del grupo CH ₂	ν_{sCH_2} , Vibración de estiramiento simétrico C-H del grupo CH ₂	ν_{CO} , Vibración de estiramiento C=O del grupo COOH, residual.	Superposición de: Vibración de estiramiento asimétrico del COO ⁻ y del estiramiento C=O de la amida I	Superposición de : $\delta_{\text{N-H}}$, flexión N-H de la amida II y ν_{CN} , estiramiento C-N de la amida III.	ν_{sCO} , Vibración de estiramiento simétrico C=O del grupo COO ⁻	ν_{VO} , Vibración de estiramiento del V=O	δ_{CO} , Flexión C=O fuera del plano del grupo amida
sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico)	3405,37	3076,5	2937,5	-	1595,73 y 1671,4	1527,4	1397,43	-	533,04
Reacción 1	3359,55	3102,1	2941,2	1721,6	1640,64	1565,9	1403,82	981,82	575,64
Reacción 2	3352,09	3102,1	2946,4	1721,6	1642,91	1550,3	1403,57	983,21	576,37
vanadilo- γ -poli(ácido glutámico)*	3295	-	-	1726	1640	-	1404	980	-

* Journal of Inorganic Biochemistry 2006, 100, 1535 - 1546.

Una comparación detallada de los espectros IR de los productos obtenidos, permitió establecer que se trata en todos los casos del mismo producto, independientemente de la relación molar, concentraciones iniciales de los reactivos, orden de adición y pH de la solución polimérica inicial utilizadas.

El análisis del espectro IR representativo de los IR de los complejos sintetizados a partir de las relaciones molares 2 : 1 y 3 : 1, que se reporta en la **Tabla 13 (Figura 42, a)**, sugiere que se ha obtenido el complejo objetivo de este trabajo de investigación para ambas relaciones molares de moles de meros de polímero por mol de catión vanadilo. Además, los valores de las señales del espectro IR del complejo son muy similares a aquellos del complejo estructuralmente similar vanadilo-poli(γ -ácido glutámico).^{36 y 53}

En primer lugar, se observa en la zona de los grupos funcionales por encima de los 1000 cm^{-1} , una notable similitud con el espectro IR de la sal de sodio del α, β -poli(DL-ácido aspártico). Se observa una banda ancha centrada en 1640 cm^{-1} que resulta de una superposición del estiramiento asimétrico del grupo carboxilato COO^- ($\nu_{\text{as}} \text{COO}^-$) y del estiramiento C=O de la amida I, presentes a 1595,73 y a 1671,4 cm^{-1} , respectivamente, en la correspondiente sal. La vibración de flexión N-H de la amida II aparece en el IR como un hombro en la banda ancha, a 1566 cm^{-1} , mientras que el pico agudo a 1404 cm^{-1} se asigna a la vibración de estiramiento simétrico del grupo COO^- ($\nu_{\text{s}} \text{COO}^-$), ligeramente desplazada respecto a la correspondiente en la sal. La presencia de las dos señales $\nu_{\text{as}} \text{COO}^-$ y $\nu_{\text{s}} \text{COO}^-$ y el considerable corrimiento en la frecuencia de la primera respecto a la sal resultan fundamentales para probar la coordinación de estos grupos con el catión vanadilo, VO^{2+} . Asimismo, las frecuencias de estiramiento C=O de la amida I y de flexión N-H de la amida II, se encuentran notablemente desplazadas en el complejo. Finalmente, la aparición de una nueva señal aguda e intensa a 982 cm^{-1} , característica de la vibración de estiramiento del catión vanadilo, demuestra la complejación de este a los grupos carboxilato de la cadena polimérica.

La presencia de una señal poco intensa, que aparece como un hombro alrededor de 1722 cm^{-1} , concuerda con la vibración de estiramiento del C=O en el grupo COOH del α, β -poli(DL-ácido aspártico) e indica una cierta proporción residual de grupos carboxílicos

no desprotonados en el complejo. Esto resulta lógico teniendo en cuenta que la síntesis del mismo se realiza a pH 3.

Por otro lado, en la **Tabla 14** aparecen los valores de $\Delta[v_{as}(\text{COO}^-) - v_s(\text{COO}^-)]$ para los seis complejos obtenidos empleando las relaciones 2 : 1 y 3 : 1 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo. El hecho que la diferencia $\Delta[(v_{as} \text{COO}^- - v_s \text{COO}^-)]$, en todos los complejos, sean valores relativamente grandes o mayores a 200 cm^{-1} y cercanos a 236 cm^{-1} indica que el modo de coordinación del carboxilato al ion vanadilo es monodentado.^{36, 37, 99} Esto concuerda con la caracterización del complejo vanadilo-poli(γ -ácido glutámico) realizada por el grupo de Sakurai, que determinó por espectroscopías infrarroja, ultravioleta visible y resonancia de spin electrónico que el catión VO^{2+} se enlaza al polímero de manera monodentada vía dos grupos carboxilatos de la cadena lateral, completándose la coordinación pirámide cuadrada con dos moléculas de agua.^{36, 37}

Tabla 14. Valores de $\Delta[v_{as}(\text{COO}^-) - v_s(\text{COO}^-)]$ de los complejos vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico)

Mol de meros del polímero : mol de catión vanadilo	2 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo		3 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo			
	Reacción 1	Reacción 2	Reacción 1	Reacción 2	Reacción 3	Reacción 4
$v_{as}(\text{COO}^-) \text{ cm}^{-1}$	1640,64	1642,91	1646,92	1643,65	1641,28	1642,94
$v_s(\text{COO}^-) \text{ cm}^{-1}$	1403,82	1403,57	1399,98	1403,29	1398,81	1400,06
$\Delta[v_{as}(\text{COO}^-) - v_s(\text{COO}^-)] \text{ cm}^{-1}$	236,82	239,34	246,94	240,36	242,47	242,88

Por último, el hecho de que el espectro IR de los complejos obtenidos sea casi idéntico al del complejo vanadilo-poli(γ -ácido glutámico) reportado por Hu y colaboradores (**Figura 42, c**), cuyo ligando polimérico solo se diferencia del α,β -poli(DL-ácido aspártico) en un CH_2 de la cadena principal, parece indicar que son similares la naturaleza y estructura propuesta para el complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico).

6.5.2.2 Contenido de vanadio en los complejos

Dada la similitud de los polímeros utilizados como ligandos resulta razonable asumir que la estructura del complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) sea similar a la propuesta para el complejo vanadilo-poli(γ -ácido glutámico) en estado sólido.

Este modo de coordinación implica que dos moles de unidades repetitivas (meros) desprotonadas a lo largo de la cadena del α,β -poli(DL-ácido aspártico) (masa molar igual a 228 g/mol), se enlazan con un mol de catión vanadilo VO^{2+} (masa molar 67 g/mol) y este último completa su coordinación con dos moles de moléculas de agua (36 g/mol). Entonces, la masa molar de un mero del conjugado sería 331 g/mol y el contenido de vanadio teórico (masa molar del V = 51 g/mol) resulta igual a 15,41 %.

Es importante señalar que este contenido corresponde a una situación de saturación coordinativa del polímero con el catión vanadilo.

En caso de que la relación molar de meros del polímero a VO^{2+} sea 3 : 1 el % teórico de vanadio será lógicamente menor (11,46 %).

En la **Tabla 15** se puede observar que el contenido de vanadio, determinado por ICP, en el complejo sintetizado empleando 2 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo de las reacciones 1 y 2 (16,79 % y 16,55 %, respectivamente) se encuentra ligeramente por encima del valor teórico (15,41 %). La misma tendencia se aprecia para las reacciones que corresponden a la relación 3 : 1, aunque en este caso la desviación por exceso es mayor. Además, se observa, que de acuerdo a lo esperado el contenido de vanadio para la relación 3 : 1 es consistentemente menor que aquel de la 2 : 1.

Por otro lado, se observa que el mayor contenido de vanadio para la relación molar 3 : 1 se da para la reacción 2 (14,46 %), debido posiblemente a que el pH de la solución polimérica al ser igual a 6 implicaría que más números de grupos carboxílicos se

encuentren desprotonados y por lo tanto tienen mayor capacidad de enlace con el catión vanadilo al momento de interaccionar ambas soluciones, la del polímero y la del catión vanadilo.

Tabla 15. Contenido de vanadio, determinado por ICP, en los complejos vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico).

	2 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo		3 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo			
	Reacción 1	Reacción 2	Reacción 1	Reacción 2	Reacción 3	Reacción 4
% Vanadio experimental	16,79	16,55	12,65 - 13,71	14,46	12,45	13,90
%Vanadio Teórico	15,41		11,46			

Nota : El porcentaje de error de los datos experimentales es de 0,01 %.

En relación a la observación antes mencionada de que los valores experimentales tienden, en general, a ser mayores que los calculados teóricamente para las relaciones molares empleadas, esto se podría justificar en parte debido a cierto margen de error en la exactitud del método. Esto será comentado más adelante mediante una comparación de resultados que pueden diferir hasta un margen de 3 % dependiendo del método utilizado para la medición. Además, se debe considerar que algo de VOSO_4 puede quedar absorbido entre las cadenas poliméricas.

6.5.2.3 Ultravioleta-visible

Se realizó el análisis UV-visible a la solución de $\text{VOSO}_4 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$, de la solución polimérica y del complejo empleando la relación 2 : 1 y 3 : 1 de moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo.

En la **Figura 43** se muestran los espectros UV-visible de las soluciones de VOSO_4 y del complejo sintetizado empleando una relación molar 3 : 1 de moles de meros del polímero al catión vanadilo. En el **Anexo 10.4** se incluye aquél del complejo que corresponde a una relación 2 : 1 y el del polímero; este último no presenta absorciones en el visible.

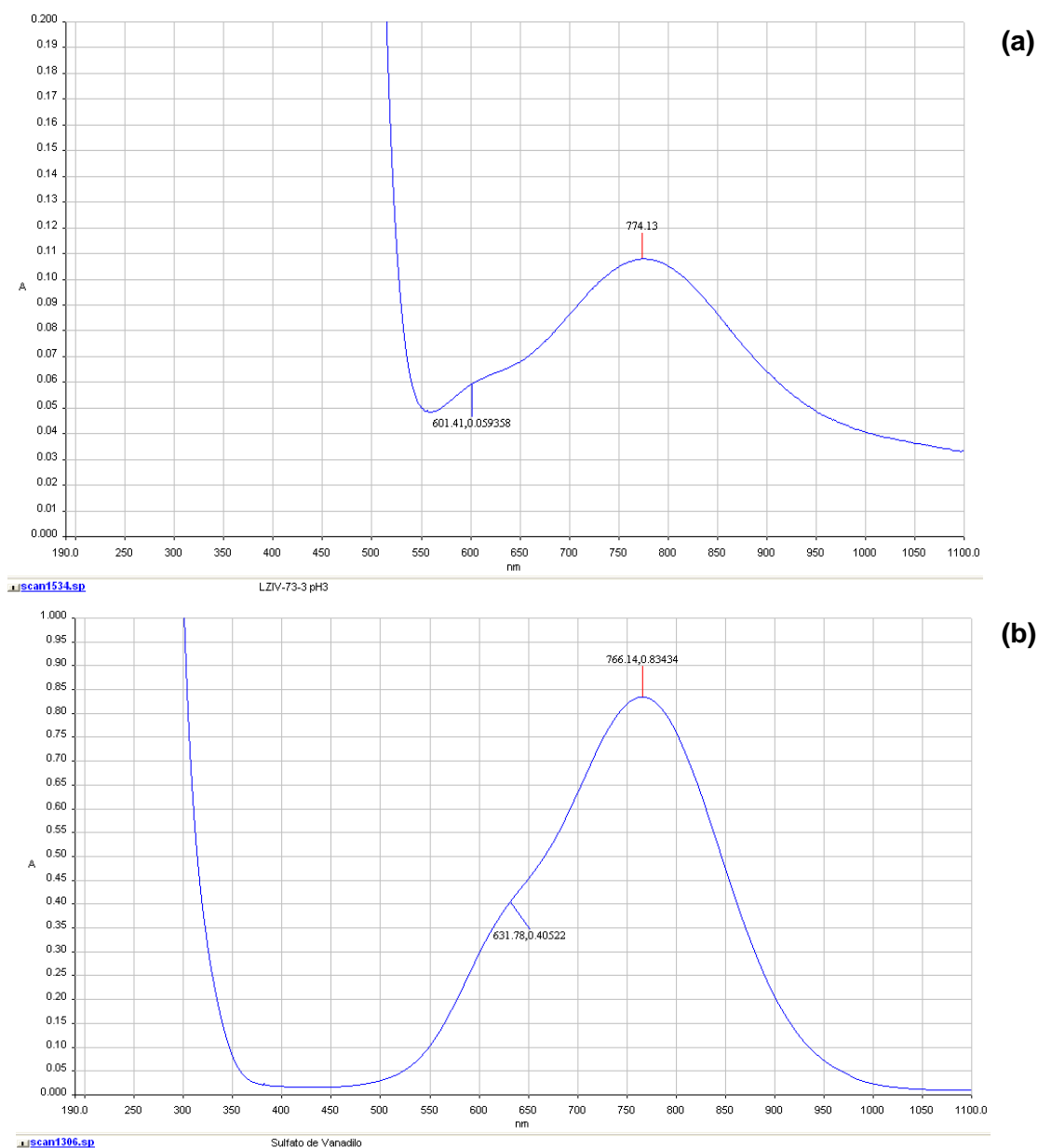


Figura 43. Comparación de los espectros UV-visible en solución acuosa del complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) correspondiente a una relación molar 3 : 1 de meros del polímero por mol de vanadilo, 9,5 mg/mL (pH = 3) (a) y de $\text{VOSO}_4 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ 0,049 M (pH = 3) (b).

En la **Tabla 16** se presentan las posiciones de los máximos de absorción en el visible del VOSO_4 y de los complejos sintetizados a ambas relaciones molares; incluidos a modo de comparación los valores reportados en la literatura para el VOSO_4 y el complejo vanadilo-poli(γ -ácido glutámico), muy similar al del presente trabajo.

Tabla 16. Máxima absorción en el visible del VOSO_4 y de los complejos vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) y vanadilo-poli(γ -ácido glutámico)* (medidos en H_2O y a $\text{pH} = 3$)

	vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico)			vanadilo-poli(γ -ácido glutámico)*	
	VOSO_4	2 moles de meros del polímero por mol de VO^{2+}	3 moles de meros del polímero por mol de VO^{2+}	VOSO_4	1 mol de VO^{2+} por 0,8 moles de polímero
λ_1 (nm)	766 (m)	778 (m)	774 (m)	765 (m)	780 (m)
λ_2 (nm)	632 (h)	615 (h)	601 (h)	620 (h)	600 (h)

*Journal of Inorganic Biochemistry, 2006, 100, 1535 – 1546.

m : máximo ; h : hombro.

El espectro de absorción electrónica de los complejos de vanadilo es normalmente interpretado en términos del esquema de nivel de energía, **Figura 44**, derivado de un estudio orbital molecular para una estructura octaédrica distorsionada con simetría C_{4v} .¹⁰⁰

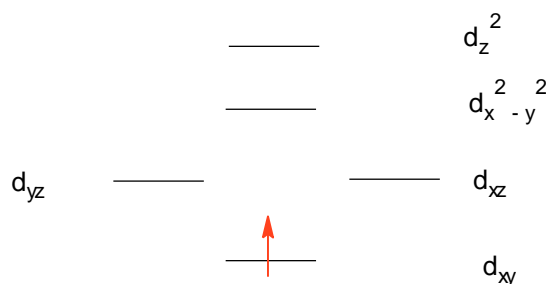


Figura 44. Desdoblamiento de los niveles de energía del ion VO^{2+} en un campo cristalino de geometría octaédrica distorsionada.^{25, 100}

En los complejos de vanadilo existen usualmente tres transiciones electrónicas las cuales son $d_{xy} \rightarrow (d_{xz}, d_{yz})$, $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$ y $d_{xy} \rightarrow d_{z^2}$. Por lo tanto, en el espectro UV-visible de la solución acuosa de $\text{VOSO}_4 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$, la cual existe como $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$, **Figura 43**, la máxima absorción (766 nm) le corresponde a la transición $d_{xy} \rightarrow (d_{xz}, d_{yz})$ y la banda de absorción a 632 nm (hombro) le corresponde a la transición $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$. Además, la transición electrónica $d_{xy} \rightarrow d_{z^2}$, puede estar enmascarada por una transición que ocurre intraligando y/o a la transferencia de carga del ligando al metal (LMCT).²⁵ Por otro lado, se puede comentar que el enlace del ion VO^{2+} se da en el orbital d_{xy} , mientras que, los enlaces del metal con las moléculas de agua se dan con los orbitales d_{xz} , d_{yz} , $d_{x^2-y^2}$ y d_{z^2} . Sin embargo, existe un enlace débil entre el orbital d_{z^2} y una quinta molécula de agua.

En el caso del complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico), en solución acuosa, también se espera que la geometría del complejo sea solo octaédrica. Sin embargo, al reemplazar dos átomos de oxígeno de la molécula de agua por dos átomos de oxígeno del grupo carboxilato de la cadena polimérica α,β -poli(DL-ácido aspártico) ocurre una interacción fuerte de estos grupos al metal y una debilitación de la unión de la molécula de agua en la posición axial, es decir, se incrementa la distorsión octaédrica, consiguiéndose de esta manera un equilibrio de la geometría piramidal cuadrada con la geometría *trans*-octaédrica, desplazándose el equilibrio hacia esta última (**Figura 45**).

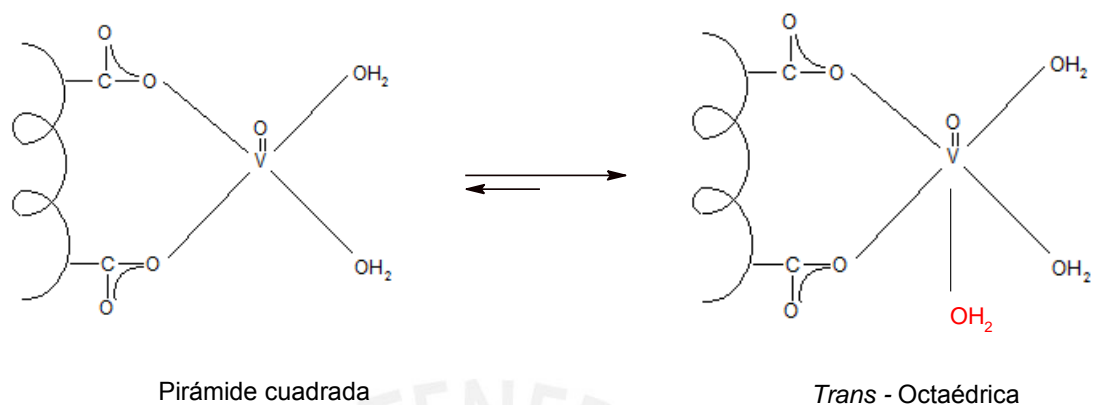


Figura 45. Equilibrio de las geometrías piramidal cuadrada y *trans*-octaédrica existente en la solución del complejo (solución amarilla)

Un comportamiento similar, en solución acuosa, ocurre en los complejos de vanadio (IV) con los siguientes ligandos : 6-metil ácido picolínico; 6-metil-2,3-piridina ácido dicarboxílico; ácido quináldico y el ácido kinurénico.¹⁰¹

La comprobación experimental de esto se puede observar en la **Tabla 16** donde se observa que ambos complejos vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) presentan desplazamientos hacia mayores longitudes de onda, es decir, hacia el rojo de la banda de absorción más intensa en el espectro UV-Visible (774 – 778 nm) y hacia el azul de la que aparece como un hombro de la misma (601 – 615 nm). Los desplazamientos hacia el rojo y al azul indican una interacción más fuerte entre los grupos carboxilato del ligando y el metal y la separación de la molécula de agua en la posición axial. Es decir, son debidos a un aumento de la distorsión octaédrica.

Similares desplazamientos de las bandas de absorción del catión VO^{2+} por complejación han sido reportados para los complejos vanadilo-poli(γ -ácido glutámico), vanadilo-ciprofloxacina y vanadilo-ácido quínico.^{36, 37, 102, 103} En el caso particular del primero, este presenta un corrimiento hacia el rojo de 15 nm y hacia el azul de 20nm de su máximo de absorción y del hombro respectivamente.

Estos valores son muy cercanos a los encontrados para el complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) preparado usando una relación molar 2 : 1 (12 nm y 17 nm hacia el rojo y azul, respectivamente).

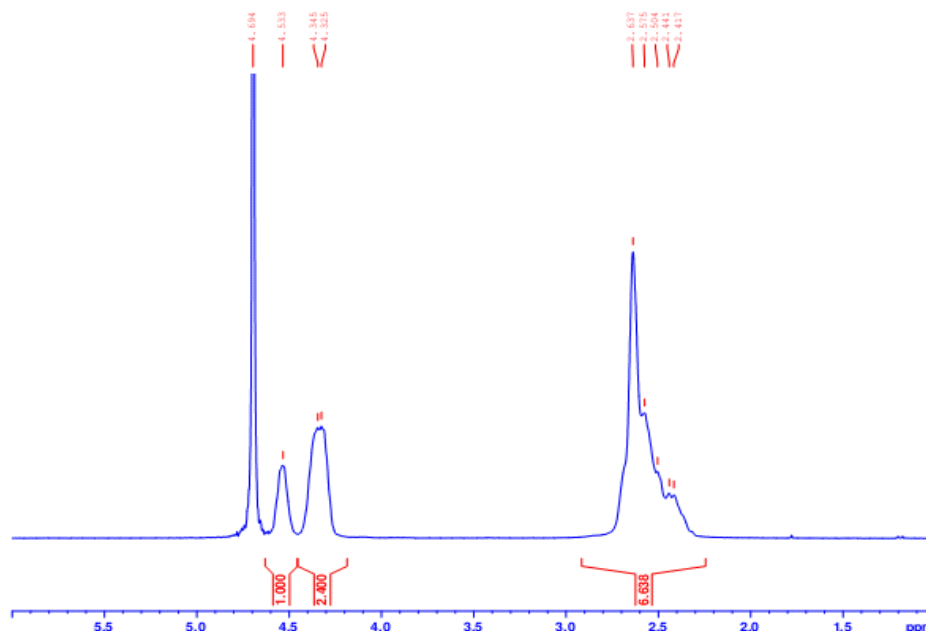
6.5.2.4 Resonancia magnética nuclear

En primer lugar, es necesario tener en cuenta que esta técnica de caracterización es solo de utilidad limitada en el caso de compuestos que incluyen algún grupo paramagnético, como es el caso del catión VO^{2+} que contiene V(IV) de configuración d^1 , porque su presencia causa un pronunciado ensanchamiento y distorsión de los picos. Sin embargo, puede ayudar a determinar la presencia y eventual desplazamiento de picos característicos del ligando polimérico que demostrarían su complejación al metal, lo que nos llevó a medir los espectros ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del complejo.

En la **Figura 46** se puede observar el espectro ^1H -RMN del complejo sintetizado empleando la relación 2 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo. Se puede observar que los protones metileno se han desplazado a campo bajo respecto a la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) (2,42 - 2,64 a 2,73 - 2,75 ppm). Los protones metino no se observan sugiriendo que se encuentran sobrelapados con la señal del D_2O .

Por otro lado, en la **Figura 47**, se muestra el espectro ^{13}C -RMN del complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) de la relación 3 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo. Se observa que el desplazamiento de los picos es a campo alto respecto a la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico). Así, el carbono metileno aparece a 34,56 - 36,61 ppm en el complejo mientras que en la sal de sodio lo hace a 37,58 - 39,06 ppm. Además, el carbono metino resuena a 49,76 ppm en el complejo respecto al 51,60 - 52,04 ppm de la sal de sodio. Por otro lado, el carbono del grupo amida aparece en 171,75 - 174,15 ppm en el complejo y en la respectiva sal a 171,92 - 173,36 ppm y el carbono del grupo ácido carboxílico aparece a 176,56 ppm en el complejo y en la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) a 177,5 - 178,06 ppm.

1H LZ II 130-1 D2O



(a)



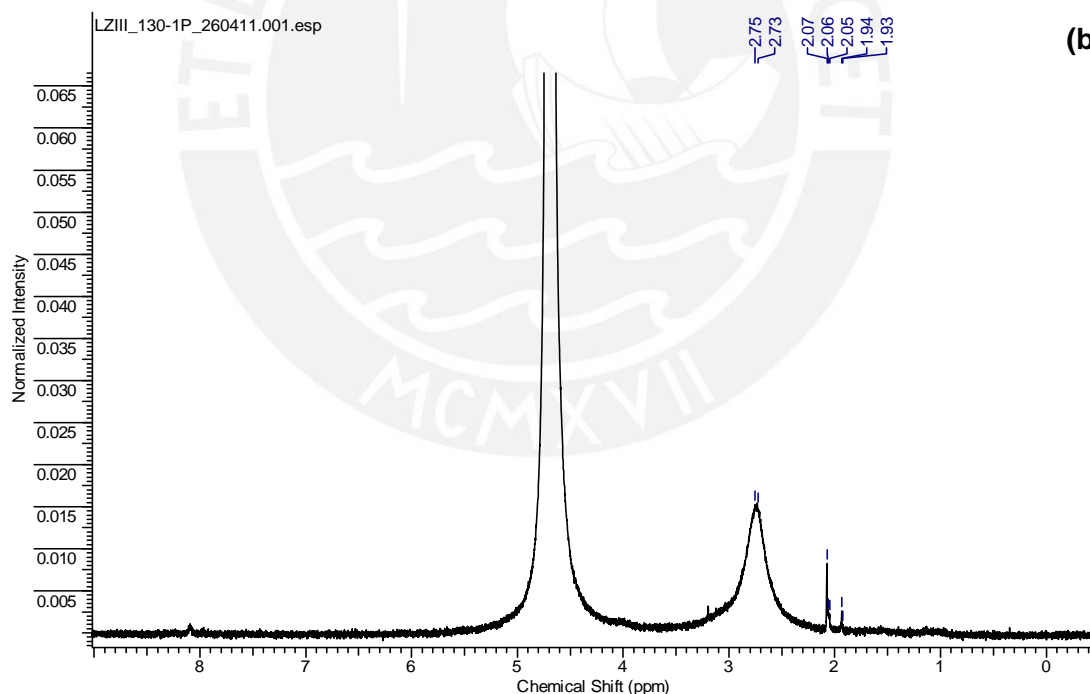
(a)

Laboratorio de RNM

Sección Química

```

NAME: LZII_130-1_200910
EXPNO: 1
PROCNO: 1
DATE_: 20100920
TIME: 10.08
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm BBO BB-1H
PULPROG: zgpg30
PRGNAME: zgpg30
TD: 65536
SOLVENT: D2O
NS: 128
DS: 4
SWH: 4328.110 Hz
F2 - F1: 0.094423 Hz
AQ: 9.2752507 sec
RG: 6.6
SR: 661.8000000 sec
AQ: 10.0000000 sec
TE: 300.2 K
D1: 5.00000000 sec
TD0: 1
    
```



(b)

Figura 46. Comparación de los espectros ¹H-RMN en D₂O de la sal de sodio del α,β-poli(DL-ácido aspártico) (a) y del complejo vanadilo-α,β-poli(DL-ácido aspártico) sintetizado empleando la relación 2 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo (b)

6.5.3 Solubilidad y cambio de color del complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) en solución

La solubilidad del complejo polimérico vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) se limita al agua. En el resto de solventes polares ensayados (N,N-dimetilformamida, acetona, dimetil sulfóxido, acetonitrilo, metanol, etanol, etilenglicol, acetato de etilo, ácido acético, anhídrido acético) y en las de baja o nula polaridad (cloroformo, tolueno, diclorometano, dioxano, hexano, éter etílico, éter de petróleo, tetrahidrofurano) fue totalmente insoluble, incluso empleando agitación vigorosa y aumentando la temperatura.

La solubilización completa del complejo en agua se desarrolló a una velocidad muy lenta; así, para 2 mg de complejo en 100 μL de agua tardó un día. Se podría mejorar este aspecto del complejo producto usando como ligando polimérico un copolímero de poli(ácido aspártico) y etilenglicol⁴⁰, por ejemplo.

La disolución del complejo sólido, de color gris-celeste, en agua produjo una solución amarilla muy intensa. En un primer momento, este cambio de color fue relacionado a una oxidación del ion vanadilo VO^{2+} (azul celeste) al ion VO_2^+ (amarillo en solución diluida), es decir, de vanadio (IV) a vanadio (V). Sin embargo, el UV-Visible de esta solución amarilla corresponde al del ion vanadilo enlazado a los grupos carboxilatos de la cadena polimérica del α,β -poli(DL-ácido aspártico). De existir iones VO_2^+ , una banda a aproximadamente 400 nm indicaría su presencia.¹⁰⁴

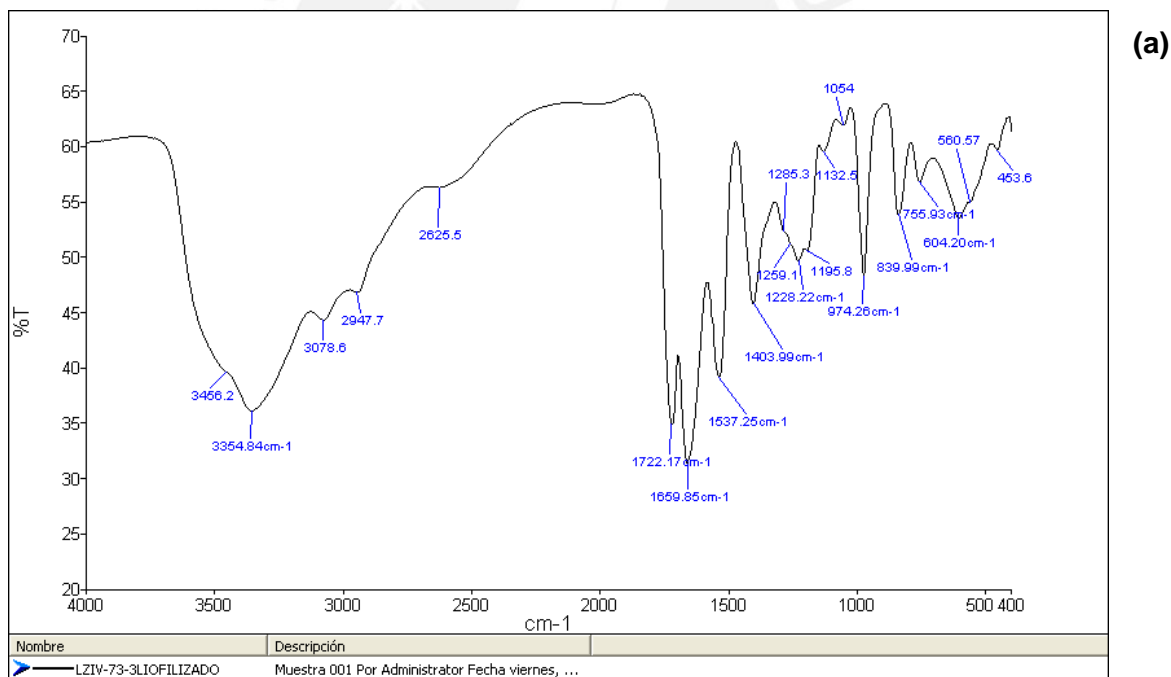
Por lo tanto, el hecho de que el complejo en solución posea un color amarillo es debido a una banda de transferencia de carga, Ligando \rightarrow Metal (LMCT), de alta energía que aparece en la región UV, cuya “cola” invade la zona al visible tal como se observa en la **Figura 43**.

Además, por liofilización de esta solución amarilla, se obtiene un sólido amarillo, el cual fue analizado por espectroscopía infrarroja. En el espectro IR del sólido amarillo (**Figura 48, a**) se puede observar claramente que está presente un pico intenso a 974 cm^{-1} correspondiente a la vibración de estiramiento del ion vanadilo VO^{2+} , vanadio (IV), y no se observa un pico aproximadamente a $900 - 920\text{ cm}^{-1}$ señal característica del ion VO_2^+ .¹⁰⁶ Además, la posición de la señal del VO^{2+} se halla desplazada con respecto a aquella del

complejo producto gris-celeste (982 cm^{-1}) y coincide con aquella del VO^{2+} en el VO_2 hidratado.

Por otro lado, en la zona por encima de los 1000 cm^{-1} , el espectro IR del sólido amarillo muestra una gran similitud con el del α,β -poli(DL-ácido aspártico), observándose todas las señales características de los grupos funcionales amida y COOH.

Esta similitud con el espectro IR del poliácido, unida al notable desplazamiento de la señal del VO^{2+} , nos lleva a sugerir que la liofilización de la solución acuosa del complejo producto ha causado una descomposición del mismo. La pérdida de moléculas de H_2O coordinadas pudo originar una desestabilización del complejo, lo que a su vez condujo a la formación del óxido VO_2 hidratado con la consiguiente protonación del ligando policarboxilato.



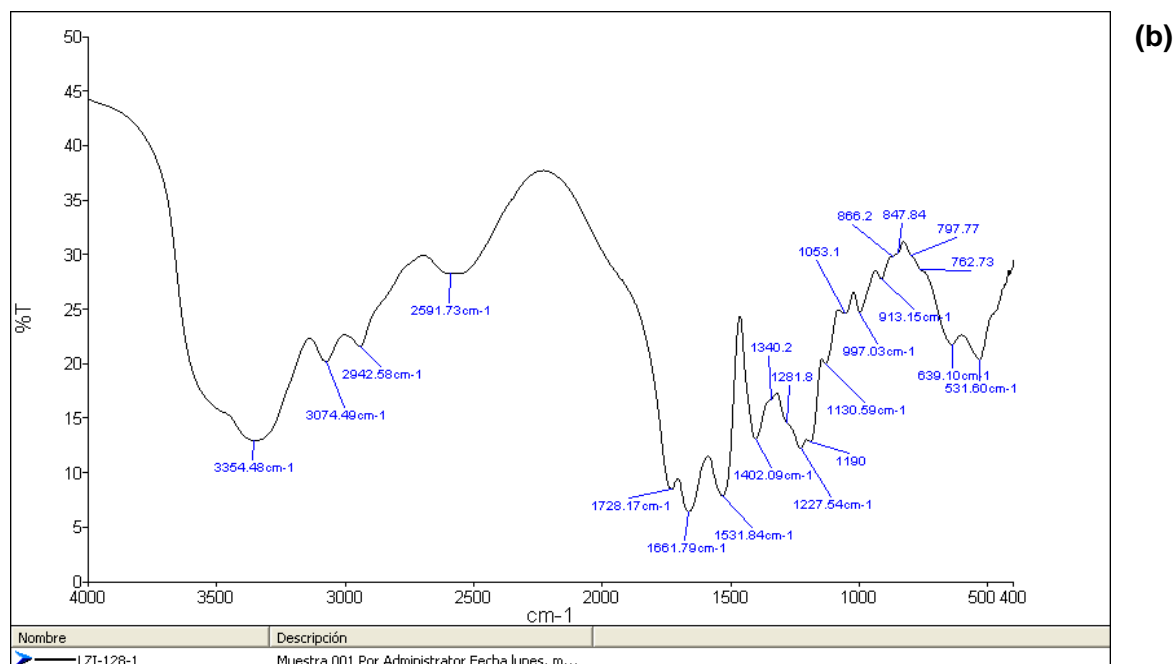


Figura 48. Comparación de los espectros IR (KBr) del del sólido amarillo (producto liofilizado de la solución amarilla) (a) y del α,β -poli(DL-ácido aspártico) (b)

Por lo tanto, por UV-visible y espectroscopía infrarroja queda determinado que no se ha producido una oxidación del ion vanadilo (VO^{2+}) al ion VO_2^+ cuando el complejo se disuelve en agua.

6.6 Sólido azulino

Este producto fue separado durante la síntesis del complejo llevada a cabo empleando las relaciones molares 2 y 3 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo. En todos los casos se observó la formación de este sólido de color azul intenso, el cual precipita rápidamente desde el momento en que las soluciones del catión y del polímero entran en contacto.

Del producto total (sólido azulino más complejo) obtenido en cada síntesis, el porcentaje de este sólido supera por un amplio margen al del complejo, como se observa en la **Tabla 17**. Se encuentra en el rango 71 – 90 % para la relación 2 : 1 de moles de meros del polímero a moles de VO^{2+} y 88 – 93 % en caso de la 3 : 1. De aquí que resulta de interés elucidar su origen e identidad química.

Tabla 17. Porcentaje de sólido azulino formado durante la síntesis del complejo

Reacción	2 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo				3 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo			
	Peso del complejo (mg)	Peso del sólido azulino (mg)	Peso Total (mg)	% Sólido azulino	Peso del complejo (mg)	Peso del sólido azulino (mg)	Peso Total (mg)	% Sólido azulino
1	22,2	59,1	81,3	72,7	19,7	168,1	187,8	89,5
2	99,3	237,1	336,4	70,5	18,8	163	181,8	89,7
3	20,1	179,7	199,8	89,9	38,1	461,4	499,5	92,4
4	-	-	-	-	17,6	132,8	150,4	88,3
5	-	-	-	-	10,5	149,4	159,9	93,4
6	-	-	-	-	11,5	133,6	145,1	92,1

Este sólido resultó insoluble en la gran variedad de solventes de diferente polaridad ensayados, incluso empleando agitación vigorosa y aumentando la temperatura. Se solubiliza en agua como el complejo, pero a diferencia de este requiere de un tiempo mucho más prolongado. Por ejemplo, 2 mg del sólido azulino en 100 μL de agua demora una semana para disolverse mientras que el complejo lo hace en un día para la misma concentración. La solución acuosa de este sólido azulino también tiene un color amarillo intenso.

Por otro lado, se observa que los espectros IR del producto azulino obtenido de las relaciones 2 y 3 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo son similares entre sí y a la vez muestran en la zona por encima de 1000 cm^{-1} una notable similitud con el espectro del α,β -poli(DL-ácido aspártico) (**Anexo 10.5.1**)

Sin embargo, el hecho de que dichos espectros presenten la típica banda del catión vanadilo a prácticamente la misma frecuencia que en el complejo ($982 - 983 \text{ cm}^{-1}$) y además muestren un significativo desplazamiento de la banda correspondiente al $\nu\text{C=O}$ de la amida I en el poliácido (1662 cm^{-1}) hacia menores frecuencias, ($1649 - 1654 \text{ cm}^{-1}$) muy cerca a la posición de la correspondiente señal en el complejo (1642 cm^{-1}), nos permiten proponer una hipótesis sobre la naturaleza química del sólido azul.

Aparentemente, el sólido azul contiene una mayor proporción de grupos carboxílicos protonados que el complejo, lo que concuerda con su menor capacidad coordinante y menor contenido de vanadio que el sólido gris-celeste caracterizado como el complejo. En la **Tabla 18**, se puede observar el porcentaje de vanadio presente en este producto para cada una de las reacciones realizadas, empleando 2 y 3 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo, determinado por ICP, análisis de activación neutrónica y por fluorescencia de rayos X. El mayor grado de protonación explicaría también la menor solubilidad respecto al complejo, lo que causaría a su vez su rápida precipitación.

Por otro lado, se descarta la posibilidad de que el VO^{2+} no se encuentre complejado sino simplemente absorbido por el α,β -poli(DL-ácido aspártico) porque si así fuera el espectro IR tendría que mostrar las señales características y muy intensas del anión sulfato (**Anexo 10.5.2**), cuya presencia sería requerida para la electroneutralidad. Además, se ha cuantificado azufre en el sólido azulino por fluorescencia de rayos X y se puede observar que el porcentaje de azufre determinado en el sólido azulino es mínimo y no representa de ninguna manera la cantidad de azufre que debería estar presente si el $\text{VOSO}_4 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ estuviera simplemente absorbido y no complejado (**Tabla 18**).

Asimismo, se determinó el porcentaje de cloro por análisis de activación neutrónica para descartar que hubiera precipitado VOCl_2 con el polímero durante la síntesis del complejo. Por comparación del valor experimental con el calculado se descartó también esta posibilidad (**Tabla 18**).

Además, se puede observar que los %V en el sólido azulino de una misma muestra, difieren por un margen apreciable al ser analizados por las tres técnicas empleadas.

Tabla 18. Porcentaje de vanadio, azufre y cloro en el sólido azulino determinado por análisis de activación neutrónica, fluorescencia de rayos X e ICP

Reacción	2 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo		3 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo					
Técnica	Activación Neutrónica	Fluorescencia de rayos X	Activación Neutrónica		Fluorescencia de rayos X		ICP	
Elemento	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2
% V	7,87 ± 0,4	7,6 ± 0,2	8,6 ± 0,4	7,9 ± 0,4	10,6 ± 0,3	9,1 ± 0,2	9,19 ± 0,01	9,28 ± 0,01
%S exp.	-	0,521 ± 0,0224	-	-	0,088 ± 0,0038	0,055 ± 0,0024	-	-
calc.	-	4,77	-	-	6,65	5,71	-	-
%Cl exp.	0,029 ± 0,007	-	0,052 ± 0,007	0,057 ± 0,007	-	-	-	-
calc.	10,96	-	11,42	10,99	-	-	-	-

Nota: Muestra 1 y Muestra 2 indica que son muestras diferentes de sólido azulino.

Por último, en el espectro UV-visible del sólido azulino (**Anexo 10.5.3**) se observa un máximo de absorbancia a 769 nm con un hombro a aproximadamente 600 nm⁻¹. Esto indicaría un corrimiento en el sentido correcto (hacia el rojo), pero de poca magnitud de la banda más intensa con respecto al observado para el complejo (774 – 778 nm). El hombro aparece en una posición similar a lo observado para el complejo sintetizado usando una relación 3 : 1 y desplazado al azul como en dicho complejo.

Por lo tanto, de acuerdo a los resultados cualitativos (IR y UV-Visible) y cuantitativos (análisis de activación neutrónica, fluorescencia de rayos X e ICP) se puede concluir que, a diferencia de los complejos producto de las reacciones 2 : 1 y 3 : 1 en los que el ligando

polimérico presenta todos o la mayor parte de sus posiciones de coordinación ocupados por el catión vanadilo, la complejación al VO^{2+} en los correspondientes sólidos azulinos ocurre de forma bastante limitada. Esto se atribuye a la alta proporción de grupos COOH presentes, incapaces de una coordinación efectiva al catión metálico.

En cuanto al origen de este sólido azulino, que por su menor solubilidad en H_2O se convierte en un producto indeseado, se propone la siguiente explicación. Aparentemente, al adicionar el VO^{2+} a la solución del ligando polimérico que se encuentra sustancialmente protonado ($\text{pH} = 4 - 2,5$), se forma rápidamente el complejo de contenido limitado de vanadio (sólido azulino), el cual es poco soluble y precipita. El complejo remanente en solución, presente a una concentración baja (la permitida por el K_{ps} del sólido azulino) sigue reaccionando con el VO^{2+} (disponible en concentraciones altas respecto al ligando). Como se mantiene en solución, conforme lo hace se va desprotonando y coordinando más VO^{2+} (efecto quelato). Esto explicaría la saturación coordinativa observada.

Además, se debe considerar una segunda hipótesis, el cual consiste en que al agregar vanadilo (VO^{2+}) a la solución del ligando polimérico que se encuentra a $\text{pH} = 4 - 2,5$, este ion podría actuar de puente entre algunas de las cadenas poliméricas (entrecruzamiento) conduciendo de esta manera a su precipitación. Por lo tanto, el producto formado posee una baja solubilidad.

6.7 Ensayos de síntesis del complejo variando las condiciones de reacción

6.7.1 Síntesis del complejo vanadilo - α,β -poli(DL-ácido aspártico) a diferentes pH finales

En la **Tabla 3** se pueden observar las condiciones de síntesis de las reacciones realizadas a diferentes pH finales.

En este contexto, resulta pertinente indicar que las reacciones llevadas a cabo a menor pH (2,5 y 2), tuvieron como único objetivo comprobar la hipótesis propuesta anteriormente sobre la naturaleza del sólido azulino.

La reacción a $\text{pH} = 2,5$ no requirió de ajuste de pH alguno ya que este se alcanza simplemente por mezcla de los reactivos. El comportamiento fue similar al de la síntesis de los complejos, es decir, formación del sólido azulino y aislamiento de un polvo celeste-

gris por precipitación con acetona. En el ensayo a $\text{pH} = 2$, en cambio, el sólido azulino formado inicialmente ($\text{pH} = 2,5$) se disolvió al ajustar el pH a 2 con simultánea aparición de una turbidez de color blanco. Durante la precipitación con acetona se observaron dos productos, un polvo muy fino blanco que atravesó el filtro y un sólido azul.

Los sólidos gris-celeste y azul obtenidos de las reacciones a $\text{pH} 2,5$ y 2, respectivamente, fueron analizados por espectroscopía IR (**Anexo 10.6.1**), observándose espectros prácticamente idénticos entre sí y muy similares al del sólido azulino caracterizado anteriormente. Sin embargo, la similitud al IR del poli(ácido aspártico) libre es más pronunciada en ambos casos y aparecen además picos característicos del anión SO_4^{2-} en la región de $1150\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ de intensidad comparable al del vanadilo. Por otro lado, el espectro UV-Visible del producto correspondiente al $\text{pH} = 2$ es muy similar al del VOSO_4 .

Se concluye de estos resultados que, la disminución del pH y consiguiente extensiva protonación del ligando polimérico no permitió o redujo al mínimo la complejación del catión vanadilo. La situación fue extrema en el caso de la síntesis a $\text{pH} = 2$, donde el complejo con bajo contenido de vanadio (sólido azulino) se disoció totalmente a dicho pH liberando al VO^{2+} , que habría coprecipitado como VOSO_4 junto con el poli(ácido aspártico).

Lo anterior resultaría consistente con la propuesta de que el sólido azulino sería un complejo con bajo contenido de vanadio coordinado.

En relación a los ensayos de síntesis del complejo realizados a $\text{pH} \geq 4$, la idea fue lograr un mayor grado de desprotonación de los grupos carboxílicos del ligando polimérico que pudiera eventualmente conducir a una disminución de la cantidad de sólido azulino precipitado y, por consiguiente, a un aumento en el rendimiento del complejo.

Por otro lado, al trabajar en este rango de pH se debe tener en cuenta la posible aparición de una reacción competitiva de hidrólisis del catión vanadilo, usual a $\text{pH} > 4,5$, que conduce a especies poliméricas de V(IV) en solución y eventual precipitación del óxido hidratado $\text{VO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$. Este hecho afectaría negativamente el rendimiento del complejo deseado.

En el **Anexo 10.6.2** se resumen las observaciones experimentales y los resultados de las síntesis a diferentes pH finales (incluidos los anteriormente discutidos a pH 2 y 2,5). Los colores de las soluciones corresponden a aquellos observados después de llegar al pH final respectivo, ya sea por mezcla directa de reactivos (reacciones 2 y 5) o por ajuste posterior con NaOH 2 M (reacciones 3 y 6) o con HCl 35 % (reacciones 1 y 4). El color y el peso de los productos formados corresponden a los sólidos aislados de las respectivas soluciones por precipitación con acetona.

Se observa que, en el rango de pH final ≥ 4 , con la única excepción de la reacción 3, no se forma del todo el sólido azulino (**Anexo 10.6.3**). Esta diferencia se debe a que en la reacción 3, el pH inicial de la mezcla fue de 2,5 (igual al de las síntesis previas a $\text{pH}_{\text{final}} = 3$), mientras que, en las demás reacciones (4, 5 y 6) el pH en todo momento se mantuvo por encima de 4. Esto último conduce a un considerable grado de desprotonación del poliácido que desfavorece la formación y precipitación del sólido azulino. Asimismo, el bajo rendimiento de la reacción 3 respecto a las demás (en particular a la 4 que coincide en el pH final) se atribuye a la precipitación de dicho sólido en la etapa inicial de mezcla de reactivos.

Los espectros IR de los productos obtenidos en las dos reacciones a pH final 4 son muy similares entre sí y a los del correspondiente complejo sintetizado con la misma relación molar 3 : 1 pero a pH final 3. Sin embargo, como se aprecia en el **Anexo 10.6.4** existe una diferencia saltante en la región de 1250 a 1000 cm^{-1} , donde aparece ahora una nueva e intensa banda de absorción característica del anión SO_4^{2-} con dos máximos muy juntos a $1117\text{-}1118$ y $1147\text{-}1151 \text{ cm}^{-1}$. Esta banda es mucho más intensa en el producto de la reacción 4 (que difiere de la 3 en el pH de la solución del polímero usada y el pH inicial de la mezcla de reactivos). Asimismo, se observa un notable desdoblamiento de la banda de absorción del catión vanadilo, que presenta ahora dos máximos, el usual a $980 - 982 \text{ cm}^{-1}$, asignable al VO^{2+} coordinado en el correspondiente complejo policarboxilato, y uno nuevo a $994 - 995 \text{ cm}^{-1}$ que corresponde al VO^{2+} en la sal VOSO_4 hidratada.

El espectro UV-visible del producto de la reacción 3 muestra el esperado desplazamiento del máximo de absorción hacia el rojo (y del hombro hacia el azul) pero de poca magnitud con respecto al correspondiente complejo sintetizado a la misma relación 3 : 1, pero a pH = 3.

De estos resultados, se concluye que en ambas reacciones a pH final 4 se ha obtenido el complejo deseado pero probablemente con menor contenido de vanadio y contaminado con una significativa proporción de VOSO_4 , el cual coprecipitó al añadir la acetona. Aparentemente, el VOSO_4 se encuentra atrapado dentro del polímero, pues no puede ser eliminado durante la operación de lavado.

En los casos de las reacciones 5 y 6, que corresponden a un pH final de 4,5 y 5 respectivamente, se observa la formación de una solución verdosa y la precipitación de un sólido fino verde.

Sin embargo, a pesar de este comportamiento similar, los respectivos espectros IR difieren entre sí en algunos aspectos significativos. El primero muestra similitud con los espectros IR de los productos obtenidos a pH final 4; sin embargo, la banda del SO_4^{2-} aparece bastante menos pronunciada y no se aprecia desdoblamiento en la correspondiente del VO^{2+} , que está ligeramente desplazada a menores frecuencias (978 cm^{-1}) respecto a la posición usual en los complejos sintetizados. Aparentemente, la coprecipitación de VOSO_4 en este caso ha sido sustancialmente menor.

En cambio, para el producto de la sexta reacción ($\text{pH}_{\text{final}} = 5$), las bandas asignadas al νCO amida I y νNH amida II aparecen en posiciones muy cercanas a las del poli(ácido aspártico) y su correspondiente sal y no a las observadas para los complejos sintetizados.

Además, la banda del SO_4^{2-} es muy intensa (comparable a aquella para la reacción 4) y la del catión VO^{2+} está desdoblada con máximos a 995 y 977 cm^{-1} ; esto indica coprecipitación del VOSO_4 . Se podría especular que hasta pH 4,5 se observa formación del complejo deseado, mientras que a pH 5 ya no se forma o en mínima cantidad. Además, el desplazamiento de la banda del VO^{2+} hacia menores frecuencias (977 cm^{-1}) cercanas a la del $\text{VO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, podría indicar cierto grado significativo de hidrólisis del catión vanadilo a partir de pH 4,5, de acuerdo a lo anteriormente discutido. Esto conduciría a una precipitación del $\text{VO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ junto al VOSO_4 .

Finalmente, se podría concluir que si bien en las reacciones realizadas a $\text{pH} \geq 4$ (con excepción de la 3) se obtiene una cantidad mucho mayor de producto sólido que en aquella a $\text{pH} = 3$ (máximo 25 mg), el problema es que se forma impuro o no se forma del todo. Por tanto, no resulta pertinente un cálculo del rendimiento para estas reacciones.

6.7.2 Síntesis del complejo a menores concentraciones de la solución polimérica y del catión vanadilo

En la **Tabla 4** se pueden observar las condiciones de síntesis de las reacciones 1, 2 y 3 llevadas a cabo a menores concentraciones de la solución polimérica y del catión vanadilo. Por otro lado, en el **Anexo 10.7.1** se muestran los resultados obtenidos, de las tres reacciones, concernientes a peso y color del producto, espectroscopía infrarroja y formación del sólido azulino.

Los espectros IR de los tres productos son muy similares entre sí (**Anexo 10.7.2**) y al del correspondiente complejo sintetizado a mayor concentración final del polímero y del catión vanadilo (1 % y 24,4 mM, respectivamente) usando una relación molar 3 : 1. La única diferencia significativa con este último radica en la presencia de tres picos característicos del anión sulfato en la zona de $1200 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ ausentes en el complejo. Estos son de baja intensidad para los productos de las reacciones 1 y 2 y de moderada intensidad para la reacción 3 realizada a mayor dilución.

Estos resultados indican que en las tres síntesis a mayor dilución se obtuvo el complejo deseado aunque ligeramente contaminado con VOSO_4 . Por esta razón y dada la mayor pureza de los productos de las reacciones 1 y 2, se decidió determinar el porcentaje de rendimiento y el contenido de vanadio de estos dos productos por medio de la técnica de espectroscopía de emisión de plasma acoplado inductivamente (ICP). En la **Tabla 19** se puede observar los resultados obtenidos del porcentaje de rendimiento y del contenido de vanadio.

Tabla 19. Porcentaje de rendimiento y contenido de vanadio de dos de los productos sintetizados a menores concentraciones finales de los reactantes

Reacción	Peso (mg)	%Rendimiento	%V exp. (ICP)	%V cal. Teórico
1	18,1	8,3	12,28	11,46
2	45,5	21,02	9,84	11,46

Se observa que el contenido de vanadio del producto de la reacción 1 se halla prácticamente dentro del rango encontrado para los complejos de referencia sintetizados empleando la relación molar 3 : 1 (12,45 – 14,46 %). Esto es consistente con la propuesta basada en su espectro IR de que se trata básicamente del mismo complejo. Sin embargo, el rendimiento (8,3 %) se encuentra ligeramente por debajo del rango obtenido (8,8 – 11,5 %) reacción de referencia llevada a cabo al doble de concentración de los reactantes, por lo que no cumple con el objetivo principal de lograr un incremento en el rendimiento.

Por otro lado, el porcentaje de rendimiento de la segunda reacción (21,02 %) si resultó parcialmente exitoso pues es mayor al encontrado en la síntesis usual del complejo. Sin embargo, el contenido de vanadio es mucho menor (9,84 %) al encontrado en los complejos sintetizados empleando la relación 3 : 1 moles de meros de polímero por mol de catión vanadilo (12,45 – 14,46 %). Debemos recordar, sin embargo, que en dichos complejos se presentaba una desviación por exceso en el contenido de vanadio respecto al esperado para la relación molar 3 : 1.

Además, se determinó el contenido de vanadio en el sólido azulino obtenido en la reacción 2 el cual fue de 9,12 % lo cual indica que se encuentra dentro del rango del contenido de vanadio de los sólidos azulinos obtenidos anteriormente en los complejos sintetizados empleando de 2 y 3 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo (7,6 – 10,6 %).

Los productos de las reacciones 1, 2 y 3 difieren del complejo de referencia en el color; estos productos consisten de un polvo fino gris-verdoso mientras que el complejo es gris-celeste. Además, estos productos se descomponen rápidamente; se observó que después de dos días cambian de color de gris-verdoso a amarillo mientras que el complejo gris-celeste permanece estable por varios meses.

En cuanto a la solubilidad, son solubles en agua como el complejo de referencia dando también una solución amarilla e insolubles en todos los demás solventes ensayados.

6.7.3 Síntesis del complejo a una temperatura de 65 °C

En la **Tabla 5** se pueden observar las condiciones de síntesis de las dos reacciones 1 y 2 realizadas a 65 °C y los resultados (peso y color del producto y formación del sólido azulino) se resumen en el **Anexo 10.8.1**.

En ambas reacciones se observó, durante la etapa del calentamiento que la solución se tornaba de un color azul intenso con precipitación de mayor cantidad del sólido azulino que en las reacciones llevadas a cabo a idénticas condiciones pero a temperatura ambiente. Al término del tiempo establecido, y luego de separar el sólido azulino insoluble por precipitación, se procedió a la precipitación usual del producto soluble con acetona. Durante la filtración, precipitación con acetona y secado se observó el mismo comportamiento que en la reacción a temperatura ambiente. Se obtuvo en ambos casos un polvo fino gris-celeste.

Sin embargo, los pesos de los productos obtenidos a 65 °C como se observa en el **Anexo 10.8.1**, resultaron considerablemente menores que aquellos a temperatura ambiente (20 – 24 mg). Esta disminución del rendimiento es consistente con la mayor cantidad de sólido azulino formado.

En cuanto a la naturaleza de los productos los espectros IR de ambos productos (**Anexo 10.8.2**) son muy similares a aquellos de los productos obtenidos y anteriormente discutidos (6.7.1) para las reacciones a pH final 4 y temperatura ambiente con una relación 3 : 1 (reacciones 3 y 4 – **Tabla 3 y Anexo 10.6.4**). Como en dicho caso, se trataría entonces del complejo vanadilo deseado pero contaminado con una significativa proporción de VO_4 sin reaccionar y absorbido al interior de la estructura polimérica del complejo. Cabe comentar finalmente la diferencia de color entre estos productos y aquellos obtenidos a pH final 4.

6.7.4 Síntesis del complejo a diferentes relaciones molares de moles de meros del polímero y moles de catión vanadilo (VO^{2+})

En la **Tabla 6** se pueden observar las condiciones de síntesis de las reacciones 1 a la 9 llevadas a cabo a diferentes relaciones molares del polímero y del catión vanadilo.

Moles de meros del polímero : moles de catión vanadilo 1 : 1

En esta síntesis ocurrió la usual precipitación inicial del sólido azulino. Además, se observó durante la precipitación del producto final con acetona que este era de color azul intenso y poseía una consistencia coloidal. Durante la filtración se observó que la mayor parte de dicho producto atravesó el filtro. Se consiguió colectar algo del producto húmedo y se intentó el lavado del mismo con agua y acetona por decantación y secado con nitrógeno gaseoso.

Obviamente fue imposible determinar la cantidad obtenida de este producto.

El análisis de su espectro IR indica que se trata de VOSO_4 en proporción dominante (**Anexo 10.9.1**).

Moles de meros del polímero : moles de catión vanadilo 4 : 1

Durante la síntesis de este producto se observó la formación del sólido azulino. En la precipitación del producto con acetona se observó la separación de un sólido. Durante la filtración y el secado se puede comentar que tiene igual comportamiento que el complejo. Se obtienen 47,20 mg de un polvo de color gris-celeste. Sin embargo, debido a las diferencias que presenta con el espectro IR del complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico), analizado en el párrafo siguiente, no es posible determinar un rendimiento.

En el espectro IR de este producto (**Anexo 10.9.2**), se puede observar que el pico a $1726,7 \text{ cm}^{-1}$, vibración de estiramiento $\text{C}=\text{O}$ del grupo carboxílico COOH , es más intenso que el que se observa en el complejo, es decir, existen más residuos del grupo COOH . Por otro lado, la νCO amida I se ubica ligeramente por encima del rango usual del complejo 3 : 1 ($1642,91$ y $1550,3 \text{ cm}^{-1}$) y νNH amida II considerablemente por debajo del rango del complejo 3 : 1 (1558 a 1548 cm^{-1}) y se acerca más bien a la correspondiente frecuencia de estiramiento en el ácido y en la sal (1532 y 1527 cm^{-1} , respectivamente). Además, se observa la señal típica del catión vanadilo complejado a $983,6 \text{ cm}^{-1}$.

Se presume que se trata del polímero altamente protonado el cual, sin embargo, contiene cierta proporción de grupos carboxilatos coordinados al vanadilo presente.

Moles de meros del polímero : moles de catión vanadilo 5,85 : 1 ; 6 : 1 y 10 : 1

En las reacciones realizadas empleando 6 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo a pH final 5 y 4,5 (reacciones 6 y 7, respectivamente) la mezcla de reacción presentaba un color azul verdoso sin la formación del sólido azulino. Durante la precipitación con acetona no se observó la separación de ningún producto sólido.

Por otro lado, en las reacciones 3 a la 5 a relaciones molares a **5,85 : 1** y **6 : 1** y pH final 3; y en las reacciones 8 y 9 a relaciones molares 10 : 1 y pH final también 3, la mezcla de reacción presentaba un color azul intenso sin la formación del sólido azulino. Durante la precipitación con acetona se observó la separación de un producto de dos consistencias y diferentes colores, blanco y celeste. Sin embargo, durante la filtración al lavar el producto con agua helada se observó que las partículas blancas atravesaban el filtro y las de color celeste eran retenidas por el filtro; pero su consistencia de polvo cambió a un producto viscoso gelatinoso. Durante el secado se observó que este producto quedaba totalmente pegado en la frita del filtro (**Anexo 10.9.3**) y que adquiría una coloración azul-celeste. Se logró aislar una mínima cantidad del producto mediante raspado para propósitos de análisis por espectroscopía infrarroja.

En este último caso, se presume, a partir de las observaciones experimentales recién mencionadas, que se trata de una mezcla de VOSO_4 y poli(ácido aspártico); este último era un polvo blanco demasiado fino que pasaba por el filtro mientras que el VOSO_4 aunque soluble en agua fue retenido parcialmente por este. No se ha podido determinar las cantidades de productos formados.

Por otro lado, los espectros IR de los productos formados en las reacciones 3 y 4 empleando las relaciones molares 5,85 : 1 y 6 : 1 son muy similares entre sí y al espectro IR del sólido azulino (**Anexo 10.9.4**).

Asimismo, el espectro del producto formado empleando la relación molar 6 : 1 (reacción 5) es similar al espectro del producto formado empleando la relación 10 : 1 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo (reacciones 8 y 9). Además, se observa que ambos espectros presentan también una notable similitud al espectro IR del sólido azulino.

Por último, en el **Anexo 10.9.5** se muestra un resumen de las 9 reacciones realizadas empleando diferentes relaciones de moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo, se muestra el resultado de la posibilidad de la cuantificación del producto formado, el color del producto, el resultado general del espectro IR y la observación sobre la formación del sólido azulino.



7. CONCLUSIONES

1. Se logró sintetizar el complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) objetivo del presente trabajo, por un método desarrollado en nuestro laboratorio empleando 2 y 3 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo en un medio acuoso, a pH 3 y con un tiempo de reacción de 24 horas a temperatura ambiente.
2. El porcentaje del rendimiento de la reacción de la síntesis del complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) es bajo (12,45 – 16,79 %), debido principalmente a la formación de un coproducto en mayor proporción (sólido azulino). Con el objetivo de incrementar el rendimiento se realizaron numerosos ensayos variando el pH final, las concentraciones de los reactantes, la temperatura de reacción y las relaciones molares; logrando en uno de los casos elevar el rendimiento al doble, aunque a costa de una disminución del contenido de vanadio.
3. Los espectros IR, UV-visible, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN así como el contenido de vanadio en el complejo sintetizado, el cual corresponde a una situación de saturación coordinativa del vehículo polimérico con el agente activo, VO^{2+} , demuestran que sí se ha formado el nuevo complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) esperado.
4. La diferencia $\Delta[(\nu_{\text{as}} \text{COO}^- - \nu_{\text{s}} \text{COO}^-)]$ determinada en los espectros IR del complejo, indicaría que el modo de coordinación del carboxilato al ion vanadilo es monodentado. Dadas las similitudes del IR del complejo con respecto al complejo vanadilo-poli(γ -ácido glutámico) reportado por Sakurai y Hu, es posible que la coordinación del vanadilo venga dada por dos grupos carboxilato, completándose la esfera de coordinación con moléculas de agua.
5. El conjugado vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) obtenido es hidrosoluble. El complejo en solución, determinado por UV-Visible, tiene una estructura octaédrica. Por otro lado, el cambio de color observado de gris-celeste al estado sólido a amarillo intenso en solución acuosa se le atribuye a una transferencia de carga del ligando al metal.

6. El coproducto azulino obtenido en la síntesis del complejo, que representa entre 80 y 90 % del producto total formado, también corresponde, de acuerdo a la caracterización por espectroscopía IR y UV-Visible, a un complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) o a un entrecruzamiento de las cadenas poliméricas siendo el VO^{2+} el que une dichas cadenas. Se ha descartado la posibilidad de que el VO^{2+} no se encuentre complejado sino simplemente absorbido como VOSO_4 o VOCl_2 por el α,β -poli(DL-ácido aspártico) mediante diferentes técnicas.

7. Se ha logrado obtener con muy buen rendimiento y con alta pureza, de acuerdo a métodos reportados, y en ciertos casos modificados, el polímero precursor polisuccinimida y el ligando polimérico sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico). Además, para este último polímero, se estableció que la proporción relativa de unidades α y β es de 28,5 % y 71,5 %, respectivamente, distribuidas en una secuencia al azar.

8. El peso molecular del polímero precursor se encuentra en el rango de 61,5 a 68 kDa, determinado por GPC empleando el estándar poli(propileno-co-anhídrido maleico). Este rango resultó conveniente para que, bajo las condiciones de hidrólisis básicas suaves usadas, se obtenga la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) con un peso molecular (27 - 30 kDa) dentro del rango deseado. Además, el polímero en cuestión es no tóxico, biocompatible y biodegradable, lo que lo convierte en un potencial vehículo polimérico efectivo del agente insulino mimético oxovanadio(IV). Por otro lado, se intentó incrementar el peso molecular del PSI con DCC. Sin embargo, no se logró incrementos significativos ni reproducibles aunque si buenos rendimientos

8. RECOMENDACIONES

1. Con los resultados obtenidos en este trabajo, valdría la pena evaluar la actividad insulino mimético *in vitro* e *in vivo* del complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) objeto del presente trabajo y determinar el esperado aumento en su acción hipoglicemiante y otros parámetros relacionados con dicha actividad con respecto al complejo molecular patrón bis(etilmaltolato)oxovanadio (IV) (BEOV).

2. Con respecto a la geometría propuesta para el complejo en cuestión, convendría emplear la técnica de resonancia de spin electrónico (ESR) como herramienta útil en la determinación de la geometría exacta del complejo en estado sólido y en solución. Por otro lado, se podría emplear la técnica Electro spray-Masas (EI - MS) con fragmentación en modo positivo o la técnica tiempo de vuelo – espectrometría de masas de ion secundario (ToF - SIMS) en modo positivo para realizar un análisis a la solución acuosa del complejo con el objetivo de concluir si en esta solución el complejo aún es estable. Se esperaría encontrar al fragmento [COVO]⁺ el cual indicaría que los iones carboxilatos de la cadena polimérica se encuentran enlazados al catión vanadilo (VO²⁺).

3. Se propone para una próxima investigación en nuestro grupo por el momento sintetizar un complejo polimérico de vanadio (IV) más hidrosoluble usando un ligando polimérico que sea un copolímero de α,β -poli(DL-ácido aspártico) y polietilenglicol. Los grupos hidroxilo OH (hidrofílicos) serían responsables del incremento de la solubilidad.

4. Por último, nuevos complejos de vanadio (IV) con otros derivados del ligando α,β -poli(DL-ácido aspártico) podrían ser objetos de estudio; entre estos derivados se pueden incluir a hidrogeles de α,β -poli(DL-ácido aspártico), reticulaciones solubles de α,β -poli(DL-ácido aspártico), bloques de α,β -poli(DL-ácido aspártico) y poli(oxazolinas) y finalmente las poliaspartamidas, siendo este último un proyecto sucesor vigente del presente trabajo.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Arya G.; Hedaytullah MD.; Raghvendra; Yadav A.; Sachan K., Treating Diabetes Mellitus with Vanadium Salts – A Future Prospectus : A Review, International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research **2011**, 8, 183 - 185.
2. Nelson D.; Cox M., Lehninger Principles of Biochemistry, W. H. Freeman and Company, 5^{ta} edición, New York, **2008**, p. 929.
3. El Cuerpo Humano. Tomo VI. Ediciones Siglo Cultural, Madrid, **1986**, pp. 85 – 86.
4. <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/what-is-diabetes>
Revisado 13/03/2012
5. http://www.aniorte-nic.net/trabaj_diabetes.htm
Revisado 18/04/2012
6. <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/foreword>
Revisado 13/03/2012
7. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1018-130X2004000100005&script=sci_arttext
Revisado 13/03/2012
8. <http://www.minsa.gob.pe/portada/Especiales/2010/diabetes/datos.asp>
Revisado 13/03/2012
9. Skyler, J.S.; Diabetes Mellitus: Pathogenesis and Treatment Strategies, Journal of Medicinal Chemistry **2004**, 47, 4113 - 4117.
10. Thompson, K.; Orvig, C., Vanadium in Diabetes : 100 years from Phase 0 to Phase I, Inorganic Biochemistry **2006**, 100, 1925 - 1935.

11. Nelson D.; Cox M., Lehninger Principles of Biochemistry, W. H. Freeman and Company, 5^{ta} edición, New York, **2008**, p. 906.
12. http://diabetesinformationhub.com/DiabetesandInsulin_StructureofInsulin.php
Revisado 13/03/2012
13. <http://www.chemicalgraphics.com/paul/vrml2pov/samples/insulin-Molscript.jpg>
Revisado 23/04/2012
14. Nelson D.; Cox M., Lehninger Principles of Biochemistry, W. H. Freeman and Company, 5^{ta} edición, New York, **2008**, p. 922.
15. http://www.medbio.info/Horn/Time%203-4/homeostasis_2.htm
Revisado 23/04/2012
16. Marzban L.; McNeill J., Insulin-Like Actions of Vanadium : Potential as a Therapeutic Agent, The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine **2003**, 16, 253 - 267.
17. <http://www.endotext.org/diabetes/diabetes1/diabetesframe1.html>
Revisado 13/03/2012
18. <http://themedicalbiochemistrypage.org/insulin.php>
Revisado 13/03/2012
19. Nelson D.; Cox M., Lehninger Principles of Biochemistry, W. H. Freeman and Company, 5^{ta} edición, New York, **2008**, p. 606.
20. Nelson D.; Cox M., Lehninger Principles of Biochemistry, W. H. Freeman and Company, 5^{ta} edición, New York, **2008**, p. 441.
21. <http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-14/CB14.html>
Revisado 13/03/2012

22. <http://medicinexplained.blogspot.com/2011/08/insulin-action-on-peripheral-cells.html>
Revisado 13/03/2012
23. Shechter Y.; Goldwasser I.; Mironchik M.; Fridkin M.; Gefel D., Coordination Chemistry Reviews **2003**, 237, 3 - 11.
24. Thompson K.; McNeill J.; Orvig Ch., Vanadium Compounds as Insulin Mimics, Chemical Reviews **1999**, 99, 2561 - 2571.
25. Sakurai H.; Katoh A.; Yoshikawa Y., Chemistry and Biochemistry of Insulin-Mimetic Vanadium and Zinc Complexes. Trial for Treatment of Diabetes Mellitus, Bulletin of the Chemical Society of Japan **2006**, 79, 1645 - 1664.
26. Leeson, P.; Davis, A., Time-Related Differences in the Physical Profiles of Oral Drugs, Journal of Medicinal Chemistry **2004**, 47, 6348 - 6368.
27. Thompson, K.; Orvig, C., Design of Vanadium Compounds as Insulin Enhancing Agents, Journal of the Chemical Society - Dalton Transactions **2000**, 2885 - 2892.
28. Sakurai, H.; Yasui, H.; Adachi, Y. The Therapeutic Potential of Insulin-Mimetic Vanadium Complexes, Expert Opinion on Investigation Drugs **2003**, 12, 1189 - 1203.
29. Hiromuraa M.; Sakurai H. Action Mechanism of Insulin-Mimetic Vanadyl– Allixin Complex, Chemistry & Biodiversity **2008**, 5, 1615-1621.
30. Neuse E., Synthetic Polymers as Drug-Delivery Vehicles in Medicine, Metal-Based Drugs **2007**, 2008, 1 - 19.
31. Duncan R.; The Dawnings Era of Polymer Therapeutics, Drug Discovery **2003**, 2, 347 - 360.

32. Fox M.; Szoka F.; Fréchet J., Soluble Polymer Carriers for the Treatment of Cancer : The Importance of Molecular Architecture, Accounts of Chemical Research **2009**, 42, 1141 – 1151
33. Duncan R., Soluble Synthetic Polymers as Potencial Drug Carriers, Advances in Polymer Science **1984**, 51 - 101.
34. Daniel D.; Hilborn D.; Messing C.; Ponticello S.; Danielson J., Immunoassay Elements Comprising Polymers Containing Vanadium IV (V+4) Ions, U.S. Patent 5,696,193, Dec. 9, **1997**.
35. Baran E., Spectroscopic Investigation of the VO²⁺/Chitosan Interaction, Carbohydrate Polymers **2008**, 74, 704 - 706.
36. Karmaker S.; Saha T., Chelation of Vanadium (IV) by a Natural and Edible Biopolymer Poly(γ -glutamic acid) in Aqueous Solution : Structure and Binding Constant of Complex, Macromolecular Bioscience **2008**, 8, 171 - 176.
37. Sakurai H.; Yasui H.; Yoshikawa Y.; Saha T.; Karmaker S., 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.
38. Karmaker S.; Saha T.; Yoshikawa Y.; Sakurai H. Amelioration of Hyperglycemia and Metabolic Syndromes in Type 2 Diabetic KKA^y Mice by Poly(γ -glutamic acid) Oxovanadium(IV) Complex. ChemMedChem **2007**, 2, 1607 - 1612.
39. Trevor M., Synthesis of Water Soluble Polymer – Bound Antiproliferative Agents, Thesis for Master degree of Science, University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa, **2005**.

40. Yokoyama M.; Znoue S.; Kataoka K.; Yui N.; Okano T.; Sakurai Y. Molecular Design for Missile Drug : Synthesis of Adriamycin Conjugated with Immunoglobulin G using Poly(ethyleneglycol)-block-Poly(aspartic acid) as Intermediate Carrier, *Makromolekulare Chemie* **1989**, 190, 2041 - 2054.
41. Yokoyama M.; Miyauchi M.; Yamada N.; Okano T.; Sakurai Y.; Kataoka K.; Inoue Sh., Characterization and Anticancer Activity of the Micelle-forming Polymeric Anticancer Drug Adriamycin-conjugated Poly(ethylene glycol)-Poly(aspartic acid) Block Copolymer, *CANCER RESEARCH* **1990**, 50, 1693 - 1700.
42. Wang CH.; Wang WT.; Hsiue GH., Development of Polyion Complex Micelles for Encapsulating and Delivering Amphotericin B., *Biomaterials* **2009**, 30, 3352 - 3358.
43. Gyenes T.; Torma V.; Zrínyi M., Swelling Properties of Aspartic Acid-Based Hydrogels, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2008**, 319, 154 – 158.
44. Ross R., Soluble, Crosslinked Polyaspartates, U.S. Patent 5,552,516, Sep. 3, **1996**.
45. Neri P.; Antoni, G. Alpha, Beta-Poly(2-Hydroxyethyl)-DL-Aspartamide, *Macromolecular Syntheses* **1982**, 8, 25 - 28.
46. Neri, P.; Antoni, G. Alpha, Beta-Poly(2-Hydroxyethyl)-DL-Aspartamide, A New Plasma Expander, *Journal of Medicinal Chemistry* **1973**, 16, 893 - 897.
47. Wang Y.; Hou Y.; Ruan G.; Pan M.; Liu T., Study on the Polymerization of Aspartic Acid Catalyzed by Phosphoric Acid, *Journal of Macromolecular Science, Part A* **2003**, 40 : 3, 293 - 307.
48. Shinoda H.; Asou Y.; Suetsugu A.; Tanaka K., Synthesis and Characterization of Amphiphilic Biodegradable Copolymer, Poly(aspartic acid-co-lactic acid), *Macromolecular Bioscience* **2003**, 3, 34 - 43.

49. National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme, File N^o : NA/932, Australia, May 2001.
50. Odian G., Principles of Polymerization, Wiley–Interscience, 4^{ta} Edición, New York, **2004**, p. 22.
51. Wang Y.; Hou Y.; Ruan G.; Pan M.; Liu T., Study on the Polymerization of Aspartic Acid Catalyzed by Phosphoric Acid, Journal of Macromolecular Science, Part A **2003**, 40 : 3, 293 - 307.
52. Brandrup, P.; Immergut, E.H. Polymer Handbook, 2nd Ed.; John-Wiley Co., EE.UU., **1975**; IV-9.
53. Hu R.; He Ch.; Liu J.; Wu Y.; Li J.; Feng Z.; Huang J.; Xi X.; Wu Z., Effects of Insulin-Mimetic Vanadyl-Poly(γ -Glutamic Acid) Complex on Diabetic Rat Model, Journal of Pharmaceutical Sciences **2010**, 99, 3041 - 3047.
54. Kim S.; Min S.; Kim J-H., Synthesis and Characterization of Novel Amino Acid-co-Poly(aspartic acid) Derivatives, Bulletin of the Korean Chemical Society **2008**, 29, 1887 - 1892.
55. Tomida M.; Nakato T.; Matsunami Sh.; Kakuchi T., Convenient Synthesis of High Molecular Weight Poly(succinimide) by Acid-Catalysed Polycondensation of L-Aspartic Acid, Polymer **1997**, 38, 4733 - 4736.
56. Nakato T.; Kusuno A.; Kakuchi T., Synthesis of Poly(succinimide) by Bulk Polycondensation of L-Aspartic Acid with an Acid Catalyst, Journal of Polymer Science: Part A : Polymer Chemistry **2000**, 38, 117 - 122.
57. Biasotto, E.; Lopes M.; Firemand C. Química Experimental de Polímeros, Edgard Blücher LTDA., Brasil, **2004**, p. 234.

58. Yamazaki, M. The Chemical Modification of Chitosan Films for Improved Hemostatic and Bioadhesive Properties. Thesis for Doctor degree of Philosophy, North Carolina State University, United States, **2007**.
59. Matsubara K.; Nakato T.; Tomida M., ^1H and ^{13}C NMR Characterization of Poly(succinimide) Prepared by Thermal Polycondensation of L-Aspartic Acid, *Macromolecules* **1997**, 30, 2305 - 2312.
60. Vu Bach Q.; Moon JR.; Lee DS.; Kim J-H. Lower Critical Solution Temperature Behavior of Amphiphilic Copolymers Based on Polyaspartamide Derivatives, *Journal of Applied Polymer Science* **2008**, 107, 509 - 513.
61. Nită, L.; Chiriac A.; Popescu C.; Neamtu I.; Alecu L., Possibilities for Poly(aspartic acid) Preparation as Biodegradable Compound, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* **2006**, 8, 663 - 666.
62. Yang J.; Fang L.; Tan T., Synthesis and Characterization of Superabsorbent Hydrogels Composites Based on Polysuccinimide, *Journal of Applied Polymer Science* **2006**, 102, 550 - 557.
63. Steven C., Copolymers of Amino Acids and Methods of Their Production, U.S. Patent 6,825,313 B2, Nov. 30, **2004**.
64. Tudorachi N.; Chiriac A., TGA/FTIR/MS Study on Thermal Decomposition of Poly(succinimide) and Sodium poly(aspartate), *Polymer Testing* **2011**, 30, 397 - 407.
65. Yang J.; Fang L.; Tan T., Synthesis and Characterization of Superabsorbent Hydrogels Composites Based on Polysuccinimide, *Journal of Applied Polymer Science* **2006**, 102, 550 - 557.
66. Piatkowski M.; Bodgał D.; Ondruschka B. Microwave-Assisted Synthesis of Poly(aspartic acid), *Polimery* **2009**, 54 , 573 - 576.

67. Masiala J. Polymer and Carbon Nanotube Bound Folic Acid and Methotrexate for Cancer Therapy. Thesis for Master degree of Science of Engineering, University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa, **2010**.
68. Chiriac A.; Nita L.; Neamtu I. Poly(ethylene glycol) Functionalized by Polycondensing Procedure with Poly(succinimide), Polimery **2010**, 55, 641 - 645.
69. Kim S.; Son, Ch.; Jeon Y.; Kim J-H., Characterizations of Novel Poly(aspartic acid) Derivatives Conjugated with γ -Amino Butyric Acid (GABA) as the Bioactive Molecule, Bulletin of the Korean Chemical Society **2009**, 30, 3025 - 3030.
70. Gaina C., Novel Modified Bismaleimide and Biscitraconimide Resins with Bis(2-oxazoline)s and Bisthiols, Chemical Bulletin of Politehnica **2006**, 51, 1 - 2.
71. Mansuri H., Fast Oxidation of Lactams to Cyclic Imides Using Microwave Irradiation, Turkish Journal of Chemistry **2005**, 29, 317 - 320.
72. Kim J-H.; Lee J.; Yoon S-W., Preparation and Swelling Behavior of Biodegradable Superabsorbent Gels Based on Polyaspartic Acid, Journal of Industrial and Engineering Chemistry **2002**, 8, 138 - 142.
73. <http://webbook.nist.gov/chemistry> (Nist Chemistry Webbook)
Revisado 4/01/2012
74. Krishnakumar V.; John Xavier R.; Chithambarathanu T. Density Functional Theory Study of Vibrational Spectra, and Assignment of Fundamental Vibrational Modes of Succinimide and N-bromosuccinimide, Spectrochimica Acta Part A **2005**, 62, 931 - 939.
75. Stamboliyska B.; Binev Y.; Radomirska V.; Tsenov J.; Juchnovski I., IR Spectra and Structure of 2,5-pyrrolidinedione (Succinimide) and of its Nitranion : Experimental and AB initio MO studies, Journal of Molecular Structure **2000**, 516, 237 - 245.

76. Wolk S.; Swift G.; Paik Y.; Yocom K.; Smith R.; Simon E., One-and Two-Dimensional Nuclear Resonance Characterization of Poly(aspartic acid) Prepared by Thermal Polymerization of L-Aspartic Acid, *Macromolecules* **1994**, 27, 7613 - 7620.
77. Ottenbrite R.; Huang S.; Park K., Hydrogels and Biodegradable Polymers for Bioapplications, Virginia, **1996**, 627, pp. 118 - 136.
78. Guo B., Preparation and Characterization of Polyaspartic Acid. Thesis for Master degree of Engineering, Nanjing University of Technology, China, **2004**.
79. Joullié M.; Lassen K., Evolution of amide bond formation, *ARKIVOC* **2010**, viii, 189 - 250.
80. Marder O.; Albericio F., Industrial application of coupling reagents in peptides *CHIMICA OGGI*, Chemistry Today, June **2003**.
81. <http://www.chem.wisc.edu/areas/reich/Handouts/nmr-h/hdata.htm>
Revisado 23/01/2012
82. Yuan Q.; Wei M.; Evans D.; Duan X. Preparation and Investigation of Thermolysis of L-Aspartic Acid-Intercalated Layered Double Hydroxide, *The Journal of Physical Chemistry B*. **2004**, 108, 12381 - 12387.
83. Pivcová H.; Saudek V.; Drobník J.; Vlasák J., NMR Study of Poly(aspartic acid). I. α - and β -Peptide Bonds in Poly(aspartic acid) Prepared by Thermal Polycondensation, *Biopolymers* **1981**, 20, 1605 -1614.
84. Saudek V.; Pivcová H.; Drobník J. NMR Study of Poly(aspartic acid). II. α - and β -Peptide Bonds in Poly(aspartic acid) Prepared by Common Methods, *Biopolymers* **1981**, 20, 1615 - 1623.

85. Fox S.W.; Harada K., Thermal Polycondensation of α -Amino Acids, A Laboratory Manual of Analytical Methods of Protein Chemistry, Alexander Peter, **1960**, 127 - 151.
86. <http://www.spectrumlabs.com/dialysis/FAQ.html>
Revisado 26/09/2010
87. Vlasák, J.; Rypáček F.; Drobník J.; Saudek V. Properties and Reactivity of Polysuccinimide, Journal of Polymer Science **1979**, 66, 59 - 64.
88. Kitano T.; Taguchi A.; Noda I.; Nagasawa M. Conformation of Polyelectrolyte in Aqueous Solution, Macromolecules **1980**, 13, 57 - 63.
89. Noda I.; Tsuge T.; Nagasawa N., The Intrinsic Viscosity of Polyelectrolytes, The Journal of Physical Chemistry **1970**, 74, 710 - 719.
90. Sumayya A.; Panicker C.; Varghese H.; Harikumar B., Vibrational Spectroscopic Studies and AB Initio Calculations of L-Glutamic Acid 5-Amide, Rasayan Journal of Chemistry **2008**, 1, 548 - 555.
91. Sikes, T.; Sikes, C.; Hochwalt, M. Amino Acid, Carbohydrate and Acrylamide Polymers Useful as Flocculants in Agricultural and Industrial Settings, U.S. Patent 20090127205, May 5, **2009**.
92. Ho G-H.; Ho T-I.; Hsieh K-H.; Y-Ch.; Lin P-Y.; Yang J.; Yang K-H.; Yang S-Ch., γ -Polyglutamic Acid Produced by *Bacillus Subtilis* (natto) : Structural Characteristics, Chemical Properties and Biological Functionalities, Journal of the Chinese Chemical Society **2006**, 53, 1363 - 1384.
93. Sun B.; Mi Z-T.; An G.; Liu G.; Zou J-J., Preparation of Biomimetic Materials Made from Polyaspartyl Polymer and Chitosan for Heavy-Metal Removal, Industrial & Engineering Chemistry Research **2009**, 48, 9823 - 9829.

94. Mrvčič J.; Stanzer D.; Grba S., The influence of Different Factors on Manganese Incorporation into *Saccharomyces cerevisiae*, *Agriculturae Conspectus Scientificus* **2009**, 74, 327 - 332.
95. Joentgen W.; Müller N.; Mitschker A.; Schmidt H., Polyaspartic Acids, In *Biopolymers – Polyamides and Complex Proteinaceous Materials I*, S.R. Fahnenstock, and A. Streinbüchel, eds. (Weinheim : Wiley. VCH), **2003**, 7, 175 - 199.
96. Pivcová H.; Saudek V.; Drobnik H., ¹³C N.M.R Study of the Structure of Poly(aspartic acid), *POLYMER* **1982**, 23, 1237 - 1241.
97. Vlaev L.; Georgieva V.; Genieva S., Products and Kinetics of Non-Isothermal Decomposition of Vanadium (IV) Oxide Compounds, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2007**, 88, 805 - 812.
98. Youssef N.; Mahdy A.; Abadir M., Thermal Decomposition in Air of Hydrated Vanadyl Sulphate, *Thermochimica Acta* **1990**, 157, 155 - 161.
99. Deacon G.; Phillips R., Relationships Between the Carbon-Oxygen Stretching Frequencies of Carboxylato Complexes and the Type of Carboxylate Coordination, *Coordination Chemistry Reviews* **1980**, 33, 227 - 250.
100. Ballhausen C.; Gray H., The Electronic Structure of Vanadyl Ion, *Inorganic Chemistry* **1962**, 1, 111-122.
101. Lodyga-Chruscinska E.; Micera G.; Garribba E., Complex Formation in Aqueous Solution and in the Solid State of the Potent Insulin-Enhancing V^{IV}O²⁺ Compounds Formed by Picolinate and Quinolate Derivatives, *Inorganic Chemistry* **2011**, 50, 883 - 899.
102. Turel I.; Golobic A.; Klavzar A.; Pihlar B.; Buglyo P.; Tolis E.; Rehder D.; Sepčič K., Interactions of Oxovanadium (IV) and the Quinolone Family Member-Ciprofloxacin, *Journal of Inorganic Biochemistry* **2003**, 95, 199 - 207.

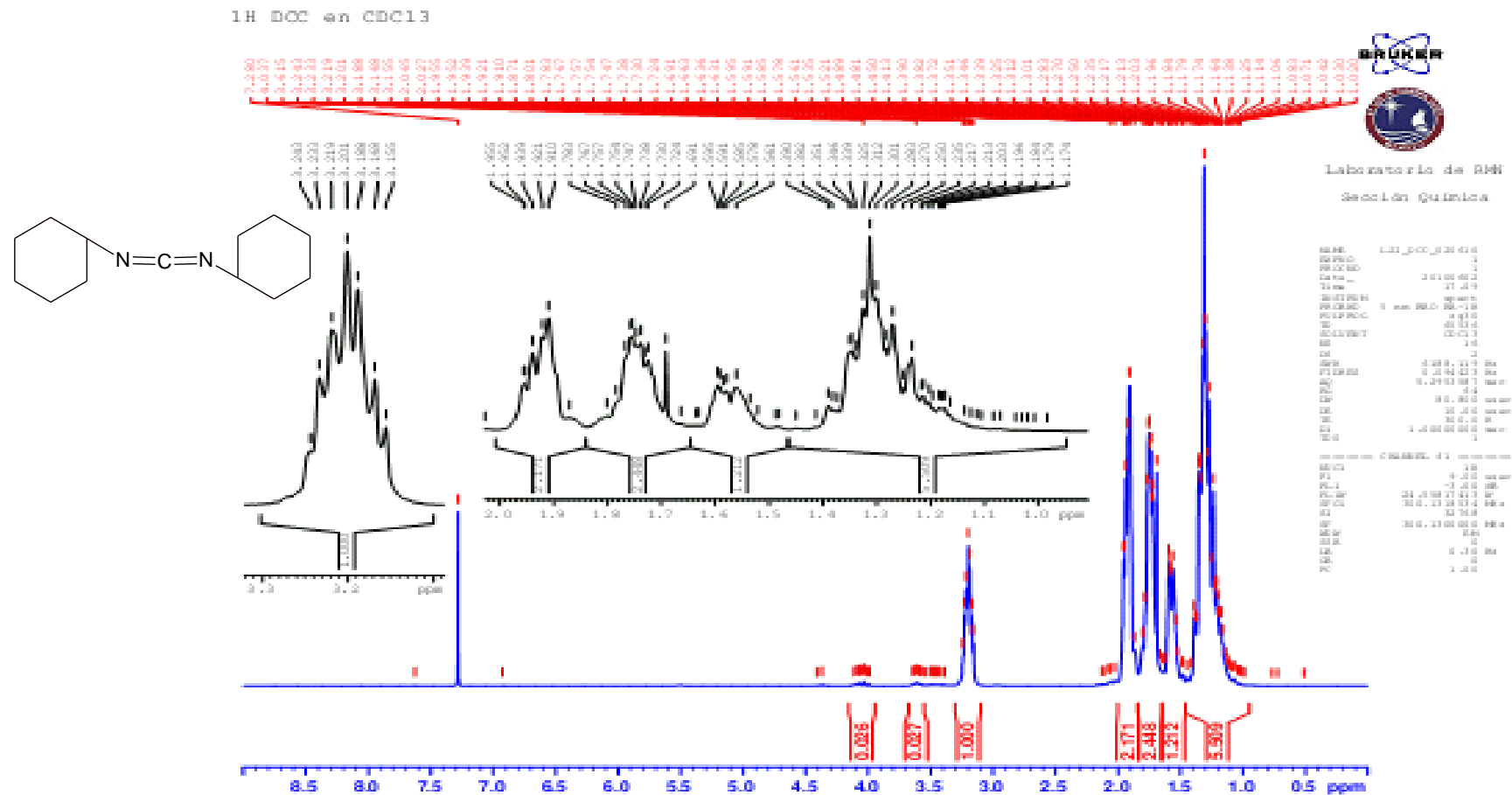
103. Allegretti Y.; Ferrer E.; González Baró A.; Williams P., Oxovanadium(IV) Complexes of Quinic acid. Synthesis, Characterization and Potentiometric Study, *Polyhedron* **2000**, 19, 2613 - 2619.
104. Crans D.; Shin P., Characterization of Vanadium (V) Complexes in Aqueous Solutions : Ethanolamine - and Glycine-Derived Complexes, *Journal of the American Chemistry Society* **1994**, 116, 1305 - 1315.

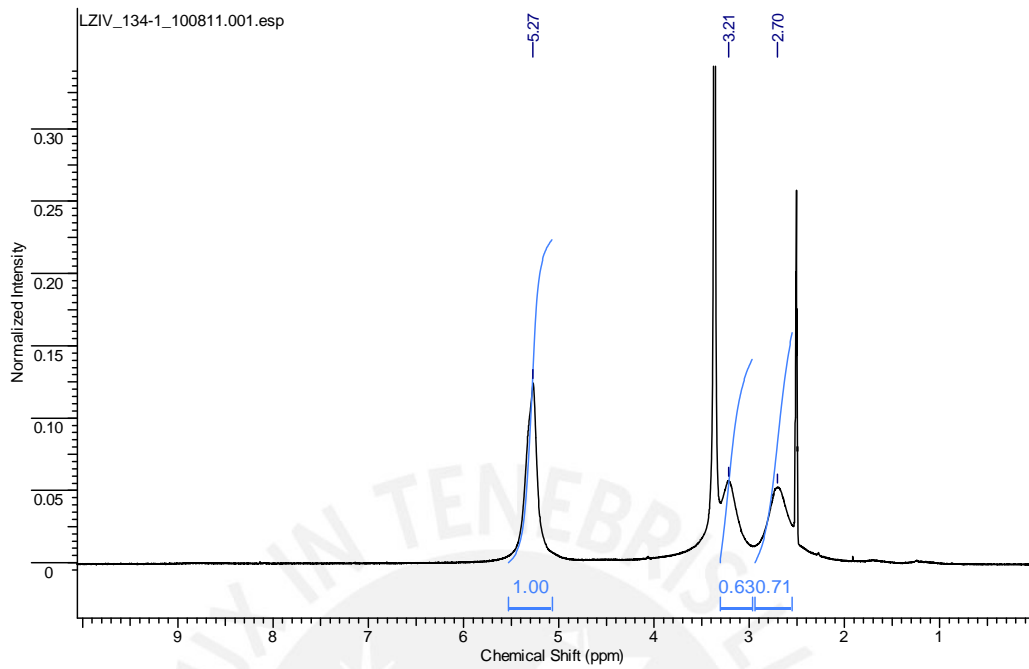


10. ANEXOS

ANEXO 10.1

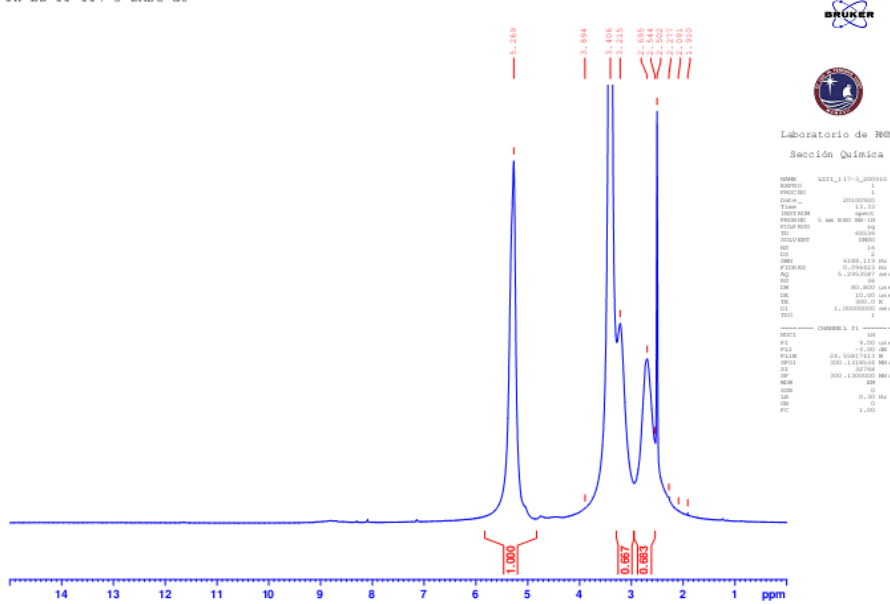
CARACTERIZACIÓN DE LA POLISUCCINIMIDA TRATADA CON DCC

10.1.1 ¹H-RMN en CHCl₃-d₁ del N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC)



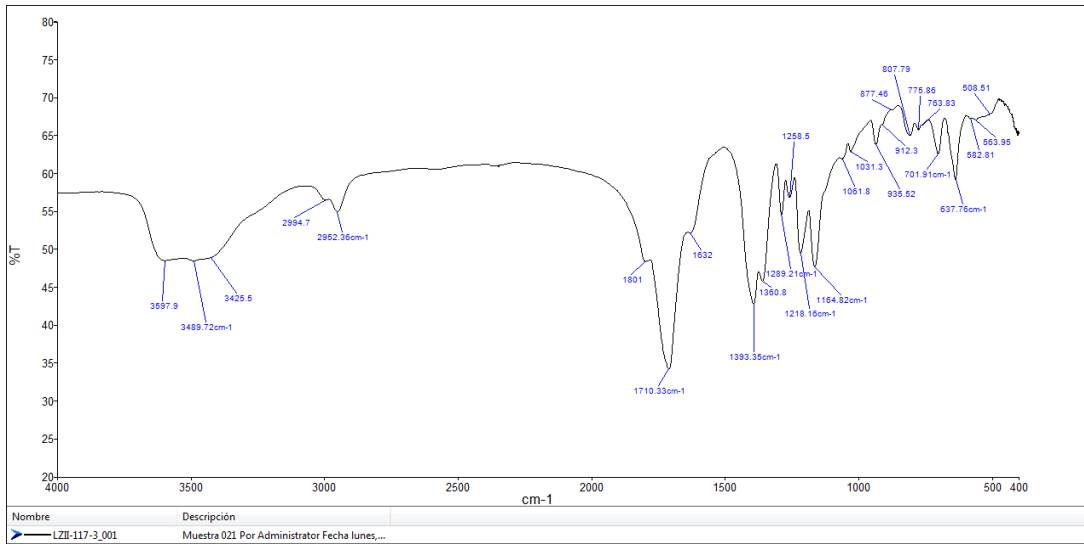
(a)

1H L2 II 117-3 DMSO-d6

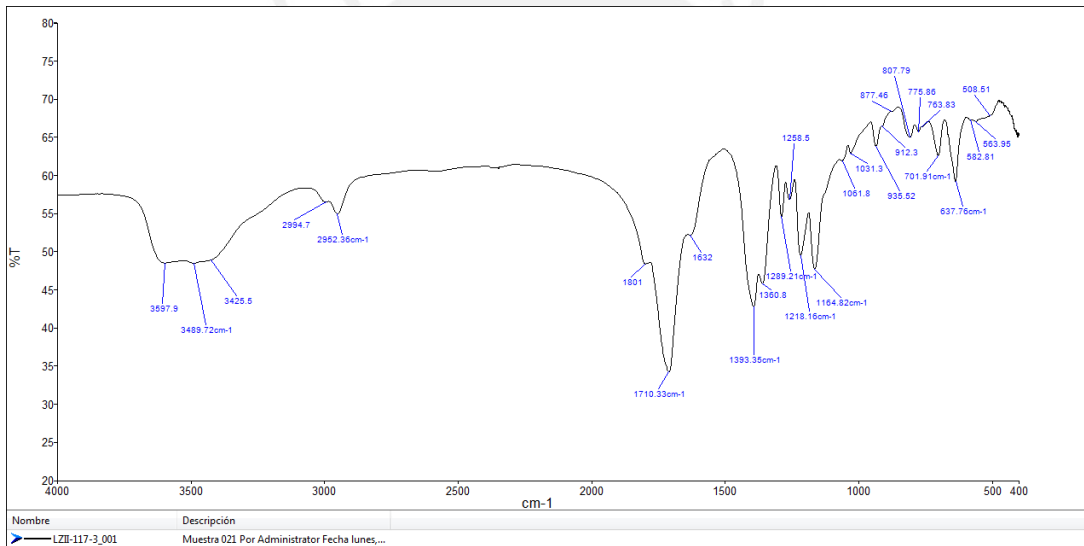


(b)

10.1.2 Comparación de los espectros ^1H -RMN representativo de las polisuccinimidas tratadas con la relación 20 mg de DCC por gramo de polímero (a) y de la polisuccinimida de partida (b)



(a)



(b)

10.1.3 Comparación de los espectros IR (KBr) representativo de las polisuccinimidas tratadas con la relación 20 mg de DCC por gramo de polímero (a) y de la polisuccinimida de partida (b)

ANEXO 10.2

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN POR IR DEL PSI A MAYOR TEMPERATURA



(a)

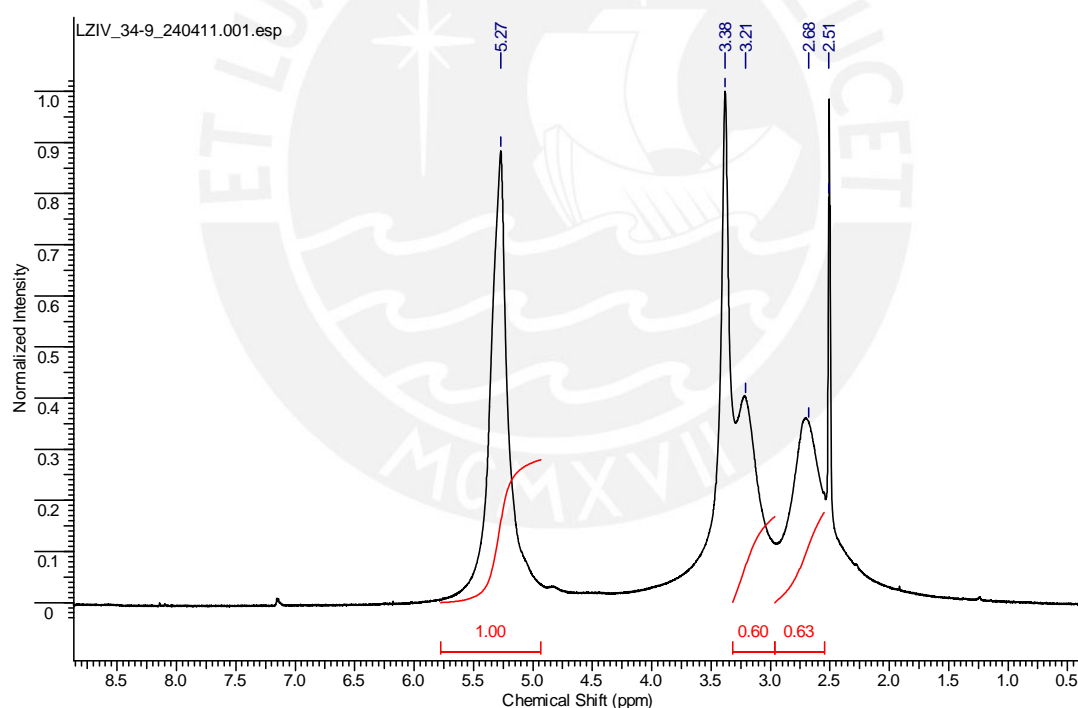
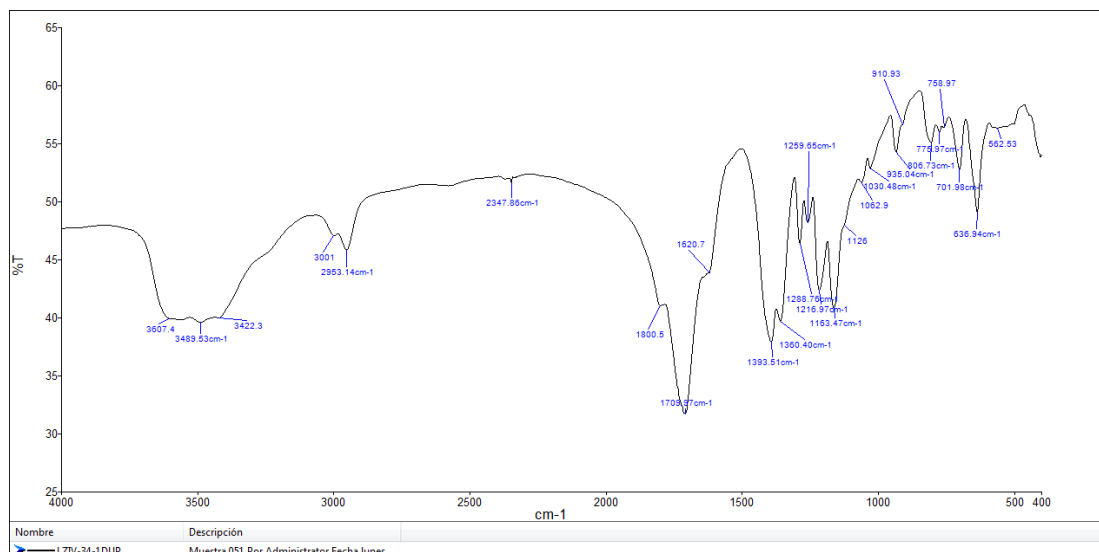


(b)



(c)

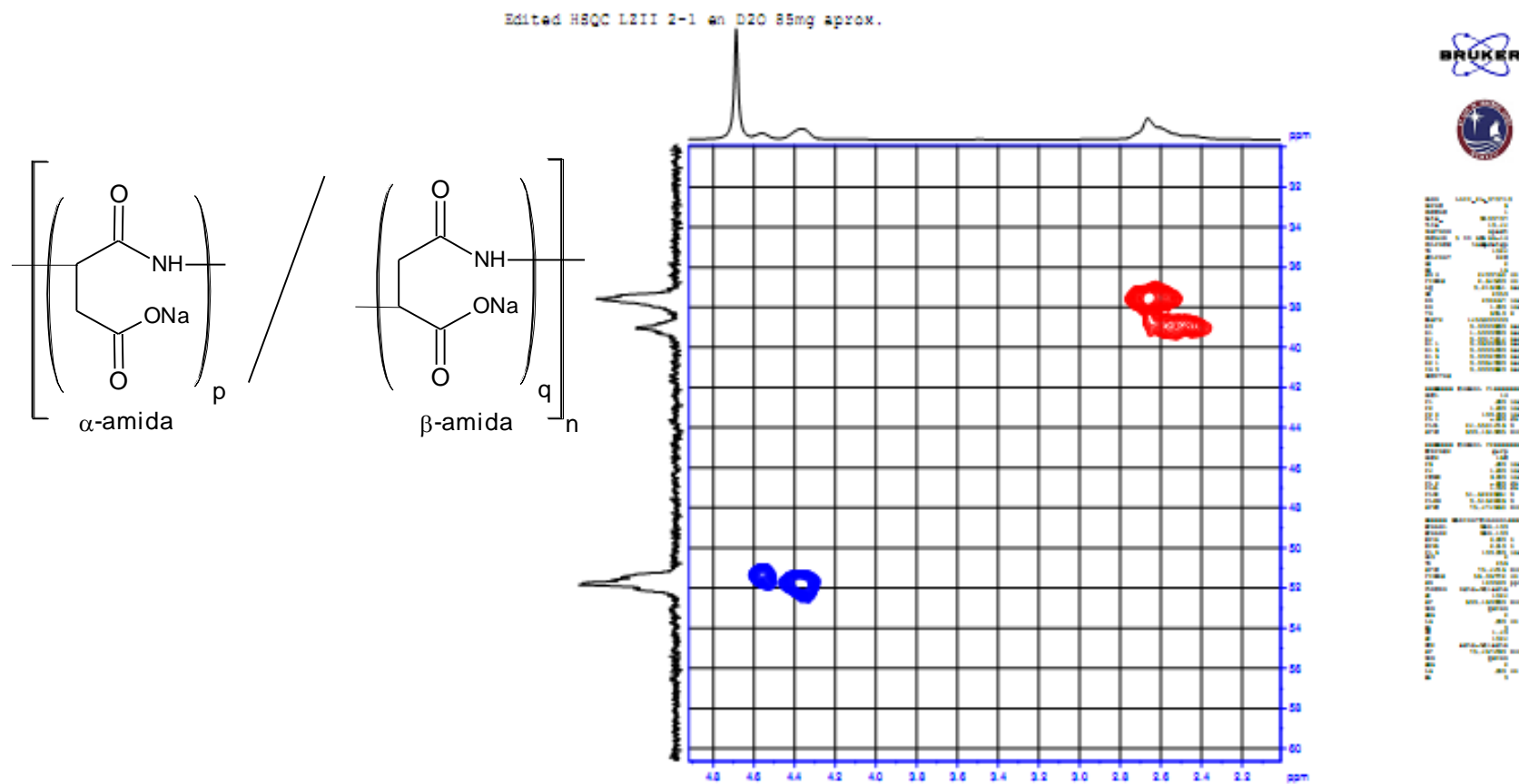
10.2.1 Etapas de la síntesis de la polisuccinimida a 239 °C : Producto disuelto en DMF en el equipo de policondensación (a) ; producto filtrado (b) y producto terminado (c)



10.2.2 Espectros IR (KBr) (a) y ¹H-RMN (b) de la polisuccinimida sintetizada a 239 °C

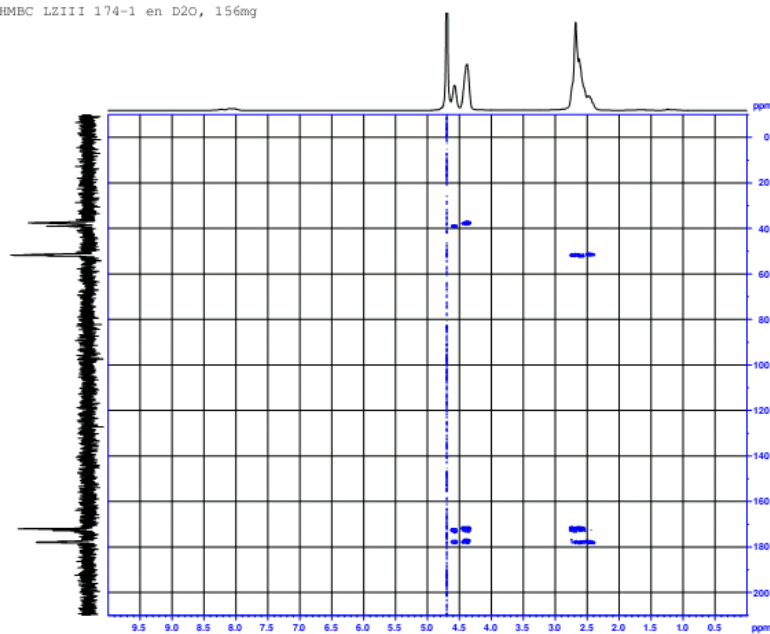
ANEXO 10.3

CARACTERIZACIÓN DE LA SAL DE SODIO DEL α,β -POLI(DL-ÁCIDO ASPÁRTICO) MEDIANTE ESPECTROSCOPIA RMN

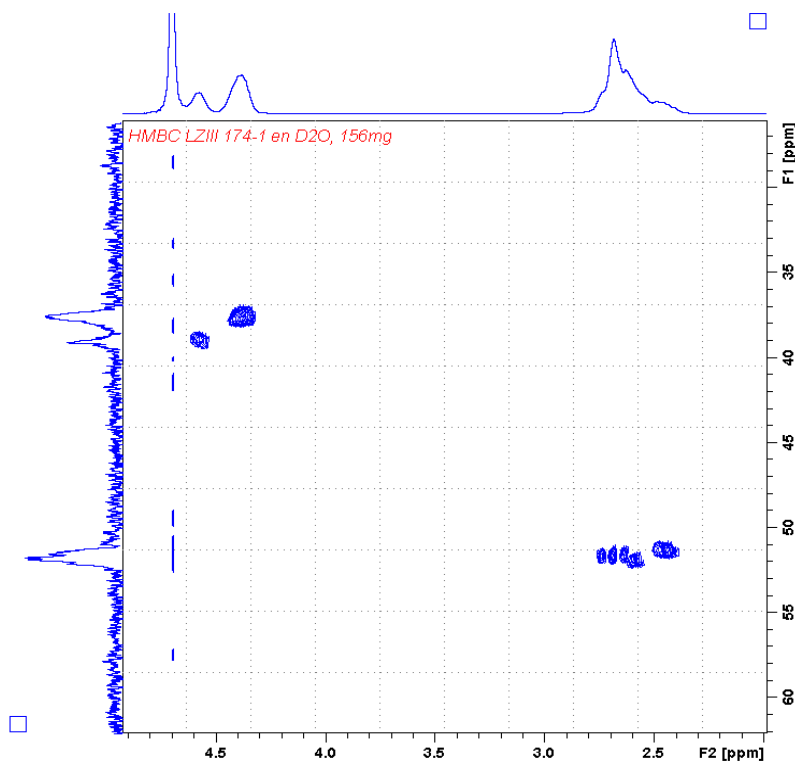


10.3.1 HSQC en D₂O de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico)

HMBC LZIII 174-1 en D2O, 156mg

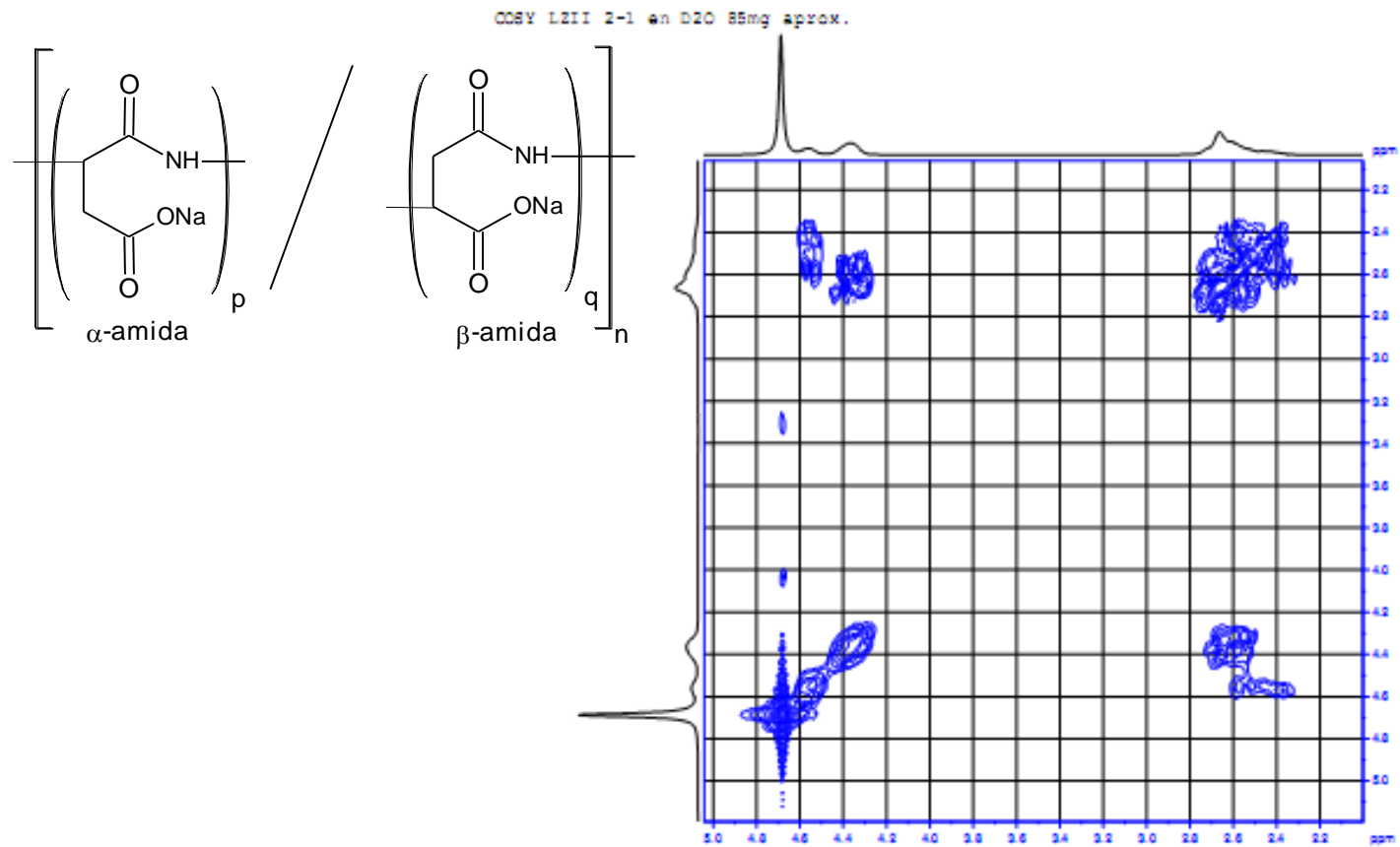


(a)



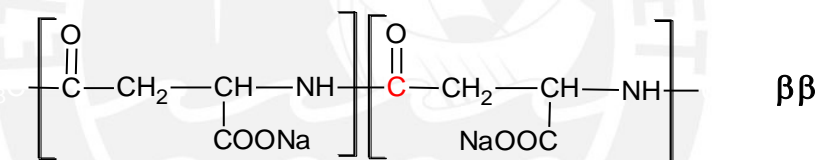
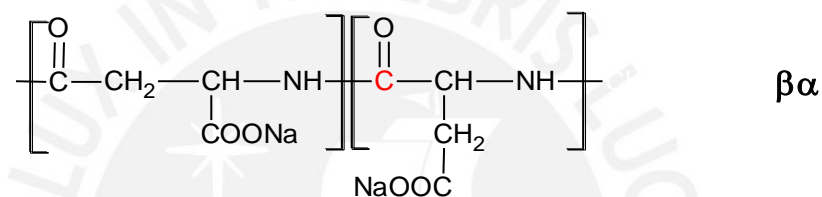
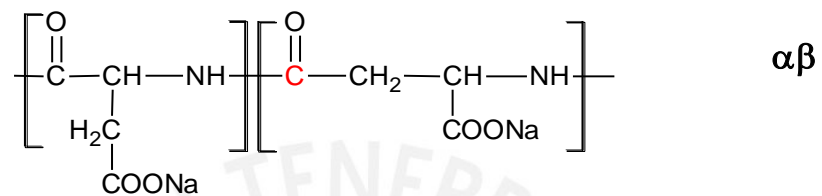
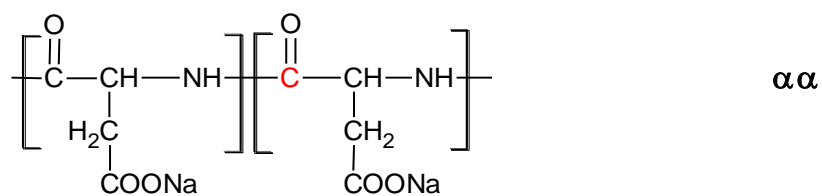
(b)

10.3.2 Espectros HMBC (expansión 0 a 180 ppm) (a) y Espectro HMBC (expansión 0 a 60 ppm) (b) en D₂O de la sal de sodio del α,β-poli(DL-ácido aspártico)

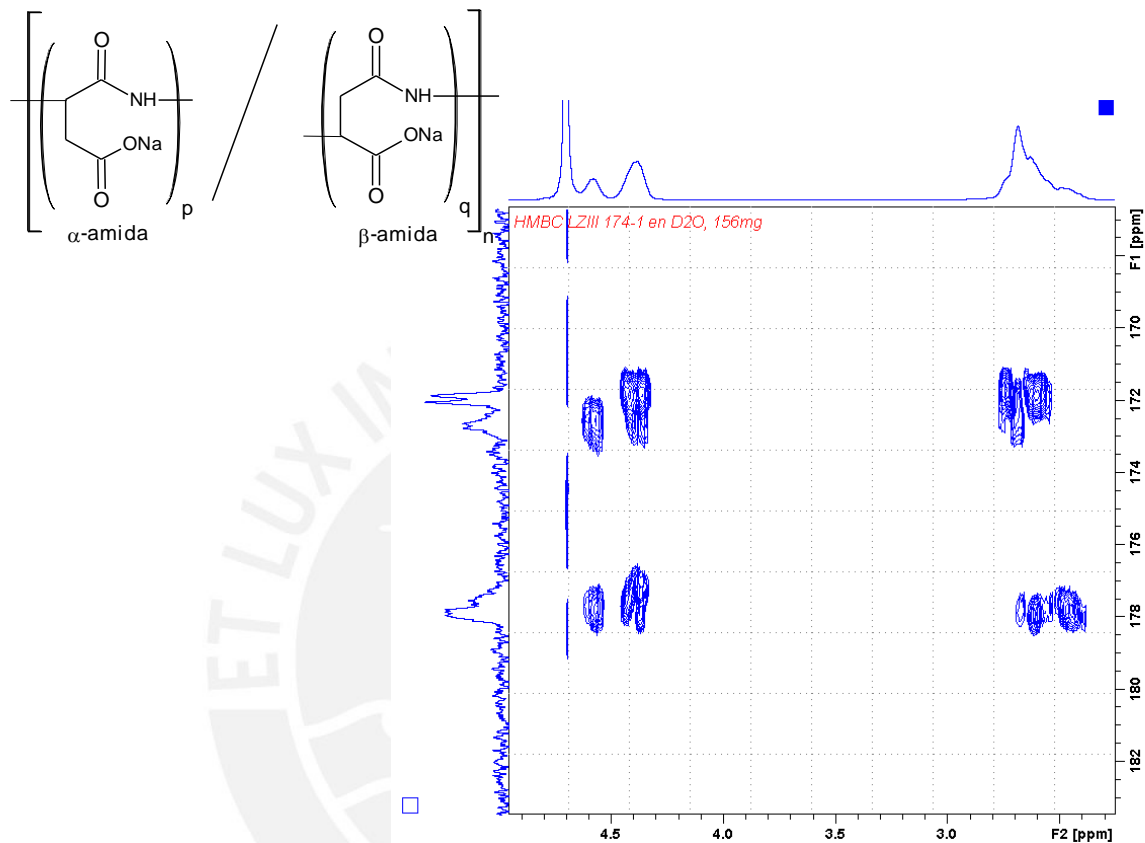


NAME	
NAME	1
EXPNO	1
PROCNO	1
F2 - F1	100.626125
PROBHD	5 mm QNP 1H/13
PROBHD2	
PROBHD3	
PROBHD4	
PROBHD5	
PROBHD6	
PROBHD7	
PROBHD8	
PROBHD9	
PROBHD10	
PROBHD11	
PROBHD12	
PROBHD13	
PROBHD14	
PROBHD15	
PROBHD16	
PROBHD17	
PROBHD18	
PROBHD19	
PROBHD20	
PROBHD21	
PROBHD22	
PROBHD23	
PROBHD24	
PROBHD25	
PROBHD26	
PROBHD27	
PROBHD28	
PROBHD29	
PROBHD30	
PROBHD31	
PROBHD32	
PROBHD33	
PROBHD34	
PROBHD35	
PROBHD36	
PROBHD37	
PROBHD38	
PROBHD39	
PROBHD40	
PROBHD41	
PROBHD42	
PROBHD43	
PROBHD44	
PROBHD45	
PROBHD46	
PROBHD47	
PROBHD48	
PROBHD49	
PROBHD50	
PROBHD51	
PROBHD52	
PROBHD53	
PROBHD54	
PROBHD55	
PROBHD56	
PROBHD57	
PROBHD58	
PROBHD59	
PROBHD60	
PROBHD61	
PROBHD62	
PROBHD63	
PROBHD64	
PROBHD65	
PROBHD66	
PROBHD67	
PROBHD68	
PROBHD69	
PROBHD70	
PROBHD71	
PROBHD72	
PROBHD73	
PROBHD74	
PROBHD75	
PROBHD76	
PROBHD77	
PROBHD78	
PROBHD79	
PROBHD80	
PROBHD81	
PROBHD82	
PROBHD83	
PROBHD84	
PROBHD85	
PROBHD86	
PROBHD87	
PROBHD88	
PROBHD89	
PROBHD90	
PROBHD91	
PROBHD92	
PROBHD93	
PROBHD94	
PROBHD95	
PROBHD96	
PROBHD97	
PROBHD98	
PROBHD99	
PROBHD100	

10.3.3 COSY en D₂O de la sal de sodio del α,β-poli(DL-ácido aspártico)



10.3.4 Posibles secuencias de las unidades α y β en la cadena polimérica de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico)

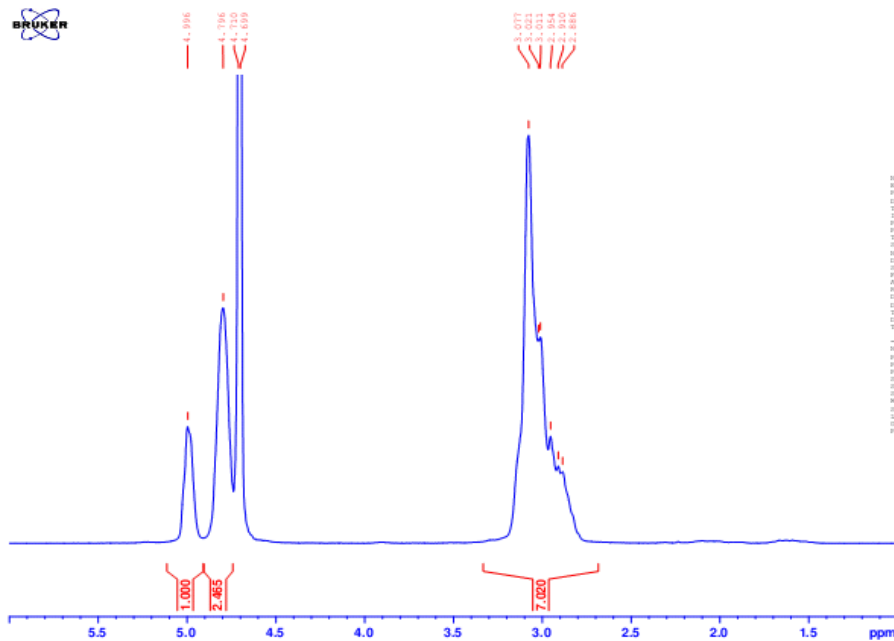


10.3.5 HMBC en D₂O de la sal de sodio del α,β -poli(DL-ácido aspártico) (expansión 160 a 182 ppm)

Observación :

En el espectro HMBC, en la expansión de 160 a 182 ppm se observa que el pico más intenso del carbono carbonilo de la amida (171,92 - 172,04 ppm) acopla sólo con el protón metino de la unidad β . Se observa además que el pico central del carbono carbonilo de la amida (172,63; 172,66 y 172,74 ppm) acopla con los protones metino α y β . También, el pico más pequeño del carbono carbonilo de la amida (173,36 ppm) acopla sólo con el protón metino α .

1H LZIII 57-4 en D2O a 60C



(a)



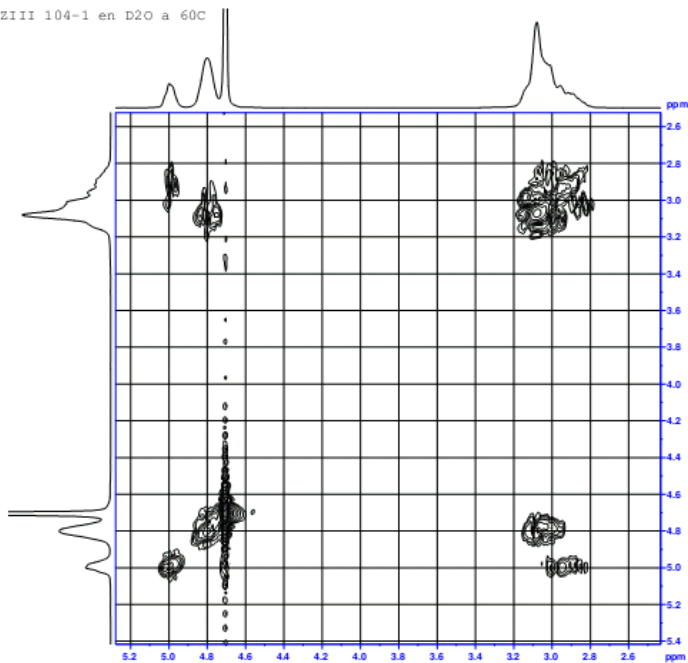
Laboratorio de QUÍMICA

Sección Química

```

NAME LZIII_57-4_191110
EXPNO 1
PROCNO 1
DATE_ 20111110
TIME 9.52
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBO BB-1H
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 2
DS 2
SWH 4199.119 Hz
F2 0.2948210 Hz
AQ 0.2293767 sec
RG 512
AQ 0.7
SR 801.800 kHz
SC 10.00 uM
TE 300.2 K
SI 1.00000000 sec
TSD 1
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 9.00 uM
PL1 -0.00 dB
PL12 20.00dB19.00 dB
PL13 200.1119010 MHz
SI 32
RG 300.1100000 MHz
===== CHANNEL f2 =====
NUC2 13C
P2 9.00 uM
PL2 -0.00 dB
PL12 20.00dB19.00 dB
PL13 200.1119010 MHz
SI 32
RG 300.1100000 MHz
===== CHANNEL f3 =====
NUC3 15N
P3 0.00 uM
PL3 0.00 dB
PL12 20.00dB19.00 dB
PL13 200.1119010 MHz
SI 32
RG 300.1100000 MHz
    
```

COSY LZIII 104-1 en D2O a 60C



(b)



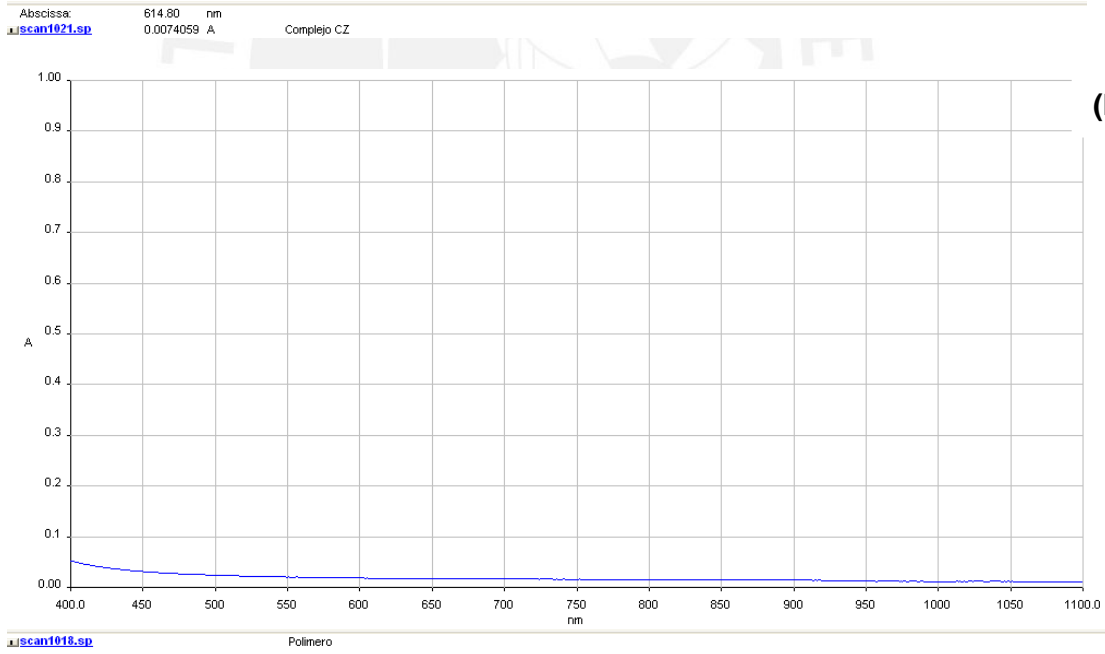
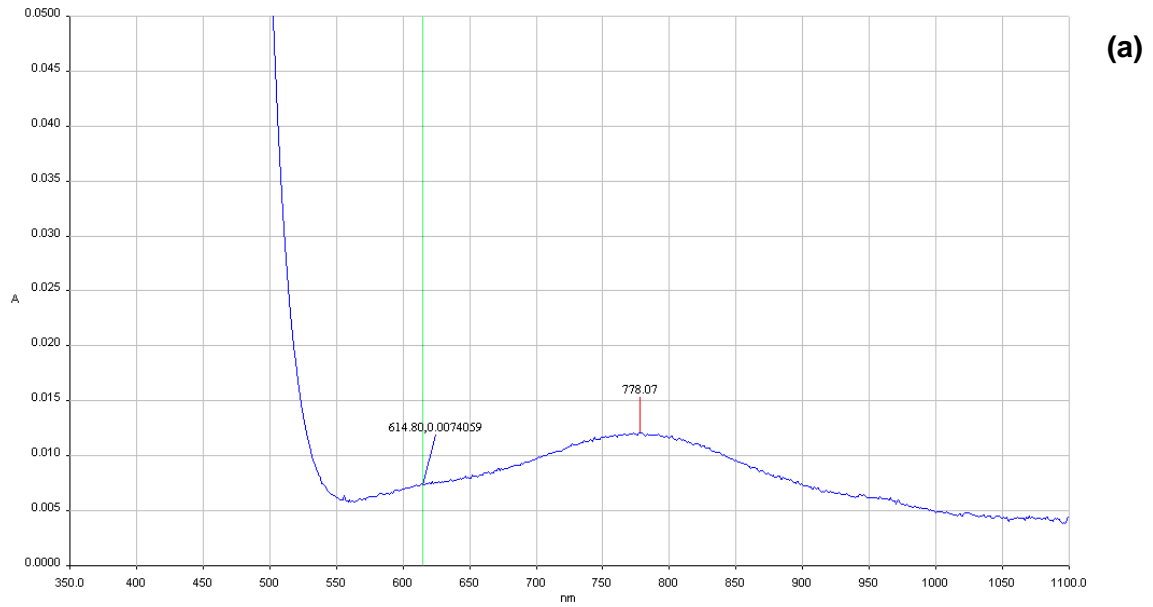
```

NAME LZIII_104-1_110310
EXPNO 1
PROCNO 1
DATE_ 20111110
TIME 10.01
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBO BB-1H
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 2
DS 2
SWH 4199.119 Hz
F2 0.2948210 Hz
AQ 0.2293767 sec
RG 512
AQ 0.7
SR 801.800 kHz
SC 10.00 uM
TE 300.2 K
SI 1.00000000 sec
TSD 1
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 9.00 uM
PL1 -0.00 dB
PL12 20.00dB19.00 dB
PL13 200.1119010 MHz
SI 32
RG 300.1100000 MHz
===== CHANNEL f2 =====
NUC2 13C
P2 9.00 uM
PL2 -0.00 dB
PL12 20.00dB19.00 dB
PL13 200.1119010 MHz
SI 32
RG 300.1100000 MHz
===== CHANNEL f3 =====
NUC3 15N
P3 0.00 uM
PL3 0.00 dB
PL12 20.00dB19.00 dB
PL13 200.1119010 MHz
SI 32
RG 300.1100000 MHz
    
```

10.3.6 Espectros ¹H-RMN a 60 °C (a) y COSY a 60 °C (b) en D₂O de la sal de sodio del α,β-poli(DL-ácido aspártico)

ANEXO 10.4

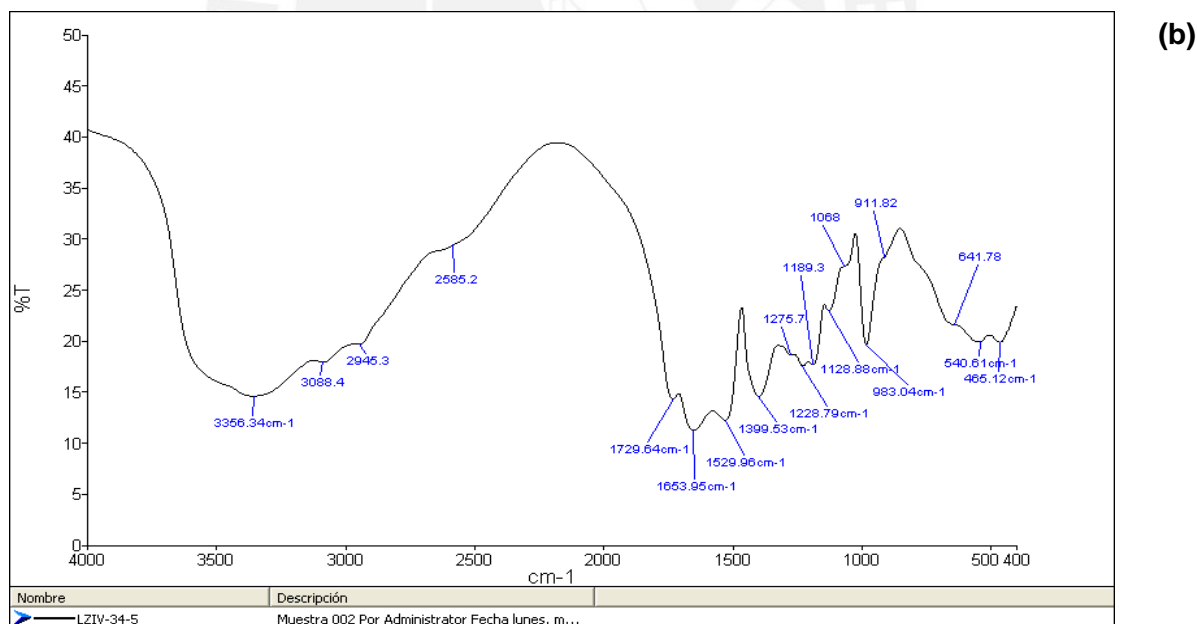
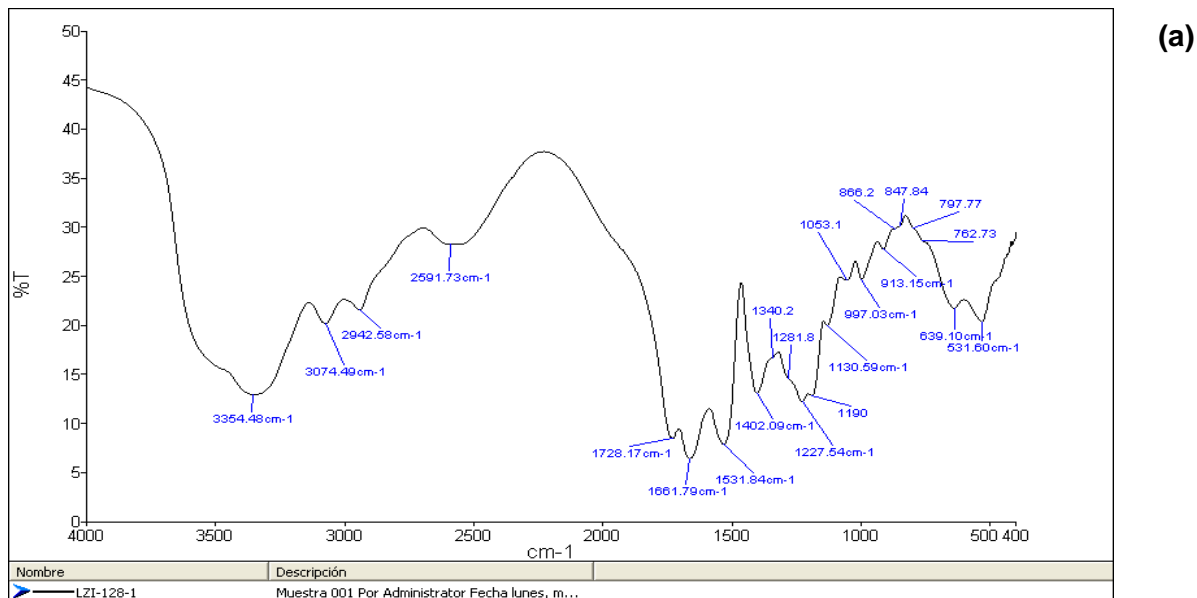
CARACTERIZACIÓN POR UV-VISIBLE DEL COMPLEJO Y DEL α,β -POLI(DL-ÁCIDO ASPÁRTICO).



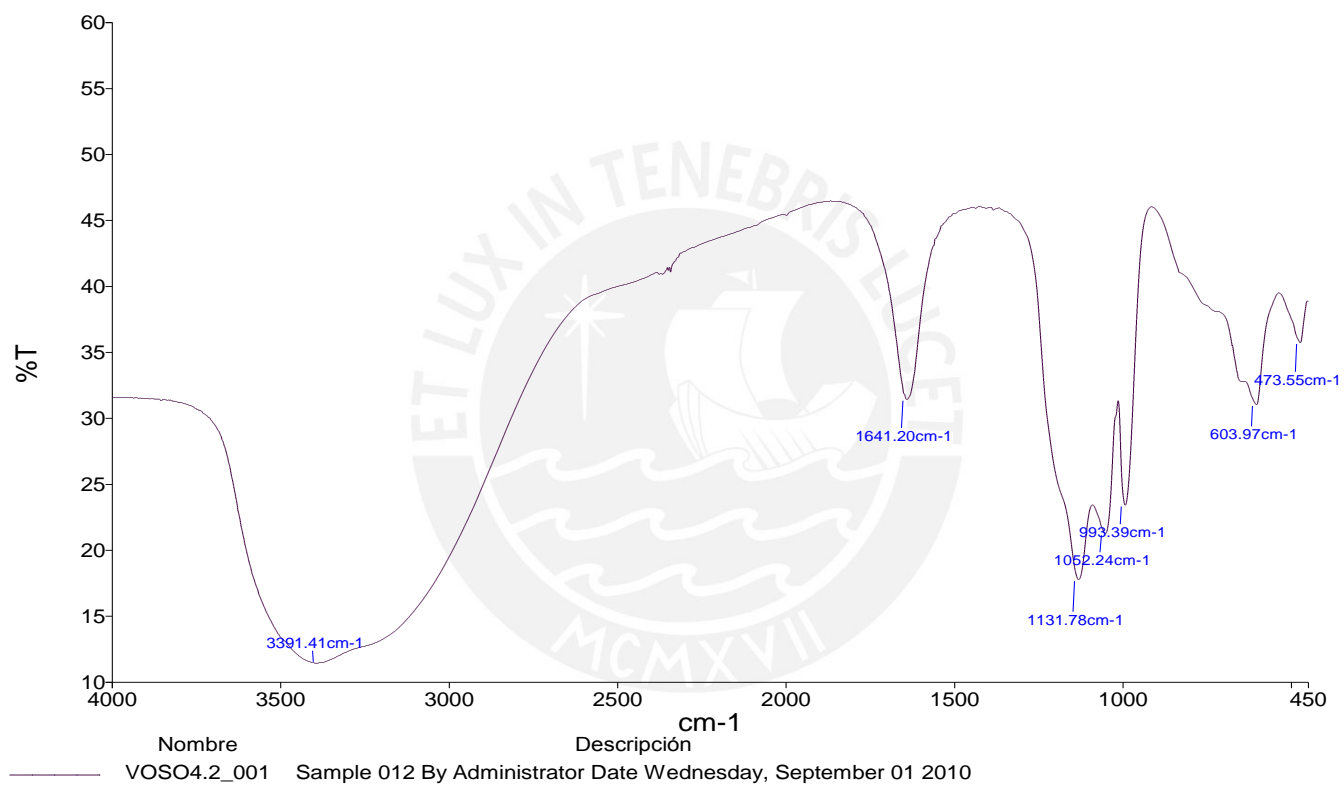
Espectros UV-visible del complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) empleando la relación 2 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo (a) y del α,β -poli(DL-ácido aspártico) 2 % (b)

ANEXO 10.5

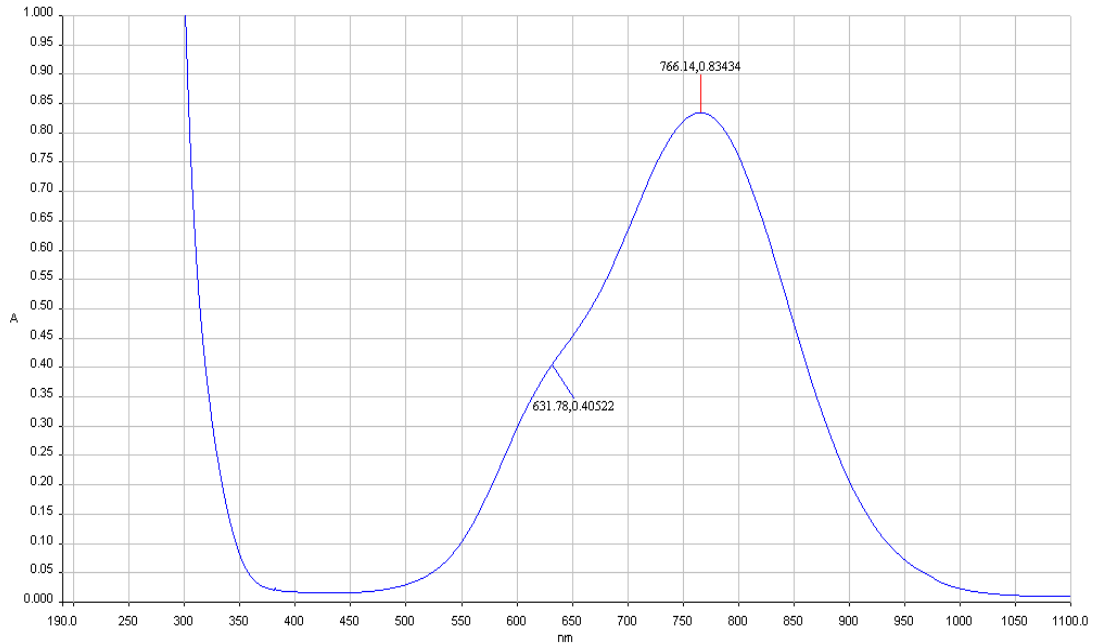
CARACTERIZACIÓN DEL SÓLIDO AZULINO POR IR Y UV-VISIBLE



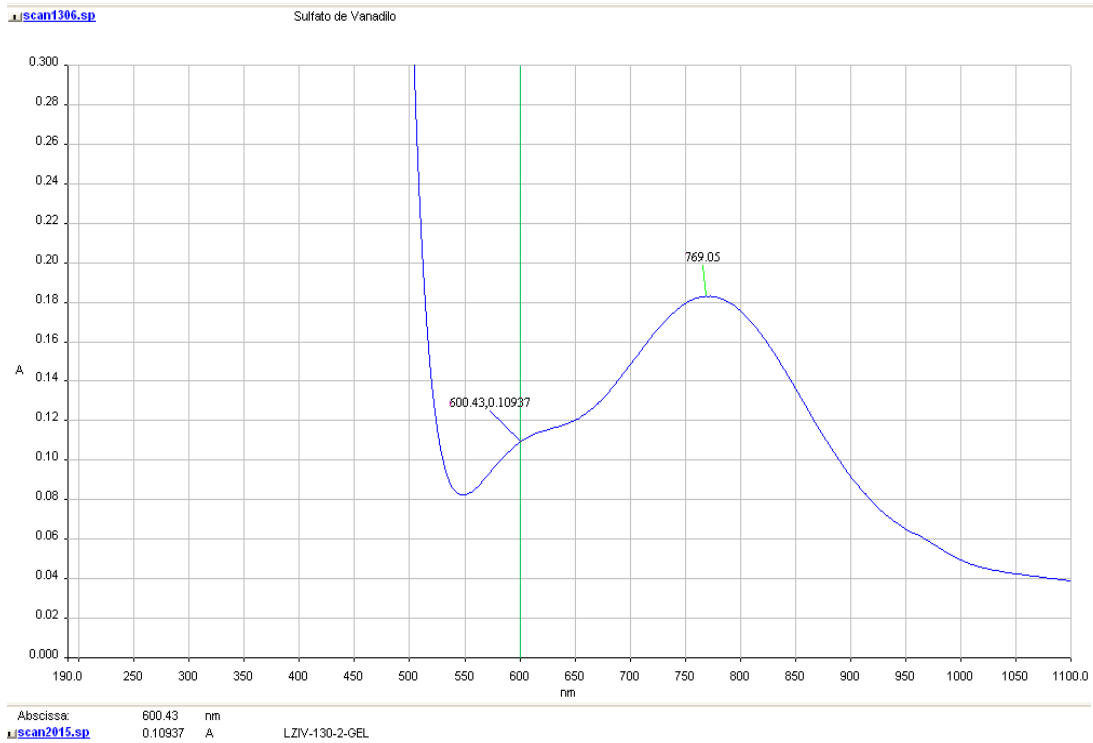
10.5.1 Comparación de los espectro IR (KBr) del polímero α,β -poli(DL-ácido aspártico) (a) y del sólido azulino sintetizado empleando 3 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo (b)



10.5.2 IR (KBr) del VOSO₄·2,5H₂O



(a)

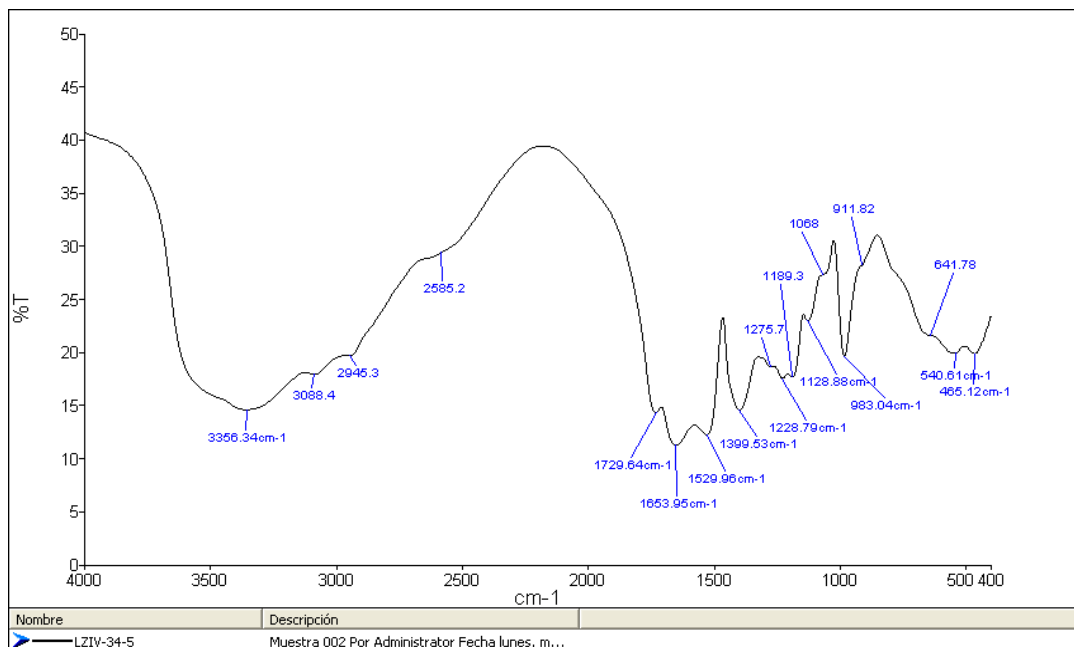


(b)

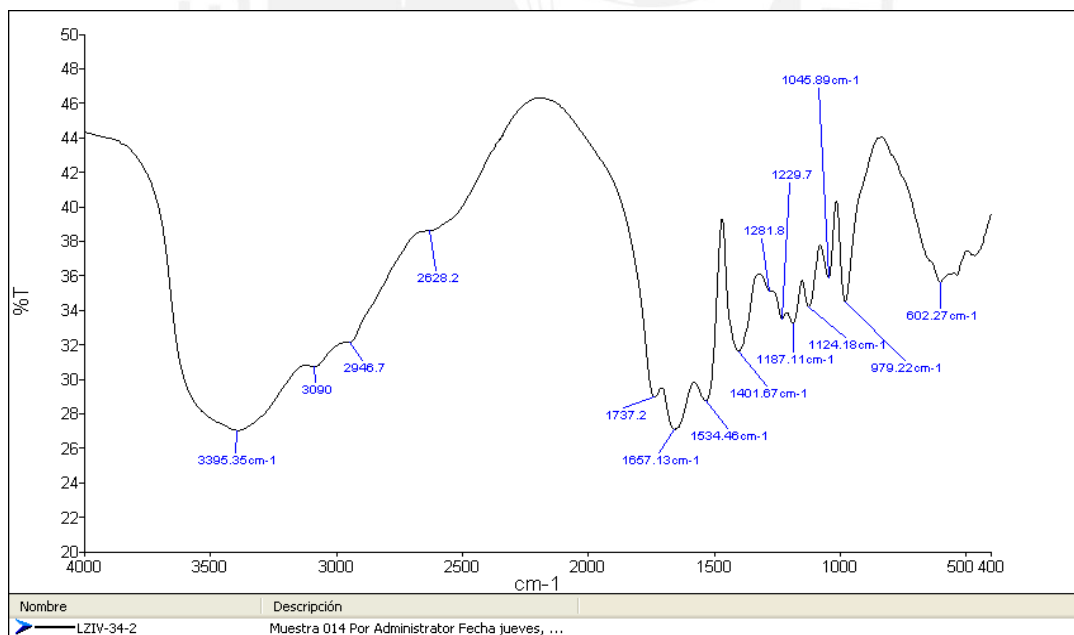
10.5.3 Comparación de los espectros UV-Visible del $\text{VOSO}_4 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ 0,049 M (pH3) (a) y de la solución acuosa del sólido azulino 9,6 mg/mL (pH 3) (b)

ANEXO 10.6

SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN POR IR Y RESULTADOS DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS POR SÍNTESIS DEL COMPLEJO A DIFERENTES pH FINALES.



(a)



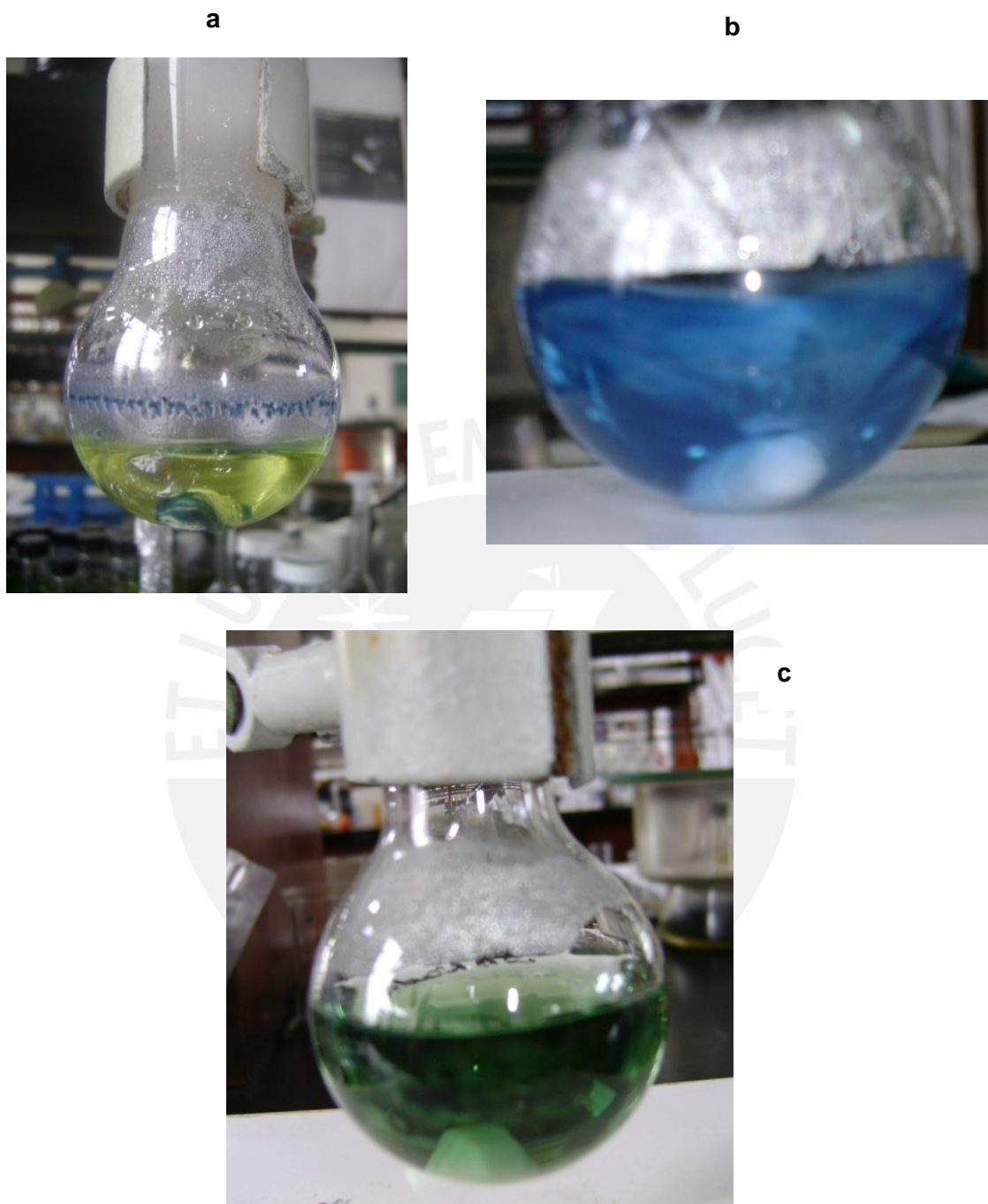
(b)

10.6.1 Comparación de los espectros IR (KBr) del sólido azulino (a) y del producto formado a pH final igual a 2 (b)

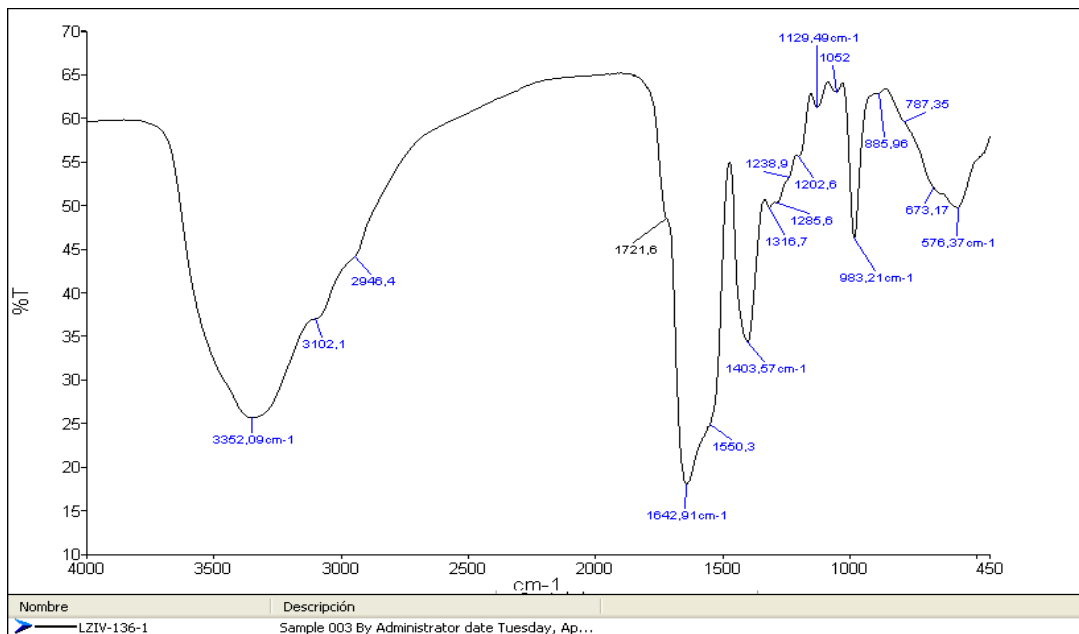
10.6.2. Resultados generales de los productos formados a diferentes pH finales de la mezcla de reacción

Reacción	pH Final de la solución	Peso del producto precipitado con acetona (mg)	Color de la solución	Observación : Formación del sólido azulino
		color		
1	2	40,2 azul	azul	No
2	2,5	111,2 gris-celeste	azul	Si
3	4 pH polímero = 4	16,8 amarillo-verdoso	amarilla	Si
4	4* pH polímero = 6	222,4 azul	azul	No
5	4,5	136,8 verde	verdosa	No
6	5	182 verde	verdosa	No

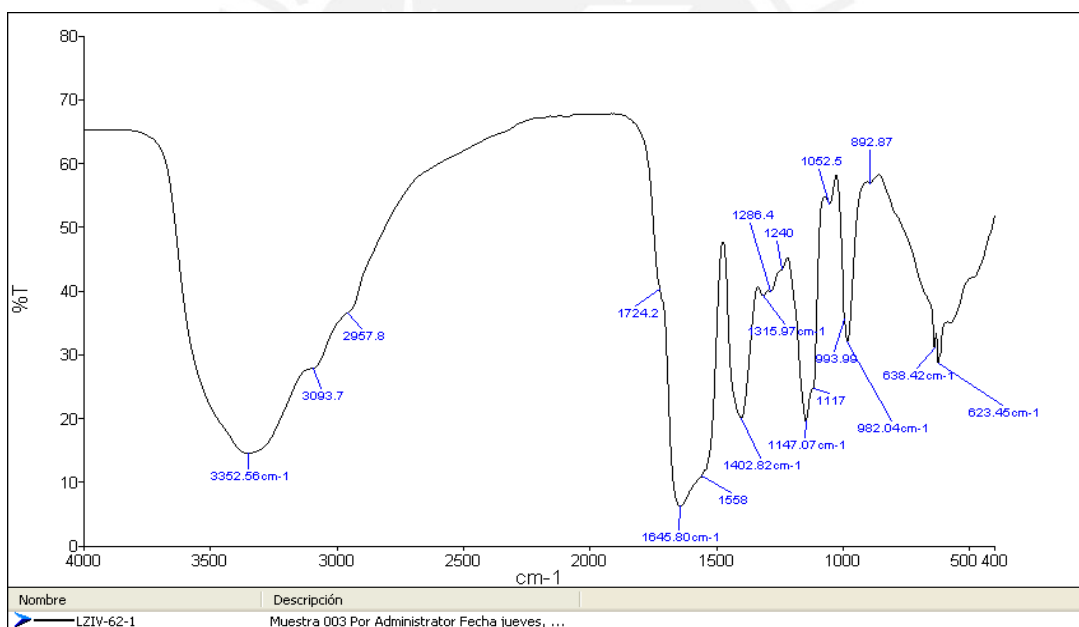
* En este caso se empleó una solución del polímero de pH 6, a diferencia de la reacción 3 en que se usó una de pH 4.



10.6.3 Síntesis del complejo a pH final igual a 4 (solución polimérica pH 4) (a) ; a pH final igual a 4 (solución polimérica pH 6) (b) y a pH final igual a 4,5 (c)



(a)



(b)

10.6.4 Comparación de los espectros IR (KBr) del complejo vanadilo - α, β -poli(DL-ácido aspártico) (a) y del producto formado a pH final igual a 4, solución polimérica pH 4 (b)

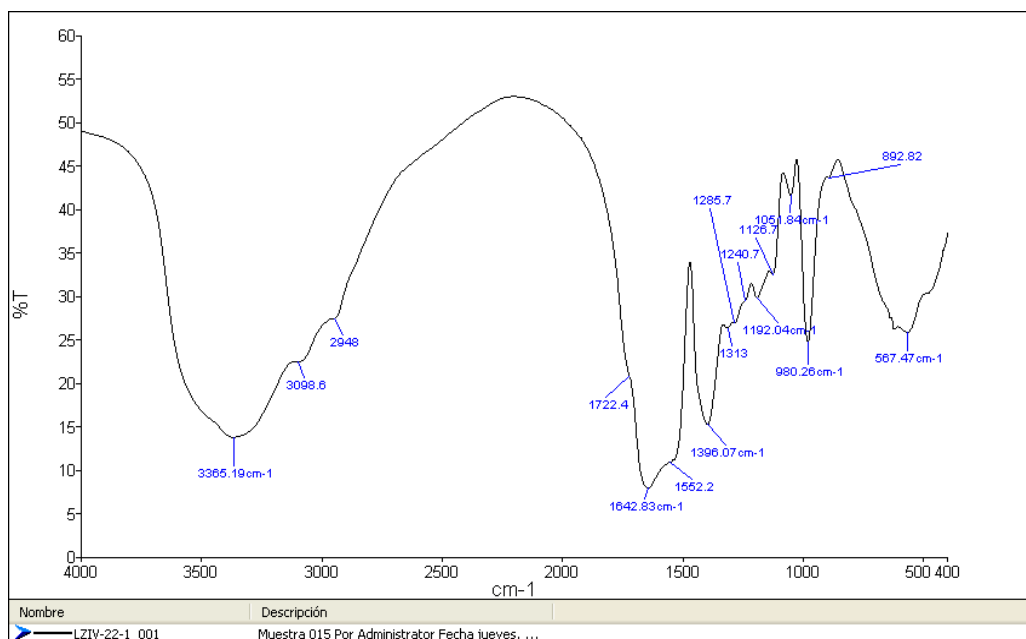
ANEXO 10.7

RESULTADOS Y CARACTERIZACIÓN POR IR DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS POR SÍNTESIS DEL COMPLEJO A MENORES CONCENTRACIONES.

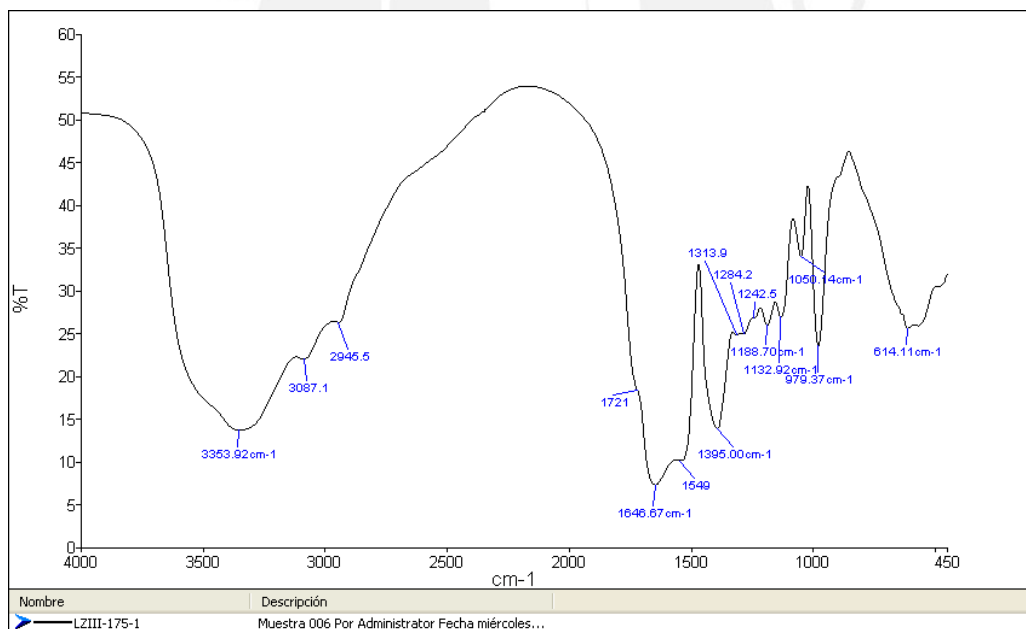
10.7.1 Resultados experimentales de las síntesis realizadas a menores concentraciones de los reactantes

Reacción	Peso del producto precipitado con acetona (mg)	Resultados del IR	Observación : Formación del sólido azulino
	color		
1	18,1	Complejo ligeramente impuro*	Si
	gris-verdoso		
2	45,5	Complejo ligeramente impuro*	Si
	gris-verdoso		
3	34	Complejo moderadamente impuro*	Si
	gris-verdoso		

*Impureza : VOSO_4 absorbido.



(a)



(b)

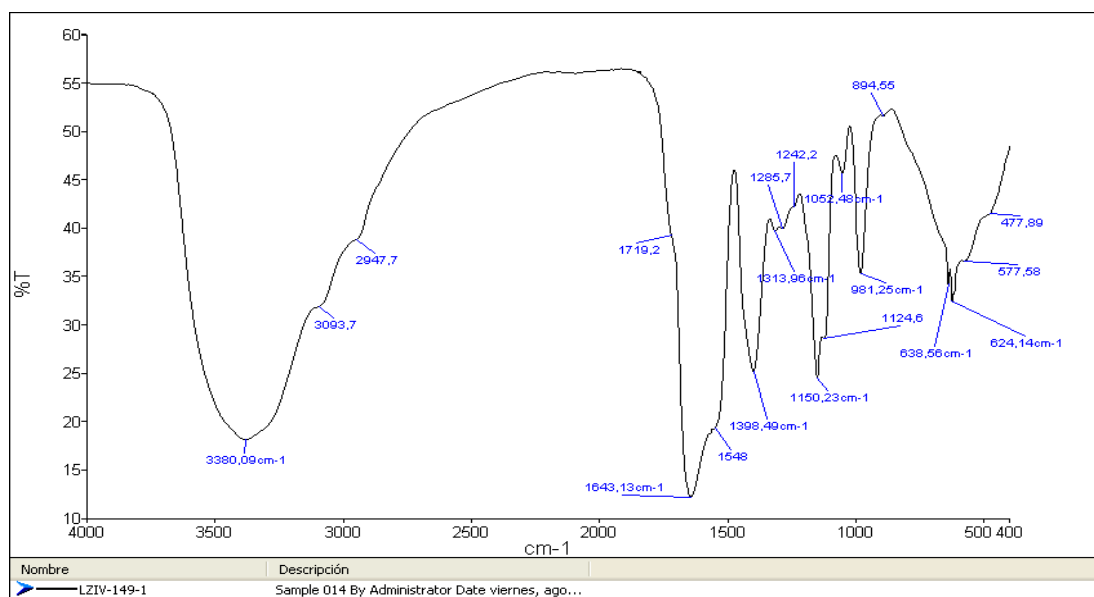
10.7.2 Espectros IR de dos de los productos sintetizados a menores concentraciones finales del polímero y del catión vanadilo (reacciones 1 y 2 – Tabla 4, (a) y (b), respectivamente)

ANEXO 10.8

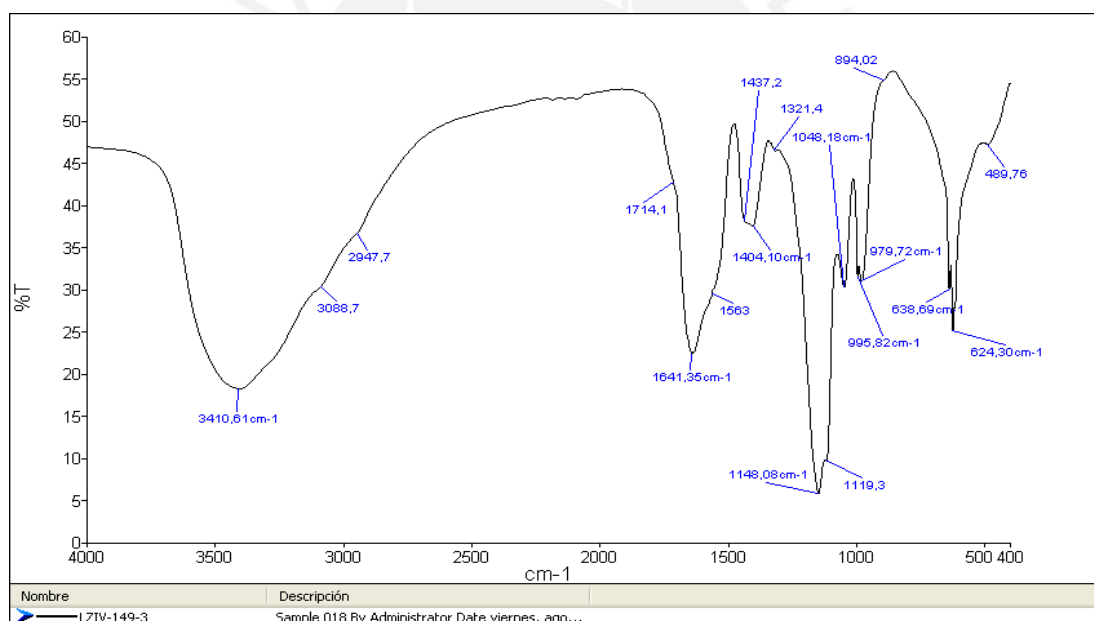
**RESULTADOS Y CARACTERIZACIÓN POR IR DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS
 POR SÍNTESIS DEL COMPLEJO A MAYOR TEMPERATURA.**

10.8.1 Resultados generales de los productos formados empleando 2 : 1 y 3 : 1 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo a 65 °C para una hora de reacción

Reacción	Mol de meros de polímero : mol de catión vanadilo	Peso del producto precipitado con acetona (mg)	Formación del sólido azulino
		color	
1	3 : 1	14,7 gris - celeste	Si
2	3 : 1	8,1 gris - celeste	Si



(a)

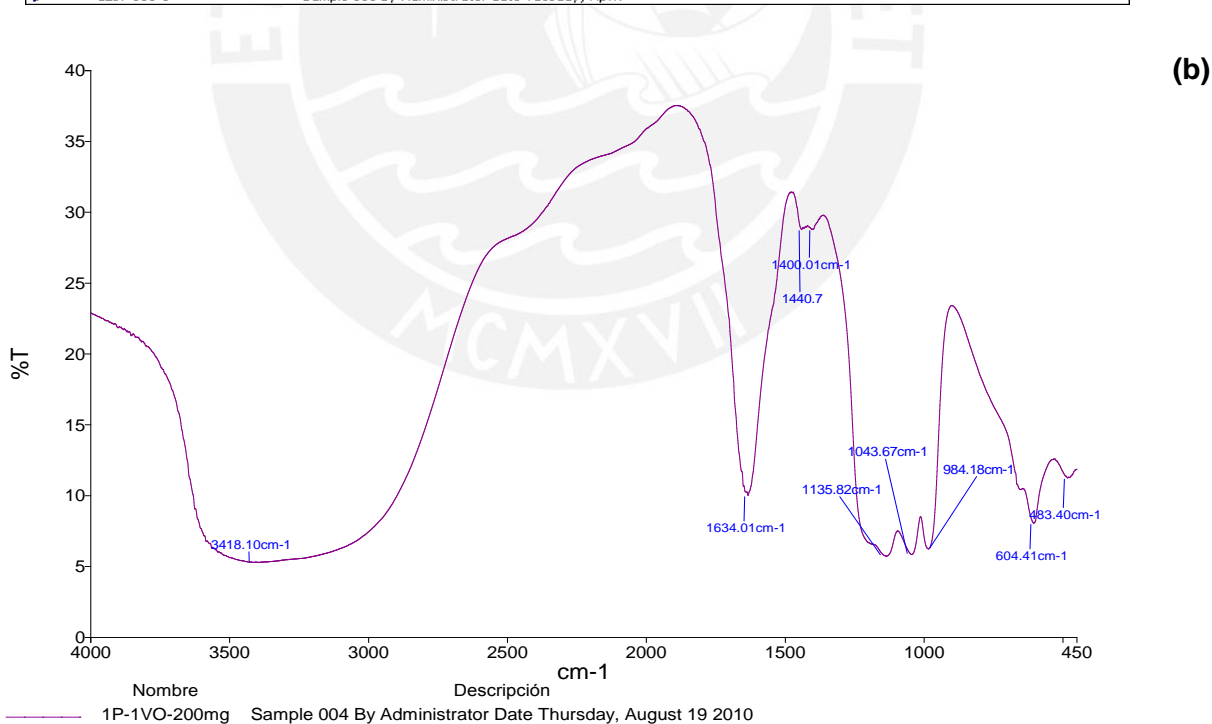
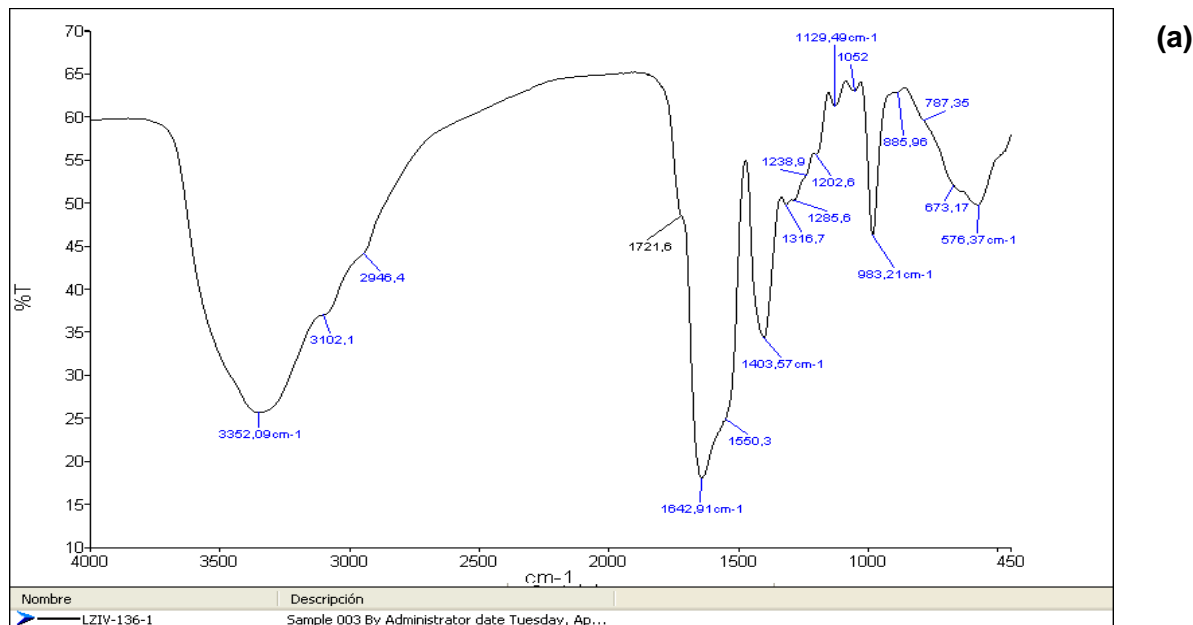


(b)

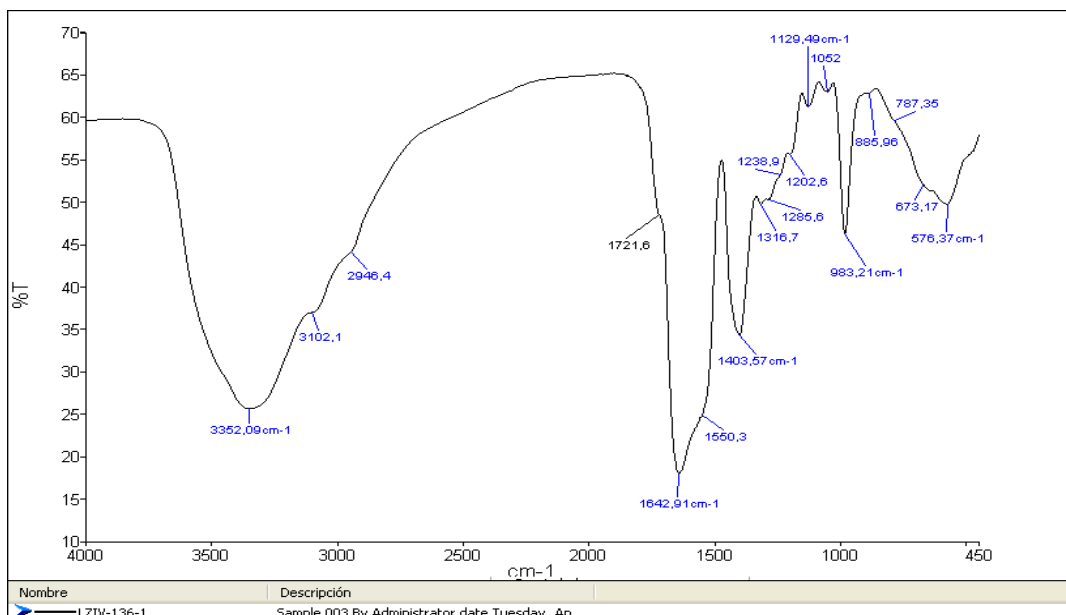
10.8.2 Comparación de los espectros IR (KBr) del producto formado empleando 2 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo (65 °C) (a) y del producto formado empleando 3 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo (65 °C) (b)

ANEXO 10.9

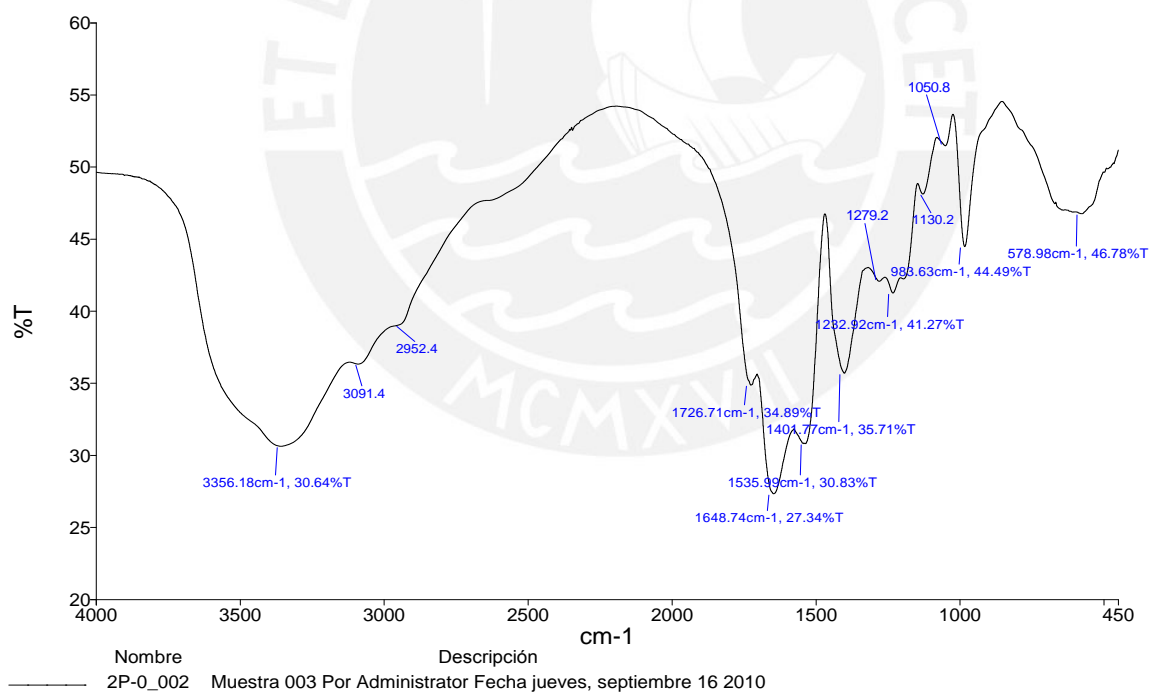
SINTESIS, CARACTERIZACIÓN Y RESULTADOS DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS
A DIFERENTES RELACIONES MOLARES DE MEROS DE POLÍMERO A VO²⁺



10.9.1 Comparación de los espectros IR (KBr) del complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) (a) y del producto formado empleando 1 mol de meros del polímero por 1 mol de catión vanadilo (b)



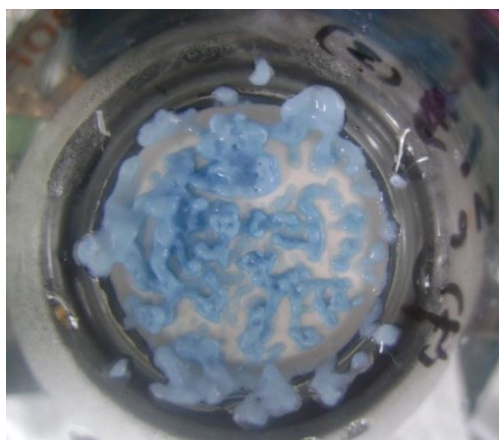
(a)



(b)

10.9.2 Comparación de los espectros IR (KBr) del complejo vanadilo- α,β -poli(DL-ácido aspártico) (a) y del producto formado empleando 4 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo (b)

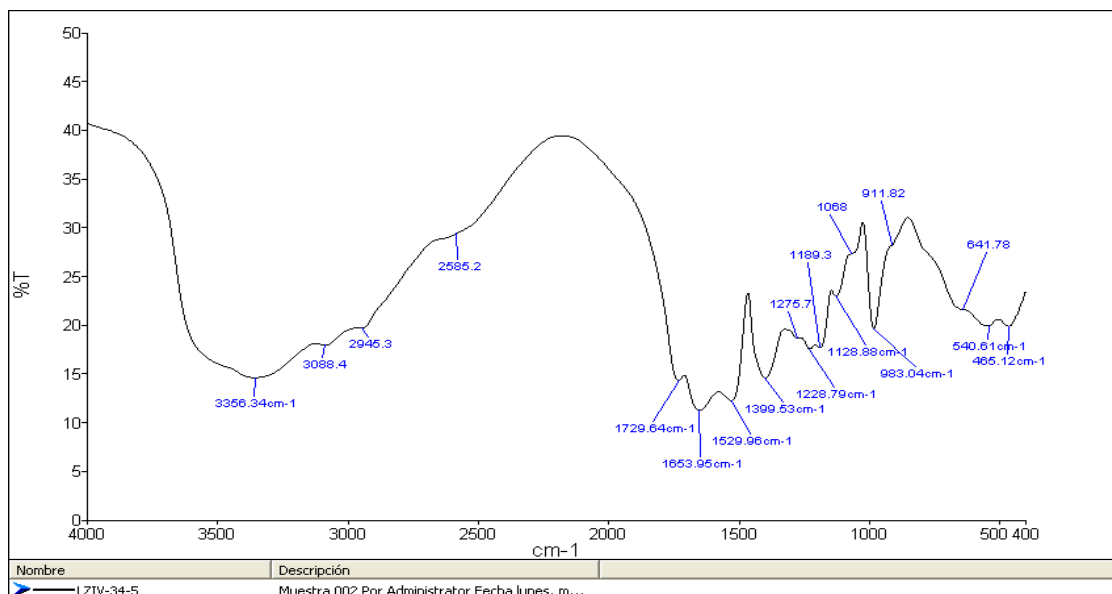
(a)



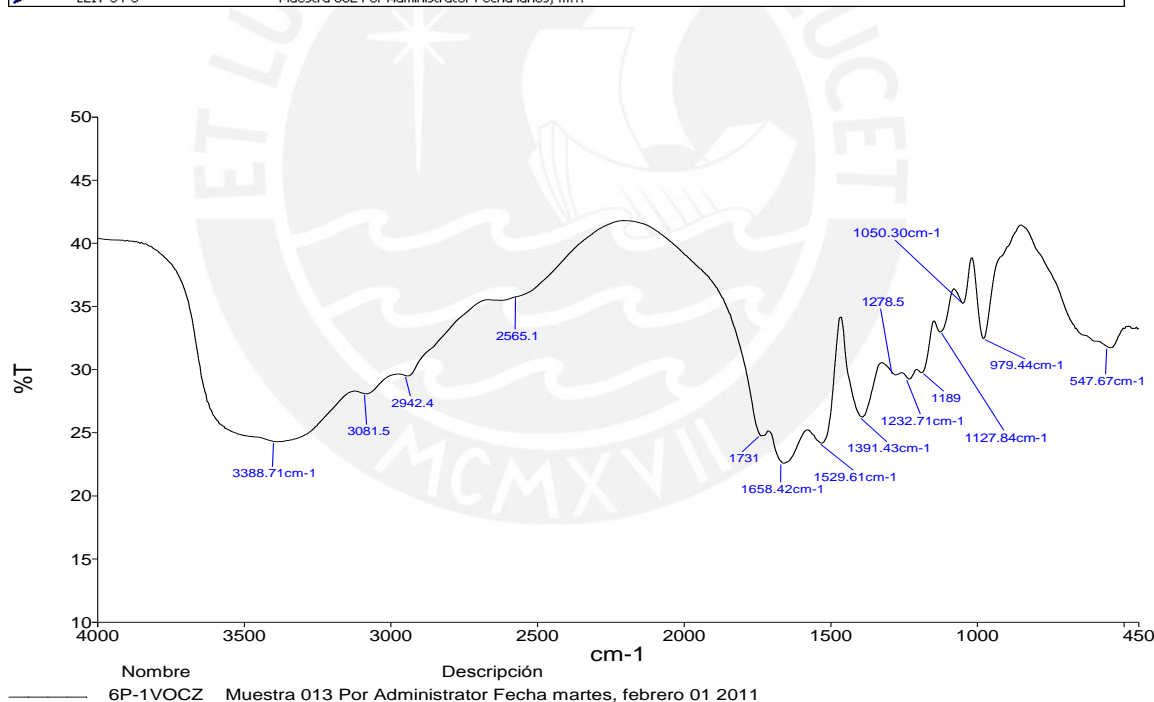
(b)



10.9.3 Productos formados empleando las relaciones 5,85 : 1 ; 6 : 1 (reacciones 6 y 7, Tabla 6) y 10 : 1 (reacciones 8 y 9, Tabla 6) de moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo en la etapa de filtración, lavado con agua y acetona helada (a) y del secado (b)



(a)



(b)

10.9.4 Comparación de los espectros IR (KBr) del sólido azulino (a) y del producto formado empleando 5,85 y 6 moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo (reacciones 3 y 4, Tabla 6) (b)

10.9.5 Resultados generales de los productos formados empleando diferentes moles de meros del polímero por mol de catión vanadilo

Reacción	Mol de meros del polímero	Peso del producto formado (mg)	Observación : Formación del sólido azulino
	mol VO ²⁺	Color	
1	1 : 1	Imposible de cuantificar azul	Si
2	4 : 1	47,20 gris-celeste	Si
3	5,85 : 1	Imposible de cuantificar azul-celeste	No
4	6 : 1	Imposible de cuantificar azul-celeste	No
5	6 : 1	Imposible de cuantificar azul-celeste	No
6	6 : 1	No se forma producto	No
7	6 : 1	No se forma producto	No
8	10 : 1	Imposible de cuantificar azul-celeste	No
9	10 : 1	Imposible de cuantificar azul-celeste	No