

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DEL PERÚ

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE UN NOVEDOSO CONJUGADO POLIASPARTAMIDA – OXOVANADIO (IV) COMO POTENCIAL METALOFÁRMACO INSULINO-MIMÉTICO

Tesis para optar el título de **LICENCIADO EN QUÍMICA**, que presenta el bachiller:

Christian Julio Murga Cotrina

ASESORA: Carla Ximena María Galli Rigo-Righi

Lima, noviembre del 2013

Resumen

La presente tesis tiene como objetivo central la síntesis y caracterización de un nuevo conjugado polímero-droga como potencial metalofármaco de uso oral en la terapia contra la *diabetes mellitus* tipo 2. En este conjugado se emplea una poliaspartamida derivatizada como vehículo polimérico para el agente activo con propiedades insulino-miméticas oxovanadio (IV).

La síntesis del mencionado conjugado requirió la preparación de un polímero que cumpla con ciertos criterios básicos, como por ejemplo, ser hidrosoluble, biodegradable y no tóxico. Así, se escogió a la poli-(alfa,beta-D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-(carboximetil)-aminopropil))), que, además de poseer las características mencionadas, incluye en su diseño una serie de particularidades, entre las que destacan la presencia de un espaciador y grupos de anclaje bidentados, que lo hacen más efectivo como agente complejante y mejoran su función protectora del centro metálico activo. Esto, unido a un peso molecular apropiado, aumenta el tiempo de permanencia del agente activo en el organismo y permite la liberación controlada del agente activo oxovanadio (IV). Todas estas características aumentarían dramáticamente su efectividad con respecto a los correspondientes complejos moleculares reportados hasta la fecha y sobre el poliaspartato de vanadilo, conjugado sintetizado en un trabajo de tesis anterior de nuestro grupo de investigación.

La síntesis del conjugado involucró, en su etapa inicial, la policondensación térmica del ácido aspártico a polisuccinimida, la cual fue sometida, en una segunda etapa, a aminólisis. Luego, la poliaspartamida obtenida se derivatizó mediante carboximetilación de sus grupos amino terminales y se consiguió mejorar su caracterización con respecto a lo reportado en la literatura. Finalmente, se logró desarrollar un método de síntesis para este novedoso conjugado, mediante numerosos ensayos en los que se variaron diferentes parámetros que incluyen las concentraciones de los reactivos y las relaciones molares entre las unidades di-carboximetiladas del polímero y el catión oxovanadio (IV). La síntesis optimizada condujo a un rendimiento promedio del 93%, lo cual significó una mejora sustancial con respecto al conjugado poliaspartato de vanadilo antes mencionado, así como un contenido de vanadio de 5,8%, que resulta apropiado para su potencial aplicación como metalofármaco antidiabético.



A Genoveva y Armando

Agradecimientos

A mis padres y a mi hermana, por su apoyo incondicional, su cariño, confianza y ejemplo.

A la M.Sc. Carla Galli, por su valiosa asesoría durante la presente tesis, su amistad y paciencia.

A todos los profesores y personal de la Sección Química y del Instituto de Corrosión y Protección, por su apoyo durante mis estudios universitarios y la realización de la presente tesis.

A la Dirección General de Investigación de la PUCP, por el financiamiento otorgado en el 2011.



Índice general

1 Marco Teórico	
1.1 Diabetes mellitus	
1.1.1 Introducción.....	1
1.1.2 Tipos de diabetes mellitus.....	1
1.1.3 Patología y tratamiento.....	3
1.2 Insulina	
1.2.1 Introducción.....	5
1.2.2 Mecanismo molecular de acción de la insulina en la regulación de la glucosa.....	6
1.3 Vanadio y su potencial como metalofármaco antidiabético	
1.3.1 Propiedades químicas y biológicas del vanadio.....	9
1.3.2 Efectos insulino-miméticos del vanadio y su mecanismo de acción molecular.....	10
1.3.3 Compuestos de vanadio en el tratamiento de diabetes.....	12
1.4 Sistemas poliméricos de transporte y liberación controlada de fármacos	
1.4.1 Introducción y características generales.....	14
1.4.2 Conjugados polímero-droga como agentes terapéuticos.....	17
2 Diseño y síntesis del conjugado poliaspartamida-vanadilo	
2.1 Diseño.....	19
2.2 Síntesis y caracterización	
2.2.1 Síntesis del polímero precursor, polisuccinimida (PSI).....	24
2.2.2 Determinación del peso molecular de la polisuccinimida por el método de viscosimetría capilar.....	25
2.2.3 Síntesis del polímero intermedio, poli- α,β -D,L-[N-(3-aminopropil)-aspartamida] (PASP-AP).....	25
2.2.4 Síntesis del polímero ligando, poli-(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]) (PASP-DC-MC).....	27

2.2.5 Síntesis del complejo, poli(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-)carboximetil)-aminopropil)-aspartamida])- oxovanadio(IV).....	27
---	----

3 Parte experimental

3.1 Equipos, materiales y reactivos

3.1.1 Equipos.....	29
3.1.2 Materiales.....	30
3.1.3 Reactivos.....	30
3.1.4 Solventes.....	31

3.2 Metodología

3.2.1 Polisuccinimida (PSI), el polímero precursor	
3.2.1.1 Síntesis.....	32
3.2.1.2 Determinación del peso molecular por el método de viscosimetría intrínseca o capilar.....	32
3.2.2 Poli- α,β -D,L-[N-(3-aminopropil)-aspartamida] (PASP-AP), el polímero intermedio	
3.2.2.1 Síntesis.....	33
3.2.2.2 Hidrólisis del PASP-AP como reacción secundaria.....	34
3.2.2.3 Carbamatación del PASP-AP como reacción secundaria.....	34
3.2.3 Poli- $(\alpha,\beta$ -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida] -co-[N-(3-)carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]) (PASP-DC-MC), el polímero ligando.....	34
3.2.4 Determinación de la cantidad de aguas de hidratación en la sal de oxovanadio (IV) por calcinación.....	35
3.2.5 Poli(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida] -co-[N-(3-)carboximetil)-aminopropil)-aspartamida])- oxovanadio(IV), el complejo.....	35

3.2.6	Determinación del contenido de vanadio en los complejos por espectrometría de emisión óptica de plasma inductivamente acoplado (ICP).....	36
4	Discusión de resultados	
4.1	Polisuccinimida (PSI), el polímero precursor	
4.1.1	Análisis de la síntesis y purificación, y discusión de resultados.....	37
4.1.2	Caracterización.....	38
4.1.3	Determinación del peso molecular por viscosimetría capilar.....	40
4.2	Poli- α,β -D,L-[N-(3-aminopropil)-aspartamida] (PASP-AP), el polímero intermedio	
4.2.1	Análisis de la síntesis y purificación.....	42
4.2.2	Caracterización.....	44
4.2.3	Discusión de resultados.....	46
4.3	Poli-(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]) (PASP-DC-MC), el vehículo polimérico	
4.3.1	Análisis de la síntesis y purificación.....	52
4.3.2	Caracterización.....	54
4.3.3	Discusión de resultados.....	57
4.4	Determinación de la cantidad equivalente de aguas de hidratación en la sal de oxovanadio (IV) por calcinación.....	62
4.5	Poli(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-carboximetil)-aminopropil)-aspartamida])-oxovanadio(IV), el complejo	
4.5.1	Análisis de la síntesis.....	63
4.5.2	Caracterización y discusión de resultados.....	71
5	Conclusiones.....	81
6	Recomendaciones.....	83
7	Bibliografía.....	84

Índice de Figuras

Figura 1.	Estimado de personas que sufren diabetes por continente en el año 2012.....	2
Figura 2.	Estructura tridimensional de un dímero de insulina.....	5
Figura 3.	Regulación de la glucosa sanguínea por parte de la insulina.....	6
Figura 4.	Representación esquemática del inicio del metabolismo regulador de la glucosa por parte de la insulina.....	7
Figura 5.	Representación esquemática de la cascada enzimática de activación de la glicógeno sintasa (GS) y conversión de glucosa a glicógeno.....	8
Figura 6.	Sitios potenciales para la acción del vanadio en la cascada de señalización de la insulina.....	11
Figura 7.	Esquema del mecanismo de pinocitosis.....	15
Figura 8.	Metalofármacos basados en ferroceno y cisplatino utilizados en el desarrollo de conjugados con actividad anticancerígena.....	17
Figura 9.	Estructura del poli(alfa,beta-D,L[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-(carboximetil)-aminopropil)-aspartamida] (PASP-DC-MC).....	21
Figura 10.	Síntesis de la polisuccinimida a partir del ácido aspártico.....	25
Figura 11.	Síntesis del PASP-AP a partir de la polisuccinimida.....	26
Figura 12.	Síntesis del PASP-DC-MC a partir del PASP-AP.....	27
Figura 13.	Espectro ^1H -RMN del PSI 2 en DMSO-d^6	39
Figura 14.	Espectro ^1H -RMN del PASP-AP 6 en D_2O	45
Figura 15.	Espectro ^1H -RMN del PASP-AP 2 en D_2O	46
Figura 16.	Espectro COSY del PASP-AP 2 en D_2O	47
Figura 17.	Comparación de la región de interés en los espectros ^1H -RMN del PASP-AP 14 normal (a), del sometido a calor (b) y del expuesto al CO_2 (c) en D_2O	48
Figura 18.	Espectro ^1H -RMN de una muestra de PASP-AP 6 sometida a corriente de CO_2	49

Figura 19.	Espectro COSY de una muestra de PASP-AP 6 sometida a corriente de CO ₂	50
Figura 20.	Comparación de la región de interés de los espectros del poliaspartato de sodio, PASP-AP 2 a 60 °C y PASP-AP 5 a 60 °C.....	51
Figura 21.	Espectro ¹ H-RMN del PASP-DC-MC 4 en D ₂ O.....	55
Figura 22.	Espectro IR del PASP-DC-MC 4 en KBr.....	56
Figura 23.	Espectro COSY del PASP-DC-MC 9 en D ₂ O.....	58
Figura 24.	Espectro HSQC del PASP-DC-MC 9 en D ₂ O.....	59
Figura 25.	Espectro IR del sólido precipitado con acetona de la síntesis D en KBr.....	73
Figura 26.	Espectro IR del precipitado inicial insoluble de la síntesis D en KBr.....	74
Figura 27.	Espectro IR del sólido precipitado con acetona de la síntesis V en KBr.....	76
Figura 28.	Desdoblamiento de los orbitales de vanadilo, para el caso del catión VO(H ₂ O) ₅ ²⁺ , de acuerdo al modelo de Ballhausen – Gray.....	78
Figura 29.	Estructura propuesta para el complejo PASP-DC-MC-VO.....	79
Figura 30.	Espectro UV-vis de un conjugado con relación molar 2:1.....	80

Índice de Tablas

Tabla 1.	Mecanismo de acción y desventajas de fármacos antidiabéticos orales orgánicos.....	4
Tabla 2.	Resultados de las síntesis del PSI.....	38
Tabla 3.	Asignaciones de las señales del ¹ H-RMN del PSI.....	40
Tabla 4.	Viscosidades intrínsecas y pesos moleculares de los diversos ensayos de síntesis de PSI.....	41
Tabla 5.	Resultados de las síntesis del PASP-AP.....	43
Tabla 6.	Asignaciones de las señales del ¹ H-RMN del PASP-AP.....	44
Tabla 7.	Resultados de las síntesis del PASP-DC-MC.....	53
Tabla 8.	Asignaciones de las señales del ¹ H-RMN del PASP-DC-MC.....	54
Tabla 9.	Cantidad de meros di-carboximetilados (X), de meros mono-carboximetilados (Y) y meros hidrolizados (Z) por cada 10 meros de PASP-DC-MC.....	61
Tabla 10.	Número de moles de agua por cada mol de sulfato de vanadilo.....	62
Tabla 11.	Primer grupo de ensayos de síntesis del complejo.....	64
Tabla 12.	Resultados de los ensayos de la Tabla 11.....	65
Tabla 13.	Segundo grupo de ensayos de síntesis de complejo.....	65
Tabla 14.	Resultados de los ensayos de la Tabla 13.....	66
Tabla 15.	Tercer grupo de ensayos de síntesis del complejo.....	66
Tabla 16.	Resultados de los ensayos de la Tabla 15.....	67
Tabla 17.	Cuarto grupo de ensayos de síntesis del complejo.....	68
Tabla 18.	Resultados de los ensayos de la Tabla 17.....	69
Tabla 19.	Quinto grupo de ensayos de síntesis del complejo.....	70
Tabla 20.	Resultados de los ensayos de la Tabla 19.....	71
Tabla 21.	Contenido de vanadio determinado por ICP.....	75

Abreviaturas

¹H-RMN	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de hidrógeno
¹³C-RMN	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de carbono
ATP	Adenosin trifosfato
COSY	Correlation spectroscopy – espectroscopía de correlación
DMF	N,N-dimetilformamida
FT-IR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
GLUT2	Transportador de glucosa tipo 2
Gly	Glicina
HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy
IRS-1	Substrato receptor insulínico tipo 1
Leu	Leucina
mARN	Ácido ribonucleico mensajero
MWCO	Molecular weight cut off
PGA	Poli(ácido glutámico)
Phe	Fenilalanina
UV-visible	Espectroscopía ultravioleta-visible

1 Marco teórico

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Introducción

La diabetes mellitus es una enfermedad asociada con el aumento de los niveles de glucosa en el plasma sanguíneo. El registro más antiguo de esta enfermedad data del 1500 a.C. en el papiro de *Ebers*, que era un compendio de las enfermedades conocidas por los egipcios. Etimológicamente, diabetes proviene del griego διαβήτης (*diabētēs*) cuyo significado es 'correr a través'. Areteo de Capadocia acuñó este término debido al síntoma más llamativo de la enfermedad: la eliminación rápida de orina por el riñón. La palabra *mellitus* (del griego *mellitus* = con sabor a miel) fue agregada en el siglo XVII por Thomas Wills debido al sabor dulce de la orina de las personas que tenían la enfermedad.¹

Desde el punto de vista clínico, el término diabetes mellitus agrupa a un conjunto de enfermedades metabólicas crónicas caracterizadas por hiperglucemia, condición producida por una absoluta o relativa deficiencia en la secreción de insulina, resistencia a la misma, o ambas.²

Esta enfermedad se ha convertido en las últimas décadas en una de las amenazas más grandes contra la salud del ser humano. El número de personas que sufren de diabetes a nivel mundial se está incrementando exponencialmente; así, mientras para el año 2012, la cifra de personas afectadas por esta enfermedad se estimó en 371 millones (Figura 1)³, se prevé que para el 2030 alcance los 552 millones de habitantes.⁴

En el Perú, se ha estimado que el número de pacientes diabéticos superó en el 2012 los dos millones de habitantes⁵ mientras que, solo entre enero y abril del presente año, se han detectado más de 85 mil nuevos casos de la enfermedad.⁶

1.1.2 Tipos de diabetes mellitus

La diabetes mellitus presenta tres variantes clínicas principales, además de otros casos menos comunes:

- diabetes mellitus tipo 1,
- diabetes mellitus tipo 2 y
- diabetes mellitus gestacional

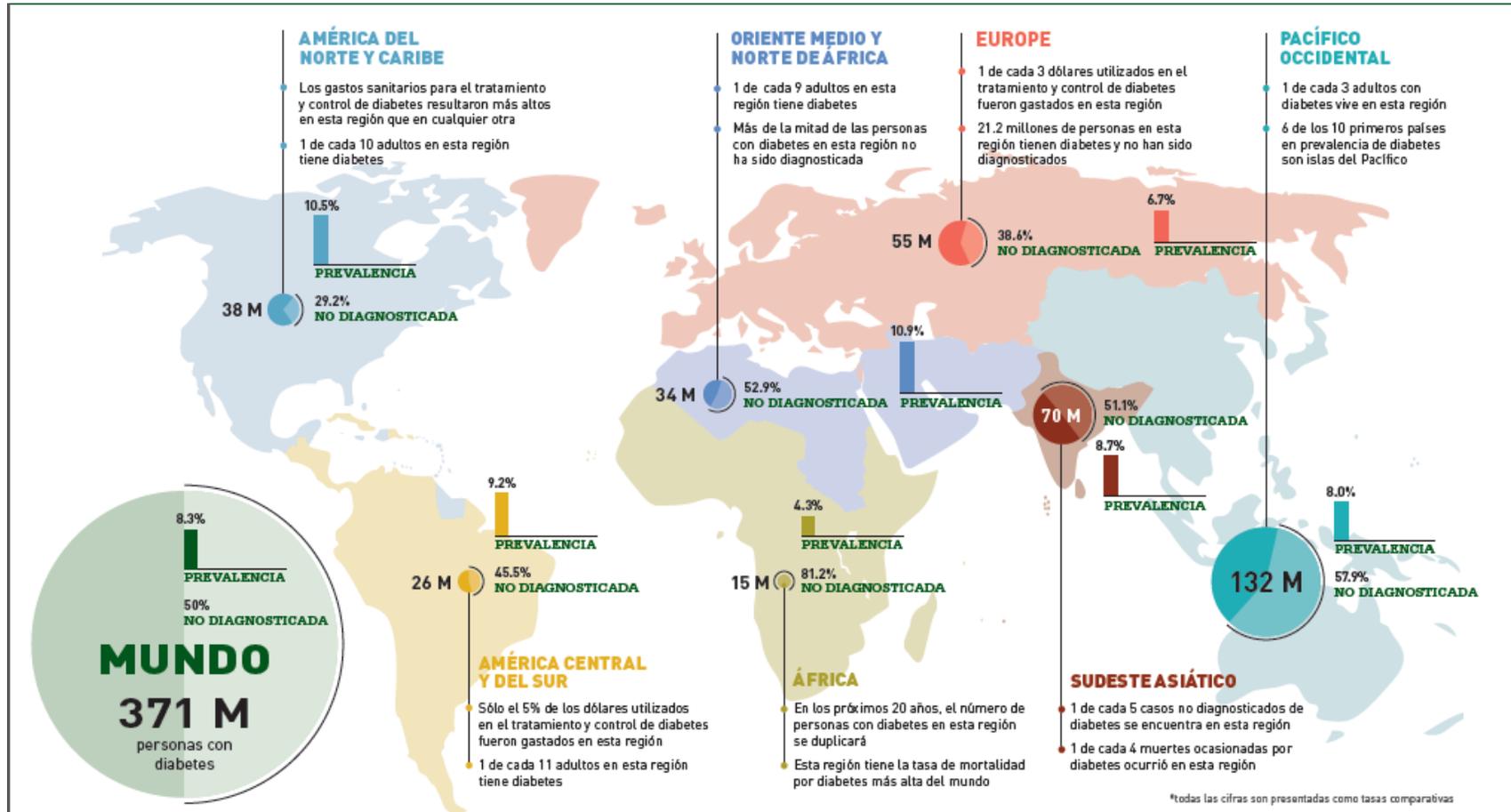


Figura 1. Estimado de personas que sufren diabetes por continente en el año 2012. Además, se muestra el porcentaje de casos no diagnosticados e información adicional por zona geográfica.³

La diabetes mellitus tipo 1 (*insulin dependent diabetes mellitus*, IDDM, diabetes mellitus dependiente de insulina) es causada por la destrucción de las células β de los islotes de Langerhans en el páncreas responsables de la síntesis y secreción de insulina, lo que ocasiona deficiencia de esta hormona reguladora de los niveles de glucosa en la sangre. Esta patología de origen genético es causada por un desorden en el sistema inmunológico del cuerpo.⁷ Afecta a personas de cualquier edad, pero se presenta generalmente en niños y jóvenes.⁸

A diferencia de la IDDM, la diabetes mellitus tipo 2 (*non insulin dependent diabetes mellitus*, NIDDM, diabetes mellitus no dependiente de insulina), que afecta al 90-95% de los pacientes diabéticos, se origina por una resistencia a la acción de la insulina acompañada de una insuficiente producción compensatoria de la misma. Además, conforme avanza la enfermedad, ocurre un deterioro progresivo de las células β , lo que resulta finalmente en una deficiencia de insulina y la necesidad de suministrarla.⁷ Este tipo de diabetes se presenta sobre todo en pacientes que sobrepasan los cuarenta años de edad y su incidencia se ha visto incrementada en la población actual debido a malos hábitos alimenticios y a la reducción de actividades físicas. Otro factor que contribuye al desarrollo de la enfermedad es la obesidad.⁸

Por último, la diabetes gestacional se manifiesta en un pequeño porcentaje de mujeres durante el embarazo, las que corren el riesgo de que esta se convierta en crónica con el tiempo. Por otra parte, los riesgos para con el bebé son que pueda nacer con un tamaño anormal, hipoglicemia e ictericia.⁸

1.1.3 Patología y tratamiento

Los síntomas que caracterizan a la diabetes mellitus son, además de la hiperglucemia, poliuria, glucosuria, polidipsia, pérdida de peso, polifagia y cetoacidosis; esta última se manifiesta solo en etapas avanzadas de la enfermedad. Pueden verse comprometidos los ojos, riñones, sistema nervioso, piel y sistema circulatorio; además, los enfermos sufren con frecuencia infecciones y una mayor incidencia de arterioesclerosis.²

Los trastornos presentes en los pacientes con diabetes comprenden alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas.⁷ Estas deficiencias metabólicas conducen a graves complicaciones micro y macrovasculares, y neurológicas como enfermedades cardiovasculares, nefropatía, neuropatía, retinopatía y amputación de miembros inferiores. Estas complicaciones son responsables de la alta tasa de mortalidad de la diabetes.

El tratamiento para los pacientes con diabetes tipo 1 consiste en inyecciones diarias de insulina. En el caso de diabetes tipo 2 resulta crucial una modificación radical del estilo de

vida que incluya una mayor cantidad de actividades físicas, además de una dieta baja en carbohidratos y azúcares. Sin embargo, generalmente se requiere además de una terapia farmacológica.⁷

En la Tabla 1 se muestran los cinco tipos de fármacos orales, todos de naturaleza orgánica, empleados actualmente para el tratamiento de la diabetes tipo 2. La desventaja principal de estas drogas es que ninguna de ellas es capaz de sustituir el efecto hipoglicemiante global de la insulina, puesto que cada una posee un efecto metabólico específico. Otras desventajas son sus serios efectos colaterales adversos y una disminución de su efectividad conforme se prolonga el tratamiento. Por las razones mencionadas, es usual recurrir a una terapia combinada e incluso, en fases más avanzadas de la enfermedad, al suministro de dosis de insulina o análogos de la misma. Por ejemplo, comúnmente se inicia el tratamiento con biguanidas, luego se las complementa con una sulfonilúrea y, si aún así no se logra un adecuado control glicémico, se recurre por último a un tercer tipo de droga (tiazolidinedionas o inhibidores de alfa-glucosidasa).⁷

Tabla 1. Mecanismo de acción y desventajas de fármacos antidiabéticos orales orgánicos.^{7,9,10}

Tipo	Mecanismo de acción	Efectos secundarios
Sulfonilúreas y glinidas	Estimulan secreción de insulina	Aumento de peso e hipoglicemia
Biguanidas	Disminuyen producción hepática de glucosa	Efectos gastrointestinales adversos, mayor producción de lactato
Tiazolidindionas	Mejoran utilización de glucosa en músculo y adipocitos	Aumento de peso, edema, retención de líquidos, anemia
Inhibidores de alfa-glucosidasa	Retardan ruptura de carbohidratos a monosacáridos en intestino, demorando absorción de glucosa	Efectos gastrointestinales adversos

1.2 Insulina

1.2.1 Introducción

La insulina, identificada a finales de 1920 por Banting y Best en páncreas de perro, fue la primera hormona descubierta. Esta proteína es sintetizada en las células β del páncreas como proinsulina, que consta de 3 dominios y es la precursora de la insulina. Posteriormente, al momento de su liberación a la sangre, la proinsulina se divide en sus dos componentes: la insulina propiamente dicha y el péptido C.¹¹

La insulina es una proteína de peso molecular relativamente bajo (5,9 kDa), que consta de 51 aminoácidos distribuidos en 2 cadenas, las cuales están unidas entre sí por tres puentes disulfuro.¹¹

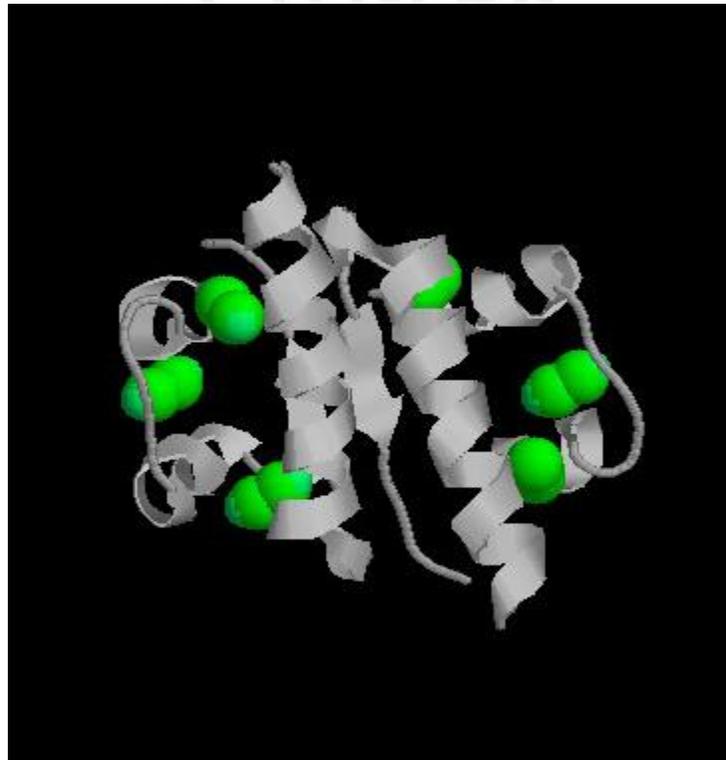


Figura 2. Estructura tridimensional de un dímero de insulina. Los tres puentes disulfuro se muestran de color verde.¹²

La insulina es secretada por el páncreas cuando la concentración de glucosa en la sangre, proveniente de la absorción gastrointestinal, se eleva. Su acción metabólica consiste en la estimulación de la toma del exceso de glucosa sanguínea por las células y su conversión a formas de almacenamiento en los tejidos periféricos: como glicógeno (en el hígado y músculos) y como triacilglicérols (en el tejido adiposo). Otra función

importante de la insulina es el control de la producción hepática de glucosa mediante la inhibición de la gluconeogénesis (síntesis de glucosa a partir de precursores más pequeños como piruvato, glicerol o lactato) y la inhibición de la lipólisis en hepatocitos y adipocitos (Figura 3).^{7,9,11}

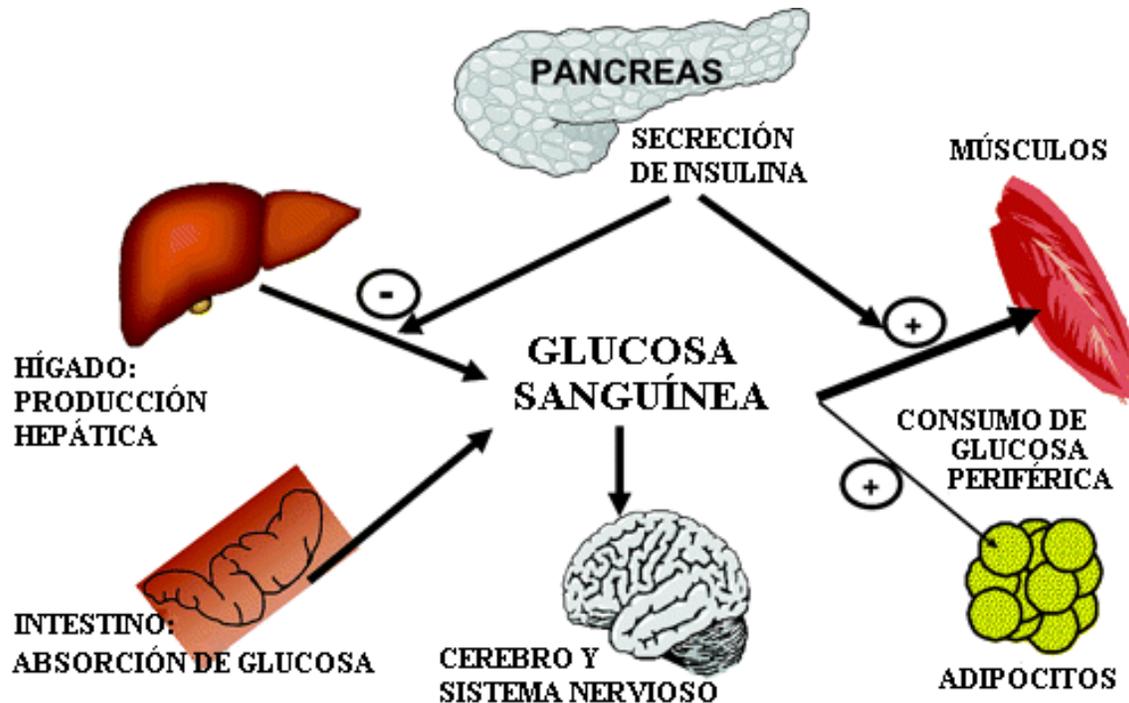


Figura 3. Regulación de la glucosa sanguínea por parte de la insulina. Traducido y adaptado de la referencia 7.

1.2.2 Mecanismo molecular de acción de la insulina en la regulación de glucosa

Un aumento en la concentración de la glucosa sanguínea, proveniente de la absorción gastrointestinal, conduce a una estimulación de la liberación de insulina por el páncreas. Los transportadores GLUT2 transportan la glucosa a las células β , en donde es convertida inmediatamente en glucosa 6-fosfato por la enzima hexoquinasa IV y entra al ciclo de glucólisis. El incremento en la velocidad del catabolismo de la glucosa aumenta la concentración de ATP, lo que ocasiona que se cierren los canales transportadores de potasio (regulados por ATP) de la membrana plasmática. La reducción en la salida de los iones potasio despolariza la membrana, por lo que se abren los canales de calcio. La entrada de los iones calcio a la célula provoca la liberación de insulina por exocitosis.¹¹

El metabolismo regulador de la glucosa se inicia en el receptor enzimático de la insulina situado en la membrana plasmática, el cual consiste de dos subunidades α ubicadas en la superficie extracelular de la misma y dos subunidades β en el lado citosólico. La cascada enzimática se desencadena con la unión de la insulina al receptor enzimático en la

subunidad α lo cual estimula la fosforilación en el residuo tirosina (Tyr) de la subunidad β con el concomitante cambio conformacional que promueve su actividad quinasa. Como consecuencia, proteínas cercanas como las pertenecientes a la familia del substrato receptor insulínico (IRS) son fosforiladas. Una vez activado, el IRS-1 actúa como puerto de proteínas con dominio SH-2 como la fosfoinositol-3-quinasa (PI3K) en su subunidad p85. La unión al IRS-1 activa a la PI3K en su subunidad p110 y estimula la migración de la enzima en cuestión hacia la membrana plasmática donde fosforila al fosfatodilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) convirtiéndolo en fosfatodilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃). La mayor concentración de PIP₃ atrae a las fosfatodilinositol-proteína dependiente quinasa-1 (PDK1) y proteína quinasa B (PKB) a la membrana plasmática, en donde esta última proteína es activada mediante fosforilación en su residuo Ser por el PDK1.^{11,13,14}

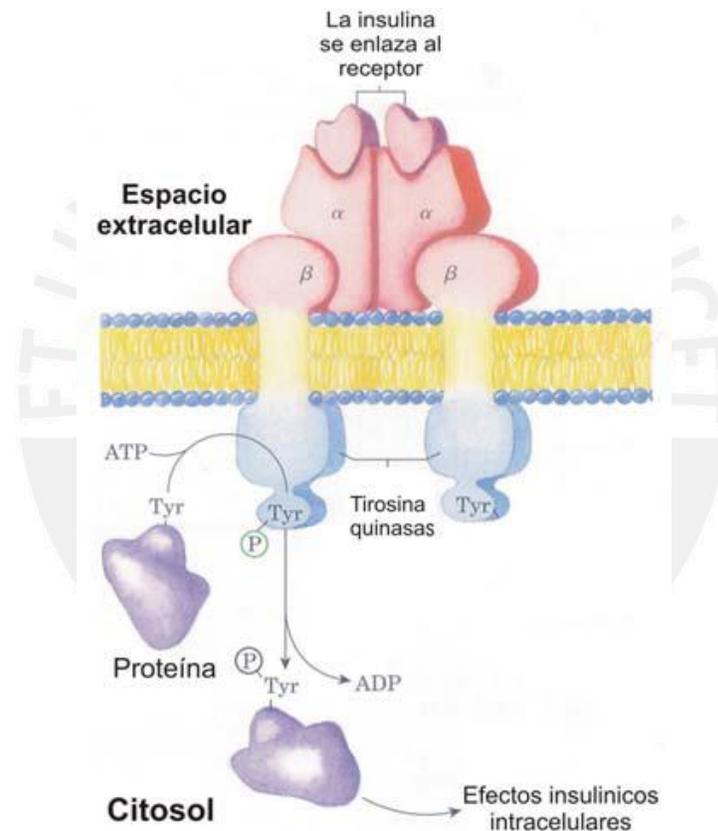


Figura 4. Representación esquemática del inicio del metabolismo regulador de la glucosa por parte de la insulina.¹¹

La PKB es la enzima responsable, dentro de la cascada de señalización de la insulina, de promover tanto la toma de glucosa por las células como su conversión a glicógeno en los tejidos periféricos. Su activación estimula, por un lado, la translocación y posterior fusión del transportador de glucosa tipo 4 (GluT4), el principal transportador de glucosa en los músculos y tejidos adiposos, con la membrana plasmática. El consiguiente aumento de la cantidad de GLUT4 en la membrana incrementa la velocidad de captación de glucosa

hasta en quince veces. Por otro lado, la PKB también juega un papel importante en la activación de la glicógeno sintasa (GS), la enzima responsable de la síntesis de glicógeno, al inactivar por fosforilación en su residuo serina (Ser) a la glicógeno sintasa 3 quinasa (GSK3). Esta última, en su forma activa (no fosforilada) inhibe a la GS. Además, la insulina activa a la otra enzima que regula la GS, la proteína fosfatasa 1 (PP1), la cual defosforila y, por lo tanto, activa a dicha sintasa.^{11,13,14,15}

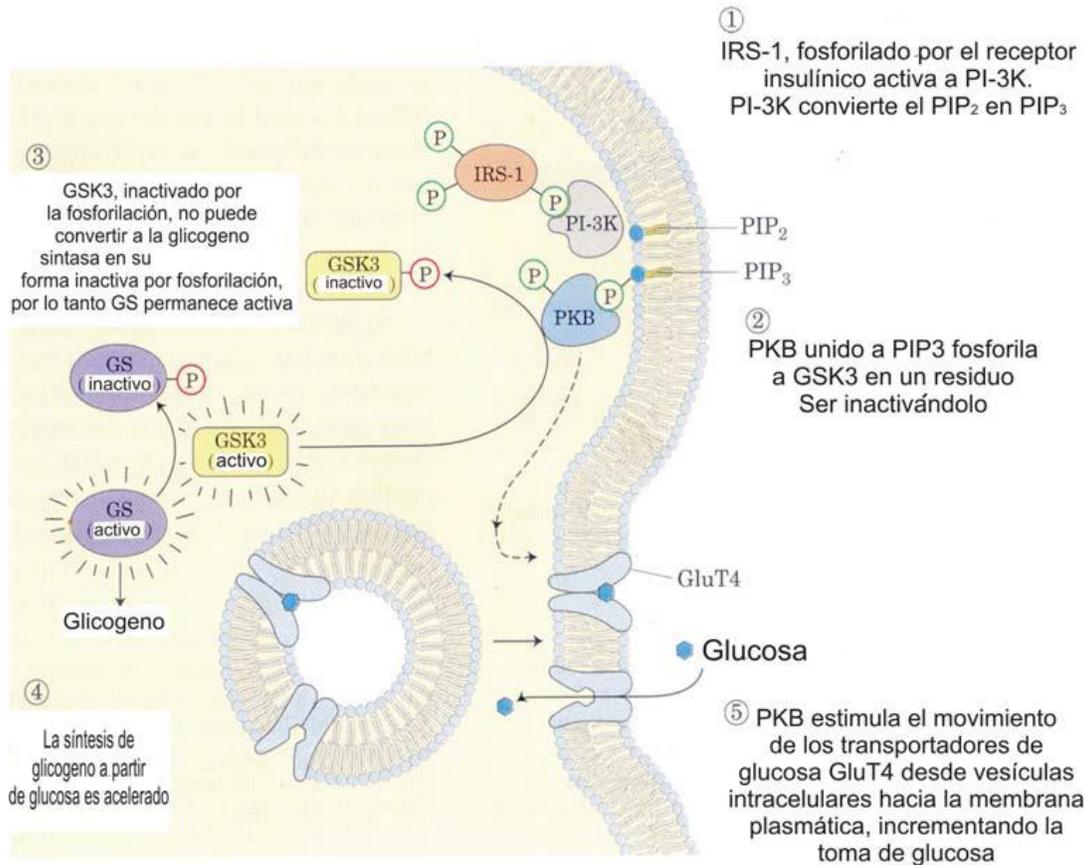


Figura 5. Representación esquemática de la cascada enzimática de activación de la glicógeno sintasa (GS) y conversión de glucosa a glicógeno.¹¹

Es importante mencionar dos efectos negativos dentro de la cascada enzimática de la insulina. Uno de ellos es la fosforilación de residuos Ser tanto en la subunidad β del receptor como en la proteína IRS, la que compite con la fosforilación de los residuos Tyr, que da inicio a la cascada enzimática. El segundo, es la rápida defosforilación del receptor enzimático y sus sustratos por una proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B).¹³

1.3 Vanadio y su potencial como metalofármaco antidiabético

1.3.1 Propiedades químicas y biológicas del vanadio

El vanadio, elemento de número atómico 23 y peso atómico 50,94 g/mol, tiene una abundancia relativa en la corteza terrestre de aproximadamente 0,2%. Este elemento presenta una química extremadamente compleja al adoptar un amplio rango de estados de oxidación, desde el -1 hasta el +5.^{16,17}

En solución acuosa, el vanadio cambia con facilidad su estado de oxidación, dados los valores relativamente pequeños de los potenciales estándar involucrados. La estabilidad de una determinada especie depende fuertemente del pH; así, mientras que a pH < 3,5 el V^{IV} se encuentra bajo la forma del catión vanadilo (VO²⁺), en soluciones muy básicas la forma predominante es el anión vanadato (VO₄³⁻).¹⁸

En complejos, el número de coordinación (NC) más común del vanadio es 6, aunque para los estados de oxidación más estables, +4 y +5, es relativamente común el NC 5. En particular, el catión VO²⁺, especie dominante del estado de oxidación +4, tiene una marcada preferencia por este número de coordinación y forma complejos con geometría de pirámide cuadrada en donde el átomo de oxígeno se encuentra en la posición apical por encima del plano ecuatorial, formando un enlace múltiple con el vanadio (un σ y dos π). Sin embargo, el enlace se representa como doble (V=O) debido a que la d_{V-O} no es lo suficientemente corta (1,57-1,68 Å).¹⁸ De encontrarse ocupada la sexta posición por una molécula de solvente, este enlace es más débil por efecto de la donación electrónica ejercida por el oxígeno en posición trans.

Bajo condiciones fisiológicas, este metal presenta principalmente los estados de oxidación +4 como el catión vanadilo y +5 como la especie H₂VO₄⁻. A través del plasma sanguíneo, el vanadio es transportado por proteínas plasmáticas que cumplen una función estabilizadora, como la apotransferrina y la albúmina, siendo la afinidad del vanadilo por la primera diez veces mayor. En el citosol, la especie predominante es el ion vanadilo, que en este medio forma complejos estables con biomoléculas más pequeñas, en particular el citrato.¹⁷

El vanadio es uno de los metales incluidos en la lista de micronutrientes considerados esenciales para el metabolismo, desarrollo y crecimiento de los mamíferos. En seres humanos, la ingesta diaria de este elemento varía entre 10-60 μ g, la concentración plasmática es de 20 nM y la cantidad total aproximada en el cuerpo se encuentra entre 100 y 200 μ g. En el año 1977, se demostró por primera vez que el vanadio tenía acción biológica cuando se describió su función inhibitoria de la ATPasa transportadora de sodio y potasio. Posteriormente se encontró que también inhibe otras ATPasas¹⁶ y que interviene en un mecanismo complementario a la regulación de la bomba de Na⁺/K⁺ en los eritrocitos. Además, el metal participa en el transporte de electrones en organelos

celulares de organismos como los tunicatos y es un biometal activo en las enzimas bromoperoxidasa y nitrogenasa presentes en algas.^{17,19} Sin embargo, el efecto biológico de vanadio que ha despertado el mayor interés por su potencial terapéutico es su acción insulino-mimética, la que será discutida en el siguiente acápite.

A pesar de su importancia en sistemas biológicos, concentraciones altas de vanadio en mamíferos están asociadas a efectos tóxicos. La toxicidad del metal varía de acuerdo al modo de administración, a la forma química en que se encuentra y también de acuerdo a la especie animal de la cual se trata. En este contexto, se ha determinado que el V^{IV} como catión vanadilo es quince veces menos tóxico que el vanadato (V^V). El principal síntoma de envenenamiento con vanadio es el sufrir problemas gastrointestinales y, aunque en raras ocasiones, de lengua verde. La acumulación de vanadio en tejidos (sobre todo óseo) es peligrosa y se requieren más estudios para evaluar adecuadamente este problema.¹⁷

1.3.2 Efectos insulino-miméticos del vanadio y su mecanismo molecular de acción

El mecanismo de la acción insulino-mimética del vanadio aun no ha sido dilucidado por completo. Se ha demostrado que, al igual que la insulina, el vanadio estimula el transporte de glucosa hacia el interior de las células, la síntesis del glicógeno a partir de glucosa-6-fosfato y la lipogénesis. Por otro lado, inhibe la producción hepática de glucosa (HGP) y la lipólisis.

El primer mecanismo propuesto y aun vigente relaciona su acción insulino-mimética con su capacidad de inhibición de las proteínas tirosina fosfatasas (PTPasas) y, en particular, de la PTP-1B, la principal PTPasa que desactiva por defosforilación al receptor de insulina e inhibe la acción de esta hormona. De este modo, el vanadio activaría indirectamente al IRS-1, lo que da inicio a la cascada de señalización de la insulina.²⁰

Por otro lado, se ha encontrado que el vanadio actúa también sobre sitios específicos dentro de la cascada. El vanadio estimula la síntesis del glicógeno mediante la activación directa de la PP1 que, como se mencionó anteriormente, es una de las dos enzimas responsables de la regulación de la glicógeno sintasa. En cuanto a la toma de glucosa desde los tejidos periféricos, el vanadio, al igual que la insulina, induce la translocación de los transportadores GLUT4 desde el citosol hacia la membrana plasmática, en este caso mediante una restauración de los niveles del mRNA GLUT4. El mecanismo exacto no es aún del todo claro y se han propuesto caminos tanto dependientes como independientes de la PI3-K.²⁰

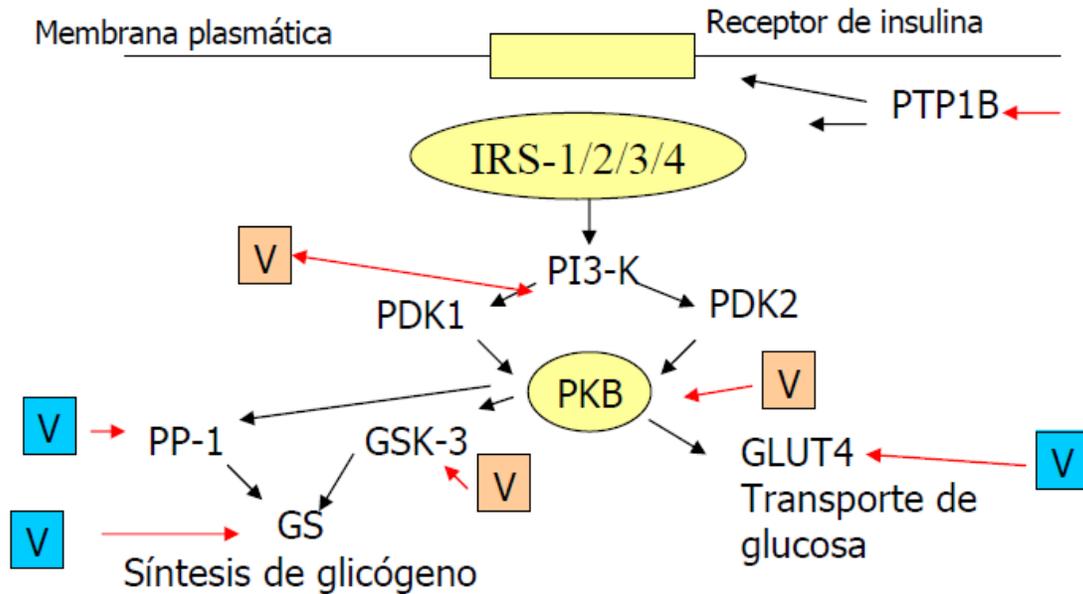


Figura 6. Sitios potenciales para la acción del vanadio en la cascada de señalización de la insulina. En azul se muestran los puntos en los que el metal actuaría directamente, mientras que en naranja aquellos donde actuaría por un mecanismo alternativo. Traducido y adaptado de la referencia 20.

En lo que se refiere a la regulación de la producción hepática de glucosa, el vanadio ejerce un efecto inhibitorio sobre la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y la glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa), las dos enzimas responsables de estimular la gluconeogénesis. Se ha demostrado mediante estudios *in vivo* que el vanadio normaliza los elevados niveles de actividad de estas enzimas en el hígado de diferentes modelos animales, aparentemente por un mecanismo complejo e independiente del sistema PI3-K / PKB. Un segundo mecanismo de inhibición de la HGP por el vanadio se da mediante la corrección de los elevados niveles de glucagón, hormona secretada por las células α del páncreas. El glucagón, al unirse con su receptor, da origen a una cascada de señalización que culmina con la activación de la PEPCK y la G-6-Pasa. Al disminuir los niveles de glucagón, el vanadio inhibe indirectamente la gluconeogénesis.²⁰

Finalmente, el vanadio también es capaz de modular el metabolismo de los lípidos, favoreciendo la lipogénesis y desactivando la lipólisis. El mecanismo de acción antilipolítica no se encuentra aún esclarecido; sin embargo, existe cierta evidencia de que, a diferencia de la insulina, el vanadio no actúa directamente sobre la cascada de señalización lipolítica. La acción antilipolítica del vanadio se debería principalmente a la inhibición de PTPasas de membrana, lo cual activaría a PTKs (proteínas tirosinas quinasa).⁹

1.3.3 Compuestos de vanadio en el tratamiento de diabetes

Existen tres clases generales de compuestos de vanadio que han mostrado actividad insulino-mimética: sales inorgánicas del metal como vanadatos o vanadilos, complejos peroxo y compuestos quelados de vanadio con ligandos orgánicos.

En lo que se considera como el primer reporte acerca de las propiedades insulino-miméticas del vanadio, Lyonnet y colaboradores observaron en 1899 que la administración de metavanadato de sodio disminuyó el nivel de glucosa en la orina en pacientes diabéticos. Luego, en la década de 1960, se observó, aunque no en todos los casos, la disminución de colesterol en el plasma sanguíneo de pacientes tratados con vanadio. Posteriormente, en 1979, se renovó el interés por el potencial antidiabético de las sales de vanadio cuando Tolman y colaboradores reportaron que el tratamiento con sales de vanadio estimula el transporte y oxidación de glucosa en adipocitos, la síntesis de glicógeno en el hígado y la inhibición de la gluconeogénesis en hepatocitos.²³

En la década de los años 80, se realizaron numerosos estudios con sulfato de vanadilo y metavanadato de sodio en pacientes con diabetes tipo 1 y 2. Se observó que la dosis diaria de insulina se redujo hasta en un 14% en pacientes de diabetes tipo 1, mientras que en el caso de los pacientes con diabetes tipo 2 se incrementó la sensibilidad hacia la insulina. Esta mejora en los pacientes duró incluso hasta dos semanas después de retirarles el tratamiento, lo que se atribuye, sobre todo, a que se produjo una buena acumulación de vanadio en el cuerpo sin alcanzar niveles de toxicidad.¹⁷

Si bien los estudios iniciales se realizaron con sales inorgánicas de vanadio, posteriormente las investigaciones se centraron en los complejos de vanadio (IV) con ligandos orgánicos al demostrarse que son más efectivos en su acción hipoglicémica, menos tóxicos y mejor tolerados por el organismo, disminuyendo así los efectos secundarios. Esto es consecuencia de un aumento de estabilidad y mayor tiempo de permanencia en el plasma, lo que mejora su bioabsorción, que ocurre por difusión pasiva a través de las membranas celulares.^{16,21,22}

El primer ensayo en humanos usando un complejo de vanadio, el bis(etilmaltolato)oxovanadio (IV), BEOV, completó en el año 2000 la fase I y en el 2008 la fase IIa. En la primera fase, se determinó la seguridad y tolerancia a una única dosis oral creciente de la droga (10-90 mg) en 40 voluntarios sanos. El estudio farmacocinético comparativo con VOSO_4 mostró que el BEOV es absorbido más rápido, que alcanza una mayor concentración plasmática máxima y presenta una biodisponibilidad tres veces mayor que la de una dosis equivalente de VOSO_4 , corroborando resultados anteriores en animales de laboratorio. No se observaron efectos adversos sobre ninguno de los individuos de la población en estudio.²³ En la fase IIa, cuyo objetivo era determinar la seguridad y eficacia de una dosis diaria de 20 mg de BEOV (3 mg de V), se administró oralmente la droga por 28 días a pacientes de diabetes tipo 2. Se observó una buena

tolerancia a la dosis de BEOV durante todo el periodo de tratamiento y, en la mayoría de pacientes, un efecto positivo en la reducción del nivel de glucosa plasmática en ayunas. Además, se observó una mejora en el test de tolerancia oral a la glucosa mientras que los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}), un índice del nivel de glucosa promedio en la sangre del paciente durante los últimos dos o tres meses, disminuyeron o se mantuvieron. En contraste, todos estos parámetros del estado diabético empeoraron en los pacientes tratados con placebo.²⁴



1.4 Sistemas poliméricos de transporte y liberación controlada de fármacos

1.4.1 Introducción y características generales

Los fármacos convencionales para el tratamiento de las diversas enfermedades, incluidos aquellos orales para la diabetes tipo 2, adolecen en mayor o menor grado de una serie de deficiencias que limitan su efectividad e introducen efectos colaterales adversos. El desarrollo de conjugados polímero-droga, una técnica que involucra la unión biorreversible del agente activo a un vehículo polimérico hidrosoluble y de diseño apropiado, constituye una opción atractiva y sumamente prometedora en la investigación avanzada de fármacos de liberación lenta y controlada.²⁵

El dramático aumento del peso molecular (M_w) del conjugado respecto a los fármacos convencionales produce un cambio radical en la farmacocinética de la droga. El componente polimérico cumple un papel protector, lo que permite que el agente terapéutico “viaje” esencialmente intacto a través del sistema circulatorio, llegue a los distintos órganos y tejidos y, gracias a su naturaleza hidrosoluble, acceda al espacio intracelular por el mecanismo activo de pinocitosis. De esta manera, el conjugado ingresa a la célula, donde libera al agente activo y este finalmente ejerce su acción.^{25,26}

Para que el sistema polimérico cumpla cabalmente su papel de transporte y protección del agente activo, debe incluir en su diseño básico ciertas características estructurales:

- una cadena principal flexible, no tóxica, biocompatible y biodegradable; y
- cadenas laterales que contengan unidades solubilizantes, ligantes y, eventualmente, sitio-específicas.

Las unidades solubilizantes son aquellas que cuentan con grupos hidrofílicos que confieren al complejo el carácter hidrosoluble necesario para permitir una rápida distribución del conjugado en el sistema circulatorio. Además, su solubilidad previene su captura y eliminación por el sistema retículo-endotelial (RES), que desecha las partículas no disueltas que ingresan a los fluidos corporales.^{27,28}

Asimismo, como se mencionó anteriormente, el carácter hidrosoluble del conjugado permitirá su ingreso a la célula por pinocitosis, mecanismo que consiste en una invaginación del polímero por la membrana celular para su posterior liberación en el interior de la misma por ruptura hidrolítica o enzimática (Figura 7). Este mecanismo es más eficiente que el de difusión pasiva, típico de compuestos moleculares, además de eludir los problemas de ionicidad y polaridad inherentes al mismo.^{25,27}

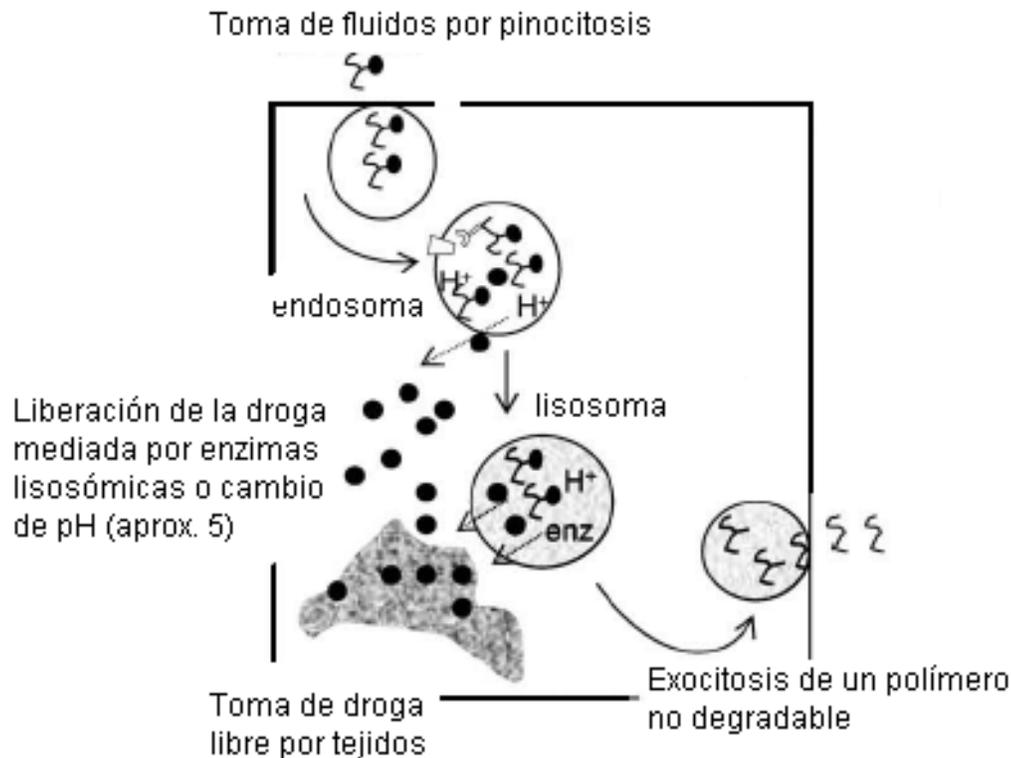


Figura 7. Esquema del mecanismo de pinocitosis. Un sustrato se une a la membrana celular y es introducido al citoplasma por invaginación de la misma. Luego, la vesícula formada se une a un lisosoma para hidrolizar o romper el sustrato ingerido. Traducido y adaptado de la referencia 29.

Por otro lado, para que una unidad cumpla función ligante, debe contener grupos funcionales apropiados para una unión biorreversible (conjugación) del tipo covalente o iónica a la droga, sea esta de naturaleza orgánica o un metal. Los enlaces que conectan el polímero con la droga deben permanecer intactos durante su tránsito a lo largo del sistema circulatorio, no deben presentar modificaciones debido al pH y solo experimentar ruptura durante el proceso de entrega del agente activo a los lisosomas en el interior de la célula. Además, estos sitios de unión no deben encontrarse impedidos estéricamente, tanto para poder anclar el sustrato como para poder liberarlo sin dificultad.²⁵

Las unidades sitio-específicas contienen entidades químicas afines a los tejidos a los que se desea direccionar preferentemente la droga. La inclusión de estas unidades en la arquitectura polimérica complica en cierta medida la síntesis de la macromolécula por lo que no son tan comúnmente utilizadas.

Por último, un aspecto importante a resaltar en la arquitectura molecular de los vehículos poliméricos es la inclusión de espaciadores, es decir, cadenas conectoras entre la cadena principal del polímero y el sitio de anclaje de fármaco. Estos espaciadores cumplen, entre otras, la función de alejar a la droga de la matriz polimérica de modo que se encuentre

más accesible estéricamente para su liberación en los lisosomas.²⁵ Los espaciadores, sin embargo, podrían presentar ciertas complicaciones si contuviesen grupos capaces de generar reacciones de condensación indeseadas (por ejemplo, grupos hidroxilo), con el consiguiente aumento de peso molecular.³⁰

En lo que respecta a la efectividad terapéutica de una droga, se busca que esta se encuentre en un rango óptimo de concentración plasmática; por encima de un límite inferior que garantice su actividad y por debajo de un límite superior que asegure su no-toxicidad.²⁵

En este sentido, el polímero cumple un papel determinante en mantener la concentración de la droga dentro del rango óptimo, pues su función protectora prolonga el tiempo de permanencia de la misma en el sistema circulatorio y aumenta su biodisponibilidad hacia los diferentes órganos y tejidos. La naturaleza polimérica del portador reduce la permeabilidad vascular gracias a su alto peso molecular, minimiza reacciones competitivas con proteínas y otras biomoléculas capaces de unirse fuertemente a la droga y la protege de una eventual degradación enzimática. La unión biorreversible al polímero permite al mismo tiempo una liberación controlada del agente activo, impidiendo así una acumulación del mismo y disminuyendo drásticamente los efectos tóxicos de la droga libre.²⁵

Por otro lado, el lograr una concentración adecuada del conjugado polímero-droga en la sangre resulta de un balance entre su recepción por los tejidos y su velocidad de remoción por una combinación de excreción renal y eliminación metabólica por el hígado y otros componentes del sistema retículo-endotelial. En este contexto, el peso molecular (Mw) del polímero y más específicamente su volumen hidrodinámico, que toma en cuenta además su forma y flexibilidad, 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 principal mecanismo de excreción del polímero del cuerpo, un criterio referencial para el diseño de vehículos poliméricos lineales es que su Mw debe estar en un rango apropiado para que su diámetro hidrodinámico sea del mismo orden de magnitud que el de los poros glomerulares de los riñones y no sea excretado demasiado rápido. Además del tamaño, la forma y flexibilidad del polímero influyen sobre la velocidad de filtración renal, así, por ejemplo, para un mismo peso molecular, los polímeros lineales poseen un tiempo de vida media en el organismo considerablemente menor que los globulares o los cíclicos, pero mayor que los tubulares.^{27,31}

Finalmente, es importante destacar la necesidad de que el polímero sea biodegradable, pues de esta manera se hará posible la eliminación gradual de los fragmentos por vía renal y se impedirá su acumulación en el organismo con los consiguientes efectos tóxicos.

1.4.2 Conjugados polímero-droga como agentes terapéuticos

Como se ha discutido ampliamente en el acápite anterior, el diseño y construcción del vehículo polimérico resulta fundamental para el éxito terapéutico de un fármaco polímero-droga. Entre los polímeros que cumplen con los requisitos estructurales y químicos necesarios, los más utilizados son las α,β -DL-poliaspartamidas, las poli(amidoaminas) y las N-(2-hidroxipropil)metacrilamidas (HPMA).²⁵

La novedosa técnica de la conjugación de agentes terapéuticos a vehículos poliméricos se ha centrado hasta el momento en el desarrollo de conjugados con actividad anticancerígena. En sus orígenes, se limitó al uso de las clásicas drogas antitumorales orgánicas usadas en quimioterapia (daunorubicina, metotrexato, doxorubicina, etc.) como componente activo, para más adelante extenderse a la conjugación de metalofármacos basados en ferroceno y cisplatino.^{25,29}

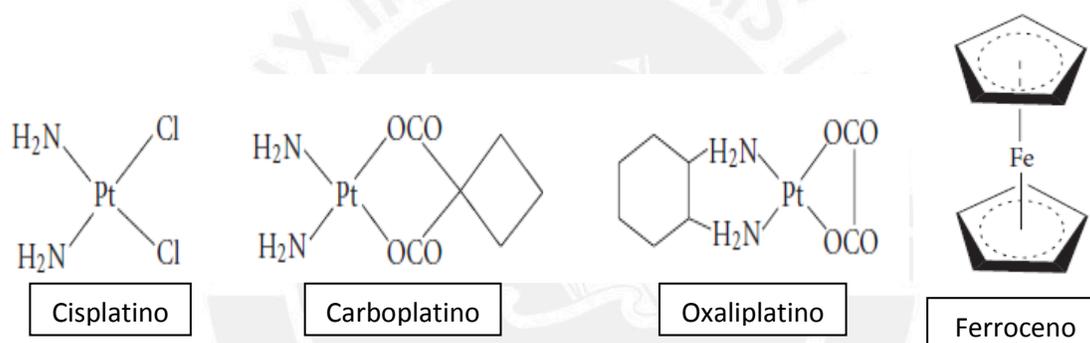


Figura 8. Metalofármacos basados en ferroceno y cisplatino utilizados en el desarrollo de conjugados con actividad anticancerígena. Traducido y adaptado de la referencia 25.

El conjugado del copolímero HPMA-Gly-Phe-Leu-Gly con doxorubicina, que alcanzó fase clínica I/II, tiene un Mw de 30 kDa y un contenido de droga de 8,5%. La dosis máxima tolerada de doxorubicina es cinco veces mayor cuando se administra como conjugado que cuando se administra como droga libre; además, no se observaron los típicos efectos adversos del fármaco no coordinado.²⁹

Los conjugados polímero-droga de segunda generación utilizan paclitaxel o camptotecinas. La baja solubilidad en agua y diversos efectos adversos de estas drogas anticancerígenas fueron superados gracias a su unión al vehículo polimérico. Se han desarrollado diversos conjugados que han alcanzado fase clínica como, por ejemplo: HPMA-paclitaxel, HPMA-camptotecinas, PEG-camptotecinas y PGA-paclitaxel. Este último, basado en una poliaspartamida como vehículo polimérico, ha logrado alcanzar la fase II/III de ensayos clínicos y constituye el primer caso de un polímero biodegradable utilizado para síntesis de conjugados; además, posee un Mw de 40 kDa, unión éster entre el polímero y la droga y un altísimo contenido del agente activo (37%).²⁹

En lo referente al uso de metalofármacos como componente activo del conjugado, los más comunes en el campo de los anticancerígenos son aquellos basados en cis-platino (II) y ferroceno. Para aquellos de cis-platino (II), se han usado dos variantes de conjugado polímero-metal. En la primera, los grupos amino necesarios para la actividad de la droga forman parte de las cadenas laterales del polímero y desplazan a los aniones cloruro del tetracloroplatinato (II) usado como fuente del metal. El resultado es una estructura que contiene al Pt ligado fuertemente al portador y la liberación del centro activo se da por ruptura de una unión covalente de un segmento de la cadena lateral por acción enzimática. En el segundo caso, por el contrario, los grupos amino forman parte del complejo que se usa como fuente del metal; la droga se une al polímero por medio de grupos carboxilato y/o hidroxilo terminales y la ruptura es más bien hidrolítica.²⁵

Los conjugados copolímero HPMA-carboplatino (II) y copolímero HPMA-oxaliplatino (II) se encuentran ya en la etapa de ensayos clínicos. El primero tiene un Mw de 25 kDa, un contenido de platino de 7% y presenta un mayor índice terapéutico que el carboplatino puro en numerosos modelos tumorales. El segundo presenta actividad terapéutica superior, en comparación con el oxaliplatino puro, en ciertos modelos de cáncer; además, este conjugado es más efectivo que el cisplatino en ciertos tumores que han desarrollado resistencia o no presentan sensibilidad al mismo.²⁹

En un trabajo reciente, Ohya y colaboradores desarrollaron un conjugado de cisplatino que incluía cadenas laterales provistas de unidades galactosa afines al tejido hepático que resultaron ser de citotoxicidad específica hacia un tipo de hepatocarcinoma. Sin embargo, la utilidad de la inclusión de unidades directivas, en general, aún es materia de discusión.³²

Con respecto a los conjugados con ferroceno, existe evidencia en el sentido de que son más efectivos y menos tóxicos que sus pares con platino; sin embargo, su uso como agentes quimioterapéuticos se encuentra aún en una fase experimental.²⁵

En el caso del desarrollo de conjugados con metalofármacos de acción antidiabética, la investigación es aún muy limitada. Recientemente, se ha propuesto un conjugado polímero-vanadilo basado en quitosano como vehículo polimérico de origen natural³³, mientras que Sakurai y colaboradores han desarrollado un conjugado con un polímero sintético, el poli(γ -glutamato)-oxovanadio (IV), el cual ha mostrado una mejorada acción insulino-mimética con respecto a la droga libre tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*.^{34,35}

2 Diseño y síntesis del conjugado poliaspartamida-vanadilo

2.1 Diseño

Como ya se mencionó en el capítulo 1, los fármacos orales de origen orgánico comercialmente disponibles para el tratamiento de la diabetes tipo 2 poseen serias limitaciones en su efecto terapéutico, así como efectos secundarios adversos. Esto ha estimulado la búsqueda de nuevas drogas orales basadas en agentes activos metálicos, particularmente compuestos de vanadio y cinc complejados con ligandos orgánicos.^{36,37,38}

En investigaciones anteriores de nuestro grupo de trabajo se han sintetizado complejos de vanadio y zinc con ligandos orgánicos del tipo cumarínico y polifenólico de potencial o demostrada actividad hipoglicemiante, con miras a lograr un efecto sinérgico entre el centro metálico y el ligando. Sin embargo, en los diversos complejos exitosamente sintetizados y caracterizados, un problema común aún no resuelto es la limitada solubilidad tanto en solventes polares como no polares, lo cual dificulta su purificación y evaluación biológica a la vez que disminuye su potencial como fármaco anti-diabético.^{39,40,41}

Si bien nuestra investigación en el campo de complejos de oxovanadio (IV) con ligandos orgánicos de bajo peso molecular continúa activa, la opción de aplicar la novedosa técnica de conjugación polímero-droga al agente metálico activo y conferir así un carácter hidrosoluble al complejo metálico resultó particularmente atractiva y motivó una ampliación de la línea de investigación en Química Bioinorgánica al campo de los ligandos poliméricos.

El ligando polimérico debe actuar como un vehículo transportador de la sustancia activa, en nuestro caso el catión vanadilo, por medio de los fluidos corporales de base acuosa, estabilizándolo y protegiéndolo de los agentes biológicos presentes en el organismo capaces de degradarlo. De esta manera, se logra aumentar 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, el portador no debe permanecer luego por mucho tiempo en el organismo, sino ser eliminado para minimizar efectos tóxicos.²⁷

En un trabajo de tesis anterior, ya culminado con éxito y sustentado, se seleccionó para complejar al agente anti-diabético oxovanadio(IV) al ligando polimérico alfa,beta-poli(D,L-ácido aspártico), un polímero pseudosintético que reúne las características de ser biodegradable, biocompatible, hidrosoluble y no tóxico, además de poseer capacidad ligante hacia centros metálicos.^{42,47}

La actual propuesta contempla la síntesis de un nuevo conjugado en el que el ligando polimérico poli(alfa,beta-D,L[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-

(carboximetil)-aminopropil)-aspartamida] (PASP-DC-MC), cuya estructura se puede apreciar en la Figura 9, es una poliaspartamida derivatizada con la finalidad de introducir un espaciador con grupos carboxílicos terminales en una disposición geométrica adecuada para una óptima complejación al oxovanadio(IV). Así, se puede obtener un conjugado poliaspartamida-vanadilo con mayor potencial para su posible desarrollo como agente antidiabético.

Las poliaspartamidas son fácilmente sintetizadas por condensación a altas temperaturas del ácido DL-aspartico en presencia de ácido fosfórico y la posterior aminólisis del intermediario polisuccinimida. Además, una adecuada selección de los amino nucleófilos permite la introducción de cadenas laterales que posean grupos funcionales terminales solubilizantes, coordinantes y, eventualmente, también directores. Estos polímeros son unos excelentes vehículos transportadores de drogas por los siguientes motivos.

- Su alta solubilidad debido a (i) la flexibilidad de la cadena principal por la libre rotación de los enlaces simples del esqueleto polimérico que conduce a un aumento de la entropía de la solución y (ii) a la presencia de cadenas laterales con grupos terminales amino terciario, hidroxilo, etc. que incrementan la posibilidad de formar enlaces de hidrógeno y/o de protonación, generando eventualmente especies catiónicas.²⁵
- La accesibilidad al sitio de anclaje de la droga que, de contar el polímero con cadenas laterales suficientemente largas que posean grupos terminales con capacidad coordinante, no se encuentra impedido estéricamente.²⁵
- Su no toxicidad debido al uso del ácido aspártico como monómero.²⁵
- La biodegradabilidad del polímero por hidrólisis en los enlaces CO-NH facilita la excreción renal de los fragmentos. Esto es de vital importancia, puesto que una cadena polimérica de gran tamaño es resistente a la excreción y su acumulación en el organismo puede generar toxicidad. La ruptura de los enlaces amido ocurre de manera lenta y controlada, además resulta mínima en los fluidos corporales (pH aprox. 7,5) y se ve favorecida en el espacio endosomal (pH aprox. 5), que es el sitio de entrega de la droga. Por último, el hecho de que se trate de una α,β -DL-poliaspartamida la hace resistente a la degradación por actividad de la α -peptidasa en el plasma sanguíneo, enzima selectiva hacia los grupos CH con conformación L y unidades α -péptido.²⁵

Por otra parte, el hecho de que el portador seleccionado sea una poliaspartamida sintética hace posible un adecuado control de su peso molecular (Mw), el cual, como se mencionó en el capítulo anterior, influye de modo crítico en los mecanismos de excreción del mismo con el consiguiente efecto sobre su farmacocinética y biodistribución. Un Mw apropiado asegura que el paso del polímero por los poros glomerulares de los riñones no sea demasiado rápido y permanezca el suficiente tiempo en el organismo para ejercer su acción terapéutica. Se ha determinado que en los polímeros lineales el tiempo de vida media en el sistema circulatorio aumenta dramáticamente a partir de los 25 kDa.¹³ Una

característica común del políácido aspártico y el nuevo ligando PASP-DC-MC, que comparten con numerosos polímeros naturales biológicamente activos, es su naturaleza polianiónica. Se ha encontrado en este tipo de polímeros cargados una relación entre el peso molecular y la toxicidad, determinándose que esta última aumenta drásticamente cuando el peso molecular supera los 50 kDa.^{26,31}

El nuevo ligando polimérico PASP-DC-MC cumple con el diseño básico de un transportador polimérico: contiene cadenas laterales con grupos carboxílicos terminales que actúan como sitios de anclaje al agente metálico activo o, por su carácter hidrofílico, como grupos solubilizantes, lo que le confiere al polímero el carácter hidrosoluble indispensable para el desarrollo de un conjugado efectivo.²⁵

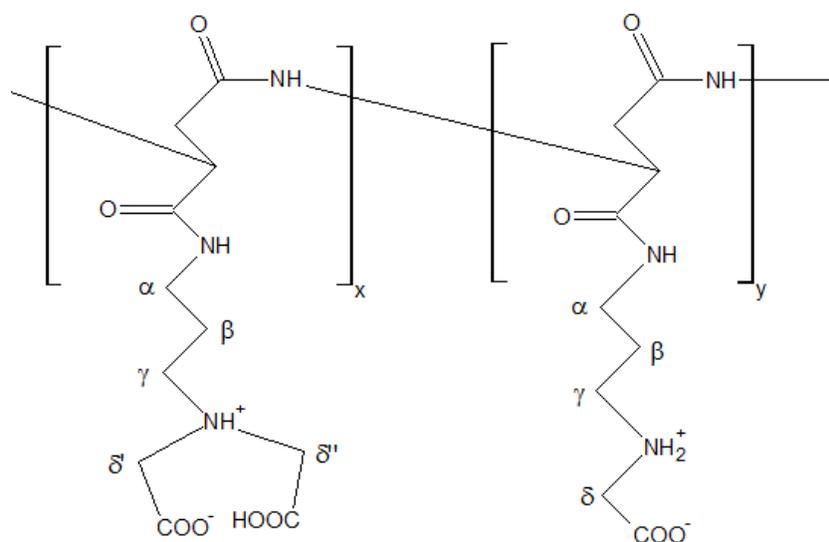


Figura 9. Estructura del poli(alfa,beta-D,L[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-(carboximetil)-aminopropil)-aspartamida] (PASP-DC-MC).

La introducción de un espaciador en el nuevo ligando polimérico constituye una mejora en el diseño del portador con respecto al políácido aspártico sintetizado en la tesis anterior. La presencia de una cadena de longitud adecuada entre el esqueleto principal y los grupos ligantes favorece, como se mencionó anteriormente, la accesibilidad estérica del agente activo al sitio de anclaje así como su posterior liberación intracelular.

En este contexto, en cuanto a la influencia de la naturaleza y longitud de un espaciador sobre la efectividad de un conjugado polímero-droga, Trouet y colaboradores realizaron estudios del grado de liberación enzimática y eficacia terapéutica de la droga anticancerígena daunorubicina unida covalentemente, vía un espaciador peptídico de longitud variable, a un portador albúmina. Ensayos *in vitro* mostraron que, mientras que en ausencia de espaciador el conjugado era completamente resistente a hidrólisis

enzimática y no ocurría liberación del agente activo, el porcentaje de liberación del mismo recién fue significativo a partir del espaciador dipéptido (8%) y aumentó dramáticamente en el tri y tetrapéptido (60-75%). Esto se atribuye al aumento de la accesibilidad estérica del sitio de anclaje a la droga en los tri y tetrapéptidos por su mayor separación de la cadena principal. Además, estos últimos presentaron una gran estabilidad en el plasma sanguíneo y la máxima eficacia quimioterapéutica *in vivo* frente a un tipo particular de leucemia.⁴³

Por otro lado, Neuse y colaboradores estudiaron la actividad citotóxica de conjugados poliaspartamida - monoaminoplatino(II) con diferentes espaciadores, oligo y polióxido de etileno, hacia un tipo de carcinoma cervical. La menor efectividad del polióxido se ha atribuido a una liberación enzimática retardada de la especie activa originada por la excesiva longitud de la cadena que obstaculizaría el acercamiento de la enzima, además de una difusión más lenta del complejo monomérico libre a través de la membrana lisosómica.⁴⁴

En lo referente a la fortaleza del enlace del agente activo al polímero, en el complejo PASP-DC-MC-oxovanadio(IV) la unión polímero-vanadilo es particularmente fuerte dada la alta afinidad del ion duro oxovanadio(IV) por ligandos con átomos donadores oxígeno y más aun si están cargados negativamente como ocurre con los grupos carboxilato.

El copolímero propuesto como vehículo polimérico presenta la ventaja de poseer ambos tipos de grupos carboxilato, mono y bidentados. Estos últimos conducen a la formación de anillos quelato relativamente pequeños, en nuestro caso de 8 miembros, los cuales son más estables a una disociación del centro metálico activo - que los que ligan vía grupos monodentados- tanto desde un punto de vista cinético como termodinámico. Este hecho se aprovecha, por ejemplo, en el diseño de conjugados con el agente antitumoral cisplatino en el que el componente polimérico coordina como en nuestro caso vía grupos carboxilato; se prefiere incorporar a la cadena principal aquellos del tipo bidentado de geometría 1,1 ó 1,2.⁴⁵

De esta manera, el PASP-DC-MC podrá cumplir a cabalidad su papel protector, permitiendo un “viaje” seguro del agente antidiabético oxovanadio (IV) a lo largo del sistema circulatorio para recién liberarlo en el espacio intracelular donde ejercerá finalmente su acción.

El conjugado polimérico a desarrollarse en este proyecto es hidrosoluble, en consecuencia ingresará a la célula por el mecanismo activo de pinocitosis, diferente de la menos eficiente difusión pasiva de los complejos monoméricos vanadilo con ligandos orgánicos. Además, la liberación del agente insulino-mimético en el interior del lisosoma ocurriría no solo por un mecanismo enzimático de ruptura del enlace péptido de la cadena lateral, sino también por un mecanismo hidrolítico, favorecido por el cambio de pH del medio.

En este sentido, si bien en una etapa inicial las investigaciones en conjugados polímero-cisplatino se orientaron al desarrollo de aquellos en que los dos ligandos amino de la entidad activa formaban parte del esqueleto polimérico y la liberación de la droga procedía por ruptura enzimática lenta de un enlace carboxamida, al reconocerse las ventajas de la estructura básica del carbo y oxaliplatino frente al cisplatino, se reorientó la estrategia de enlace de la entidad metálica activa hacia una coordinación del metal vía grupos carboxilato incorporados al polímero. Esto último conduce a una variación en la modalidad de liberación de la droga, que deviene a una ruptura hidrolítica.²⁸

Ensayos *in vitro* comparativos de conjugados polímero-platinato del tipo amino terminal versus los carboxi terminal contra dos líneas celulares de cáncer (cervical y de colon), reflejan una importante superioridad en actividad citotóxica (valores de IC₅₀) de estos últimos, lo cual se atribuye a una liberación más fácil del agente activo por el mecanismo hidrolítico. En promedio, los conjugados mostraron actividades citotóxicas similares o superiores, en un factor de 10 a 100, al cisplatino libre.²⁸

En nuestro caso particular, a diferencia de los conjugados con drogas de segunda generación basadas en cisplatino, en que el enlace coordinado del carboxilato al ion blando platino (II) es más débil y la ruptura es exclusivamente hidrolítica, cabe considerar un mecanismo paralelo de liberación por ruptura enzimática del enlace péptido presente en el espaciador.

Finalmente, el portador seleccionado PASP-DC-MC es, al igual que el alfa,beta-poli(D,L-ácido aspártico) empleado como ligando en la tesis anterior, de naturaleza pseudisintética y biodegradable.

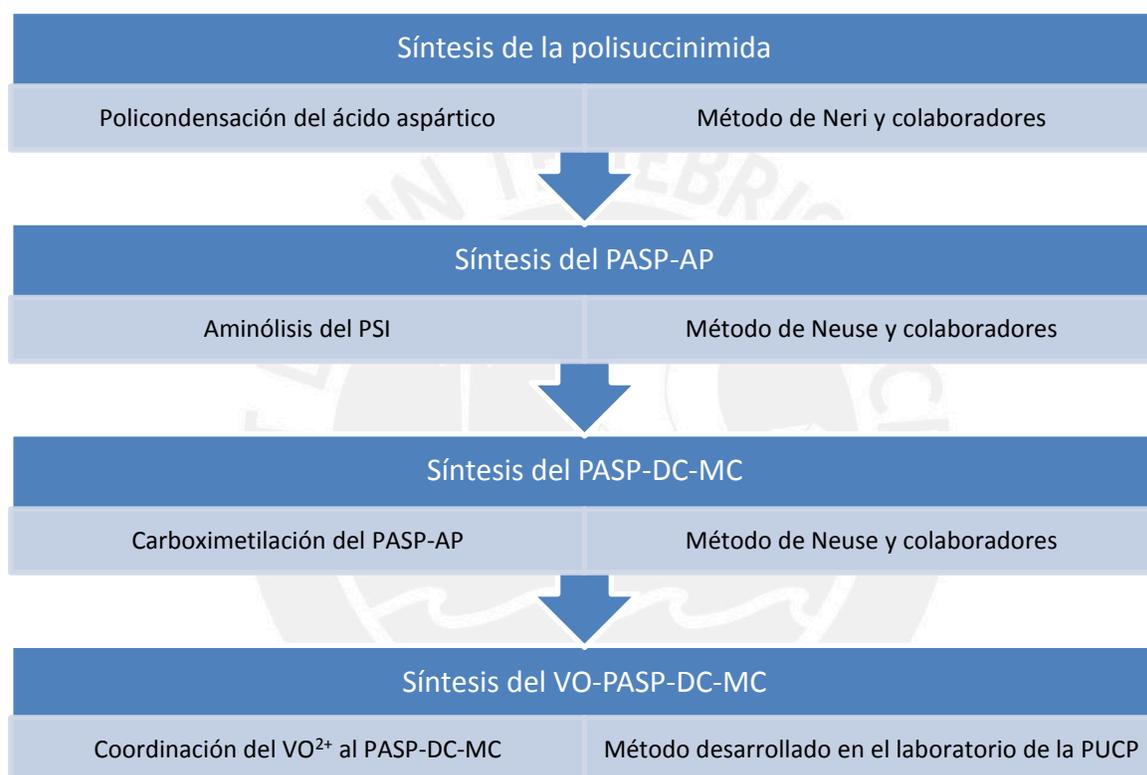
En el campo particular de la diabetes y el vanadio Sakurai y colaboradores reportan en el año 2006 el conjugado polímero-droga oxovanadio(IV)-poli(γ-ácido glutámico), VO(γ-pga). Se determinó por espectroscopía infrarroja, ultravioleta visible y resonancia de spin electrónico que, en dicho conjugado, el catión VO²⁺ se enlaza vía uno o dos grupos carboxilato de la cadena principal al polímero, completándose la coordinación pirámidal cuadrada con moléculas de agua.⁴⁶

Estudios *in vivo*, en modelos animales de diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2, demostraron que la administración oral del VO(γ-pga) casi normalizaba los niveles plasmáticos de glucosa, produciendo a la vez mejoras sustanciales en otros indicadores asociados a la enfermedad. Asimismo, por monitoreo mediante espectroscopia de espín electrónico *in vivo* de la variación en concentración de la especie activa paramagnética VO²⁺, se encontró que su administración por vía intravenosa como conjugado lo mantenía por mucho más tiempo y a concentraciones más elevadas en el aparato circulatorio que en el caso del VOSO₄, confirmando así el esperado y considerable aumento en su biodisponibilidad.^{34,35,46}

2.2 Síntesis y caracterización

El presente trabajo consistió en el diseño y síntesis de un complejo oxovanadio (IV) con el ligando polimérico poli(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]), el cual fue sintetizado por carboximetilación de la poli- α,β -D,L-[N-(3-aminopropil)-aspartamida], que a su vez es el producto de la aminólisis de polisuccinimida con 1,3-propilendiamina.

A continuación se presenta el esquema de síntesis utilizado en la presente tesis.



2.2.1 Síntesis del polímero precursor, polisuccinimida (PSI)

La síntesis de la polisuccinimida ha sido ampliamente discutida en la tesis para optar el grado de Magíster en Química “Síntesis de un nuevo vehículo polimérico alfa,beta-poli(D,L-ácido aspártico) del agente activo antidiabético oxovanadio (IV)”.⁴⁷ Se la preparará mediante el método modificado de Neri y colaboradores y será caracterizada por espectroscopía ¹H-RMN.

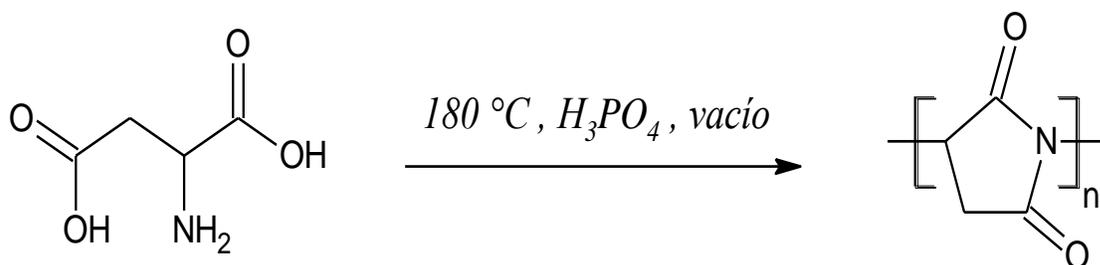


Figura 10. Síntesis de la polisuccinimida a partir del ácido aspártico.

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

El método de viscosimetría capilar se basa en la relación existente entre el peso molecular de un polímero y su viscosidad intrínseca. Esta última puede ser obtenida a partir de las medidas de viscosidad relativa de varias soluciones diluidas del polímero y depende, entre otros factores, de la forma y tamaño de la macromolécula, el solvente utilizado, la temperatura de trabajo, etc.⁴⁹

El peso molecular promedio, M_v , de un polímero se obtiene utilizando el valor de viscosidad intrínseca en la ecuación de Mark-Houwink:^{48,49}

$$[\eta] = K * Mv^a$$

En donde K y a son constantes específicas para cada combinación polímero-solvente a determinada temperatura. En el caso de la polisuccinimida, dichas constantes toman los valores de 0,0132 g/mL y 0,76, respectivamente, a 25 °C.⁴⁸

En este contexto, se debe tener en cuenta que el peso molecular obtenido por el método de viscosimetría capilar se acerca más al peso molecular promedio en peso, M_w , que a aquel promedio en número M_n ; estos últimos determinables por el método de Cromatografía de Permeación en gel (*Gel Permeation Chromatography*, GPC). Además, el valor de M_v es, en promedio, de 10 a 20% menor que el peso molecular promedio real M_w . Así, en general, se cumple que $M_w > M_v > M_n$.⁴⁹

2.2.3 Síntesis del polímero intermedio, poli- α,β -D,L-[N-(3-aminopropil)-aspartamida] (PASP-AP)

Las poliaspartamidas que poseen funciones amino primaria o secundaria separadas de la cadena principal del polímero por un espaciador pequeño y biofisionable representan una clase prometedora de vehículos poliméricos. En este tipo de macromoléculas, los grupos

amino pueden servir directamente como sitios de anclaje de drogas o se pueden derivatizar para obtener grupos carboxilo terminales, entre otros.⁵⁰

En vista de que las reacciones de anclaje de drogas o de derivatización de estos polímeros son lentas y se dan mayoritariamente en medio acuoso, es necesario que los espaciadores posean suficiente estabilidad hidrolítica para evitar el rompimiento de la cadena principal durante las síntesis posteriores. Asimismo, la estabilidad de la cadena principal es requisito para que se pueda lograr una actividad biológica satisfactoria.⁵⁰

Neuse y colaboradores sintetizaron una serie de macromoléculas basadas en cadena principal de poliaspartamida con diferentes espaciadores con funciones amino terminales, entre las cuales se encuentra la 'PASP-AP'. Se determinó que para este tipo de polímeros, aquellos con espaciadores de uno o dos carbonos sufren rompimiento hidrolítico apreciable de la cadena principal después de haber sido sometidos a 48 h de diálisis, a diferencia de las macromoléculas con espaciadores de tres o más carbonos.⁵⁰ En nuestro caso particular, se escogió un espaciador de tres carbonos y no uno más largo para evitar posibles mermas en la solubilidad del polímero derivado y del complejo.

El PASP-AP será sintetizado por el método de Neuse y colaboradores por aminólisis de la polisuccinimida en DMF. Tanto la reacción como la posterior diálisis se llevarán a cabo bajo atmósfera de nitrógeno para impedir posibles reacciones secundarias del producto con el CO₂ del ambiente.

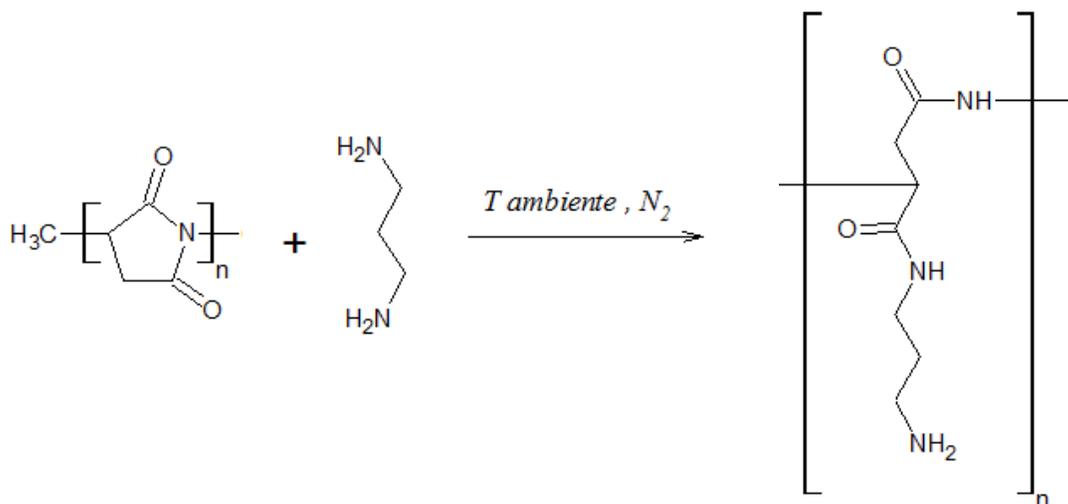


Figura 11. Síntesis del PASP-AP a partir de la polisuccinimida.

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

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

Como se ha mencionado anteriormente, las poliaspartamidas pueden ser derivatizadas para otorgar al polímero grupos funcionales con capacidad ligante. En la presente tesis se utilizará el método de Neuse y colaboradores⁵¹ para carboximetilar al PASP-AP, con lo cual se obtendrán meros di-carboximetilados, cuya función será ligante, y meros mono-carboximetilados, con función solubilizante. En la reacción de carboximetilación, llevada a cabo en medio acuoso, el pH deberá mantenerse entre 8 y 9 y al término de la misma se acidificará hasta pH 1 para protonar los grupos carboxilato y obtener el polímero. Finalmente, el PASP-DC-MC será dializado para purificarlo y posteriormente liofilizado para obtener el producto final.

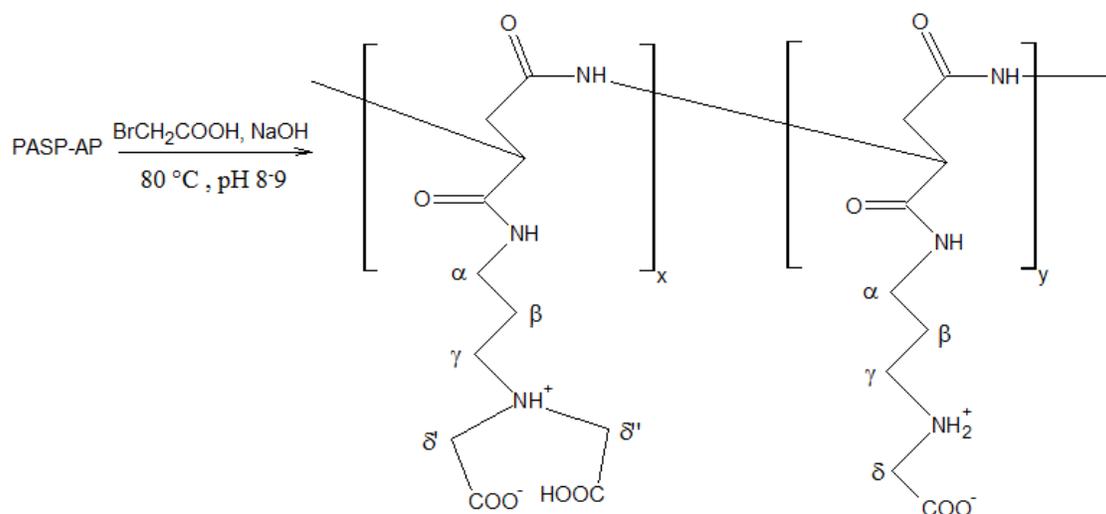


Figura 12. Síntesis del PASP-DC-MC a partir del PASP-AP.

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

2.2.5 Síntesis del complejo, poli(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-)carboximetil)-aminopropil)-aspartamida])-oxovanadio(IV)

La complejación del vehículo polimérico PASP-DC-MC se realizará por reacción de metátesis con la sal $\text{VOSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ en medio acuoso. Se tomará como base el trabajo realizado en la tesis relacionada antes mencionada⁴⁷ y se buscará mejorar el bajo rendimiento obtenido en la misma mediante variaciones en la relación molar entre meros di-carboximetilados y el catión vanadilo, así como en las concentraciones iniciales y finales de ambos reactivos.

Se partirá de la premisa de que la coordinación del catión vanadilo al polímero ocurrirá mayoritariamente mediante los meros di-carboximetilados, puesto que estos formarían un anillo quelato de ocho miembros, más estable que aquel formado si ligasen los meros mono-carboximetilados. Estos últimos cumplirían más bien la función de grupos solubilizantes y otorgarían el carácter hidrosoluble necesario para que el complejo cuente con potencial como agente antidiabético.

El complejo PASP-DC-MC-oxovanadio (IV) será caracterizado por espectroscopía FT-IR y UV-visible, mientras que la determinación del contenido de vanadio será realizada mediante espectroscopía de plasma inductivamente acoplado (ICP), tomando como referencia los procedimientos de Sakurai y colaboradores.⁴⁶



3 Parte experimental

3.1 Equipos, materiales y reactivos

3.3.1 Equipos

Los espectros infrarrojos fueron medidos en un espectrofotómetro FTIR-Perkin Elmer 1600.

Los espectros de Resonancia magnética nuclear fueron medidos en un espectrómetro Bruker de 300 MHz, modelo UltraShield™.

Los espectros ultravioleta visible fueron medidos en un espectrofotómetro UV-visible Agilent 8453.

La determinación del contenido de vanadio se realizó en un espectrómetro de Emisión Óptica de Plasma Inductivamente Acoplado (ICP) OPTIMA 3000 DV Perkin Elmer.

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

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

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

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

La regulación de la temperatura durante las mediciones de peso molecular por viscosimetría capilar se efectuó mediante un baño termostizador Julabo ED-5.

Los ensayos de calcinación para la determinación del contenido de agua de hidratación del sulfato de oxovanadio (IV) se realizaron en una mufla no electrónica.

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

3.1.2 Materiales

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

La diálisis de los ligandos precursor PASP-AP y final PASP-DC-MC se realizó a través de membranas de Spectrum Laboratories Inc., Spectra/Por[®] de poro 4 de 12000-14000 MWCO.

La atmósfera inerte necesaria para las síntesis, disoluciones y diálisis de los tres polímeros se consiguió con gas nitrógeno (UHP) de Praxair (El Callao, Perú).

El congelamiento de las soluciones de PASP-AP y PASP-DC-MC para la liofilización se realizó con nitrógeno líquido de AGA (El Callao, Perú).

El secado de la propilendiamina y el DMF para la síntesis del PASP-AP se realizó con tamices moleculares de 4 Å.

3.1.3 Reactivos

De J.T. Baker:

- Ácido fosfórico al 85%

De SigmaAldrich:

- D,L-ácido aspártico al 99%,
- Sulfato de vanadilo hidratado al 97%,
- Ácido bromoacético al 97%,
- 1,3-propilendiamina al 99% y
- Cloruro de litio al 99%

De Merck:

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

3.1.4 Solventes

De J. T. Baker:

- N,N-dimetilformamida p.a.,
- Acetona p.a.,
- n-propanol p.a. y
- Etanol p.a.

De Merck:

- Dietil éter p.a.

De Riedel-de Haën:

- 1,4-dioxano p.a.



3.2 Metodología

3.2.1 Polisuccinimida (PSI), el polímero precursor

3.2.1.1 Síntesis

En un balón de 500 mL integrado al equipo de policondensación, y previamente calentado a 170-200 °C, se colocan 10,0 g (75,2 mmol) del monómero D,L-ácido aspártico y 5,4 g (55,0 mmol) de ácido fosfórico al 85%. Se calienta la mezcla durante cinco minutos para luego aplicar vacío. Se deja reaccionar por tres horas, durante las cuales el producto, que en la etapa inicial de la reacción presenta una consistencia muy viscosa que hace imposible realizar la agitación, va adquiriendo progresivamente un aspecto vítreo. Al cabo de este tiempo, se observa que el tubo de conexión del equipo de policondensación está completamente seco, lo que indica que la reacción se ha completado. A continuación, se añade al contenido del balón en caliente 100 mL de DMF bajo atmósfera de N₂. Se deja en agitación durante 1-2 días hasta lograr disolución completa del sólido. Luego, se filtra la solución y se vierte gota a gota a un vaso que contiene 500 mL de H₂O con el fin de precipitar el polímero. El precipitado obtenido se filtra y lava exhaustivamente con agua hasta eliminar todo resto de H₃PO₄ (pH neutro). A continuación, se lava con 1.5 L adicionales de H₂O, de modo que se asegure la eliminación total de los restos de solvente DMF. El sólido obtenido se seca en una estufa a 60 °C y luego, en búsqueda de una mayor pureza del producto, se disuelve por segunda vez en 100 mL de DMF para proceder, previo filtrado, a una segunda precipitación del polímero en 500 mL de agua. Este paso es seguido de la correspondiente filtración y lavado con al menos 2,0 L de H₂O. Finalmente, el sólido de color *beige* se seca en una estufa a 110 °C por tres días. Rendimiento promedio: 82%.

Solubilidad: el producto es soluble en DMF y DMSO e insoluble en H₂O a temperatura ambiente.

¹H-RMN (DMSO-d⁶) δ: 2,73 ppm (1H, CH₂) ; 3,21 ppm (1H, CH₂); 5,26 ppm (1H, CH)

3.2.1.2 Determinación del peso molecular por el método de viscosimetría intrínseca o capilar

Se preparan 500 mL de una solución de LiCl 0,1 M en DMF. Luego, se preparan 25 mL de una solución al 1% de PSI utilizando como solvente la solución previamente mencionada.

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

- Se introduce el viscosímetro de Ubbelohde en la chaqueta con agua a 25 °C y se coloca en él la solución de LiCl 0,1 M en DMF. Se deja reposar 10 minutos.
- Se determina el tiempo de flujo de dicha solución.
- Se retira la solución de LiCl del viscosímetro y se introduce, previo enjuague con la misma, la solución de PSI. Se deja reposar 10 minutos y a continuación se determina el tiempo de flujo.
- A partir de la solución de PSI al 1% se prepara 25 mL de una solución al 0,8% de PSI y se repite el procedimiento descrito para obtener el tiempo de flujo.
- De manera análoga, se preparan soluciones de PSI al 0,6%, 0,4% y 0,2% y se les toma el tiempo de flujo.

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

$$\eta_{red} = \frac{t - t_0}{c * t_0}$$

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

Con los 5 valores de η_{red} obtenidos, se grafica η_{red} vs concentración. Se extrapolan las concentraciones a cero y del intercepto de la recta con el eje Y se obtiene el valor de la viscosidad intrínseca $[\eta]$, el cual se introduce en la ecuación de Mark-Howink $[\eta] = 1,32 \times 10^{-2} M_v^{0,76}$ para el PSI y, despejando M_v , se obtiene el valor del peso molecular.

3.2.2 Poli- α,β -D,L-[N-(3-aminopropil)-aspartamida] (PASP-AP), el polímero intermedio

3.2.2.1 Síntesis

En un balón de tres bocas y de 100 mL provisto de un embudo de adición con compensación de presión, se introduce, previo cuidadoso purgado con N_2 y bajo atmósfera del mismo gas, una solución de 16,7 mL (200 mmol) de propilendiamina seca en 50 mL de DMF seco. Se burbujea dicha solución con N_2 durante 5 minutos. Por otro lado, se coloca en el embudo de adición bajo atmósfera de N_2 una solución, previamente burbujeada con N_2 , de 1,94 g (20 mmol de mero) de PSI en 20 mL de DMF. A continuación, se enfría a 0 °C la solución de propilendiamina y se le añade gota a gota la solución de PSI en el lapso de 20-30 minutos. Una vez acabada la adición, se deja reaccionar por 15 minutos a 0 °C y luego durante 5 h a temperatura ambiente, manteniendo una agitación constante. Al cabo de este tiempo, se vierte la mezcla de reacción en 180 mL de una mezcla 1:1 de n-propanol/éter etílico y el producto precipitado

se centrifuga por 2 min a $30-35 \times 10^2$ rpm. Luego, se decanta la mezcla de solventes de cada tubo de centrifuga y se lava cada porción del precipitado con la mezcla de solventes utilizada previamente para centrifugar nuevamente. El proceso de lavado se repite tres veces. Finalmente, se retira el sólido de cada tubo y se disuelve inmediatamente en un volumen total de 100 mL de agua saturada con N_2 . A continuación se diáliza con membranas de poro 4 de 12000-14000 MWCO, previamente humedecidas exterior e interiormente con agua destilada, por aproximadamente 40 h en agua saturada con N_2 . Es conveniente no llenarlas demasiado puesto que se corre el riesgo de que se rompan durante el proceso. Durante las 40 h que dura la diálisis se hacen por lo menos dos cambios de agua de diálisis. Finalmente, la solución dializada se congela con N_2 líquido y se coloca en el liofilizador por 4-5 días. Rendimiento promedio: 53%.

1H -RMN (D_2O) δ : 1,53 ppm (2H, β - CH_2); 2,53 ppm (2H, γ - CH_2) 2,62-2,65 ppm (2H, Asp- CH_2); 3,09-3,10 ppm (2H, α - CH_2); 4,50 ppm (1H, Asp-CH)

3.2.2.2 Hidrólisis del PASP-AP como reacción secundaria

En un balón de dos bocas que contiene 30 mL de agua destilada burbujeada con N_2 se introduce, bajo atmósfera del mismo gas, 30 mg de PASP-AP. Se burbujea la solución resultante durante 5 minutos con dicho gas, para luego sellar el balón y, en agitación constante, calentarlo a $80^\circ C$ por tres horas. Al finalizar este tiempo, se congela la solución con N_2 líquido y se coloca en el liofilizador por 4-5 días.

3.2.2.3 Carbamatación del PASP-AP como reacción secundaria

En un balón de dos bocas que contiene 30 mL de agua destilada se introduce 30 mg de PASP-AP. Se burbujea la solución con CO_2 generado in situ por dos horas. Al finalizar el tiempo, se congela la solución con N_2 líquido y se coloca en el liofilizador por 4-5 días.

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

En un balón de 25 mL de dos bocas equipado con un refrigerante de reflujo se coloca una solución de 342 mg de poliaspartamida (2 mmol de mero) en 3 mL de agua. Paralelamente, se prepara una solución de 1,11 g de ácido bromoacético (8 mmol) y 480 mg de NaOH (12 mmol) en 2 mL de agua. Ambas soluciones se burbujean con N_2 y la del bromoacetato de sodio se añade a la primera a contracorriente del gas bajo agitación constante. Se deja reaccionar por 1 h a temperatura ambiente y luego se aumenta a $80-85^\circ C$ por 24 h. Además, se controla el pH de la mezcla de reacción cada 30 min para

mantenerlo entre 8-9 y, de ser necesario, se ajusta con soluciones de NaOH o HCl según convenga. Al cabo de 24 h, se deja enfriar a temperatura ambiente y luego se acidifica la mezcla de reacción con HCl 6M hasta pH 0-1 y se precipita la solución resultante en 100 mL de una mezcla 1:1 de acetona/alcohol etílico. El precipitado se filtra por succión e inmediatamente se disuelve en 50 mL de agua saturada con N₂ para su posterior diálisis durante 48 h. Durante dicho período, se cambia el agua de diálisis (saturada con N₂) cada 3 h durante el día. Finalmente, la solución dializada se congela con N₂ líquido y se coloca en el liofilizador por 4-5 días. Rendimiento: 64%.

¹H-RMN (D₂O) δ: 1,82 ppm (2H, β-CH₂); 2,66-2,73 ppm (2H, Asp-CH₂); 3,17 ppm (4H, α-CH₂, γ-CH₂); 3,79 ppm (δ-CH₂); 4,52 ppm (1H, Asp-CH)

IR (KBr): 1714 cm⁻¹ (ν_{C=O} COOH); 1640 cm⁻¹ (ν_{C=O} de la amida I y ν_{as} COO⁻); 1543 cm⁻¹ (δ_{N-H} de la amida II); 1402 cm⁻¹ (ν_s COO⁻); 1365 cm⁻¹ (δ_{O-H} COOH)

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

- Se colocan tres muestras de aproximadamente 80 mg de sulfato de vanadilo (VOSO₄.xH₂O) en crisoles previamente pesados y se llevan a calentar en la mufla.
- Se aumenta la temperatura de la mufla de 25 a 200 °C y se mantiene a esta temperatura durante veinte minutos.
- Se aumenta la temperatura de 200 a 400 °C y se mantiene a esta temperatura durante media hora.
- Se aumenta la temperatura de 400 a 600 °C y se mantiene a esta temperatura durante media hora.
- Se aumenta la temperatura de 600 a 800 °C.
- Se mantienen los crisoles a 800 °C por cuatro horas, luego de las cuales se los deja enfriar a 550 °C.
- Luego, se retiran los crisoles a 550 °C y se los deja reposar en un desecador durante la noche.
- Finalmente, se pesan los crisoles y de acuerdo a la masa del residuo de pentóxido de vanadio (V₂O₅) se determina el contenido de vanadio en la muestra.

3.2.5 Poli(α,β-D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-carboximetil)-aminopropil)-aspartamida])-oxovanadio(IV), el complejo

A una solución acuosa de PASP-DC-MC se le agrega lentamente, gota a gota, una solución de VOSO₄.3H₂O. Se usan concentraciones predeterminadas de ambas soluciones dentro de un rango establecido experimentalmente en cada caso. Al día

siguiente, se separa el precipitado eventualmente formado, por filtración al vacío y se vierte la mezcla de reacción a un vaso que contiene acetona con el fin de precipitar el complejo. La relación entre los volúmenes de acetona y la mezcla de reacción varió entre 12:1 y 8:1, dependiendo de lo que empíricamente se determinara necesario para lograr una precipitación completa del complejo en cada caso particular. Finalmente, se separa el complejo producto precipitado por centrifugación, se lo lava con acetona y agua destilada y luego de separarlo nuevamente por centrifugación se seca al vacío.

La relación molar entre meros di-carboximetilados y VO^{2+} se varió desde 1:1 hasta 6:1. Para cada una de estas relaciones molares se realizaron múltiples ensayos en los que se variaron la concentración inicial de PASP-DC-MC y las concentraciones finales de PASP-DC-MC y de $\text{VOSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

IR (KBr): 1642 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$ de la amida I y $\nu_{\text{as COO}^-}$); 1547 cm^{-1} ($\delta_{\text{N-H}}$ de la amida II); 1384 cm^{-1} ; 975 cm^{-1} ($\nu_{\text{V=O}}$ VO^{2+})

3.2.6 Determinación del contenido de vanadio en los complejos por espectrometría de emisión óptica de plasma inductivamente acoplado

- En un vaso de precipitados se pesa entre 5 y 10 mg del complejo de oxovanadio (IV) producto de un ensayo de síntesis particular y posteriormente se añade 1 mL de ácido nítrico concentrado. Se evapora a sequedad.
- Las cenizas resultantes del paso anterior se disuelven en 10 mL de una solución de ácido nítrico al 6%.
- Se toma una alícuota de 1 mL de dicha disolución y se coloca en una fiola de 25 mL. Se enrasa con agua destilada y finalmente se envían las muestras al espectrómetro para ser analizadas.

4 Discusión de resultados

4.1 Polisuccinimida (PSI), el polímero precursor

4.1.1 Análisis de la síntesis y purificación, y discusión de resultados

La síntesis de la polisuccinimida, el polímero precursor, ha sido realizada según el método de Neri y colaboradores^{48,52}, tomando en cuenta la experiencia adquirida en un trabajo anterior.⁴⁷

Este método se basa en la policondensación bajo vacío y a altas temperaturas del monómero D,L-ácido aspártico catalizada por ácido fosfórico. Esta reacción involucra formación sucesiva de enlaces amido intermoleculares mediante el ataque del grupo amino de un monómero sobre el carbonilo de otro. Paralelamente, ocurre una ciclación intramolecular en cada unidad de la cadena en formación que da lugar a los anillos succinimida.

Se utilizó el equipo de policondensación construido para el trabajo de tesis anterior⁴⁷ basado en un diseño reportado en la literatura⁵³. Con este equipo es posible realizar la síntesis de manera estática y los resultados son similares a los de Neri y colaboradores que utilizaron un rotaevaporador al vacío.

El uso de ácido fosfórico como catalizador permite obtener pesos moleculares relativamente altos, puesto que evita reacciones secundarias de ruptura de la cadena polimérica y reacciones de desaminación según lo reportado por Matsubara y colaboradores.⁵⁴

En la Tabla 2 se muestran los resultados de las siete síntesis de polisuccinimida realizadas. Se puede apreciar que, con excepción de los ensayos 1 y 6, en los que se presentaron ciertos inconvenientes de índole experimental en el transcurso de la síntesis, el rendimiento obtenido es alrededor del 83%. Este valor, aunque alto, es inferior al reportado en la literatura (96%) y la diferencia se atribuye a que en nuestro caso se realizan dos precipitaciones del polímero con fines de purificación en vez de una.

En el caso del ensayo 1, se tuvo pérdidas involuntarias durante la filtración y en el caso del ensayo 6 ocurrió un calentamiento inicial brusco que condujo a cierta pérdida del reactivo inicial.

Tabla 2. Resultados de las síntesis del PSI.

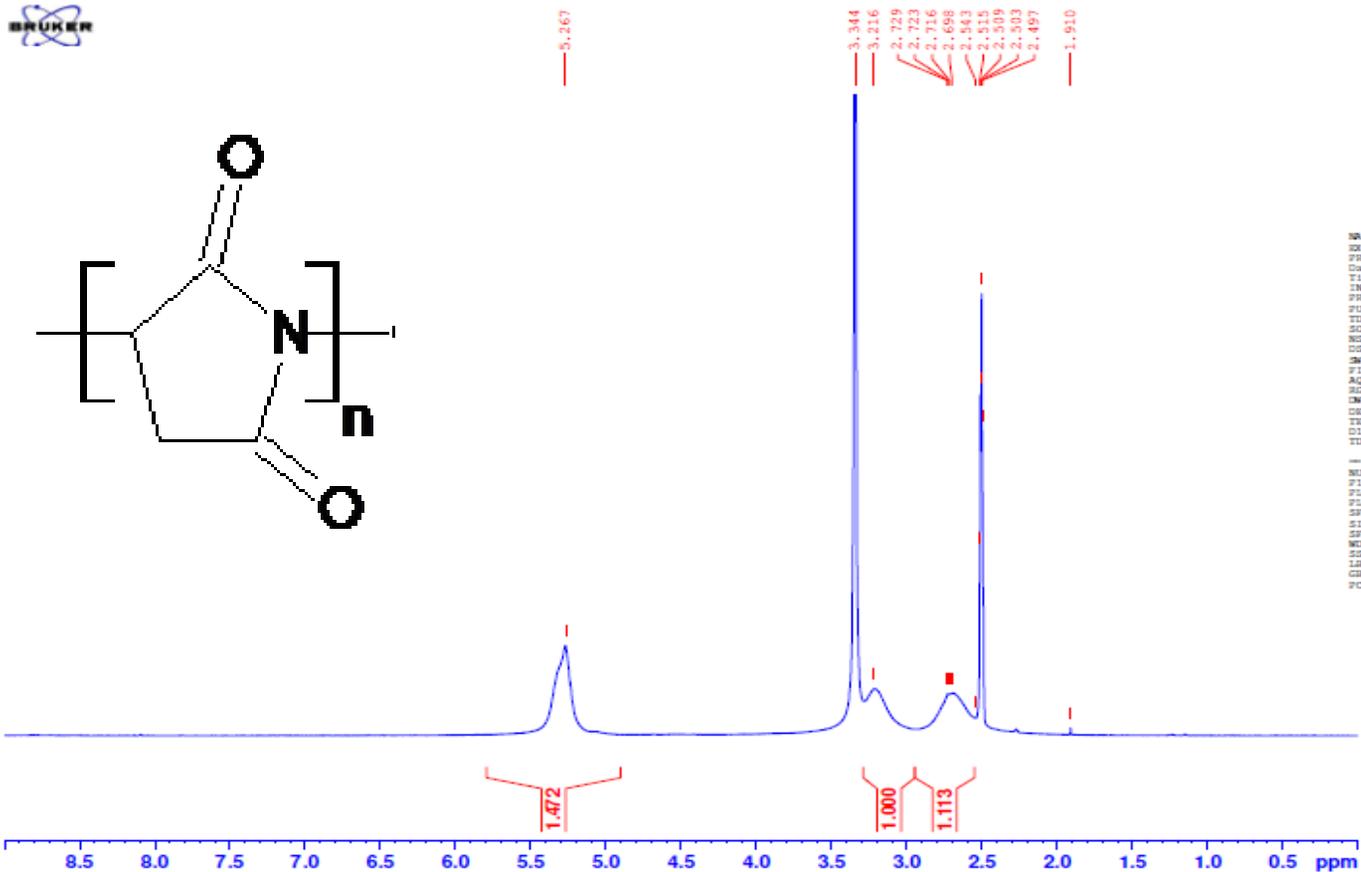
Ensayo	Masa del producto (g)*	Rendimiento (%)	Temperatura promedio de la reacción (°C)
1	5,8	79,56	179
2	6,1	83,68	176
3	6,0	82,30	190
4	6,0	82,30	197
5	6,3	86,42	204
6	5,7	78,18	196
7	6,1	83,68	180

*: En todos los casos, se partió de 10,0 g del monómero D,L-ácido aspártico.

4.1.2 Caracterización

En el trabajo de tesis anterior relacionado⁴⁷, se caracterizó exhaustivamente la polisuccinimida mediante espectroscopía infrarroja (IR) y de resonancia magnética nuclear (RMN). Esta última incluyó, además del ¹H-RMN y ¹³C-RMN, las técnicas de *Correlation Spectroscopy* (COSY ¹H-¹H) y *Heteronuclear Single-Quantum Correlation Spectroscopy* (HSQC ¹H-¹³C). Los espectros obtenidos confirmaron la obtención de la polisuccinimida con alto grado de pureza. Por esta razón, en el presente trabajo la caracterización del PSI se limitó al espectro de ¹H-RMN.

En la Figura 13 se muestra un espectro ¹H-RMN típico de la polisuccinimida sintetizada y en la Tabla 3 se pueden apreciar las asignaciones de las distintas señales presentes.

¹H C1S2.1E1 en DMSO-d₆

 Laboratorio de RMN
Sección Química

```

NAME CMC_C1S2.1E1_081110
EXPNO 1
PROCNO 1
Date_ 20101108
Time 17.26
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBO BB-1H
PULPROG zg
TD 65536
SOLVENT DMSO
NS 16
DS 2
SWH 6188.119 Hz
FIDRES 0.094423 Hz
AQ 5.2953587 sec
RG 64
SM 80.800 usec
DE 10.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

----- CHANNEL f1 -----
NUC1 1H
P1 9.00 usec
PE1 -3.00 dB
PC1M 24.55817413 W
SFO1 300.1318534 MHz
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00
  
```

Figura 13. Espectro ¹H-RMN del PSI 2 en DMSO-d₆. Espectro obtenido con el espectrómetro Brucker de 300 MHz de la PUCP.

Tabla 3. Asignaciones de las señales del ^1H -RMN del PSI.

Señal	Asignación (ppm)
CH_2 (1H)	2,71
CH_2 (1H)	3,21
CH	5,27

Los protones metileno no equivalentes aparecen como dos picos de igual intensidad a 2,71 y 3,21 ppm mientras que el protón metino aparece a 5,27 ppm. Las dos primeras señales están parcialmente sobrepuestas con la del protón residual del DMSO a 2,5 ppm y con la del protón del agua (presente en el DMSO) a 3,4 ppm.

4.1.3 Determinación del peso molecular por viscosimetría capilar

Para determinar el peso molecular de la polisucinimida se utilizó el método de viscosimetría capilar, basado en la relación existente entre el peso molecular de un polímero y su viscosidad intrínseca. Este método ha sido discutido en el acápite 2.2.2.

Se determinó el peso molecular por este método para 6 de los 7 productos obtenidos de las síntesis de polisuccinimida. El procedimiento ha sido descrito en detalle en el acápite 3.2.1.2, los resultados se muestran en la Tabla 4 y las gráficas η_{red} vs concentración, en el Anexo 1.

Se puede apreciar que los pesos moleculares de los 6 productos medidos tienden a ubicarse en el rango de 47-58 KDa, con excepción de las muestras 1 y 4, en las cuales no se alcanzó el vacío óptimo durante la síntesis, lo que condujo a un menor grado de polimerización. Finalmente, en las muestras cuyos valores de peso molecular pueden considerarse representativos (2, 3, 5 y 7), se podría inferir de la tabla que, con el vacío utilizado en el presente trabajo (10,5 mmHg), temperaturas promedio elevadas (190-205 °C) promueven un mayor grado de polimerización y, por ende, un mayor peso molecular.

Se espera que los valores de peso molecular obtenidos resulten adecuados, dado que en etapas posteriores de derivatización de la polisuccinimida ocurrirá cierto grado de ruptura de la cadena principal, que ubicaría el peso molecular del polímero final en el rango deseado de 25 a 50 kDa.

Tabla 4. Viscosidades intrínsecas y pesos moleculares de las polisuccinimidas obtenidas en las síntesis de PSI realizadas.

Síntesis	Ecuación de la gráfica	Viscosidad intrínseca (mL/g)	Peso Molecular (kDa)
1	$\eta = 1582,9 C + 29,015$	29,015	25,0
2	$\eta = 708,18 C + 48,464$	48,464	49,0
3	$\eta = 611,76 C + 55,323$	55,323	58,4
4	$\eta = -105,13 C + 41,142$	41,142	39,5
5	$\eta = 867,9 C + 54,769$	54,769	57,6
7	$\eta = 115,8 C + 47,287$	47,287	47,5

4.2 Poli- α,β -D,L-[N-(3-aminopropil)-aspartamida] (PASP-AP), el polímero intermedio

4.2.1 Análisis de la síntesis y purificación

La síntesis del PASP-AP fue realizada según el procedimiento descrito por Neuse y colaboradores. Este método se basa en la ruptura del anillo succinimida del PSI por ataque nucleofílico del reactivo 1,3-propilendiamina, el cual funge en el vehículo polimérico final como espaciador de tres carbonos con un grupo amino terminal que será derivatizado en el siguiente paso de la síntesis de dicho portador.

Se utilizó un gran exceso de propilendiamina (relación molar de 10:1 con respecto a cada mero de PSI), como se recomienda en la bibliografía especializada, para evitar un posible entrecruzamiento del polímero. Dado que este reactivo puede realizar el ataque nucleofílico al anillo del PSI por ambos extremos, el añadir una gran cantidad del mismo hace que sea más probable que una diamina libre reaccione con un anillo succinimida en lugar de que lo haga una diamina con un extremo ya unido a la matriz polimérica.

Por otro lado, como se ha mencionado en el acápite 3.2.2.1, la síntesis de PASP-AP debe ser llevada a cabo en atmósfera inerte. Esto se justifica por el hecho de que tanto el reactivo de partida propilendiamina como el producto PASP-AP son relativamente lábiles frente al CO_2 y reaccionan con este en solución para formar carbamatos. Además, ambos compuestos son sumamente higroscópicos.

Los resultados de las 8 síntesis de PASP-AP realizadas se muestran en la Tabla 5. Además, previamente a las síntesis mostradas en dicha Tabla, se ensayaron síntesis de PASP en menor escala (2,5-5 mmol de meros de PSI) para adquirir destreza con el equipo y practicar las técnicas de síntesis, diálisis y liofilización.

Se aprecia en la Tabla 5 que las síntesis de PASP-AP se llevaron a cabo con dos tiempos distintos de reacción: a 5 h y a 20 h. A pesar de que la literatura reporta que el tiempo de reacción debe ser de 5 h, en los ensayos previos se encontró que un aumento en el tiempo de reacción conducía a un mayor rendimiento del polímero crudo (sin dializar). Sin embargo, luego de dializar, el rendimiento de las síntesis con mayor tiempo de reacción resultó ser mucho más bajo que el reportado. Esto se atribuyó a que el mayor tiempo de reacción había conducido a un mayor grado de ruptura de la cadena principal por aminólisis, lo que derivó en una mayor proporción de polímeros de bajo peso molecular que fueron eliminados durante la diálisis.

En vista de lo anterior, se decidió atenernos al tiempo recomendado en el procedimiento original y se comprobó que un menor tiempo de reacción tiene un efecto positivo en el rendimiento del producto dializado como se observa en la Tabla 5. Las únicas excepciones son las síntesis 6 y 7, en las que el menor rendimiento se atribuye a pérdidas físicas en la búsqueda de otras modalidades de recolección del polímero.

Tabla 5. Resultados de las síntesis del PASP-AP.

Síntesis	PSI de partida	Moles de mero de PSI de partida ($\times 10^{-3}$)	Tiempo de reacción (h)	Masa (g)	Rendimiento (%)
1	7	20	20	1,0994	32,15%
2	7	20	20	0,9906	28,97%
3	7	14	5	1,3304	55,58%
4	3	20	5	2,1083	61,65%
5	3	20	5	2,1550	63,01%
6	3	14	5	1,1221	46,88%
7	4	20	5	1,4330	41,90%
8	5	20	5	2,0088	58,74%

El rendimiento reportado en la literatura para esta síntesis es de 74%. La diferencia con los rendimientos obtenidos en este trabajo de tesis se atribuye a pérdidas físicas en los procesos de recolección del producto. La pérdida del producto crudo PASP-AP ocurre después de acabado el proceso de centrifugación, pues la higroscopicidad del polímero hace que este, apenas entra en contacto con la humedad del ambiente, se adhiera a las paredes de los tubos de centrifugación una vez decantada la mezcla de solventes utilizada para el lavado.

El proceso de recolección del polímero utilizado consistía inicialmente en coleccionar el sólido de todos los tubos de ensayo e irlo colocando en una luna de reloj, lo que ocasionaba que minutos después de recolectado el producto y en contacto con el aire, se produjese un cambio en la coloración y consistencia del polímero, que se tornaba amarillento y endurecía. Esto último dificultaba en alto grado la extracción y disolución del polímero que se volvía extremadamente lenta (alrededor de 4 horas).

Con el fin de evitar esta complicación experimental se ensayaron otras modalidades de recolección como la de disolver directamente el polímero en los tubos de centrifugación con el agua saturada con N_2 a utilizar en la diálisis y la de reemplazar el paso de centrifugación por una filtración al vacío, ambas bajo atmósfera de N_2 .

De acuerdo a la experiencia adquirida, se propone una rápida extracción del producto de cada tubo, seguida de su inmediata disolución en una porción del agua saturada con N_2 a utilizar en la diálisis y lavado del producto residual que haya quedado adherido en el tubo.

4.2.2 Caracterización

Se obtuvieron los espectros 1H -RMN de los productos de todas las síntesis de PASP-AP. A partir de dichos espectros se pudo determinar que, si bien todos concuerdan con las señales reportadas para el PASP-AP⁵⁰, los productos de las síntesis 3, 5, 6, 7 y 8 tienen un grado de pureza superior a aquellos obtenidos de las 1, 2 y 4.

En la Figura 14 se muestra un espectro 1H -RMN típico del PASP-AP sintetizado y en la Tabla 6 se pueden apreciar las asignaciones de las distintas señales presentes.

Tabla 6. Asignaciones de las señales del 1H -RMN del PASP-AP.

Señal	Asignación (ppm)
Asp-CH	4,50
Asp-CH ₂	2,62-2,65
α	3,09-3,10
β	1,53
γ	2,53

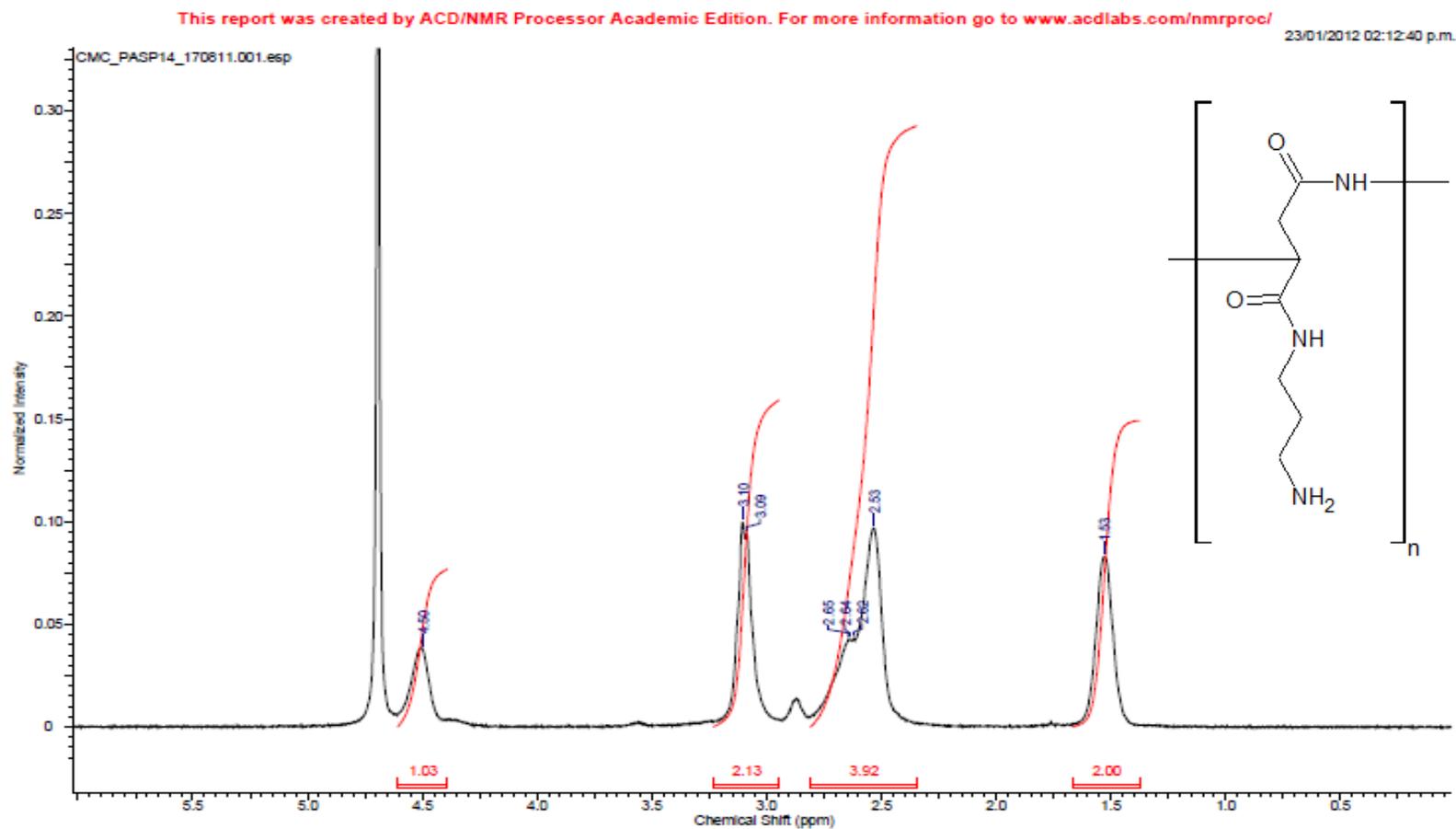


Figura 14. Espectro ^1H -RMN del PASP-AP 6 en D_2O . Espectro obtenido con el espectrómetro Bruker de 300 MHz de la PUCP.

4.2.3 Discusión de resultados

Como se ha mencionado en el acápite 4.2.2, los PASP-AP que se han sintetizado se pueden dividir en dos grupos de distinta pureza. La diferencia más relevante entre estos dos grupos fue que en el caso de los de menor pureza, la disolución del polímero previa a la diálisis se hizo en ausencia de N_2 y con calor, mientras que el mismo proceso fue realizado bajo atmósfera inerte y a temperatura ambiente en el segundo grupo. En ambos casos, la diálisis fue realizada en agua saturada con N_2 .

Al comparar los espectros del PASP-AP 6 (Figura 14) con el del PASP-AP 2 (Figura 15) se aprecia que la diferencia más notoria es la aparición de una segunda señal de protón al costado de la del metinil (Asp-CH) en el PASP-AP 2, hacia 4,34 ppm aproximadamente. Esta señal aparece muy pronunciada en los PASP 1, 2 y 4 mientras que es apenas visible en los PASP 3, 5, 6, 7 y 8. Dado que esta señal no correspondía a ninguno de los productos de partida (PSI y 1,3-propilendiamina) se planteó la posibilidad de que se deba a alguna reacción secundaria en el polímero producto.

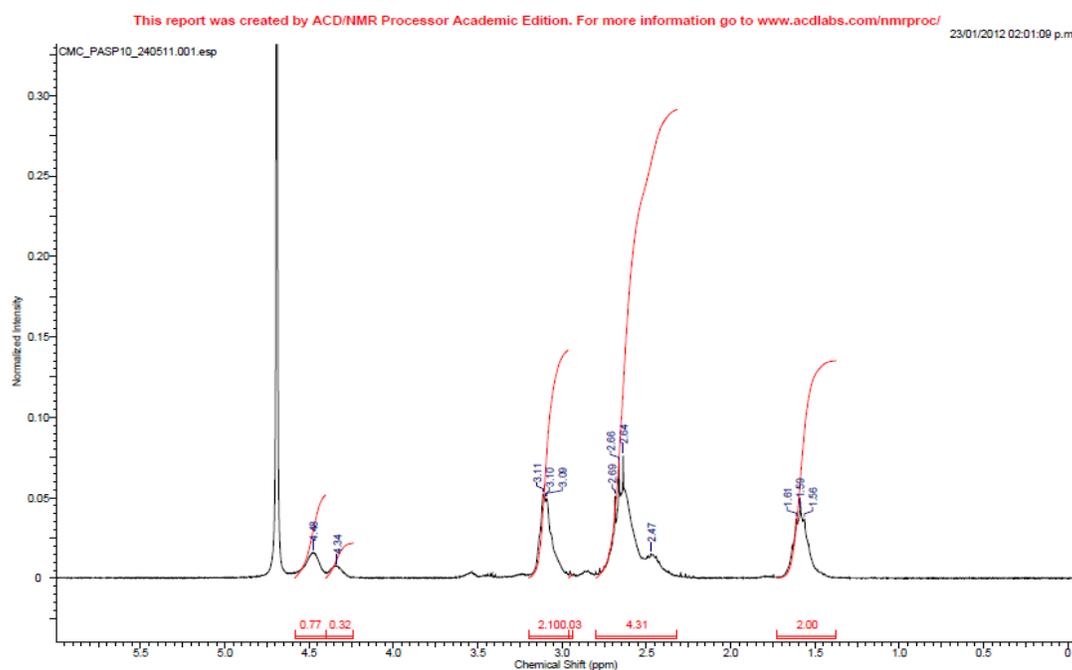


Figura 15. Espectro 1H -RMN del PASP-AP 2 en D_2O . Espectro obtenido con el espectrómetro Bruker de 300 MHz de la PUCP.

Mediante el espectro COSY del PASP-AP 2 (Figura 16) se pudo comprobar que la señal problema tenía acoplamiento con otros hidrógenos que se encuentran en la misma zona del metileno (Asp- CH_2) de la cadena principal del polímero, por lo que se deduce que

ausencia de calor, la señal es apenas visible. En contraste, en caso de los PASP-AP 1, 2 y 4, el calor junto con el medio básico, generado por el grupo amino terminal presente en la cadena lateral del polímero al disolverlo en agua, podrían haber favorecido esta reacción indeseable. Esto conduciría a un elevado grado de hidrólisis, lo que se vería reflejado en el aumento de intensidad de la señal problema.

Para comprobar la hipótesis de una posible hidrólisis, se disolvió bajo atmósfera de N_2 el PASP-AP 6 (producto que se asume no hidrolizado) y calentó a $80\text{ }^\circ\text{C}$ para simular las condiciones en que se habían disuelto a los PASP-AP 1, 2 y 4, las que habrían dado lugar a que contengan algunos meros hidrolizados. Mediante espectros ^1H -RMN se comprobó la aparición de la señal problema al costado de la del metinil en la muestra de PASP-AP 6 sometida a dichas condiciones, como se aprecia en la Figura 17, de lo que se infiere que dicha señal se debe en efecto a la reacción secundaria de hidrólisis. Esta reacción genera un copolímero que, aunque constituido principalmente por los meros del PASP-AP, contiene una cierta proporción de meros hidrolizados; es decir, de meros correspondientes al poli- $\alpha,\beta\text{-D,L}$ -[aspartato de 3-aminopropilamonio].

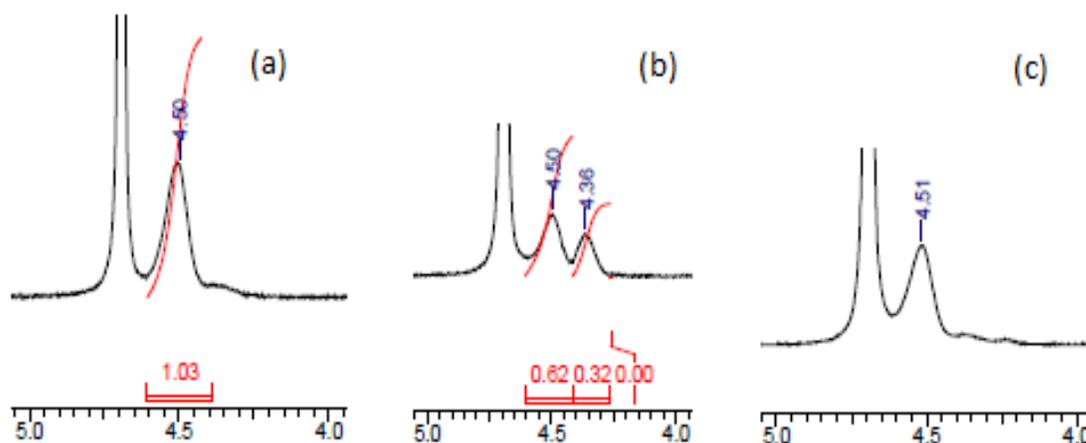


Figura 17. Comparación de la región de interés en los espectros ^1H -RMN del PASP-AP 14 normal (a), del sometido a calor (b) y del expuesto al CO_2 (c) en D_2O .

Otra diferencia encontrada entre ambos grupos de polímeros es que en los PASP-AP 1, 2 y 4 la señal que corresponde al $\gamma\text{-CH}_2$ y al Asp- CH_2 tiene un hombro a la derecha, mientras que en el grupo de PASP-AP de mayor pureza, la misma señal tiene el hombro hacia la izquierda.

Por el análisis del espectro COSY del PASP-AP 2, producto cuyo espectro ^1H -RMN es idéntico al de la muestra de PASP-AP 6 que se sometió a hidrólisis, se comprobó que la señal del metinil problema acopla con una señal hacia 2,47 ppm, a la derecha del $\gamma\text{-CH}_2$ y del Asp- CH_2 del producto no hidrolizado. Esta señal no se encuentra presente en los

espectros de los PASP-AP no hidrolizados, por lo que se deduce que corresponde a un Asp-CH₂ de meros hidrolizados.

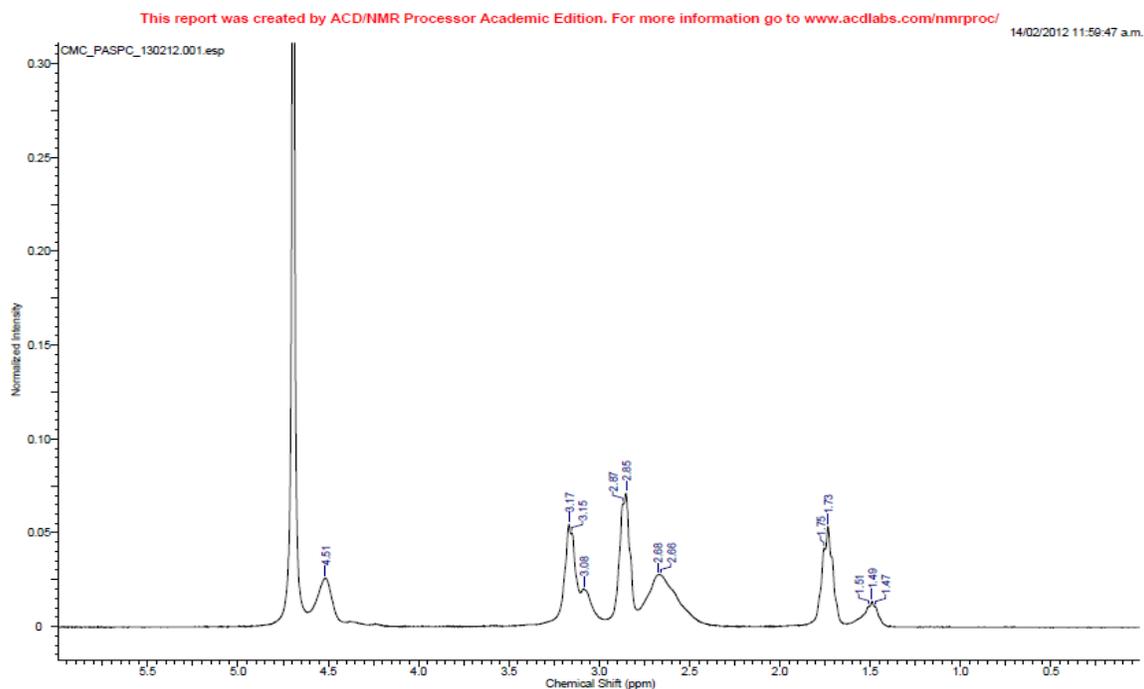
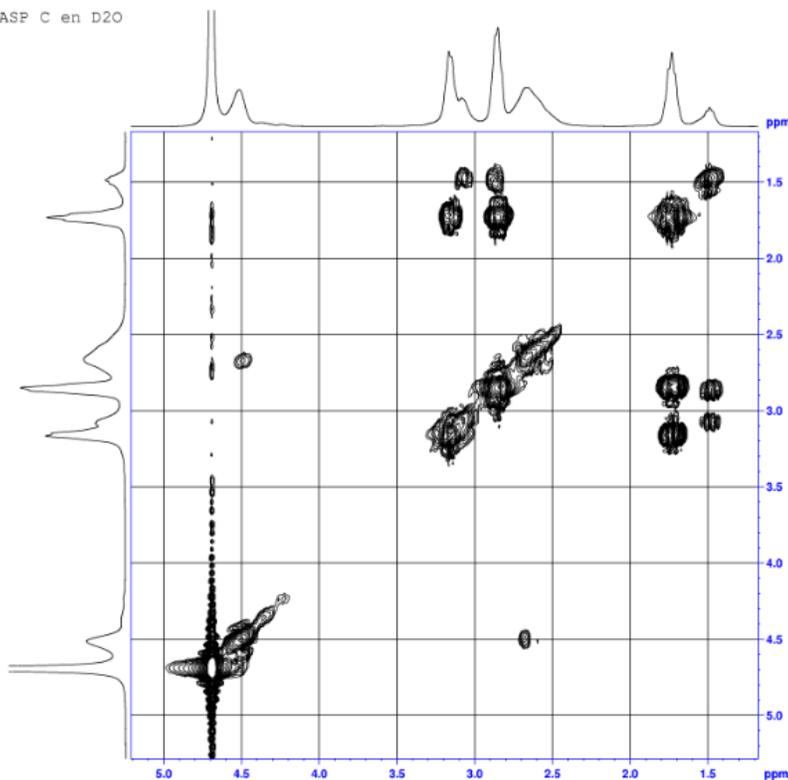


Figura 18. Espectro ¹H-RMN de una muestra de PASP-AP 6 sometida a corriente de CO₂. Espectro obtenido con el espectrómetro Bruker de 300 MHz de la PUCP.

Con respecto a una posible reacción de formación de carbamatos, comparando los espectros ¹H-RMN del PASP-AP 6 y el de la muestra de PASP-AP 6 sometido a una corriente de CO₂ (Figuras 14 y 18, respectivamente) se pueden apreciar considerables diferencias. En base a los desplazamientos químicos y a los acoplamientos presentes en el espectro COSY de la muestra tratada (Figura 19), se puede deducir que existen dos tipos de β-CH₂ a 1,49 y 1,74 ppm; de α-CH₂ a 3,08 y 3,16 ppm; y de γ-CH₂ a 2,87 y 2,85 ppm en la cadena lateral del polímero, los que se pueden asignar a meros correspondientes al PASP-AP puro y a meros en los cuales ha ocurrido la carbamatación del grupo amino terminal, respectivamente. Otro aspecto a destacar es que la señal de los meros γ-CH₂ no carbamatados se ha desplazado notablemente hacia campo bajo y separado de la señal del Asp-CH₂ de la cadena principal. De todo lo anterior se puede concluir que sí es posible que ocurra la reacción secundaria de formación de carbamatos en el polímero, pero esta se evita al trabajar con atmósfera de N₂ en todas las etapas de la síntesis.

COSY PASP C en D2O



Laboratorio de RMN
Sección Química

```

NAME   CMC_PASP_130212
EXPNO  2
PROCNO  1
DATE_   20120212
TIME    14.35
INSTRUM spect
PROBHD  5 mm BBO BB5-1H
PULPROG zgpg30
TD       65536
SOLVENT DMS
NS       2048
DS       4
SWH      4004.610 MHz
F2       1.942213 GHz
AQ       0.1019454 sec
RG        64
WDW      EM
SSB      0
LB        10.00 kHz
GB        0
PC        200.00 nsec
AQ        2
DE        0.0000000 sec
DI1       1.4000000 sec
DI2       0.0000000 sec
DI3       0.0000000 sec
DI4       0.0000000 sec
DI5       0.0000000 sec
===== CHANNEL f1 =====
NUC1     13C
P1        9.00 nsec
PL1       0.00 dB
PL12      0.00 dB
PL13      0.00 dB
PL14      0.00 dB
PL15      0.00 dB
===== CHANNEL f2 =====
NAME2    GRACEFUL CHANNEL
EXPNO2   2048
PROCNO2  1
DATE2_   20120212
TIME2    14.35
INSTRUM2 spect
PROBHD2  5 mm BBO BB5-1H
PULPROG2 zgpg30
TD2       65536
SOLVENT2 DMS
NS2       2048
DS2       4
SWH2      4004.610 MHz
F22       1.942213 GHz
AQ2       0.1019454 sec
RG2        64
WDW2      EM
SSB2      0
LB2        10.00 kHz
GB2        0
PC2        200.00 nsec
AQ2        2
DE2        0.0000000 sec
DI12       1.4000000 sec
DI22       0.0000000 sec
DI32       0.0000000 sec
DI42       0.0000000 sec
DI52       0.0000000 sec
    
```

Figura 19. Espectro COSY de una muestra de PASP-AP 6 sometida a corriente de CO₂. Espectro obtenido con el espectrómetro Bruker de 300 MHz de la PUCP.

En lo que se refiere al paso de ruptura del anillo por la 1,3-propanodiamina, en la literatura se reporta que el ataque al anillo de la polisuccinimida por diversos nucleófilos conduce a la formación de dos meros distintos, uno de conformación alfa y el otro beta, dependiendo del carbonilo del anillo succinimida que sufre el ataque. En diversos derivados del PSI se demuestra la existencia de estas dos formas utilizando los espectros ¹H-RMN, puesto que los desplazamientos químicos de los protones metínicos alfa y beta son distintos. En el caso particular del PASP-AP, sin embargo, se observa en su correspondiente espectro ¹H-RMN solo una señal de protón metínicos a 4,51 ppm. Se proponen dos explicaciones posibles para esta diferencia: (a) que la ruptura del anillo del PSI por la 1,3-propilendiamina sea estereoespecífica; es decir, que solo se genere un tipo de mero (alfa o beta) o (b) que la señal del metinil del segundo mero no se observe por encontrarse oculta por la señal del agua. Para comprobar o descartar la hipótesis (b) se tomó un espectro ¹H-RMN a 60 °C a los PASP-AP 5 (producto puro) y PASP-AP 2 (producto hidrolizado parcialmente) con el fin de producir un desplazamiento de todas las señales del producto hacia campo bajo y poder observar si aparecía la posible señal del segundo tipo de mero. Se observó que en ninguno de los dos casos apareció la supuesta señal oculta por la del agua; de aquí se podría concluir que la aminólisis del PSI ocurre de forma preferente, o incluso específica, sobre únicamente uno de los carboxilos del anillo.

Por otro lado, para determinar cuál sería la ruptura preferente, alfa o beta, en la aminólisis del PSI, se realizó una comparación de los espectros $^1\text{H-RMN}$ del PASP-AP que tiene meros hidrolizados (PASP-AP 2) con el del poli-aspartato de sodio, puesto que los meros de este último resultan idénticos a los hidrolizados del primero. Además, se asume que la aminólisis del PSI es la etapa que define la conformación alfa o beta de los meros, la cual se mantiene durante la hidrólisis. En el espectro del poli-aspartato de sodio se aprecia que la señal metínica de los meros alfa se encuentra a 4,54 ppm, mientras que la correspondiente a los meros beta se ubica a 4,34 ppm. Se podría concluir entonces, que la señal que aparece a 4,36 ppm en el espectro del PASP-AP 2 pertenece a un metinil de un mero beta y que la aminólisis del PASP-AP genera únicamente esta forma. Es importante mencionar también, en este contexto, que en la siguiente etapa de síntesis, la derivatización del grupo amino terminal a carboxilato, se mantendrá esta conformación beta de los meros.

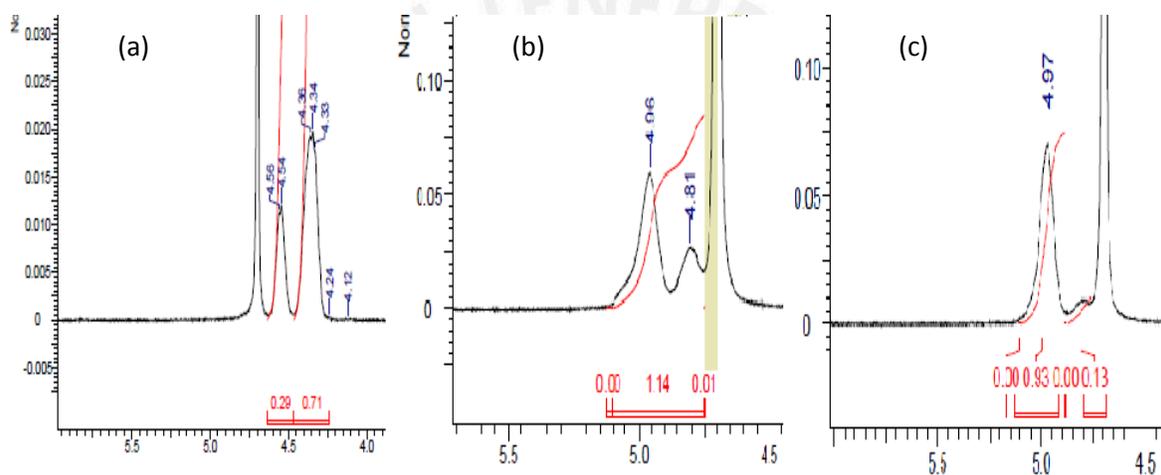


Figura 20. Comparación de la región de interés de los espectros del poliaspartato de sodio (a), PASP-AP 2 a 60 °C (b) y PASP-AP 5 a 60 °C (c).

4.3 Poli-(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]) (PASP-DC-MC), el vehículo polimérico

4.3.1 Análisis de la síntesis y purificación

La síntesis del PASP-DC-MC ha sido realizada según el método de Neuse y colaboradores, el cual consiste en la derivatización del grupo amino terminal del PASP-AP para formar grupos mono o dicarboxilato con capacidad ligante hacia el catión vanadilo. Esta derivatización se lleva a cabo mediante el ataque nucleofílico del nitrógeno primario de la cadena lateral del PASP-AP al átomo de carbono positivado del bromoacetato de sodio en medio ligeramente básico. Esta reacción conduce a la formación de meros tanto mono- como di-carboximetilados según que ocurra un único ataque del nucleófilo o dos ataques sucesivos.

Se utiliza un exceso del reactivo bromoacetato de sodio con el fin de obtener un predominio en el número de meros di-carboximetilados (DC) sobre los mono-carboximetilados (MC). En nuestro caso particular, esto resulta conveniente, pues los meros DC ejercen un efecto coordinante más efectivo gracias a la cercanía entre los dos grupos carboxilato, lo cual permite la formación de un anillo quelato más pequeño y, por tanto, más estable que el que se formaría mediante dos grupos carboxilatos de meros MC.

El ácido bromhídrico liberado como producto secundario a medida que la reacción avanza, ocasiona una disminución progresiva del pH que, de no ser controlada mediante la adición periódica de $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$, genera la protonación de los grupos amino terminales del PASP-AP. Dicha protonación es perjudicial, pues conduce a una pérdida de su poder nucleofílico.

Si bien en la literatura se recomienda que la síntesis de PASP-DC-MC se realice bajo atmósfera de N_2 como medida de precaución, se comprobó en la práctica que no es una condición absolutamente necesaria. La etapa crítica de la síntesis de este polímero se da entre 1 y 4 horas después de iniciada, puesto que es en este periodo en que el pH de la solución disminuye considerablemente, hasta 4 aproximadamente, por lo que resulta necesario un monitoreo y corrección constante del mismo mediante la adición de gotas de una solución de NaOH para ajustarlo al deseado. Por otro lado, en vista de que la mezcla de reacción se encuentra a $80\text{ }^\circ\text{C}$ y cada vez que se abre el balón para hacer el control de pH se reduce un poco el volumen, se requiere compensarlo mediante la adición de algunas gotas de agua destilada. De este modo, se evita la eventual precipitación de una masa sólida que conduce a un producto de menor pureza (PASP-DC-MC 1, 2 y 3).

Un problema experimental adicional en el caso de las síntesis de los PASP-DC-MC 1, 2 y 3 ocurrió en la etapa de filtración, puesto que al realizarla mediante embudo Büchner y aún con papel de filtro fino, se perdía una cantidad significativa de producto. A partir del

PASP-DC-MC 4 se minimizó esta fuente de pérdida usando crisoles de placa porosa de medida C, lo que condujo a un mayor rendimiento promedio de aproximadamente 65%, superior al reportado en la literatura (60%)

Tabla 7. Resultados de las síntesis del PASP-DC-MC. En todos los casos, se partió de 2 mmol de mero de PASP-AP.

Síntesis	PASP-AP utilizado	Masa del producto PASP-DC-MC (mg)	Rendimiento (%)
1	1	179,8	31,11
2	1	301,5	52,16
3	2	47,8	8,27
4	6	383,9	66,42
5	3	291,3	50,40
6	3	434,2	75,12
7	3	337,0	58,30
8	3	415,6	71,90
9	5	357,7	61,89
10	5	410,1	70,95
11	5	346,6	59,96

Un detalle curioso es que la velocidad de precipitación con la mezcla de solventes acetona / etanol 1:1 introduce diferencias en la consistencia y aspecto del precipitado. En los PASP-DC-MC 5 y 6, en los que la precipitación se realizó más rápido, se formó una

masa pegajosa del polímero mientras que en las demás síntesis el polímero precipitó en forma de polvo. A pesar de esta diferencia, no se observó variación en los espectros $^1\text{H-RMN}$.

La masa obtenida del producto, mostrada en la Tabla 7, corresponde al polímero seco y puro; es decir, la resultante después de los procesos de diálisis y liofilización. En lo que respecta al rendimiento, este ha sido calculado tomando como 100% el caso de que todos los meros se encuentren di-carboximetilados, lo cual no ocurre en la práctica pues, de acuerdo a lo reportado, siempre se obtiene una cierta proporción de meros MC.⁵¹

4.3.2 Caracterización

Se obtuvieron los espectros $^1\text{H-RMN}$ de los productos de todas las síntesis de PASP-DC-MC. A partir de la información obtenida, se pudo determinar que, si bien todos concuerdan con las señales reportadas para el producto, los PASP-DC-MC 1, 2 y 3 tienen un grado de pureza inferior al resto de polímeros sintetizados.

Tabla 8. Asignaciones de las señales del $^1\text{H-RMN}$ del PASP-DC-MC.

Asignación	Señal (ppm)
$\alpha, \alpha', \gamma, \gamma'$	3,17
β, β'	1,82
$\delta, \delta', \delta''$	3,79
Asp-CH ₂	2,66-2,73
Asp-CH	4,52

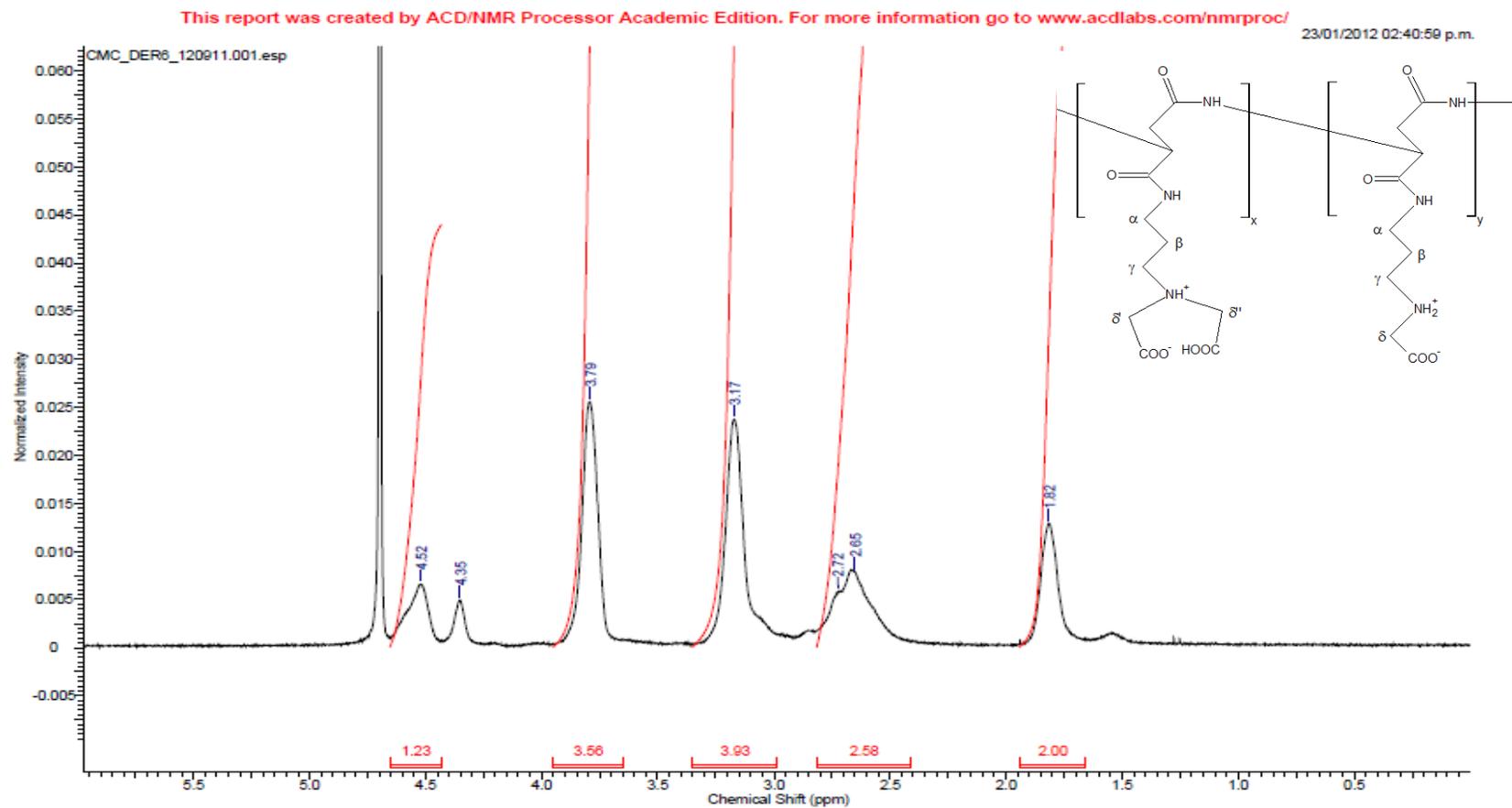


Figura 21. Espectro H-RMN del PASP-DC-MC 4 en D₂O. Espectro obtenido con el espectrómetro Bruker de 300 MHz de la PUCP.

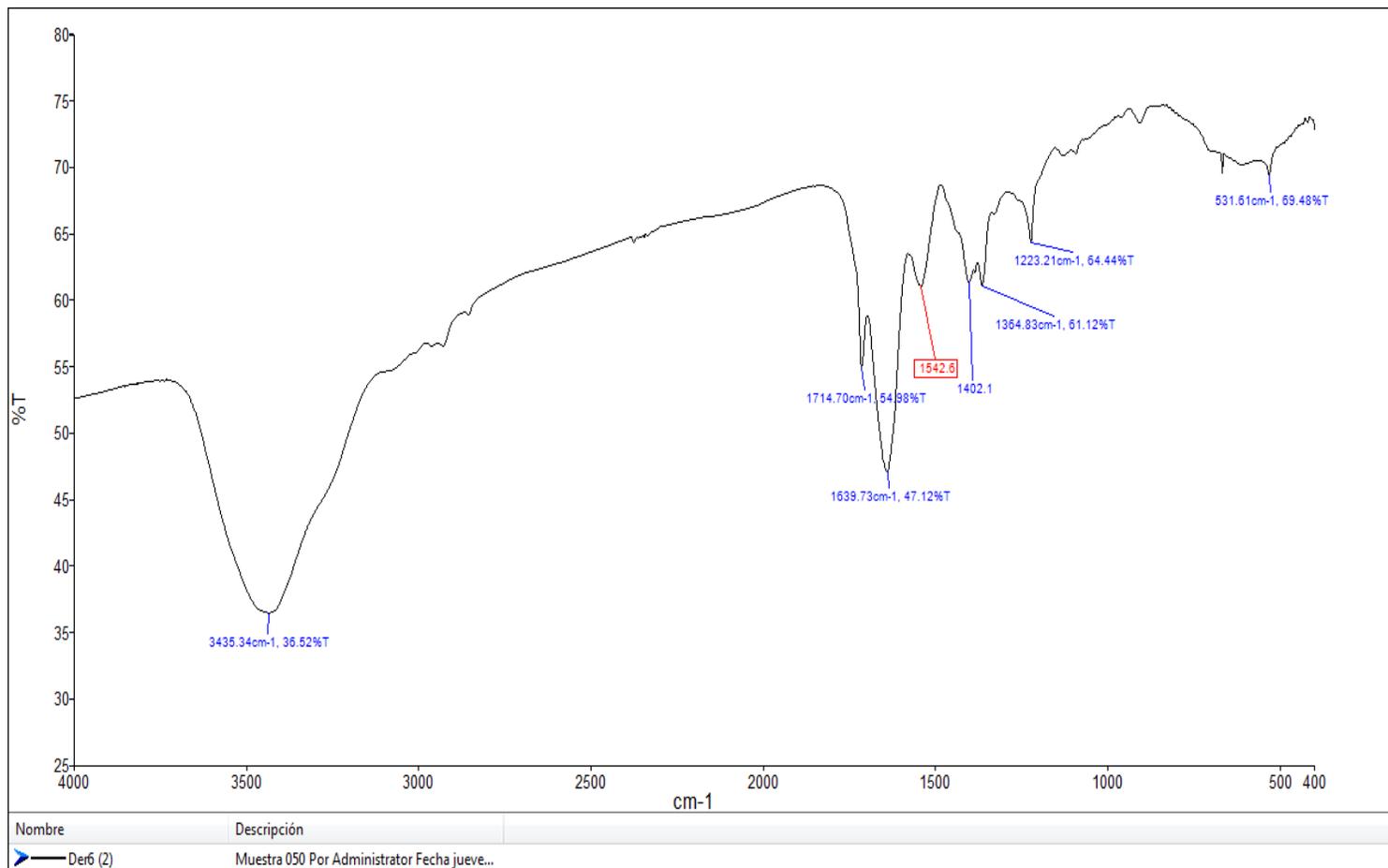


Figura 22. Espectro IR del PASP-DC-MC 4 en KBr.

El espectro IR de las diversas muestras de PASP-DC-MC concuerda con el reportado en la literatura.⁵¹ Se puede apreciar a 3425 cm^{-1} una banda de absorción muy intensa que corresponde a la vibración de estiramiento N-H del grupo amida. Además, se observa a 1714 cm^{-1} una fina banda que corresponde al estiramiento C=O del grupo carboxilo. La fuerte absorción hacia 1640 cm^{-1} pertenece al estiramiento C=O de la amida I y se encuentra superpuesta con la banda correspondiente al estiramiento asimétrico del grupo carboxilato, mientras que a 1543 cm^{-1} se observa la absorción de la banda de amida II (flexión N-H). La doble banda a 1402 y 1365 cm^{-1} corresponde al estiramiento simétrico del grupo carboxilato y a la flexión O-H del grupo carboxílico, respectivamente. De esto se deduce la presencia tanto del grupo carboxílico como del carboxilato, lo que confirma el reporte bibliográfico de que el grupo COOH terminal protona al nitrógeno de la amina terciaria o secundaria de la cadena lateral formando un zwitterion.

4.3.3 Discusión de resultados

Las asignaciones mostradas en la Tabla 8 fueron posibles gracias al análisis del correspondiente espectro COSY, puesto que en la literatura solo se reporta el desplazamiento químico de los hidrógenos δ y la región del espectro en que se encuentran todas las señales de los hidrógenos de la cadena lateral y del Asp-CH₂ se reporta como un rango, sin especificar asignaciones específicas.

Por otro lado, las integraciones de los picos indican que la cantidad de hidrógenos en la cadena principal y la cantidad de hidrógenos en la cadena lateral de propilendiamina ha perdido la relación de 1:2 que tenía en el PASP-AP. Así, por ejemplo, en el PASP-DC-MC 4 se tiene que los hidrógenos de la cadena principal integran por 3,81 mientras que los hidrógenos de la cadena de propilendiamina integran por 5,93, lo que da una relación de 1:1,55. Esta tendencia se repite en todos los PASP-DC-MC.

Debido a que las condiciones de síntesis del PASP-DC-MC son muy similares a las utilizadas en el ensayo realizado para comprobar la posible hidrólisis del PASP-AP (explicada en el acápite 4.2.3), se planteó la hipótesis de que esta reacción secundaria también ocurra en esta etapa de la síntesis del vehículo polimérico. El resultado sería un polímero con algunos meros análogos a los obtenidos en la hidrólisis del PASP-AP con la diferencia de que en este caso, dado que la mezcla de reacción se acidifica durante el *work-up* de la síntesis del PASP-DC-MC, los grupos carboxilo se encontrarían protonados.

En este contexto, cabe mencionar que en un trabajo de tesis anterior⁴⁷ se ha sintetizado el poli-alfa,beta(ácido aspártico) y en su espectro ¹H-RMN se asignaron las señales del α -CH y del β -CH a 4,7 y 4,5 ppm, respectivamente. Como ya se ha discutido anteriormente, tanto el PASP-AP como el derivado PASP-DC-MC presentan preferentemente la conformación β , por lo que la hipótesis de la hidrólisis del PASP-DC-MC quedaría demostrada si se observasen en su respectivo espectro ¹H-RMN las señales del β -CH y

del Asp-CH₂ (ambos de la cadena principal) con el mismo desplazamiento químico que en el poli(ácido aspártico).

Ahora bien, como se aprecia en el espectro ¹H-RMN del PASC-DC-MC (Figura 21), tanto la señal del Asp-CH como la del ASP-CH₂ tienen hombros a la izquierda, en la misma ubicación donde deberían aparecer las señales del β-CH y Asp-CH₂ del polímero hidrolizado. Según un minucioso análisis del espectro COSY (Figura 23), se obtiene que estos dos hombros acoplan entre sí, lo que demostraría la presencia de meros hidrolizados en el PASC-DC-MC que corresponden al poli-β(ácido aspártico).

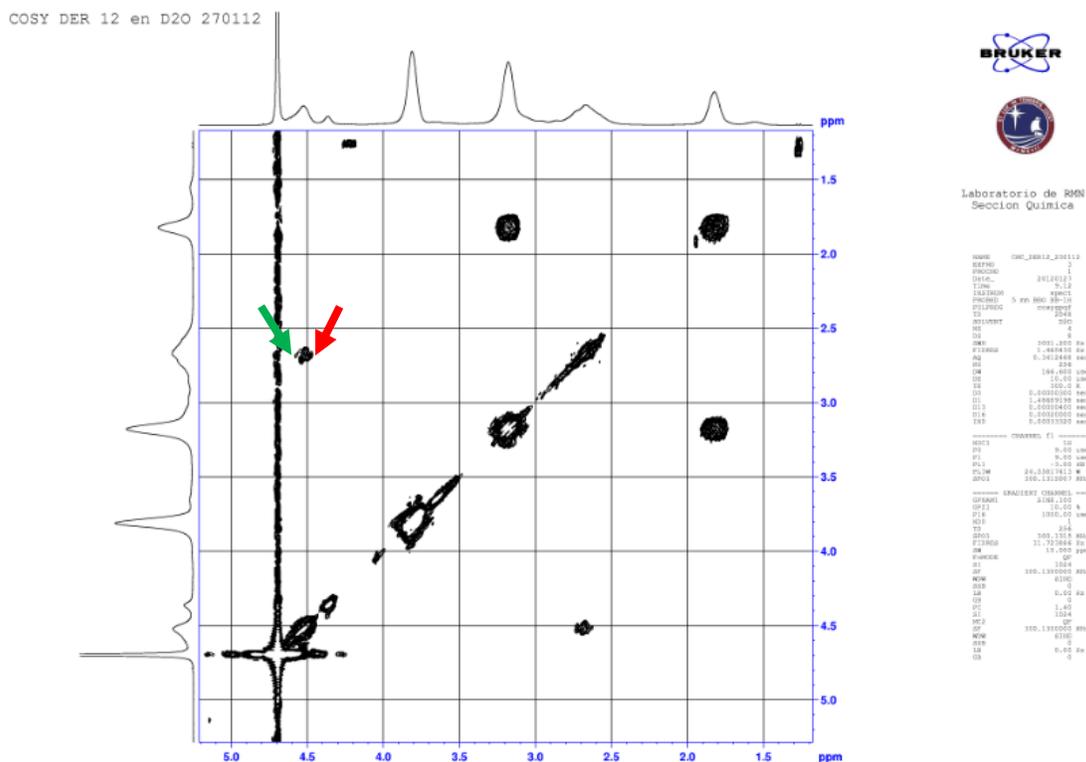


Figura 23. Espectro COSY del PASC-DC-MC 9 en D₂O. La flecha verde señala el acoplamiento entre el metilil y el metileno de un mero hidrolizado, mientras que la flecha roja señala el acoplamiento de un metilil y un metileno de un mero de PASC-DC-MC. Espectro obtenido con el espectrómetro Bruker de 300 MHz de la PUCP.

En el espectro ¹H-RMN también se puede observar una señal a 4,35 ppm que, según información proporcionada por el espectro HSQC (Figura 24), pertenece a hidrógenos de un grupo metileno. Debido a que, de acuerdo al espectro COSY, esta señal no presenta acoplamiento con ninguna otra, se planteó la posibilidad de que pertenezca a un grupo bromoacetamida, el cual se habría formado en una reacción competitiva a la principal, por

conveniente para una mayor capacidad de coordinación del polímero al agente activo, catión vanadilo. En el Anexo 3 se muestra un ejemplo del cálculo de la proporción DC:MC.

Adicionalmente, como se ha demostrado en párrafos anteriores, el PASP-DC-MC no presenta en su composición exclusivamente meros DC y MC, sino también una pequeña proporción de meros provenientes de reacciones de hidrólisis y de amidación de las cadenas laterales; además, cabe la posibilidad de una eventual presencia de meros sin reaccionar del PASP-AP. Estos meros no deseados han sido agrupados como una tercera categoría y se los considerará simplemente como meros hidrolizados para fines de cálculos posteriores.

La proporción de meros de esta tercera categoría (meros Z) se ha calculado comparando, en el espectro $^1\text{H-RMN}$ del PASP-DC-MC, las integrales de dos señales, una correspondiente al Asp-CH_2 de la cadena principal y que sería común a todos los tipos de meros presentes en el polímero; y otra que pertenece al $\beta\text{-CH}_2$ de la cadena lateral asignable únicamente a los meros DC y MC. En el caso ideal de no haber ocurrido ninguna reacción secundaria, la relación entre estas dos señales sería 1:1. La desviación observada indica un cierto grado de meros que no corresponden a los DC y MC del producto principal; sin embargo, cabe mencionar que la presencia de los mismos no actuaría en desmedro de la capacidad de la macromolécula para actuar como vehículo polimérico.

En la Tabla 9 se presentan los resultados de los cálculos de la proporción de las tres categorías de meros antes discutidas. Cabe mencionar que en los casos de las síntesis 1, 2 y 3 se partió del polímero intermedio PASP-AP parcialmente hidrolizado, lo cual se evidencia en el alto porcentaje de hidrólisis en el polímero final PASP-DC-MC. Por otro lado, sin considerar los casos 1, 2 y 3 y tomando en cuenta solamente los casos en que se partió de un PASP-AP puro, la relación entre meros DC y MC varía desde 4:1 hasta 2:1. Esto indica que se ha obtenido una proporción similar o mayor de meros DC a la reportada en la literatura, de 2,3:1.

En lo que respecta al contenido total de meros DC y MC en el polímero, se obtiene que estos constituyen en promedio el 80% de meros del mismo. En este cálculo no se han incluido los polímeros obtenidos en las síntesis 1, 2 y 3 por las razones explicadas en el párrafo anterior.

Tabla 9. Cantidad de meros di-carboximetilados (X), de meros mono-carboximetilados (Y) y meros hidrolizados (Z) por cada 10 meros de PASP-DC-MC.

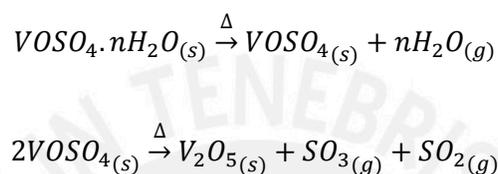
PASP-DC-MC	X	Y	Z
1	3,61	1,78	4,61
2	4,25	2,72	3,03
3	4,74	1,19	4,07
4	6,05	1,70	2,25
5	5,90	1,97	2,13
6	6,28	1,72	2,00
7	5,60	2,63	1,77
8	6,30	1,93	1,77
9	5,68	2,38	1,94
10	5,30	2,67	2,03
11	6,14	1,35	2,51

Finalmente, cabe mencionar que se espera que el peso molecular del vehículo polimérico PASP-DC-MC se encuentre dentro del rango adecuado, es decir, entre 25 y 50 kDa. Se plantea esto pues en el caso del poli(ácido aspártico) sintetizado en la tesis anterior⁴⁷ se partía de PSI en el mismo rango de peso molecular que el utilizado en el presente trabajo y luego de una reacción de hidrólisis a pH 13, considerablemente mayor que el utilizados en las etapas de aminólisis y carboximetilación, se llegaba a pesos moleculares de aproximadamente 30 kDa.

4.4 Determinación de la cantidad equivalente de aguas de hidratación en la sal de oxovanadio (IV) por calcinación

Para obtener el número de equivalentes de agua por mol del reactivo sulfato de vanadilo hidratado, que se utilizará en la síntesis de los complejos, se siguió el procedimiento descrito en el acápite 3.2.4.

Este procedimiento se fundamenta en el hecho de que a altas temperaturas ocurre una oxidación de la especie de vanadio (IV), VO^{2+} , a vanadio (V), V_2O_5 , mientras que las aguas de hidratación y el sulfato se eliminan.



Como se aprecia en la Tabla 10, la cantidad de moles de agua de hidratación por mol de sulfato de vanadilo es aproximadamente de 2,9. Para fines de cálculo posteriores, sin embargo, se redondeará este valor a 3.

Tabla 10. Número de moles de agua por cada mol de sulfato de vanadilo. En el Anexo 4 se presenta un ejemplo de cálculo.

Ensayo	Masa de $VO_{SO_4} \cdot nH_2O$	Masa de V_2O_5	Número de moles de H_2O en una mol de $VO_{SO_4} \cdot nH_2O$
1	83,7	35,3	2,93
2	80,7	34,2	2,87
3	80,9	34,3	2,83

4.5 Poli(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-carboximetil)-aminopropil)-aspartamida])-oxovanadio(IV), el complejo

4.5.1 Análisis de la síntesis

La síntesis del complejo PASP-DC-MC-VO se ha realizado tomando como referencia los trabajos de síntesis de dos conjugados poliaspartamida relacionados estructuralmente: el poliglutamato de vanadilo (realizado por Sakurai y colaboradores)⁴⁶ y el poliaspartato de vanadilo (realizado por una colaboradora de nuestro grupo de investigación para obtener el grado de Magíster en Química)⁴⁷.

Al respecto de este último trabajo, cabe mencionar que en los ensayos hechos para la obtención del poliaspartato de vanadilo se obtuvieron dos tipos de complejos: uno, muy insoluble en agua, que precipitaba durante el transcurso de la síntesis misma y el otro, que se mantenía en solución en el medio de reacción y solo precipitaba por adición de acetona. La formación en gran cantidad del complejo insoluble ocasionó que el rendimiento de aquel hidrosoluble deseado sea bajo, de alrededor del 14%.

En el presente trabajo, al utilizar las condiciones de síntesis de las referencias mencionadas anteriormente, se observó que se presentaba el mismo problema de formación del coproducto insoluble. Por este motivo, y en la búsqueda de aumentar el rendimiento del complejo hidrosoluble, se realizaron numerosos ensayos en los que se variaron, entre otros parámetros, la velocidad de adición de la solución de sulfato de vanadilo a la del vehículo polimérico PASP-DC-MC, las concentraciones iniciales y finales de las soluciones del polímero y del oxovanadio, y la relación molar entre el polímero y el agente activo. Un parámetro importante para este tipo de síntesis, como se estableció en el trabajo anterior, es el pH de la mezcla de reacción. Este debe asegurar, por un lado, una suficiente deprotonación de los grupos carboxílicos del polímero y, por otro, debe evitar una posible hidrólisis del catión oxovanadio (IV), pues esta reacción competitiva contaminaría al conjugado PASP-DC-MC-VO con el sólido insoluble $\text{VO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Esta hidrólisis es propiciada a un pH mayor o igual que 4 – 4,5. En el presente trabajo, todos los ensayos se han realizado a pH 3, el óptimo según lo determinado en el trabajo previamente mencionado.

En cada uno de los ensayos que se describirán a continuación, a menos que se indique lo contrario, se ha utilizado 10 mg del ligando polimérico PASP-DC-MC.

Así, en una primera etapa, se realizaron las síntesis detalladas en la Tabla 11, en las que se varió sistemáticamente las concentraciones finales del ligando polimérico PASP-DC-MC y del agente activo mediante una variación del volumen total de la solución. En todos estos ensayos, se empleó una relación molar 1:1 entre los meros DC del polímero y el catión vanadilo, manteniendo constantes las masas de ambos y la concentración inicial

del polímero. Un ejemplo de cálculo de volúmenes y cantidades de los reactivos utilizados en estos ensayos se muestra en el Anexo 6.

Tabla 11. Primer grupo de ensayos de síntesis de complejo. En todas estas síntesis, se utilizó el PASP-DC-MC 4 como vehículo polimérico.

Ensayo	Relación molar meros DC:VO ²⁺	[PASP-DC-MC] inicial	[VO ²⁺] inicial (mM)	[PASP-DC-MC] final	[VO ²⁺] final (mM)	Volumen total (mL)
A	1 : 1	5%	6,67	0,25%	6,33	4,0
B	1 : 1	5%	5,28	0,20%	5,07	5,0
C	1 : 1	5%	4,73	0,18%	4,56	5,555
D	1 : 1	5%	4,46	0,17%	4,31	5,88
E	1 : 1	5%	4,19	0,16%	4,06	6,25
F	1 : 1	5%	3,90	0,15%	3,78	6,7

Como se puede apreciar, cuando las concentraciones finales del PASP-DC-MC y de VO²⁺ fueron iguales o superiores al 0,18% y 4,56 mM, respectivamente, se obtuvo más cantidad del precipitado inicial insoluble que del complejo deseado. Sin embargo, la situación se invirtió a partir del ensayo C y se optimizó en el E, en que se obtuvo mínima cantidad del sólido indeseado y un rendimiento del complejo hidrosoluble de cerca al 60%, mejorando así el problema de bajos rendimientos en el trabajo antes mencionado con poliaspartato de vanadilo. Curiosamente, una ligera disminución en las concentraciones finales de los reactivos (ensayo F) ocasiona una marcada disminución del rendimiento. Esto se podría atribuir a que la precipitación del complejo con una cantidad razonable de solvente acetona resulta incompleta por debajo de cierta concentración límite.

Tabla 12. Resultados de los ensayos de la Tabla 11.

Ensayo	Masa del precipitado inicial (mg)	Masa del complejo precipitado con solvente (mg)	Rendimiento del complejo precipitado con solvente (%)
A	8,7	0,2	1,7
B	8,0	0,0	0,0
C	0,4	4,0	34,2
D	3,7	5,8	49,6
E	0,3	7,0	59,8
F	0,1	5,0	42,7

Por otro lado, se estudió la influencia de la velocidad de adición sobre la cantidad de precipitado inicial indeseado. Se realizaron dos síntesis en las que se utilizó como línea de base los parámetros del ensayo D (Tabla 11), puesto que en este se obtuvieron cantidades comparables de ambos productos. Las condiciones y resultados se muestran en las Tablas 13 y 14.

Tabla 13. Segundo grupo de ensayos de síntesis del complejo. En todas estas síntesis, se utilizó el PASP-DC-MC 9 como vehículo polimérico.

Ensayo	Relación molar meros DC:VO ²⁺	[PASP-DC-MC] inicial	[VO ²⁺] inicial (mM)	Condiciones de adición
G	1 : 1	5%	4,26	Gota a gota
H	1 : 1	5%	4,26	Directamente todo el contenido

Tabla 14. Resultados de los ensayos de la Tabla 13.

Ensayo	Masa del precipitado inicial (mg)
G	3,5
H	9,0

Se comprobó que añadir demasiado rápido la solución de VO_2SO_4 aumenta en gran medida la cantidad del producto insoluble. Cabe mencionar que en los ensayos detallados en la Tabla 11 se añadió el VO^{2+} gota a gota.

Una vez confirmado el modo apropiado de adición, se introdujo una variación en el solvente utilizado como agente precipitante, con el fin de explorar si esto conducía a un mayor rendimiento del complejo soluble. Se repitió el ensayo E, el mejor de la primera serie de síntesis, utilizando esta vez una mezcla de acetona y dioxano en relación 2:1, en lugar de únicamente acetona. Se obtuvo un alza en el rendimiento de aproximadamente 13%. Sin embargo, el dioxano presenta mayores dificultades que la acetona para su volatilización durante el posterior secado del producto por lo que se descartó utilizarlo en futuras síntesis.

Tabla 15. Tercer grupo de ensayos de síntesis del complejo.

Ensayo	Relación molar meros DC: VO^{2+}	Ensayo de PASP-DC-MC utilizado	[PASP-DC-MC] inicial	[VO^{2+}] inicial (mM)	[PASP-DC-MC] final	[VO^{2+}] final (mM)	Volumen total (mL)
I	2 : 1	8	5%	4,40	0,32%	4,12	3,13
J	3 : 1	8	5%	4,66	0,48%	4,21	2,08
K	4 : 1	8	5%	4,74	0,64%	4,14	1,56
L ^a	5 : 1	9	5%	4,84	0,80%	3,81	3,75
M ^a	6 : 1	9	5%	4,74	0,96%	3,83	3,13

a: Ensayos en los que se partió de 30 mg de PASP-DC-MC.

Para estudiar la influencia de la relación molar entre los meros DC y el catión vanadilo sobre el rendimiento del complejo deseado, se decidió explorar otras variaciones de este parámetro. Se tomó como base el mejor ensayo con dicha relación molar, es decir, el E de la Tabla 11. Las variaciones realizadas se presentan en la Tabla 15.

Tabla 16. Resultados de los ensayos de la Tabla 15.

Ensayo	Masa del precipitado inicial (mg)	Masa del complejo precipitado con solvente (mg)	Rendimiento del complejo precipitado con solvente (%)
I	0,0	6,9	64,7
J	0,0	8,5	81,4
K	0,0	7,2	69,7
L	0,0	19,9	64,8
M	0,0	3,7	12,1

Como se puede apreciar en la tabla, el mayor rendimiento se da en el ensayo con la relación molar 3:1. A relaciones molares superiores, el rendimiento disminuye hasta un mínimo de 12% para la relación molar 6:1. Este decrecimiento se atribuye al progresivo aumento observado de la solubilidad del complejo resultante conforme disminuye su contenido de vanadio, lo que impide lograr su precipitación completa. Sin embargo, según la información proporcionada por los correspondientes espectros FT-IR, los complejos obtenidos, con excepción de aquel con relación molar 2:1, se encuentran, en mayor o menor medida, contaminados con sulfato.

Al respecto, cabe indicar que, justamente, a partir de la síntesis con relación molar 3:1, no fue posible realizar el exhaustivo lavado con agua de los complejos obtenidos por precipitación con acetona, pues esto conducía a pérdidas de rendimiento. Por este motivo, se concluye que el mejor ensayo de este grupo es el I, que corresponde a la relación molar 2:1, en el que incluso se mejora el rendimiento obtenido en el ensayo E.

Para estudiar la influencia de una disminución de la concentración inicial de polímero, de 5% a 1%, se realizó el ensayo S con relación molar 2:1. Se tomó como referencia el

ensayo I de la Tabla 15 con la misma relación molar. Este nuevo ensayo se detalla en la Tabla 17 y sus resultados, en la Tabla 18.

Tabla 17. Cuarto grupo de ensayos de síntesis del complejo. En todas estas síntesis, se utilizó el PASP-DC-MC 7 como vehículo polimérico.

Ensayo	Relación molar meros DC:VO ²⁺	[PASP-DC-MC] inicial	[VO ²⁺] inicial (mM)	[PASP-DC-MC] final	[VO ²⁺] final (mM)	Volumen total (mL)
N	1:1	1%	1	0,04%	0,96	24,040
O	1:1	1%	5	0,17%	4,11	5,610
P	1:1	1%	10	0,30%	6,97	3,305
Q	1:1	1%	20	0,47%	10,72	2,150
R	2:1	1%	1	0,08%	0,92	12,520
S	2:1	1%	5	0,30%	3,49	3,305
T	2:1	1%	10	0,47%	5,36	2,150
U	2:1	1%	20	0,63%	7,31	1,575

A diferencia de la síntesis I, en el ensayo S en cuestión se obtuvo una pequeña cantidad del sólido indeseado y el rendimiento fue 15% más bajo.

Adicionalmente, se exploró el efecto de variaciones en las concentraciones iniciales de VOSO₄. El mejor resultado, con un rendimiento de 80% de complejo deseado, se obtuvo en la síntesis R, en la que se disminuyó 5 veces la [VO²⁺], con respecto a la síntesis S. Por otro lado, se confirmó mediante los ensayos T y U que un aumento de la concentración del catión metálico resultó perjudicial sobre el rendimiento, pues condujo a un predominio de la cantidad de sólido indeseado. De esta manera, se establece que incluso empleando una relación molar favorable, la concentración inicial de vanadilo no debe superar cierto límite máximo para minimizar o eliminar la precipitación del producto insoluble.

Con el fin de extender el estudio de la influencia de la disminución de la concentración inicial del polímero y la consecuente alza de la concentración inicial de catión metálico a las síntesis con relación molar 1:1, se realizaron nuevos ensayos análogos a aquellos recién discutidos con relación 2:1, los que se reportan asimismo en la Tabla 17 y cuyos resultados se muestran en la Tabla 18. En los casos de las síntesis O, P y Q, la combinación de una relación molar 1:1 y las altas concentraciones iniciales y finales de VO^{2+} ocasiona que precipite mayor cantidad del sólido inicial en desmedro del complejo deseado. Esto último es consistente con los resultados obtenidos en los ensayos T y U con relación molar 2:1. En el caso de la síntesis N, la disminución de la concentración de vanadilo hasta 1 mM tuvo como consecuencia que la concentración final del conjugado se reduzca en gran medida, tanto así que no se logró precipitar el complejo a pesar de agregar abundante cantidad de acetona.

Tabla 18. Resultados de los ensayos de la Tabla 17.

Ensayo	Masa del precipitado inicial (mg)	Masa del complejo precipitado con solvente (mg)	Rendimiento del complejo precipitado con solvente (%)
N	0,2	0,0	0,0
O	8,9	2,6	22,5
P	9,9	1,0	8,7
Q	10,3	1,3	11,3
R	0,0	8,7	80,8
S	0,7	5,4	50,1
T	4,8	1,5	13,9
U	7,3	0,0	0,00

Finalmente, se trató de optimizar el ensayo R de la Tabla 17. En base a la experiencia acumulada en ensayos anteriores, se había determinado que a concentraciones muy

bajas del conjugado no se producía una precipitación completa. Por este motivo, se buscó aumentar la concentración final del conjugado sin exceder las concentraciones finales límite establecidas para el polímero y el metal. Además, dada la dificultad práctica generada al trabajar con concentraciones iniciales de PASP-DC-MC de 5% y 1%, en las que el volumen de la solución de vanadilo excedía en gran medida a aquel de la solución de polímero, se buscó la manera de usar volúmenes comparables de ambas soluciones.

Estas consideraciones condujeron a los ensayos V, W y X, que se muestran en la Tabla 19. Como se puede apreciar, se han utilizado concentraciones finales de polímero y vanadilo iguales al doble de las utilizadas en el ensayo R. Además, se logró utilizar volúmenes comparables de ambas soluciones.

Tabla 19. Quinto grupo de ensayos de síntesis del complejo.

Ensayo	Relación molar DC:VO ²⁺	Ensayo de PASP-DC-MC utilizado	[PASP-DC-MC] inicial	[VO ²⁺] inicial (mM)	[PASP-DC-MC] final	[VO ²⁺] final (mM)	Volumen total (mL)
V ^a	2 : 1	7	0,25%	5,16	0,16%	1,86	15,625
W ^a	2 : 1	9	0,25%	5,57	0,16%	2,01	15,625
X ^b	2 : 1	9	0,25%	5,68	0,16%	2,05	25

a: ensayos en los que se partió de 25 mg de PASP-DC-MC

b: ensayo en el que se partió de 40 mg de PASP-DC-MC

Mediante estos ensayos se confirmó la premisa de que un aumento de la concentración final del conjugado, con respecto al ensayo R, resultaría beneficioso para el rendimiento del producto, siempre que no exceda cierto límite auto-establecido, como se comprobó con los ensayos de las Tablas 11 y 17.

El rendimiento de estos últimos ensayos se ubica entre 91% y 94%, aproximadamente, lo que representa una mejora significativa con respecto al ensayo R. Además, al igual que en dicho ensayo, se evitó totalmente la formación del sólido insoluble y se superó el problema práctico de trabajar con volúmenes tan distintos entre sí.

Tabla 20. Resultados de los ensayos de la Tabla 19.

Ensayo	Masa del precipitado inicial (mg)	Masa del complejo precipitado con solvente (mg)	Rendimiento del complejo precipitado con solvente (%)
V	0,0	24,4	90,6
W	0,0	25,4	93,7
X	0,0	40,1	92,3

4.5.2 Caracterización y discusión de resultados

Los productos obtenidos por precipitación con acetona fueron analizados por espectroscopías IR y UV-vis; además, se determinó su contenido de vanadio por la técnica de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (*Inductively Coupled Plasma*, ICP). Por otro lado, los sólidos iniciales insolubles fueron caracterizados por IR e ICP.

En las Figuras 25 y 26, se presentan los espectros IR de ambos tipos de productos para el caso en que la proporción entre los meros dicarboximetilados y el catión vanadilo es de 1:1. Los espectros mostrados corresponden a la síntesis D y son representativos de todas las síntesis con esta relación molar.

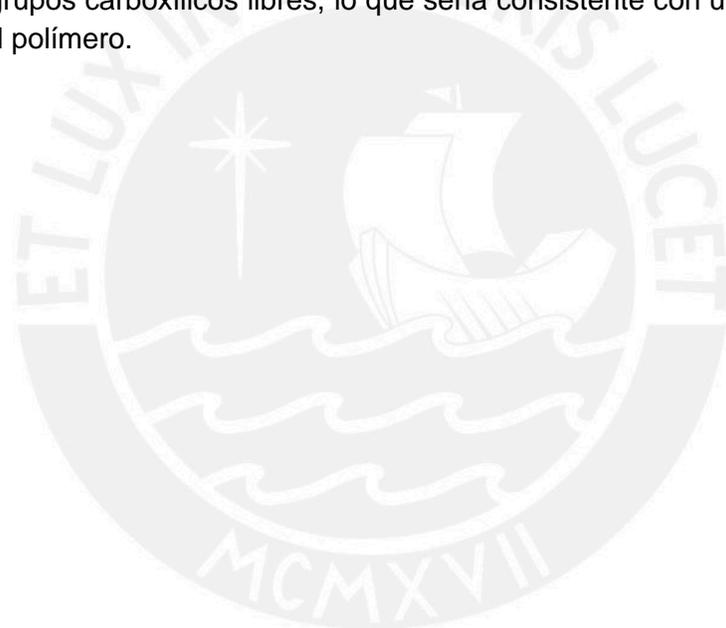
En el espectro IR mostrado en la Figura 25 se aprecian las bandas características de los grupos funcionales del ligando polimérico. A 3429 cm^{-1} , se observa la banda de estiramiento del grupo N-H de la amida; a 1642 cm^{-1} , el estiramiento C=O de la amida I, superpuesto con el asimétrico del grupo COO^- . La flexión N-H de la amida II aparece ahora como un hombro, a 1547 cm^{-1} , a la derecha de la banda a 1642 cm^{-1} , lo que evidencia un desplazamiento hacia menores frecuencias de la señal correspondiente al estiramiento asimétrico del COO^- . Esto último sería consecuente con la complejación de dicho grupo al catión vanadilo. Por otro lado, en la zona de la banda del estiramiento simétrico del grupo COO^- del polímero se observan dos señales, a 1403 y 1385 cm^{-1} . La primera podría asignarse al $\nu_s\text{ COO}^-$ de grupos carboxilatos no coordinados, en tanto que la segunda podría pertenecer a aquellos complejados.

Finalmente, en el espectro en discusión, a diferencia de aquel del polímero, no se observan las bandas características de los grupos COOH, $\nu\text{ CO}$ a 1714 y $\delta\text{ OH}$ a 1365

cm^{-1} . Esto es consistente con el hecho de que la complejación del catión vanadilo al polímero demanda una deprotonación de los grupos carboxílicos.

Asimismo, la complejación del catión vanadilo a los grupos carboxilato da lugar a una intensa banda a 976 cm^{-1} , que corresponde al estiramiento $\text{V}=\text{O}$ del catión oxovanadio (IV). Esta banda se encuentra considerablemente desplazada hacia menores frecuencias con respecto a la de la sal sulfato de vanadilo, en donde aparece aproximadamente a 993 cm^{-1} , lo que concuerda con una efectiva complejación del catión metálico a los meros di-carboximetilados del polímero.

El espectro IR del sólido inicial insoluble es muy similar al del complejo precipitado con acetona. La diferencia más relevante es la aparición de un hombro a la izquierda de la intensa banda de absorción a 1635 cm^{-1} . Esta nueva señal, a 1745 cm^{-1} , corresponde al estiramiento $\nu \text{ C}=\text{O}$ del grupo COOH y pone en evidencia la presencia de una cantidad significativa de grupos carboxílicos libres, lo que sería consistente con un menor grado de complejación del polímero.



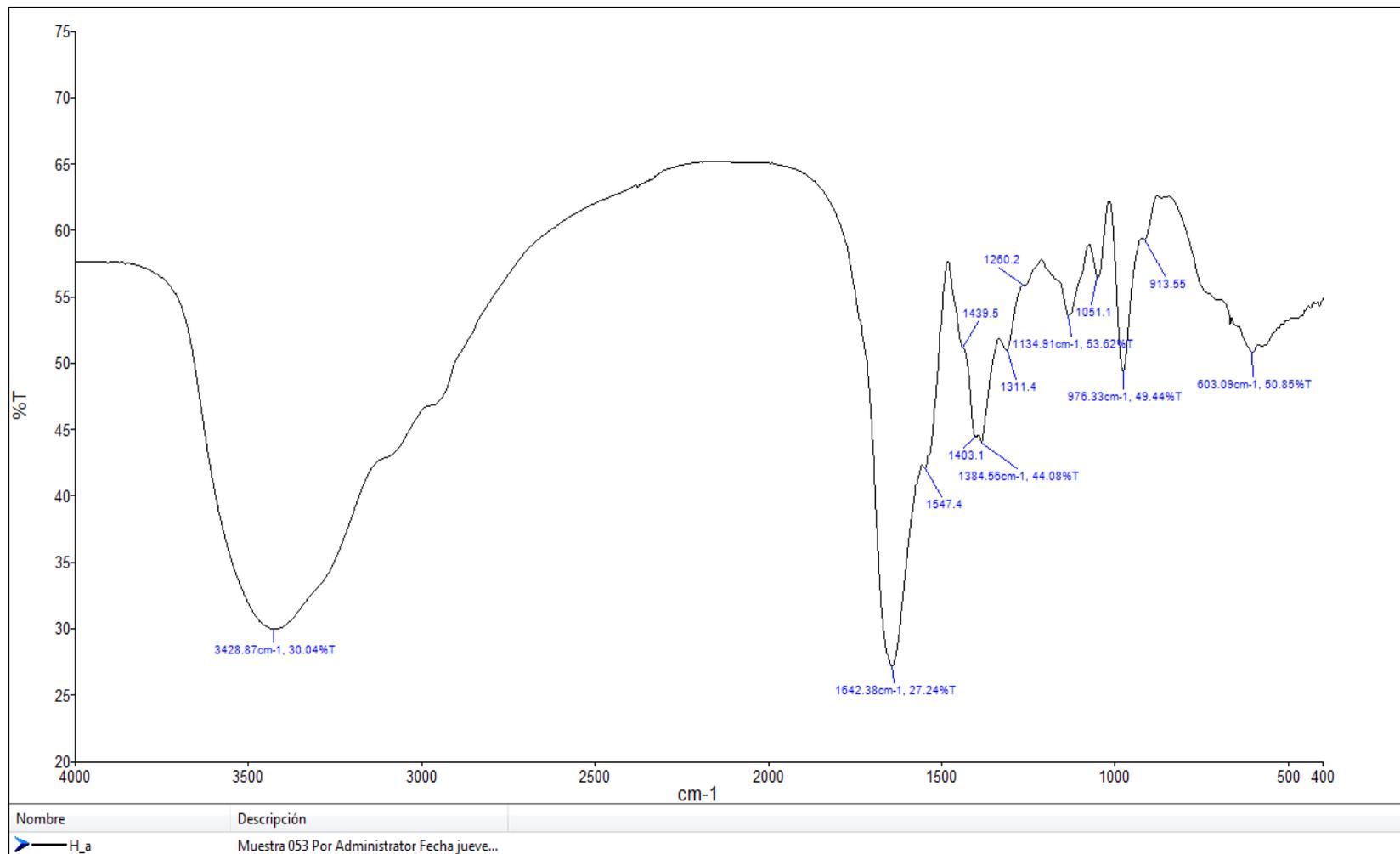


Figura 25. Espectro IR del sólido precipitado con acetona de la síntesis D en KBr.

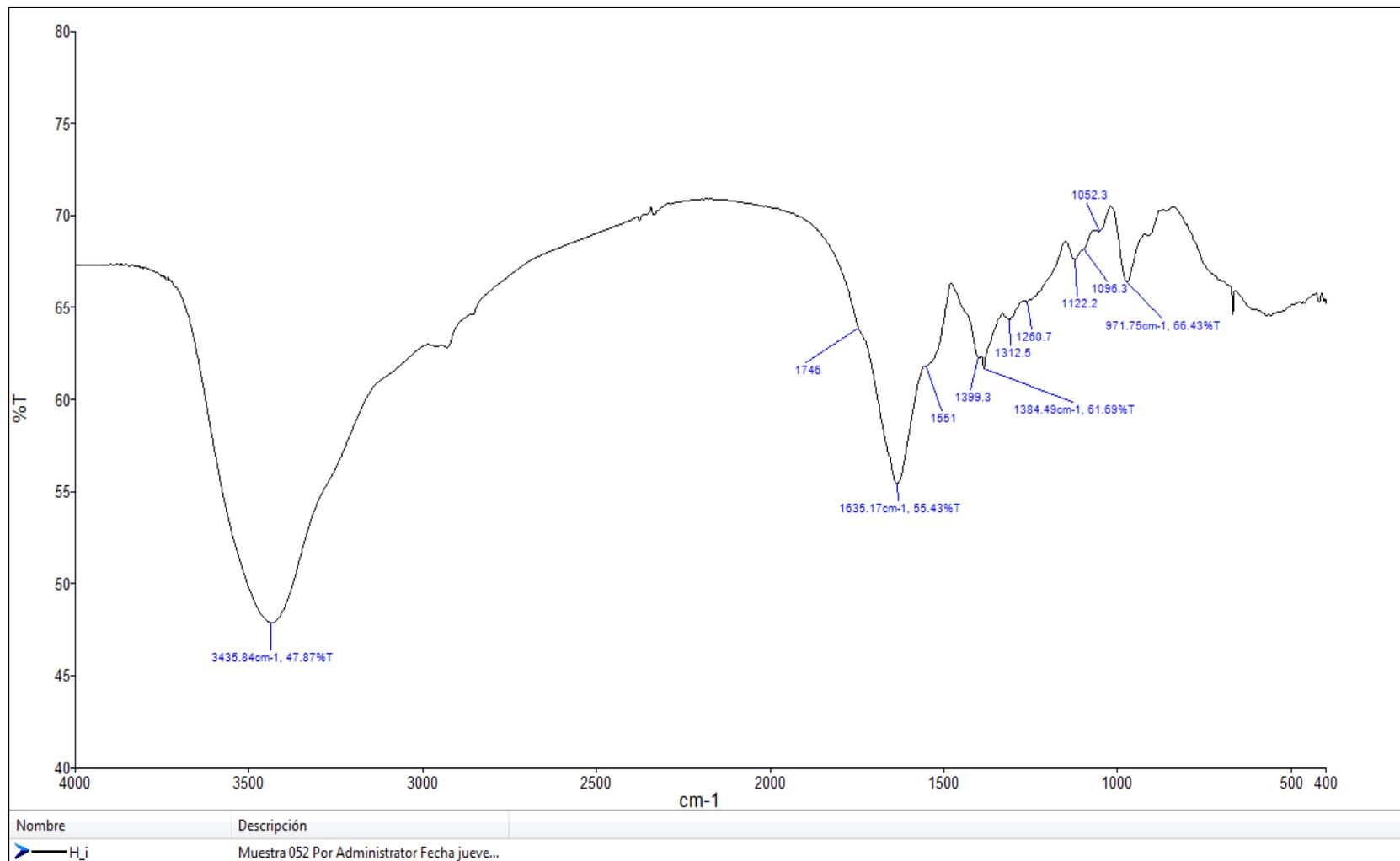


Figura 26. Espectro IR del precipitado inicial insoluble de la síntesis D en KBr.

Para determinar el contenido de vanadio de ambos tipos de sólidos, el inicial insoluble y el precipitado con acetona, se aplicó la técnica de ICP. Con este fin, se sintetizó un complejo a condiciones similares a las del ensayo D de la Tabla 11, en el que la cantidad obtenida de ambos productos fue semejante. Los espectros IR de ambos sólidos se pueden observar en los Anexos 7 y 8. Los resultados del análisis, mostrados en la Tabla 21, indican un menor contenido de vanadio del sólido inicial insoluble. Esto concuerda con lo concluido a partir de la interpretación comparativa de los espectros IR de ambos productos, donde se propuso un menor grado de complejación para este caso.

Tabla 21. Contenido de vanadio determinado por ICP

Ensayo	% de vanadio*
Sólido inicial ensayo Y	7,09
Sólido precipitado con acetona ensayo Y	10,46

* El valor teórico de contenido de vanadio del sólido precipitado con acetona para este ensayo es de 9,71%. Para el cálculo se consideró que el VO^{2+} se encuentra coordinado por dos grupos carboxilato de modo monodentado y por dos moléculas de agua.

Además, al realizar una comparación de estos resultados con los del trabajo anterior del poliaspartato de vanadilo⁴⁷ para una síntesis comparable en cuanto a relación molar utilizada, se encuentra que el porcentaje de vanadio del sólido inicial indeseado fue también considerablemente menor que el porcentaje para el producto precipitado con acetona.

Por otro lado, se obtuvieron los espectros IR de los productos de los ensayos en los que la relación molar entre los meros dicarboximetilados del polímero y el catión vanadilo fue de 2:1. En la Figura 27, se puede apreciar el espectro correspondiente a la síntesis V, que es representativo de todos los ensayos con esta relación molar. Cabe mencionar que, como en las síntesis 2:1 más exitosas no ocurrió precipitación del sólido inicial insoluble los espectros de estos productos indeseados no serán, en este caso, motivo de discusión.

En comparación con el espectro de la Figura 25 del sólido con relación molar 1:1, el espectro del complejo de la síntesis V presenta una única diferencia significativa: la presencia de un hombro a la izquierda de la intensa señal a 1642 cm^{-1} . La presencia de este hombro, que corresponde al estiramiento $\nu\text{ C=O}$ del grupo COOH y que también se encuentra presente en el espectro del sólido inicial insoluble de las síntesis 1:1 (Figura 26), es consistente con un menor grado de complejación del polímero dada la menor cantidad de vanadilo utilizado en los ensayos 2:1.

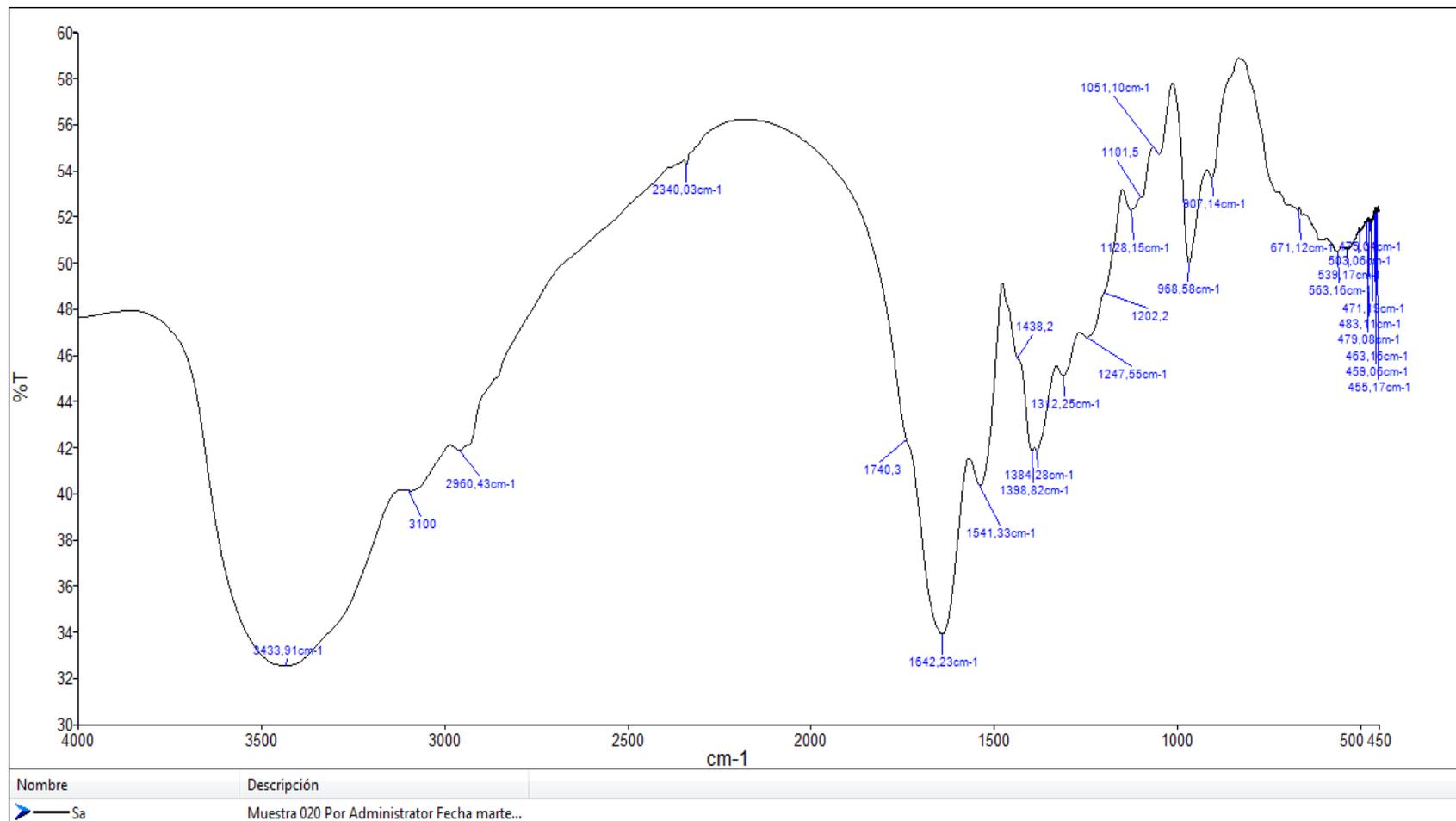


Figura 27. Espectro IR del sólido precipitado con acetona de la síntesis V en KBr.

El menor grado de complejación para los ensayos con relación molar 2:1 fue comprobado con la técnica de ICP. Así, se determinó que el porcentaje de vanadio de las síntesis que condujeron a mayores rendimientos del producto deseado, W y X (ensayos mostrados en la Tabla 19), fue de alrededor de 5,8%. Este valor es, como sería de esperar, aproximadamente la mitad del porcentaje de vanadio obtenido en el caso análogo del ensayo Y (mostrado en la Tabla 21).

De acuerdo a la discusión realizada hasta el momento de los espectros IR y de los resultados de la técnica de ICP, se puede concluir que los dos tipos de sólidos, el precipitado inicial insoluble y los precipitados con acetona, son todos complejos del vehículo polimérico PASP-DC-MC con el catión vanadilo. La única diferencia entre estos productos radica en la cantidad de catión metálico complejado.

En este sentido, resulta curioso *a priori*, al considerar, por un lado, la altísima solubilidad en agua del portador polimérico y, por otro, la rigidez introducida en cada cadena polimérica por un mayor grado de complejación del metal, que el complejo insoluble contenga menos vanadilo que aquel precipitable con acetona, como se aprecia en la Tabla 21. No obstante, esto resulta consistente con un posible entrecruzamiento de distintas cadenas poliméricas por medio del catión metálico, que actuaría como puente entre ellas. Aparentemente, añadir VO^{2+} en concentraciones relativamente altas a la solución del ligando polimérico, que al pH 3 de trabajo se encuentra predominantemente protonado, ocasiona que se forme rápidamente el complejo entrecruzado, el cual, debido a su reducida flexibilidad, es insoluble y precipita. Por otro lado, el polímero remanente en solución, a concentraciones tales que ya no propician el entrecruzamiento, paulatinamente va deprotonándose y complejando VO^{2+} hasta llegar a saturarse coordinativamente.

Todo lo expuesto concuerda, además, con los resultados de los ensayos descritos en el acápite 4.5.1, de los que se concluyó que una alta concentración inicial de vanadilo en solución propiciaba la precipitación del sólido inicial indeseado. Asimismo, se observó que otro factor que influyó sobre la generación de este sólido fue la velocidad de adición de la solución de vanadilo, puesto que la cantidad del mismo disminuía cuando se agregaba lentamente, como se reportó en la Tabla 15. Esto último se podría asociar a que una rápida adición del catión metálico genera una concentración local muy alta al momento de la adición que, como se acaba de mencionar, propicia el entrecruzamiento.

En lo referente al espectro electrónico, se sabe que la mayoría de los oxocomplejos de vanadio(IV) estudiados presentan tres bandas de baja intensidad correspondientes a transiciones d-d. Comúnmente, estas bandas se localizan entre unos márgenes de 625 – 909 nm, 527 – 687 nm y 333 – 500 nm, con esta última normalmente solapada por bandas de transferencia de carga más intensas.⁵⁵

De acuerdo al modelo de Ballhausen - Gray⁵⁶, los orbitales d del vanadio, para el caso del $\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5^{2+}$, se desdoblan, como consecuencia de la distorsión de la geometría octaédrica ideal por el acortamiento del enlace múltiple VO, en la forma que indica la Figura 28. Al respecto, cabe señalar que el conjugado PASP-DC-MC-VO presentaría desdoblamiento similares, pues solamente se estarían reemplazando dos moléculas de H_2O en el plano ecuatorial por dos ligandos carboxílicos. Por tanto, se propone que la asignación de las bandas en el espectro UV-vis del complejo poliaspartamida-vanadilo sea muy similar a la del acuaión VO^{2+} .

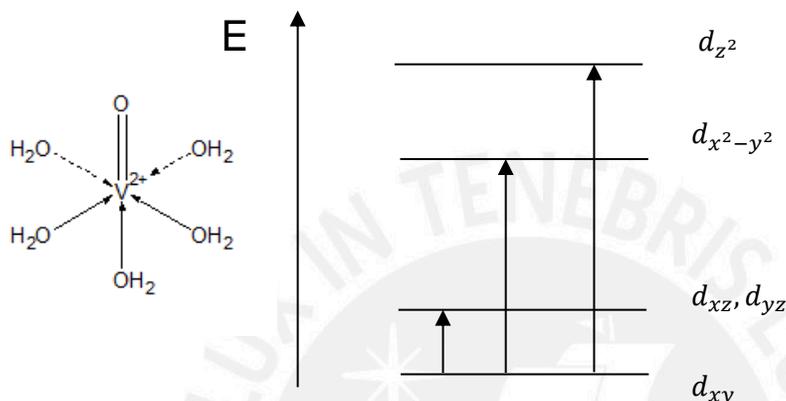


Figura 28. Desdoblamiento de los orbitales de vanadilo, para el caso del catión $\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5^{2+}$, de acuerdo al modelo de Ballhausen – Gray.⁵⁵

En el caso particular del espectro UV-vis del conjugado con relación molar 2:1, la banda a 771 nm corresponde a la transición $d_{xy} \rightarrow d_{xz}, d_{yz}$ y el hombro a 593 nm, a la transición $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$. Como es usual, la tercera banda de mayor energía, correspondiente a la transición $d_{xy} \rightarrow d_{z^2}$, se encuentra enmascarada por una intensa banda de transferencia de carga ligando carboxilato – metal en la región ultravioleta, que se extiende hasta el rango visible. Los desplazamientos de las dos primeras bandas, con respecto a las observadas para el $\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5^{2+}$ (Anexo 9), demuestran la complejación del catión vanadilo a los grupos carboxilato del portador, el cual no presenta absorción alguna la región de interés de su respectivo espectro electrónico (Anexo 10).

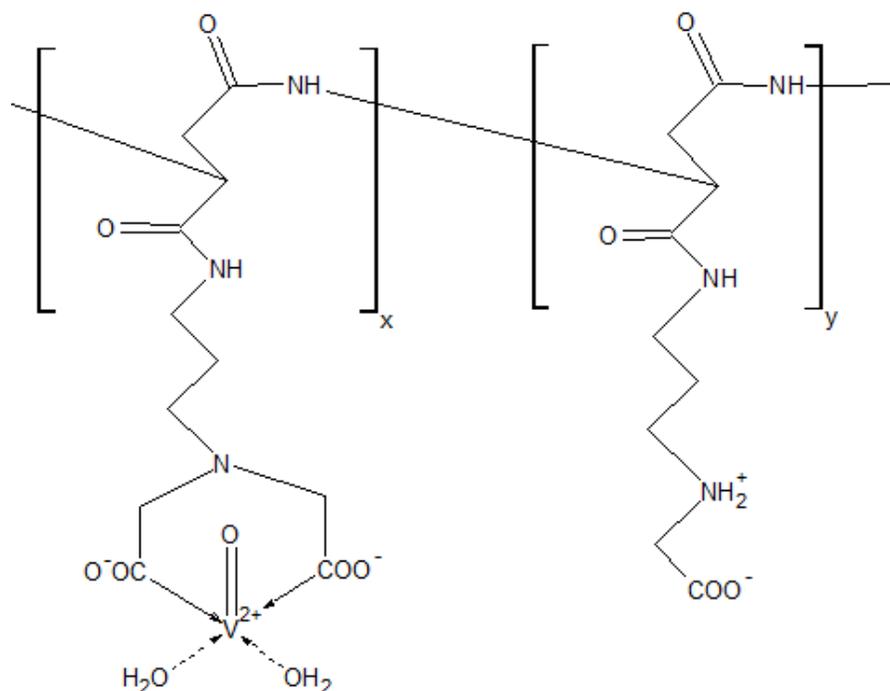


Figura 29. Estructura propuesta para el complejo PASP-DC-MC-VO.

En lo que respecta al modo de coordinación de los complejos sintetizados, se ha reportado que valores altos de $\Delta[v_{as}(\text{COO}^-) - v_s(\text{COO}^-)]$ en el espectro IR indican que los grupos carboxilato coordinan de modo monodentado al catión vanadilo.⁵⁷ Precisamente, en los espectros mostrados en las Figuras 25, 26 y 27 se puede observar que dicha diferencia es igual a 239, 236 y 244 cm^{-1} , respectivamente. Asimismo, Sakurai y colaboradores han utilizado la técnica EPR en un conjugado poliglutamato-oxovanadio (IV) y determinaron que los grupos carboxilato del polímero portador complejan al metal de modo monodentado. En base a lo anterior, se propone una coordinación monodentada de grupos carboxilato de la cadena lateral del polímero al metal, probablemente de un mero di-carboximetilado que coordinaría más efectivamente al agente activo que los meros mono-carboximetilados. La coordinación al metal se completaría, entonces, con dos o tres moléculas de agua para dar lugar a una geometría de pirámide cuadrada u octaédrica en el conjugado. (Figura 29)

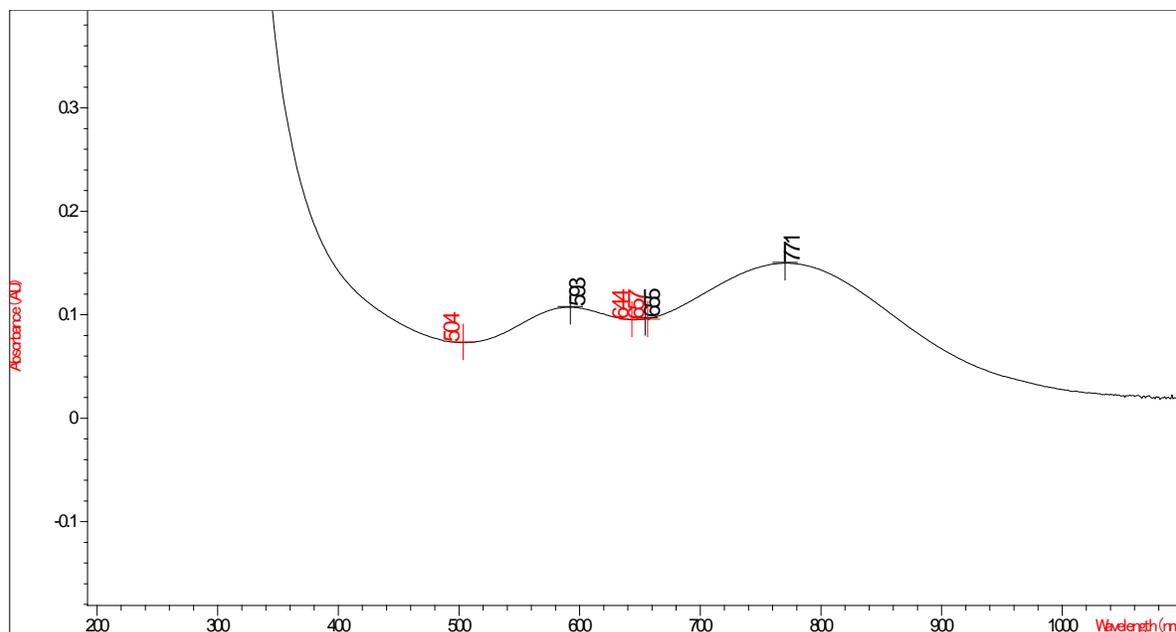


Figura 30. Espectro UV-vis de un conjugado con relación molar 2:1.

Finalmente, con respecto a la solubilidad de los complejos precipitados con acetona, se ha comprobado que a menor cantidad de vanadio en el complejo, la hidrosolubilidad aumenta. Así, mientras que fue imposible redissolver en agua los complejos con relación molar 1:1 entre meros di-carboximetilados y catión vanadilo, aquellos con relación molar 3:1 o superior se redisolvieron sin problemas. Esto se atribuye al hecho de que, dada la alta movilidad de las cadenas de polímero, es posible que ocurra entrecruzamiento incluso en estado sólido.⁵⁸

5 Conclusiones

1. Se logró sintetizar con éxito el complejo poli(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-)carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]-oxovanadio(IV), objetivo del presente trabajo, por un método desarrollado en nuestro laboratorio. Dicho complejo fue obtenido bajo diversas condiciones de síntesis, tales como diferente proporción molar entre meros di-carboximetilados y catión vanadilo, y diferentes concentraciones de los reactivos. Todos los ensayos fueron realizados en medio acuoso, a pH 3 y con un tiempo de reacción de 24 horas a temperatura ambiente.
2. El porcentaje de rendimiento más elevado de la síntesis del complejo PASP-DC-MC-VO se obtuvo empleando una relación molar de 2:1 entre los meros di-carboximetilados del polímero y el catión vanadilo y a bajas concentraciones finales de los reactivos (0,16% para el polímero y alrededor de 2 mM para el VO^{2+}). Bajo estas condiciones, se alcanzaron rendimientos de hasta 93% y un contenido de vanadio de entre 5,7% y 5,9%, según análisis por ICP. Esto último concuerda con el porcentaje esperado teóricamente para esta relación molar.
3. En el caso del complejo sintetizado con relación molar de 1 : 1, el contenido de vanadio, 10,4% según el análisis por ICP, denota saturación coordinativa de los meros di-carboximetilados.
4. Los espectros IR y UV-visible de los sólidos obtenidos por precipitación con acetona demuestran la efectiva complejación del vanadilo al polímero vía los grupos carboxílicos terminales. Dada la similitud en la naturaleza de los grupos funcionales ligantes del PASP-DC-MC con aquellos del poliglutamato, en cuyo caso se demostró un modo de coordinación monodentado de los grupos carboxilato al vanadilo, y la semejanza entre los espectros UV-vis del $\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5^{2+}$ y el conjugado poliaspartamida-VO, se propone una geometría octaédrica o pirámidal cuadrada, con dos posiciones ecuatoriales ocupadas por oxígenos de un mero di-carboximetilado y completada con dos o tres moléculas de agua.
5. El sólido inicial insoluble, obtenido en las síntesis con relación molar 1:1, es también un complejo. El contenido de vanadio para este co-producto es de 7,1%, lo que evidencia un menor grado de complejación en comparación con el sólido precipitado por acetona y además es consistente con la presencia de grupos carboxílicos protonados en su espectro IR. Se propone que la insolubilidad y el menor contenido de vanadio de este producto deriven de un posible entrecruzamiento de las cadenas poliméricas mediante el catión vanadilo que actúa como puente entre ellas.
6. Se logró obtener con altos rendimientos el vehículo polimérico poli(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-)carboximetil)-aminopropil)-

aspartamida]) de acuerdo a un método previamente reportado. Asimismo, se caracterizó de forma más completa este polímero con las técnicas COSY y HSQC, lográndose asignar todas sus señales en el espectro $^1\text{H-RMN}$, las cuales no se encontraban reportadas en la literatura especializada.

7. Este polímero cumple con las características necesarias para su desarrollo como un potencial vehículo de transporte y entrega del agente insulino mimético oxovanadio (IV). Dadas sus particulares características estructurales, el polímero sintetizado representa una mejora importante con respecto al poli(ácido aspártico) utilizado en un trabajo de tesis anterior.
8. Finalmente, se logró obtener con buenos rendimientos y alta buena pureza los polímeros precursores poli- $\alpha,\beta\text{-D,L-[N-(3-aminopropil)-aspartamida]}$ y polisuccinimida, de acuerdo a métodos previamente reportados. En el caso particular de la polisuccinimida, se determinó que su peso molecular, obtenido por viscosimetría capilar, se encuentra entre 47 y 58 kDa. Esto último resulta conveniente para que en las posteriores derivatizaciones del polímero se obtenga un peso molecular M_w dentro del rango deseado (25 – 50 kDa en polímeros lineales) para una efectiva aplicación del mismo como vehículo polimérico del catión VO^{2+} .

6 Recomendaciones

1. Con el fin de maximizar el rendimiento del complejo precipitado con acetona en el caso de la síntesis con relación molar 1:1 entre meros di-carboximetilados y el catión vanadilo, que corresponde a la saturación coordinativa, se propone investigar otros métodos de aislamiento del producto distintos a la precipitación con solvente acetona. Por ejemplo, liofilizar o evaporar a sequedad el solvente agua utilizado durante la síntesis, luego de haber realizado una purificación de la mezcla de reacción por diálisis.
2. Asimismo, se propone evaluar la actividad insulino mimética *in vitro* e *in vivo* del nuevo conjugado PASP-DC-MC-VO en comparación con la del complejo poliaspartato de vanadilo, sintetizado en un trabajo de tesis anterior de nuestro grupo de investigación, utilizando como patrón el complejo molecular bis(etilmaltolato)oxovanadio (IV).
3. Finalmente, se propone la síntesis de un nuevo vehículo polimérico, similar al Poli-(α,β -D,L-[N-(3-di(carboximetil)aminopropil)-aspartamida]-co-[N-(3-)carboximetil)-aminopropil)-aspartamida]) (PASP-DC-MC), con grupos solubilizantes que cumplan exclusivamente esta función y no sean capaces de ligar al catión oxovanadio(IV). De esta manera, se evitarían las complicaciones experimentales derivadas de la presencia de grupos ligantes-solubilizantes libres responsables de un posible entrecruzamiento de las cadenas poliméricas.

7 Bibliografía

1. Goldfine, I. D.; Youngren, J. F. Contributions of the American Journal of Physiology to the discovery of insulin. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 204, 207-209, 1998.
2. *Mosby. Enciclopedia de Medicina y Enfermería.* Océano: Barcelona, España. Edición de 1987.
3. http://idf.org/sites/default/files/5E_IDFAtlasPoster_2012_ES.pdf. Revisado el 11 de julio de 2013.
4. <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/foreword>. Revisado el 11 de julio de 2013.
5. <http://andina.com.pe/Espanol/noticia-mas-dos-millones-personas-padecen-diabetes-el-peru-estiman-435745.aspx#.Ud8t0EflZEg>. Revisado el 11 de julio de 2013.
6. http://www.app.minsa.gob.pe/bsc/Detalle_IndBSC.asp?lcind=10&lcobj=3&lcper=1&lcfreq=21/6/2013. Revisado el 11 de julio del 2013.
7. Skyler, J. S. Diabetes mellitus: Pathogenesis and Treatment Strategies. *J. Med. Chem.* 47, 4113-4117, 2004.
8. <http://www.odf.org/diabetes/5E/what-is-diabetes>. Revisado el 11 de julio del 2013.
9. Ross, S. A.; Gulve, E. A.; Wang, M. Chemistry and Biochemistry of Type 2 Diabetes. *Chem. Rev.* 104, 1255-1282, 2004.
10. Inzucchi, S. E. Oral Antihyperglycemic Therapy for Type 2 Diabetes. *Scientific review and clinical applications.* 287, 3, 360-372, 2002.
11. Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principios de Bioquímica.* W. H. Freeman & company: Barcelona, España. Edición de 2005.
12. <http://www2.fiu.edu/~leeswj/insulin.jpg>. Revisado el 12 de Julio de 2013.
13. Jansen, J.; Karges, W.; Rink, L. Zinc and diabetes – clinical links and molecular mechanisms. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 20, 399-417, 2009.
14. Lin, Yi; Sun, Zhongjie. Current views on type 2 diabetes. *Journal of Endocrinology.* 204, 1-11, 2010.
15. Shepherd, P. R.; Kahn, B. B. Implications for Insulin Resistance and Diabetes Mellitus. *The New England Journal of Medicine.* 341, 4, 248-257, 1999.

16. Thompson, K. H.; McNeill, J. H.; Orvig, C. Vanadium Compounds as Insulin Mimics. *Chem. Rev.* 99, 2561-2571, 1999.
17. Brichard, S. M.; Henquin, J. C. The role of Vanadium in the management of diabetes. *Trends in Pharmacological Sciences.* 16, 265-270, 1995.
18. Atkins, P.; Overton, T. *Shriver & Atkins Química Inorgánica.* McGraw Hill Interamericana: México D.F., México. Cuarta edición, 2008.
19. Guevara, J. A. *Educación Química.* 7, 185-189, 1996.
20. Marzaban, L.; McNeill, John H. Insulin-like actions of vanadium: Potential as therapeutic agent. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine.* 16, 253-267, 2003.
21. Leeson, P.D.; Davis, A.M. Time-Related Differences in the Physical Property Profiles of Oral Drugs. *J. Med. Chem.* 47, 6338-6348, 2004.
22. Thompson, K.H.; Orvig, C.J. Design of vanadium compounds as insulin enhancing agents. *Chem. Soc. Dalton Trans.* 2885-2892, 2000.
23. Thompson, K.H.; Orvig, C.J. Vanadium in diabetes: 100 years from Phase 0 to Phase I. *Inorg. Biochem.* 100, 1925-1935, 2006.
24. Thompson, K. H.; Lichter, J.; LeBel, C.; Scaife, M. C.; McNeill, J. H.; Orvig, C. Vanadium treatment of type 2 diabetes: A view to the future. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 103, 554-558, 2009.
25. Neuse, E.W. Synthetic Polymers as Drug-Delivery Vehicles in Medicine. *Metal-Based Drugs.* 1-19, 2008.
26. Duncan, R. The Dawnings Era of Polymer Therapeutics. *Drug Discovery.* 2, 347-360, 2003.
27. Fox, M.; Szoka F.; Fréchet, J. Soluble Polymer Carriers for the Treatment of Cancer: The Importance of Molecular Architecture. *Acc. Chem. Res.* 42 (8), 1141-1151, 2009
28. Komane, L. L.; Mukaya, E. H.; Neuse, E. W.; van Rensburg, C. E. J. Macromolecular Antiproliferative Agents Featuring Dicarboxylato-Chelated Platinum. *J Inorg Organomet Polym.* 18, 111-123, 2008.

29. Duncan, R. Development of HPMA copolymer-anticancer conjugates: Clinical experience and lessons learnt. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 61, 1131-1148, 2009.
30. Tang, Gu-Ping; Zhu, K. J.; Chen, Q. Q. Poly- α,β -(3-Hydroxypropyl)-DL-Aspartamide: A New Drug Carrier. *Journal of Applied Polymer Science*. 77, 2411-2417, 2000.
31. Duncan, R. Soluble Synthetic Polymers as Potencial Drug Carriers. *Advances in Polymer Science*. 51-101, 1984.
32. Ohya, Y.; Oue, H.; Nagatomi, K.; Ouchi, T. Design of Macromolecular Prodrug of Cisplatin Using Dextran with Branched Galactose Units as Targeting Moieties to *Hepatoma* Cells. *Biomacromolecules*. 2, 927-933, 2001.
33. Kofuji, Kyioko; Qian, Chun-Jun; Murata, Yoshifumi; Kawashima, Susumu. The controlled release of insulin-mimetic metal ions by the multifunction of chitosan. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 99 (6), 1329-1334, 2005.
34. 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. *Chem. Med. Chem.* 2, 1607-1612, 2007.
35. Karmaker, S.; Saha, T.; Yoshikawa, Y.; Sakurai, H. Vanadyl-poly(γ -glutamic acid) complexes as oral therapeutics agents for the treatment of type 1 like diabetic mice. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 4(5), 235-243, 2010.
36. Galli, C.; Salas, P.; Pacheco, J. Actividad Insulino-Mimética del Vanadio. *Revista de Química*. XX, 3-10, 2006.
37. Galli, C.; Salas, P.; Pacheco, J. Diseño de Agentes Antidiabéticos de Vanadio: Desarrollo y Avances Recientes. *Revista de Química*. XXI, 37-48, 2007.
38. Sakurai, H.; Katoh, A.; Yoshikawa, Y. Chemistry and Biochemistry of Insulin-Mimetic Vanadium and Zinc Complexes. Trial for Treatment of Diabetes Mellitus. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 79 (11), 1645-1664, 2006.
39. Proyecto DAI 2005-3028, Síntesis de complejos de oxovanadio(IV) con ligandos de la familia de la cumarina-3-ácido carboxílico y estudio de su actividad insulino-mimética *in vivo* en ratas de la cepa Sprague-Dawley.
40. Proyecto DAI 2006-3245, Evaluación integral de la actividad insulino-mimética oral *in vivo* de complejos cumarínicos de oxovanadio(IV) y síntesis de nuevos complejos con ligandos fenólicos de comprobada acción hipoglicemiante.

41. Proyecto DAI 2008-4053, Síntesis y caracterización de nuevos complejos cumarínicos de zinc(II) con potencial aplicación como metalofármacos antidiabéticos.
42. Proyecto DGI 2010-0071, Síntesis y caracterización de alfa,beta-poli(D,L-ácido aspártico) como nuevo vehículo polimérico para complejación, transporte e ingreso intracelular más efectivo del agente antidiabético oxovanadio(IV).
43. Trouet, A.; Masquelier, M.; Baurain, R.; Deprez-De Campeneere, D. A covalent linkage between daunorubicin and proteins that is stable in serum and reversible by lysosomal hydrolases, as required for a lysosomotropic drug-carrier conjugate: In vitro and in vivo studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79, 626-629, 1982.
44. Caldwell, G.; Neuse, E.W.; van Rensburg, E. J. Cytotoxic activity of two polyaspartamide based monoamineplatinum(II) conjugates against the HeLa cancer cell line. *Appl. Organometal. Chem.* 13, 189–194, 1999.
45. Neuse E.W.; Ntshengedzeni, M; Humphrey, M; Johnson, M.T. Synthesis and preliminary *in vitro* evaluation of polymeric dicarboxylato- and dihydroxilato-platinum(II) chelates as antiproliferative agents. *Polym. Adv. Technol.* 13, 884-895, 2002.
46. Karmaker, S.; Saha, T.; Yoshikawa, Y.; Yasui, H.; Sakurai, H. A novel drug delivery system for type 1 diabetes: Insulin-mimetic vanadyl-poly(γ -glutamic acid) complex. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 100, 1535-1546, 2006.
47. Zegarra, C. Síntesis de un nuevo vehículo polimérico alfa,beta-poli(D,L-ácido aspártico) del agente activo antidiabético oxovanadio (IV). Tesis para optar el grado de Magíster en Química. Pontificia Universidad Católica del Perú, 2012.
48. Neri, P; Antoni, G. Alpha, Beta-Poly(2-Hydroxyethyl)-DL-Aspartamide, A New Plasma Expander, *Journal of Medicinal Chemistry.* 16 (8), 893-897, 1973.
49. Odian, G. *Principles of Polymerization.* Wiley–Interscience: Staten Island, New York. Cuarta edición, 2004.
50. Schmitt, S.; Neuse, E. W.; Perlwitz, A. G. Water-soluble polyamides as potential drug carriers, III. Relative main-chain stabilities of side chain-functionalized aspartamide polymers on aqueous-phase dialysis. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie.* 192 (3300), 35 -50, 1991.

51. Machado, M. De L.; Neuse, E. W.; Perlwitz, A. G. Water-soluble polyamides as potential drug carriers, V. Carboxy-functionalized polyaspartamides and copolyaspartamides. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*. 195 (3347), 35-56, 1992.
52. Neri, P.; Antoni, G. Alpha, Beta-Poly(2-Hydroxyethyl)-DL-Aspartamide, *Macromolecular Syntheses*. 8, 25-28, 1982.
53. Blasotto, E.; Lopes, M.; Firemand, C. *Química Experimental de Polímeros*. Edgard Blücher LTDA: Brasil. Edición de 2004.
54. Matsubara, K.; Nakato, T.; Tomida, M. ^1H and ^{13}C NMR Characterization of Poly(succinimide) Prepared by Thermal Polycondensation of L-Aspartic Acid. *Macromolecules*. 30, 2395-2312, 1997.
55. Cuenca Salas, L. Complejos de oxovanadio (IV) con arilhidrazinas y aroilhidrazonas. Tesis para optar el grado de Doctor en Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, 1994.
56. Ballhausen, C.J.; Gray, Harry B. The Electronic Structure of the Vanadyl Ion. *Inorganic Chemistry*. 1, 111-122, 1962.
57. Deacon, G; Phillips, R. Relationships between the Carbo-Oxygen Stretching Frequencies of Carboxylato Complexes and the Type of Carboxylate Coordination. *Coordination Chemistry Reviews*. 33, 227-250, 1980.
58. Neuse, E. W.; Perlwitz, A.G. *Water-Soluble Polymers*. ACS Symposium Series: United States of America. Edición de 1991.