

2.1. Disolventes y reactivos

Los disolventes y reactivos utilizados fueron de grado analítico o superior y, en general, se utilizaron sin purificación adicional. En los casos en que fue necesario algún tipo de precaución o tratamiento especial, se siguieron los procedimientos descritos por Riddick y Bunger (1970). Los tratamientos seguidos con algunos de estos productos se describen a continuación.

Diclorometano (DCM) P.A. (Merck): se agitó sobre Na_2CO_3 durante una hora, se filtró y se dejó agitando una noche sobre CaCl_2 . El producto se destiló fraccionadamente recogiendo la fracción que destila a 39-40 °C.

Eter etílico anhidro P.A. (Panreac, agua < 0.01%), benceno P.A. (Panreac, agua <0.03%) y xileno P.A. (Merck) se trataron con sodio hilado.

El tetrabutóxido de titanio se mantuvo siempre bajo atmósfera de nitrógeno.

Los alcoholes usados para las transesterificaciones fueron suministrados por Aldrich o Merck. Algunas propiedades de estos alcoholes, de interés para este trabajo, se muestran en la **Tabla 2.1**.

Tabla 2.1. Propiedades de los *n*-alcoholes utilizados en este trabajo.

Alcohol	F. M.	M (g·mol ⁻¹)	p.f. (°C)	p.e. (°C)	Solubilidad
metanol	CH ₄ O	32.0		64.6	
etanol	C ₂ H ₆ O	46.0		78.0	
1-butanol	C ₄ H ₁₀ O	74.1		117.7	
1-hexanol	C ₆ H ₁₄ O	102.2	-52	156.5	
1-octanol	C ₈ H ₁₈ O	130.2	-15	196.0	
1-decanol	C ₁₀ H ₂₂ O	158.3	7	231.0	
1-dodecanol	C ₁₂ H ₂₆ O	186.3	24-27	261.0	EtOH, éter
1-tetradecanol	C ₁₄ H ₃₀ O	214.4	38-40	289.0	éter
1-hexadecanol	C ₁₆ H ₃₄ O	242.4	54-56	307.0	EtOH, CHCl ₃ , éter
1-octadecanol	C ₁₈ H ₃₈ O	270.5	60-61	335.0	EtOH, éter, acetona
1-eicosanol	C ₂₀ H ₄₂ O	298.6	64-66	356.0	acetona, benceno
1-docosanol	C ₂₂ H ₄₆ O	326.6	65-72	188.0/0.22 mmHg	EtOH, CHCl ₃

Tampón fosfato 50 mM, pH 7.0: se mezclaron 1.36 g de KH_2PO_4 (10 mmoles) y 7.12 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (40 mmoles) en 800 mL de H_2O MilliQ, se ajustó el pH a 7.0 con NaOH y el volumen final se llevó a 1 L. Se añadió azida sódica.

Medio E: Se disolvieron, en unos 800 mL de agua, 20 g de ácido L-glutámico, 12 g de ácido cítrico, 80 g de glicerina, 7 g de NH_4Cl , 0.5 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.04 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.15 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 0.104 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. El pH se ajustó a 7.4 con NaOH y el volumen final se llevó a 1 L.

2.2. Procedimientos de síntesis de carácter general

2.2.1. (S)-4-benciloxicarbonil-2-azetidiona (lactama de bencilo)

Se preparó a partir del ácido L-aspártico siguiendo el método descrito por Saltzman y col. (1980) y fue modificado más tarde por Rodríguez-Galán y col. (1986). El método consta de cuatro etapas que se muestran en la **Figura 2.1** y que se describen a continuación.

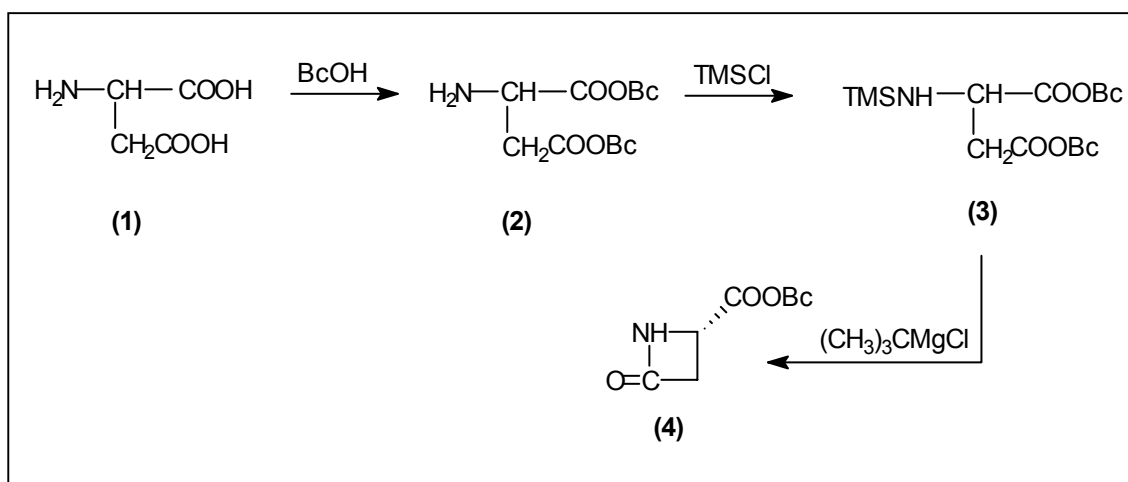


Figura 2.1. Obtención de la (S)-4-benciloxicarbonil-2-azetidiona (lactama de bencilo).

***p*-Toluensulfonato del L-aspartato de dibencilo (*p*-TSA*Di*Bc):**

En un balón equipado con una columna tipo Dean & Star se colocaron 90 g (0.68 moles) de ácido L-aspartico (**1**), 134 g (0.70 moles) de ácido *p*-toluensulfónico monohidratado, 267 mL (2.56 moles) de alcohol bencílico y 200 mL de benceno. La mezcla se calentó a 80 °C durante aproximadamente 12 horas hasta que cesó la formación de agua. Se dejó enfriar y el producto se precipitó con éter, se filtró y se recristalizó en isopropanol caliente. Tras filtrar y lavar con isopropanol, se obtuvieron 305 g de *p*-TSA*Di*Bc (rendimiento 93%, p.f. 155-156 °C).

L-Aspartato de dibencilo (2**):**

A una solución acuosa de Na₂CO₃ (35g en 300 mL H₂O) se añadieron 80 g (0.1649 moles) de *p*-TSA*Di*Bc y se dejó agitando durante una hora. El producto se extrajo con éter, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el éter con ayuda de un rotavapor hasta peso constante. Se obtuvieron 51.3 g (0.1638 moles) de (**2**) en forma de aceite (rendimiento 99.3%).

***N*-Trimetilsilil L-aspartato de dibencilo (**3**):**

A una solución de 51.3 g (0.1638 moles) de (**2**) en 400 mL de éter a 0 °C se añadieron gota a gota y bajo atmósfera de nitrógeno seco 23.2 mL (0.185 moles) de cloruro de trimetilsililo. La mezcla se agitó durante una hora cuidando de mantener constante la temperatura. Posteriormente se añadieron 25.5 mL (0.182 moles) de trietilamina disuelta en 46 mL de éter. La mezcla se mantuvo agitando durante una noche. El clorhidrato de trietilamina formado se filtró bajo atmósfera de nitrógeno y el filtrado se evaporó hasta sequedad obteniéndose 60.5 g de producto (**3**) (rendimiento 96%).

Cloruro de *terc*-butilmagnesio (Puntambeker y Zoellner, 1956):

En un balón de tres bocas de 500 mL de capacidad, equipado con una columna de reflujo con tubo de CaCl₂, una llave y un embudo de adición, se introdujeron 9 g de Mg y una escama de I₂ bajo corriente de N₂. El embudo de adición se llenó con una disolución de 34.5 mL de 2-cloro-2-metilpropano en 250 mL de éter seco. Para iniciar

la reacción, se añadió, bajo fuerte agitación magnética, una quinta parte del volumen de la disolución contenida en el embudo sobre el magnesio. El comienzo de la reacción se evidenció por la formación de una gran cantidad de burbujas en el seno del líquido y por la desaparición del color amarillento del yodo que cambia gradualmente a grisáceo. El recipiente se enfrió introduciéndolo en un baño de agua-hielo hasta que cesó el burbujeo. En ese momento se retiró el baño y se añadió gota a gota el resto de la disolución que contenía el cloruro de alquilo, proceso que duró alrededor de 2 horas. Una vez finalizada la adición, la mezcla de reacción se dejó agitando durante media hora más y se filtró por succión con un embudo de placa porosa del nº 3 bajo atmósfera de nitrógeno con el fin de eliminar los restos de magnesio sin reaccionar. La solución etérea del reactivo se guardó en un recipiente cerrado bajo N₂. La concentración del magnesiano se determinó valorando con una disolución 1 M de alcohol sec-butílico en xileno, utilizando 2,2'-biquinolina como indicador (Watson y col., 1967). Todo el proceso de valoración se efectuó bajo atmósfera de N₂.

4-(S)-Benciloxicarbonil-2-azetidionona (4):

A una disolución de 60.5 g (0.1570 moles) de **3** en 260 mL de éter a -8 °C bajo atmósfera de nitrógeno seco se añadieron gota a gota 260 mL de una disolución 0.48 M de cloruro de *terc*-butilmagnesio (0.1248 moles) previamente preparada y valorada. La mezcla se agitó durante 2 horas a baja temperatura y luego durante la noche a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla se hidrolizó a 0 °C con una solución 1 M de HCl saturada con NH₄Cl hasta obtener un pH de 1-2. La fase acuosa se extrajo con éter y luego con acetato de etilo. El disolvente se evaporó con la ayuda de un rotavapor y la lactama cristalizó durante el proceso de concentración. Se obtuvieron 10.2 g de producto (0.049 moles) (rendimiento del 40%). Se pudieron obtener cantidades adicionales de lactama por cristalización del aceite restante con acetato de etilo/éter de petróleo o metanol. El producto se recrystalizó en una mezcla de metanol/cloroformo 4:1 (p.f. 139-140 °C).

2.2.2. Pirrolidona sódica (Coutin, 1973)

Bajo atmósfera de nitrógeno seco se cortan 0.22 g de sodio y se pesan dentro de un vaso con 20 mL de éter seco. Tanto el sodio como el éter se introducen en un balón de tres bocas de 100 mL de capacidad saturado con nitrógeno y, bajo corriente del mismo gas, se añaden otros 30 mL de éter y 1.47 mL (1.68 g) de pirrolidona de grado espectroscópico (Aldrich). La mezcla se mantiene agitando durante 24 horas a temperatura ambiente con el balón conectado a una columna de cloruro de calcio para proteger de la humedad la reacción. Transcurrido este tiempo, la pirrolidona sódica (sólido blanco higroscópico), se filtró por succión en una placa porosa del número 4 bajo fuerte corriente de nitrógeno y se pulverizó sobre el mismo embudo hasta obtener un polvo suelto. Posteriormente se colocó en un desecador a vacío conectado a una bomba durante una hora para eliminar los restos de disolvente. El producto se guarda a vacío hasta el momento de ser utilizado. Preparando el catalizador de esta manera es recomendable usarlo antes de 48 horas, aunque guardado bajo condiciones anhidras puede mantener su actividad durante dos o tres semanas.

2.3. Biosíntesis. Cultivo e inoculación

La cepa utilizada fue *Bacillus licheniformis* NCIMB 11709 (ATCC 9945 A) de la colección nacional de bacterias industriales y marinas de Gran Bretaña. Se seleccionaron las colonias más mucosas y se hicieron crecer aeróbicamente durante 5 días a 37 °C, en frascos de Roux que contenían 150 mL de un medio compuesto de 23 g de agar nutriente y 5 g de extracto de levadura por litro de disolución. El crecimiento de bacterias se recuperó por arrastre con bolitas de vidrio y agua esterilizada. Las bacterias se lavaron con agua 3 veces y se centrifugaron descartándose el sobrenadante. El sedimento bacteriano se resuspendió en agua y se mantuvo a 65 °C durante 20 min para asegurar la esporulación y matar las células vegetativas. A continuación la suspensión se enfrió a -20 °C y se guardó a esta temperatura hasta su uso. El inóculo se preparó con una concentración superior a $3 \cdot 10^7$ cfu por cada 100 mL del medio de cultivo usado para la fermentación, que fue el medio E (Leonard y

col., 1958). La suspensión de bacterias que se utilizó como inóculo se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

2.4. Degradación por ultrasonidos

El ácido poli(γ -glutámico) de composición enantiomérica mayoritaria en D y que presentó una $[\eta]_{\text{DMSO}} = 5 \text{ dL}\cdot\text{g}^{-1}$ se irradió mediante ultrasonidos en NMP durante aproximadamente 1 h, hasta que la $[\eta]_{\text{DMSO}}$ descendió a $1.6\text{-}1.8 \text{ dL}\cdot\text{g}^{-1}$. Para este fin se utilizó un generador Branson B-12 operando a una potencia de 50 W. Las vibraciones ultrasónicas se introdujeron en la disolución de polímero mediante un transductor o punzón de material cerámico. El recipiente utilizado para contener la disolución del polímero es una celda Rosset provista de ramas laterales que promueven la recirculación del líquido y, por consiguiente, la existencia de un medio más homogéneo durante el proceso de sonicación. El sistema se introdujo en un baño termostatzado a 0 °C para evitar un sobrecalentamiento de la disolución debido a la cavitación producida durante el proceso de irradiación.

2.5. Determinación de pesos moleculares

2.5.1. Viscosimetría

Las mediciones de viscosidad se realizaron en viscosímetros Cannon-Ubbelohde CUSMU 50 y 100 termostatzados a 25 ± 0.1 °C. Los poliglutamatos de cadenas laterales largas se disolvieron en CHCl_3 o en THF. El PAAG-2 se disolvió en dimetilsulfóxido o en NMP que contenía un 2% (p/v) de LiCl y el poliácido en DMSO o en tampón fosfato. En cuanto a los poliaspartatos, las viscosidades se determinaron en ácido dicloroacético (DCA). La concentración inicial fue de aproximadamente $1 \text{ g}\cdot\text{dL}^{-1}$, diluyéndose posteriormente hasta $0.25\text{-}0.30 \text{ g}\cdot\text{dL}^{-1}$.

Los pesos moleculares de los PAAG-*n* de cadenas largas se determinaron mediante la ecuación $[\eta] = (1.29 \pm 0.35) \cdot 10^{-5} M_w^{1.29 \pm 0.09}$ ($[\eta]$ en $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$) obtenida por Poché y col. (1990) para el poli(γ -estearil α ,L-glutamato) en THF a 25 °C. Las

viscosidades de los coPAAG-18,2 (a:b) se midieron en DCA y en CHCl_3 , puesto que sólo el copolímero de composición 90:10 fue soluble en THF. Los pesos moleculares se determinaron utilizando la ecuación $[\eta]=2.9 \cdot 10^{-4} Mv^{0.74}$, ($[\eta]$ en $\text{dL} \cdot \text{g}^{-1}$) obtenida por Tanaka (1972) para el poli(γ -metil α ,L-glutamato) en DCA. Las viscosidades de disoluciones de poliaspartatos se midieron en DCA y, para la determinación de los pesos moleculares se utilizó además de la ecuación de Tanaka (1972), la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada $[\eta]=2.78 \cdot 10^{-5} Mv^{0.87}$ ($[\eta]$ en $\text{dL} \cdot \text{g}^{-1}$) establecida para el poli(γ -bencil α ,L-glutamato) por Doty y col. (1956).

2.5.2. SEC y SEC/LS

Los pesos moleculares promedio en número y en peso (M_n y M_w) de los PGGAs se determinaron en un equipo de SEC Perkin-Elmer equipado con dos columnas lineales de ultrahidrogel y un detector UV que opera a 210 nm. Se utilizaron patrones de POE para la calibración sin ninguna otra corrección. El eluyente fue tampón fosfato 50 mM a pH 7.0. Se inyectaron volúmenes de muestra de 20-100 μL que contenían 0.4 % (p/v) de polímero, manteniéndose la fase móvil a un flujo de 0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

La determinación de los pesos moleculares de los poli(γ -glutamato)s de cadena larga mediante SEC/LS, se llevó a cabo en el Departamento de Química Analítica y Orgánica de la Universidad Rovira i Virgili (Tarragona). Se utilizó un sistema cromatográfico que constaba de una bomba WATERS 510; una precolumna Waters SHODEX K800P y tres columnas lineales en serie de Polymer Laboratories: una columna SHODEX K80M ($2 \cdot 10^3$ - $4 \cdot 10^6$, 47 300 platos teóricos/m), una columna PLGEL 5 μ MIXED-D ($2 \cdot 10^2$ - $4 \cdot 10^5$, 70 800 platos teóricos/m) y una columna PLGEL 3 μ MIXED-E (10^2 - $3 \cdot 10^4$ con 97 200 platos teóricos/m).

Las columnas estaban conectadas a un detector de dispersión de luz miniDAWN con fotómetro láser (Wyatt Technology Corporation) y un detector de índice de refracción Shimadzu RID-6A. El tratamiento matemático de los datos se realizó con el programa ASTRETTE versión 1.2 de Wyatt Technology. Como patrón interno se utilizó *o*-diclorobenceno al 90-95%. El disolvente de trabajo fue THF MALLINCRODT

ChronAR HPLC previamente desgasificado con Helio que fue bombeado a un flujo de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. En cada ensayo se inyectó del orden de $2.5\cdot 10^{-4}$ g de muestra mediante un *loop* de $100 \mu\text{L}$. Antes de preparar las muestras todos los polímeros se prefiltraron a través de un filtro de tamaño de poro $0.22 \mu\text{m}$. Antes de la inyección las muestras preparadas se filtraron a través de un filtro MILLEX-FG (Millipore) de tamaño de poro $0.20 \mu\text{m}$ y se inyectaron por triplicado. Para calibrar el detector de índice de refracción se utilizaron 7 disoluciones de un poliestireno de peso molecular $\sim 212\ 000$ de concentraciones entre 0.5 y $3.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ que se inyectaron por triplicado. El detector de dispersión de la luz se calibró con tolueno de grado HPLC (Promochem). Dado que no se conoce cómo varía el índice de refracción de los polímeros obtenidos con la concentración, los pesos moleculares se determinaron mediante el método de la masa.

2.6. Análisis configuracional

a) Poli(α -alquil γ -glutamato)s. La configuración de estos polímeros se determinó mediante un método desarrollado para la determinación cuantitativa de la composición enantiomérica de mezclas de aminoácidos (Marfey, 1984). Dicho método fue utilizado por Cromwick y Gross (1995a) y fue puesta a punto para el análisis del PGGA en nuestro laboratorio por Pérez-Camero y col. (1999). El método está basado en la resolución cromatográfica del par de diastereoisómeros que se obtiene al reaccionar el 1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-L-alanina (F-DNP-L-Ala-NH₂) con la mezcla de los dos aminoácidos enantiómeros D y L.

Para llevar a cabo la determinación, tanto del PGGA como sus ésteres, las muestras se hidrolizaron en una disolución de HCl 6N a $110 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Para ello se tomó la cantidad necesaria de cada polímero para obtener concentraciones de ácido glutámico 50 mM . Los polímeros se introdujeron en tubos de hidrólisis junto con 2 mL de HCl 6N, se congelaron con nieve carbónica en acetona y se sellaron a vacío. Tras 24 h a $110 \text{ }^\circ\text{C}$ se abrieron los tubos, se tomaron $100 \mu\text{L}$ de cada muestra y se secaron con una corriente de nitrógeno. Las muestras se redisolviéron en $100 \mu\text{L}$ de agua y se hicieron reaccionar a $35\text{-}40 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 h , con $200 \mu\text{L}$ de una disolución al

0.5% p/v del reactivo de Marfey (F-DNP-L-Ala-NH₂) en acetona que contenía 20 µL de NaHCO₃ 1M. Una vez concluida la reacción, se neutralizó el medio con 10 µL de HCl 2N y se dejó secar durante una noche sobre un deshidratante energético como es el NaOH. Finalmente el producto seco se disolvió en 0.35 mL de DMSO para la inyección en la columna de HPLC.

El sistema de cromatografía está compuesto por los siguientes elementos: una bomba de inyección Perkin Elmer binaria LC 250, un sistema de inyección Rheodyne, un detector por absorbancia de Applied Biosystems modelo 785 A y una columna de fase reversa Spherisorb ODS2 de 5 µ de tamaño de poro y dimensiones 25 x 0.46 cm de longitud y diámetro respectivamente. Como eluyente se usó una mezcla 80:20 de fosfato de trietilamonio (50 mM, pH = 3.0) y acetonitrilo. El flujo fue de 2 mL·min⁻¹ y el tiempo total de elución de 25 minutos. El detector utilizado fue de absorción en el ultravioleta (λ= 340 nm). El tiempo de retención del isómero L fue de 6.75 min y el del isómero D de 10 min. El contenido en cada enantiómero se calculó a partir de las áreas de los picos de cada diastereoisómero. Previamente se efectuó una curva de calibrado construida a partir de mezclas derivatizadas de ácidos D y L-glutámicos comerciales.

b) Poli(α-alkil β,L-aspartato)s. Para estos polímeros se efectuó el análisis configuracional empleando dos técnicas. La primera es la misma que se ha utilizado para los PAAG-*n*, y ya se ha descrito en el apartado anterior. El tiempo de retención del isómero L fue de 7.2 min y el del isómero D de 9.6 min.

La segunda técnica consiste en determinar la rotación específica de los hidrolizados de los PAALA-*n*, que se compararon con la rotación específica del PABLA (polímero de partida para la reacción de transesterificación) y con la del ácido L-aspartico sometidos a las mismas condiciones de hidrólisis que los PAALA-*n*, el procedimiento fue utilizado por García Alvarez en su Tesis Doctoral (1997a).

Para la hidrólisis de las muestras se tomaron unos 50 mg de cada polímero que se introdujeron en tubos de hidrólisis junto con 2 mL de HCl 6 N. Los tubos se

cerraron tal como se ha indicado para los PAAG-*n*. Tras 24 h a 110 °C se abrieron los tubos y se filtraron sus contenidos. El líquido filtrado se evaporó a sequedad. Se añadieron 2 mL de agua, se evaporó nuevamente y se repitió dos veces esta operación.

Unos 15 mg de cada muestra se disolvieron en 2 mL de HCl 6N que contenía una cantidad comparable y conocida de glicina. Se midió la rotación óptica en un polarímetro Perkin Elmer 241 MC, del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Barcelona. Se utilizó una celda de 10 cm de longitud y un volumen aproximado de 1 mL, a 25 °C y utilizando una radiación correspondiente a la raya D del sodio (589 nm).

La glicina, que al ser ópticamente inactiva no influye en la medida de la rotación óptica, se empleó como patrón interno en el analizador de aminoácidos con el fin de determinar la concentración de ácido aspártico en las muestras usadas en el polarímetro.

El analizador de aminoácidos utilizado es un analizador automático Beckman System 6300. Se ha utilizado el programa de elución con sales de sodio, en una columna de 250 mm de longitud y 4 mm de diámetro recubierta con una resina polisulfonada de intercambio catiónico y un sistema de detección post-columna por reacción con ninhidrina.

El porcentaje de racemización (% R) se calculó de la siguiente manera:

$$\% R = \frac{[\alpha]_L - [\alpha]_H}{[\alpha]_L} \times 100$$

siendo $[\alpha]_L$ la rotación específica del ácido L-aspártico sometido a las mismas condiciones de hidrólisis que los polímeros y $[\alpha]_H$ la rotación específica de los polímeros hidrolizados. Teniendo en cuenta que tanto el PABLA como el ácido L-aspártico se racemizan durante la hidrólisis, se puede calcular una racemización neta (R_{neta}) de la siguiente manera:

$$R_{\text{neta}} = R_H - R_{\text{PABLA,H}}$$

o bien

$$R_{\text{neta}} = R_{\text{H}} - R_{\text{L}}$$

siendo $R_{\text{PABLA,H}}$ la racemización del PABLA hidrolizado, R_{H} la racemización de cada polímero hidrolizado y R_{L} la racemización que sufre el ácido L-aspártico.

2.7. Espectroscopias RMN e IR

Los espectros de RMN se realizaron en un equipo Bruker AMX300 de nuestro grupo que operan a 300.13 y 70.48 MHz para ^1H y ^{13}C respectivamente. Como referencia interna se empleó tetrametilsilano (TMS) y la sal sódica del ácido 3-(trimetilsilil)-propanosulfónico. Los espectros correspondientes al PGGGA se realizaron en agua deuterada (D_2O) y NaOD, mientras que los de los ésteres se llevaron a cabo en una mezcla de deuterocloroformo (CDCl_3) y ácido trifluoroacético (TFA). Las concentraciones utilizadas para los espectros de ^1H y ^{13}C fueron de 2-5 y 25-30 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente.

Los espectros de ^{13}C en estado sólido se registraron mediante la técnica de CP-MAS/RMN en el espectrómetro Bruker AMX300 equipado con un accesorio CP-MAS y una unidad de temperatura variable. Los espectros fueron obtenidos a diferentes temperaturas en un intervalo comprendido entre 25 y 80°C y registrados a 75.5 MHz. Se emplearon muestras de 50-200 mg diluidas en KBr y giradas a una velocidad de 3.9-4.2 KHz en un rotor cilíndrico cerámico. Todos los espectros fueron adquiridos con un tiempo de contacto de 2 ms, un tiempo de espera entre pulsos de 10 s y se acumularon entre 256 y 1024 adquisiciones. La anchura espectral fue de 31.2 KHz y el número de puntos de 4 K. Los desplazamientos químicos fueron calibrados externamente en función del pico que aparece a campo más alto del adamantado (29.5 ppm relativo al TMS).

Para el análisis por espectroscopia infrarroja se utilizó un espectrofotómetro FTIR Perkin Elmer 2000. El análisis de los poliglutamatos y de los poliaspartatos se realizó a partir de películas obtenidas por evaporación de sus disoluciones, en general

en CHCl_3 o mezclas de CHCl_3 y TFE, o bien CHCl_3 y TFA. Los espectros del ácido poli(γ -glutámico) se registraron en pastillas de KBr.

La **espectroscopia infrarroja de polarización (DIR)** es una técnica muy útil en el estudio conformacional de polímeros en estado sólido, puesto que es particularmente sensible a la orientación espacial de los diferentes grupos funcionales. Las medidas de la absorbancia de los diferentes grupos cromóforos con radiación polarizada en función de la orientación, permiten determinar el momento de transición y obtener información sobre la disposición del mismo en la conformación del polímero.

Para los estudios de DIR es imprescindible el uso de muestras orientadas por lo que Ambrose y Elliott (1951) desarrollaron un procedimiento para la orientación de la poliglicina. Para ello se dispersa el polímero en una matriz de poliestireno y posteriormente se estira de manera que se orientan tanto la matriz como la poliglicina. Ingwall y col. (1975) incorporaron muestras de poli(γ -etil α ,L-glutamato) y gramicina S en películas de poli(óxido de etileno) (POE) y las orientaron posteriormente por estiramiento uniaxial. Así obtuvieron muestras parcialmente orientadas tanto de oligómeros sintéticos derivados del ácido glutámico como de polipéptidos de alto peso molecular. Las características espectroscópicas del POE en el infrarrojo lo convierten en un material particularmente apropiado para el análisis de los polipéptidos debido a que no presenta absorciones en la mayoría de las zonas de interés de estos polímeros, especialmente en la zona de las vibraciones de tensión asociadas al grupo amida. La alta solubilidad en agua y en disolventes orgánicos tales como cloroformo, TFE o HFIP y la gran facilidad con la que se pueden orientar las películas de este polímero mediante tensión mecánica, hacen del POE una matriz idónea para estudios de esta naturaleza en poliamidas.

Al estirar una muestra de una poliamida semicristalina, estamos orientando preferentemente la fase cristalina inmersa en una matriz amorfa. Dentro de cada cristal, el grupo peptídico deberá estar alineado siempre de la misma manera, esto implica también la orientación de los vectores de los momentos de transición de las diferentes bandas correspondientes a los enlaces implicados. Los enlaces presentes en el grupo amida se encuentran dentro de un mismo plano (el llamado plano peptídico), donde los valores de los ángulos formados por los mismos es siempre

cercano a 120° ($O=C-N$: 123.5° ; $O=C-C$: 120.5° ; $C-N-C$: 122°). En la **Tabla 2.2** se detallan las medidas experimentales de los ángulos que forman los momentos de transición de las diferentes bandas correspondientes al grupo amida con el enlace $C=O$ de este grupo, tal y como se citan en la bibliografía para el poli(γ -bencil α,L -glutamato).

Tabla 2.2. Angulo formado entre el vector del momento de transición y el enlace $C=O$ del grupo amida.

Autores	amida A	amida I	amida II
Sandeman, 1955	+11 o -8°	+22 $^\circ(\pm 2)$	+72 o -57°
Abbott y Elliott, 1956	+8 $^\circ$	+17 $^\circ$	+68, +77 $^\circ$ (doble)
Bradbury y Elliott, 1963	+8 o -28°	entre +15 y 25 $^\circ$	+73 o -37°
Ingwall y col., 1975	+8 $^\circ$	+20 $^\circ$	+73 $^\circ$

En la práctica se hace variar el ángulo de incidencia de la radiación infrarroja polarizada con respecto a la dirección de orientación de la muestra (θ) y se registran los espectros IR cuando esta incide de forma paralela ($\theta = 0^\circ$), y perpendicular ($\theta = 90^\circ$) al eje de estiramiento. El cociente entre las medidas de la absorbancia para estas dos orientaciones (relación dicroica) es utilizado para calcular el ángulo entre el momento de transición de la banda analizada y el eje de estiramiento de la muestra. El radio dicroico puede tomar valores entre 0 e ∞ , y θ puede ser calculado a partir de las ecuaciones dadas por Fraser (1958).

Para la adquisición de los espectros de dicroísmo IR se usó un polarizador de oro suministrado por la casa Perkin Elmer. Dicho polarizador consta de un sistema mecánico que permite variar el ángulo del haz incidente polarizado respecto al eje de orientación de la muestra entre 0 (paralelo) y 90° (perpendicular). El barrido de fondo se realizó con un ángulo de 45° , intermedio entre los utilizados para determinar la relación dicroica.

Las películas utilizadas para este estudio fueron preparadas a partir de disoluciones diluidas de cloroformo o bien de cloroformo/TFE. Las muestras se orientaron por estiramiento en las mismas condiciones que las muestras para difracción de rayos X, y el espesor de los filmes se restringe a unas pocas micras con el fin de que las muestras no absorban demasiado (Ley de Lambert-Beer). Este hecho hace que las películas no sean apropiadas para difractar los rayos X. Alternativamente en algunos casos se prepararon muestras inmersas en una matriz de POE según el método desarrollado por Ingwall y col. (1975) para poli(α -glutamato)s. La concentración de los polímeros en el POE se aumentó al 80 % (p/p) debido a la disminución de la concentración de grupos cromóforos (amida) en la cadena principal, inherente a la constitución química de los poli(γ -glutamato)s.

2.8. Determinación de densidades

Para la determinación de la densidad se siguió el método de flotación en disoluciones acuosas de KBr o en mezclas de etanol-agua. Este método consiste en introducir pequeñas porciones de filmes, rigurosamente secos, en una probeta con un líquido de menor densidad que el polímero al cuál se le va añadiendo la disolución o el líquido de mayor densidad hasta que la muestra se eleva del fondo y se mantiene en equilibrio en el interior del líquido. Posteriormente se determina la densidad del líquido con un picnómetro y se promedia con la obtenida utilizando el mismo procedimiento pero empezando con un líquido de densidad superior a la de la muestra.

2.9. Difracción de rayos X

Los diagramas de difracción de rayos X se obtuvieron en una cámara Statton Pinhole modificada (W. H. Warhus, Willmington, Delaware, USA) con registro fotográfico sobre film plano y monocromador de grafito que selecciona la radiación Cu- K_{α} ($\lambda = 0.15418$ nm). La calibración se hizo con sulfuro de molibdeno (d_{200} : 0.6147 nm). Para los registros fotográficos de los difractogramas se utilizó film Kodak DEF-5.

Para las muestras en polvo se utilizaron capilares de paredes delgadas de vidrio sin plomo, especial para rayos X, transparentes a la radiación y con diámetros comprendidos entre 1.0 y 1.5 mm.

Las películas se obtuvieron por evaporación de disoluciones concentradas de polímeros en cloroformo, o en mezclas de cloroformo-trifluoroetanol. El vidrio sobre el que se preparó el film se silanizó previamente con cloruro de trimetilsilano para favorecer la separación de las muestras.

De manera general, los polímeros se orientaron por estiramiento uniaxial a diferentes temperaturas. Para este propósito, en algunos casos, se utilizaron baños de líquidos inertes.

Las películas de polímero se colocaron directamente sobre la superficie del colimador, de manera que el haz incidiese de forma paralela o perpendicular a la superficie de los mismos.

Los termodifractogramas se registraron a partir de películas de polímero sin orientar depositadas sobre aluminio. Se utilizó un difractómetro Siemens D-500 con radiación Cu-K α , dentro de un intervalo de 2θ comprendido entre 5 y 40°. La temperatura fue regulada por un sistema TPK-A y la detección de la radiación se realizó con un contador de centelleo.

2.10. Microscopía óptica y electrónica

Las observaciones ópticas se realizaron en un microscopio de polarización Nikon provisto con una platina de calentamiento Mettler FP-80.

Los diagramas de difracción de electrones se obtuvieron en un microscopio Philips-301 que opera a 100 kV. Las muestras se prepararon como películas ultrafinas con espesores menores de 50 nm por evaporación de disoluciones de polímero al 1% en CHCl $_3$ sobre una superficie de agua y recogiénolas sobre rejillas cubiertas con film de carbón.

2.11. Calorimetría diferencial de barrido y termogravimetría

La calorimetría diferencial de barrido para los poliaspartatos se llevó a cabo en un calorímetro Mettler TA4000 con una célula de análisis DSC30, que permite realizar medidas entre $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ con una precisión de $\pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y un microprocesador acoplado TC11. Para los poliglutamatos se utilizó un calorímetro DSC Perkin-Elmer, Pyris 1, con un dispositivo Intracooler que permite trabajar a temperaturas de hasta $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las curvas de DSC se registraron principalmente de filmes previamente caracterizados por rayos X, empleándose entre 2 y 4 mg de muestra. Los barridos se efectuaron con una velocidad de calentamiento de $20\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ en un intervalo de temperaturas comprendido entre -30 y $270\text{ }^{\circ}\text{C}$, bajo corriente de nitrógeno con un flujo de $60\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. El aparato se calibra con un estándar de indio de entalpía y temperatura de fusión perfectamente conocidas.

Para el análisis termogravimétrico se utilizó una termobalanza Perkin Elmer modelo TGA-6 capaz de trabajar desde temperatura ambiente hasta $1000.0\text{ }^{\circ}\text{C}$. La velocidad de calentamiento puede ser variada desde 0.1 a $100\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ y la microbalanza con la cual está equipado el sistema, posee una precisión de $0.5\text{ }\mu\text{g}$ para pesos de muestra de 1 a 20 mg.

Para las curvas de TGA se emplearon cantidades de muestra de 5-6 mg y se aplicó una velocidad de calentamiento de $20\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ en un intervalo de temperatura comprendido entre 50 - $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ bajo corriente de nitrógeno con un flujo de $200\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

2.12. Análisis dinamomecano-térmico

Esta técnica se basa en deformar la muestra por aplicación de un movimiento sinusoidal, que puede expresarse por la ecuación: $\epsilon(t) = \epsilon_0 \text{sen}(\omega t)$, donde $\epsilon(t)$ es la deformación en función del tiempo, ϵ_0 es la deformación máxima aplicada, ω es la frecuencia angular y t , el tiempo. La tensión producida en el material puede ser expresada por la ecuación: $\sigma(t) = \sigma_0 \text{sen}(\omega + \delta)t$, donde σ_0 es la tensión máxima y δ la diferencia de fase entre la deformación aplicada y la tensión producida. Si el material fuese totalmente elástico no existiría tal desfase. Este se produce como consecuencia

de la naturaleza viscoelástica del material, el cual no responde de forma instantánea a la deformación aplicada. Las propiedades dinamomecánicas de un material viscoelástico se describen mediante el módulo complejo, $E^* = \sigma/\epsilon = E' + iE''$, donde E' es el módulo de almacenamiento, y está relacionado directamente con la energía que puede recuperarse de la deformación producida en el material viscoelástico y E'' es el módulo de pérdidas, relacionado con la energía no recuperable. La diferencia de fase δ , viene determinada por la relación entre estos dos componentes denominada tangente de pérdidas, $\tan \delta = E''/E'$.

Mediante la técnica de DMTA se pueden obtener experimentalmente los valores de E' , E'' y $\tan \delta$. A partir de estas medidas se obtiene información cuantitativa de la variación que experimenta el módulo con la temperatura durante las transiciones térmicas inherentes al polímero. De esta manera se pueden determinar las transiciones asociadas a movimientos de la cadena principal (α), así como aquellas relacionadas a movimiento moleculares locales de la cadena lateral (β y γ).

Por lo general se observa un comportamiento lineal entre $\ln f$ y $1/T$ en la relajación α dentro del intervalo de frecuencias empleado. Por consiguiente, la energía de activación correspondiente a un proceso de relajación se puede calcular mediante la ecuación de Arrhenius

$$\ln f = \ln f_0 - E_a/RT$$

donde f es la frecuencia, f_0 la frecuencia a la temperatura infinita, T es la temperatura absoluta, E_a es la energía de activación y R es la constante universal de los gases.

La energía de activación E_a se obtiene a partir de la pendiente de la representación lineal del logaritmo de la frecuencia ($\ln f$) frente al inverso de la temperatura del máximo de $\tan \delta$ ($1/T$) (Wetton, 1985). Si bien es ampliamente aceptado un comportamiento tipo Arrhenius para las relajaciones γ y β , para la relajación α se suele utilizar la relación de Williams-Landel-Ferry (WLF). No obstante Brouckere y Offergeld (1958) observaron que la relajación α para una serie de polimetacrilatos sigue la relación lineal $\ln f - 1/T$ en lugar de la de WLF.

Los análisis de DMTA se realizaron en un equipo Rheometrics PL-DMTA MK3 de los laboratorios de Termodinámica y Fisicoquímica de esta Escuela. Las medidas dinamomecánicas se han realizado en un intervalo de temperaturas de -150 °C a 200 °C a frecuencias de 1, 5, 10 y 50 Hz y con una velocidad de calentamiento de 2 °C·min⁻¹. En todos los casos se trabajó con un flujo de nitrógeno seco para garantizar que en el interior del aparato no existiera humedad.

Se han utilizado probetas rectangulares (2 cm x 1.2 cm x 0.25 cm). En todas las muestras se ha trabajado con una deformación prefijada de $\pm 32 \mu\text{m}$ y en el modo de flexión en simple cantilever. Para ello la muestra se amordazó por un extremo a un marco, y por el centro a un vástago móvil que le transmitió el movimiento.

Las probetas se obtuvieron por prensado en caliente en un accesorio Constant Thickness Film Maker (CTFM) P/N 15620 de Specac Limited. Se utilizó el espaciador E (250 μm) y la cantidad de muestra empleada fue de aproximadamente 120 mg de polímero lo más finamente dividido posible. La velocidad de calentamiento empleada fue en todos los casos de 2 °C·min⁻¹.

Todas las muestras (tanto poliglutamatos como poliaspartatos) se mantuvieron durante 15 minutos a la temperatura final y después se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente en el accesorio refrigerado con agua que circula para tal fin.

Mediante difracción de rayos X no se apreciaron diferencias de cristalinidad en las muestras antes y después del ensayo de DMTA.