

### 3.1. Antecedentes

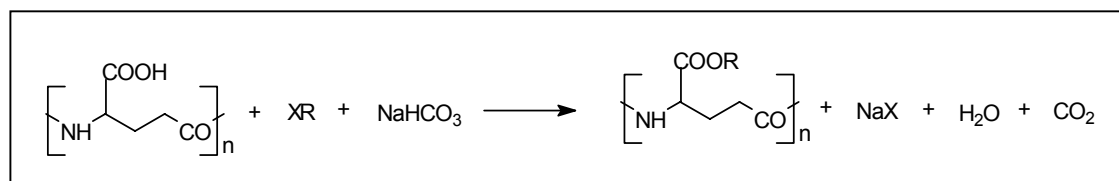
El desarrollo de materiales biodegradables y/o biocompatibles es hoy día una de las áreas de investigación prioritarias. El PGGGA, a diferencia de los nylons tradicionales, es biodegradable, sin embargo, algunas de sus limitaciones como la baja solubilidad o la dificultad para formar fibras o películas ha estimulado la exploración de derivados en los que se mejoren estas propiedades.

#### 3.1.1. Síntesis

Un procedimiento relativamente sencillo para modificar las propiedades del poliácido es la esterificación. No obstante, esta no es una reacción fácil de realizar debido a que la proximidad del grupo carboxilo a la cadena principal hace disminuir su reactividad y porque las condiciones de reacción no pueden extremarse sin que se produzcan reacciones indeseables, tales como descarboxilaciones o rotura de la cadena principal.

Los ésteres del PGGGA se pueden obtener por esterificación directa, o por transesterificación de un poliglutamato de partida. La esterificación directa se basa en el método descrito por Bocchi y col. (1979) empleado para esterificar aminoácidos en disolventes apróticos. Para ello el PGGGA se disuelve en un disolvente tal como DMSO, NMP o DMF, y se añade bicarbonato de sodio en exceso, con lo cual el poliácido se convierte en su sal sódica. Posteriormente, al agregar un haluro de alquilo, tiene lugar la esterificación por sustitución nucleofílica (**Figura 3.1**). Como consecuencia de esta reacción se produce  $\text{CO}_2$ , el haluro de sodio correspondiente y agua. El empleo de diferentes condiciones de reacción (disolvente, base, tiempo y temperatura) ha permitido obtener una amplia diversidad de ésteres con conversiones y rendimientos aceptables. En la **Tabla 3.1** se comparan los procedimientos descritos en la bibliografía para la esterificación directa del PGGGA.

Mediante la apropiada selección del grupo alquilo se pueden cambiar las características del producto final y obtener materiales a medida. Los poli( $\alpha$ ,L-glutamatos) (Block, 1983), poli( $\beta$ ,L-aspartato)s (Muñoz-Guerra y col., 1996) y los poli( $\gamma$ -glutamato)s (Melis, 1999) constituyen excelentes ejemplos al respecto.



**Figura 3.1.** Esquema general de obtención de ésteres del PGGA.

**Tabla 3.1.** Métodos de esterificación directa del PGGA encontrados en la bibliografía.

Polímero	Reactivo	Disolvente <sup>a</sup>	T (°C)	t (h)	conv <sup>b</sup> (%)	Referencia
<b>Método A</b>						
PABG	BcBr	NMP	60	20	100	Kubota y col., 1993a
PAAG-1	CH <sub>3</sub> I	"	60	20	100	Kubota y col., 1995
PAAG-2	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> Br	"	60	20	100	"
PAAG-3	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> Br	"	60	20	100	"
PAAG-4	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> Br	"	60	20	100	"
PAAG-6	<i>n</i> -C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> Br	"	60	20	100	"
PAAG-8	<i>n</i> -C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> Br	"	60	20	100	"
PAAG-10	<i>n</i> -C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> Br	"	60	20	100	"
<b>Método B</b>						
PAAG-2	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> Br	DMSO	60	20	90	Borbély y col., 1994
PAAG-3	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> Br	"	25	20	90	Gross y col., 1995
PAAG-4	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> Br	"	25	20	98	"
PAAG-5	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> Br	"	45	120	>95	Shah y col., 1992
PAAG-8	<i>n</i> -C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> Br	"	25	20	59	Borbély y col., 1994
PAAG-12	<i>n</i> -C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> I	HMPA	45	120	>95	Shah y col., 1992

<sup>a</sup>La base utilizada es NaHCO<sub>3</sub>. <sup>b</sup>Grado de esterificación.

Como se observa en la tabla anterior, el grupo de trabajo de Gross (al que pertenecen Borbély, Shah y col.) utiliza DMSO o HMPA como disolvente, temperaturas más bajas y tiempos de reacción relativamente largos. Las conversiones que alcanzan no siempre se acercan al 100%. Por otro lado el grupo de Kubota ha obtenido los ésteres alquílicos (con  $n = 1-10$ ) utilizando NMP como disolvente y temperaturas algo más elevadas (60 °C) con lo que obtienen conversiones totales.

Otro método de obtención de los ésteres del PGGA consiste en la transesterificación de un poliglutamato de partida y ha sido utilizado por el Dr. Melis (1999) en su Tesis Doctoral. El método consta de dos etapas: inicialmente se esterifica el PGGA para obtener, por ejemplo, el poli( $\alpha$ -etil  $\gamma$ -glutamato) (PAAG-2) y a continuación este compuesto se transesterifica con el alcohol alifático o aromático que se desee en presencia de  $\text{Ti}(\text{OBU})_4$ . El Dr. Melis (1999) obtuvo de esta manera los poli( $\gamma$ -glutamato)s con cadenas cortas ( $n \leq 10$ ) y el derivado bencílico. El PAAG-2 de partida lo obtuvo siguiendo el método propuesto por Gross y col. (1995).

Los poli( $\alpha$ -glutamato)s, isómeros de los poli( $\gamma$ -glutamato)s, también se suelen obtener por transesterificación del poli( $\gamma$ -metil  $\alpha$ ,L-glutamato) o del poli( $\gamma$ -bencil  $\alpha$ ,L-glutamato) con  $n$ -alcoholes pero utilizando ácido  $p$ -toluensulfónico como catalizador. Este método, extensamente utilizado en la bibliografía (Konishi y col., 1976; Bradbury y col., 1968 y Yokomori y col., 1972) no siempre proporciona conversiones del 100%, en especial cuando las cadenas laterales son largas, por lo que en esta tesis nos hemos decantado por la transesterificación empleando un alcóxido de titanio.

La transesterificación utilizando alcóxidos de titanio es un método conocido desde hace tiempo, ya en 1982, Seebach y col. estudiaron esta reacción sobre diversos ésteres con alcoholes primarios y secundarios. En este trabajo las cantidades del alcóxido de titanio utilizadas no siempre fueron "catalíticas". En nuestro grupo, este procedimiento también se ha utilizado para la obtención de 4-alcocarbonil-2-azetidionas con grupos alquilo que varían desde metilo a docosilo e incluso en los que el grupo lateral es ramificado o cíclico. Estas lactamas se emplearon como monómeros en la polimerización por apertura de anillo para obtener los correspondientes poli( $\beta$ ,L-aspartato)s (Vives y col., 1989; López-Carrasquero y col., 1994; García-Alvarez y col., 1994).

En esta tesis, como poli( $\gamma$ -glutamato) de partida para la transesterificación, utilizaremos el PAAG-2. Este polímero lo obtendremos esterificando el PGGA con  $\text{C}_2\text{H}_5\text{Br}$  según el método propuesto por Kubota y col. (1993a, 1995). Posteriormente transesterificaremos el PAAG-2 con alcoholes lineales de cadena larga ( $n \geq 12$ ) para obtener los correspondientes PAAG- $n$ , en presencia de  $\text{Ti}(\text{OBU})_4$ .

La bibliografía referente a la obtención de copolímeros de  $\alpha$ -péptidos es abundante (Bradbury y col, 1968, Konishi y col, 1976) pero no así la referente a la preparación de copolímeros de  $\gamma$ - péptidos.

Tsubokawa y col. (1993a), han obtenido copolímeros de injerto PGGA-PMMA utilizando grupos azo laterales que luego inician la polimerización del MMA. Desafortunadamente las propiedades térmicas que presentan estos copolímeros son inferiores a la del PGGA de partida. Estos autores también han preparado copolímeros de injerto con el N-vinilcarbazol y con la N-vinil-2-pirrolidona aprovechando que los grupos carboxilo laterales no ionizados del PGGA pueden iniciar polimerizaciones catiónicas (Tsubokawa y col., 1993b).

### 3.1.2. Propiedades térmicas y dinamomecano-térmicas

Los PAAG- $n$  con  $n \leq 6$  son polímeros semicristalinos con temperaturas de fusión y entalpías que tienden a decrecer a medida que  $n$  aumenta. Las curvas de TGA revelaron que la degradación térmica se presenta por encima de la  $T_m$  con temperaturas de descomposición *onset* que usualmente aparecen alrededor de los 300°C. Por debajo de esta temperatura la descomposición tiene lugar por depolimerización con liberación del correspondiente piroglutamato de alquilo. Entre 400-450 °C el mecanismo descomposición parece ser una descarboxilación para dar la poliamida insaturada (Melis y col., 2001).

Melis (1999) estudió también el comportamiento dinamomecano-térmico de los poli( $\gamma$ -glutamatos) con grupos alquilo lineales desde 2 a 10 átomos de carbono y con los grupos alquilo ramificados isopropilo e isobutilo. Estos polímeros, al igual que los poli( $\alpha$ -glutamato)s estudiados por Watanabe y col. (1985) mediante DMTA y por Romero-Colomer y col. (1994) mediante relajación dieléctrica, mostraron tres relajaciones características denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  en orden decreciente de temperatura. El Dr. Melis encontró que la **relajación  $\alpha$**  se observaba entre los 110 y 50 °C, disminuyendo con el aumento de longitud de la cadena lateral. Este descenso era más pronunciado para los ésteres de mayor longitud de cadena lateral que para los de menor longitud. La **relajación  $\beta$**  se apreció a temperaturas de entre -100 y -53 °C. La  $T_\beta$  aumentó con el incremento del tamaño de la cadena lateral en los PAA(DL)G- $n$  con  $n \leq 4$  hasta alcanzar

un máximo, para descender con los PAA(DL)G- $n$  con  $n \geq 6$ . En cuanto a la **relajación  $\gamma$**  sólo se observó en los ésteres de 8 y 10 átomos de carbono a temperaturas cercanas a  $-150$  °C. En esta familia de polímeros durante la relajación  $\beta$  se producía la pérdida más importante del módulo de almacenamiento  $E'$ . Este efecto se acentuaba a medida que aumentaba la longitud de la cadena lateral. El Dr. Melis encontró que los poli( $\gamma$ -glutamato)s con cadenas laterales cortas e intermedias presentaban las transiciones  $\alpha$  y  $\beta$  a temperaturas inferiores respecto a las descritas para otras familias de polímeros como los poli( $\alpha$ -glutamato)s y los poli( $\beta$ -aspartato)s.

El significado que se ha dado a las relajaciones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , en diferentes familias de polímeros de estructura relacionada con la que nos ocupa, los poli( $\gamma$ -glutamato)s, se comenta a continuación.

La **relajación  $\alpha$**  es la que aparece a temperaturas superiores y, en polímeros amorfos, se asocia a **movimientos microbrownianos** de la cadena principal del polímero y, por lo tanto, está estrechamente relacionada con la transición vítrea del material. En el caso de polímeros muy cristalinos, como los poli( $\gamma$ - $n$ -alquil  $\alpha$ ,L-glutamato)s, donde las cadenas principales están altamente ordenadas y no son posibles movimientos conformacionales, la relajación  $\alpha$  se ha asociado al movimiento molecular térmico de toda la hélice  $\alpha$  en la región cristalina (Kajiyama y col., 1975a y b) o a movimientos de translación y rotación de las hélices de la cadena principal a lo largo del eje de la hélice (Watanabe y col., 1985). Esta transición es muy sensible a la longitud y constitución de la cadena lateral y al grado de cristalinidad.

La **relajación  $\beta$**  se atribuye a **movimientos globales del grupo lateral**, la rotación del grupo éster de la cadena lateral alrededor del enlace que le une al carbono  $\alpha$  de la cadena principal, es uno de los movimientos que más contribuye a esta relajación. La temperatura a la que se produce esta transición depende de la longitud y de la forma de la cadena lateral, aunque también de las interacciones del grupo lateral con las regiones adyacentes de la cadena principal. Es de esperar que un aumento de la longitud de la cadena lateral vaya acompañado tanto de un aumento de la temperatura a la cual se produce esta relajación ( $T_\beta$ ) así como de la energía de activación asociada al proceso. Sin embargo, Watanabe y col. (1985) han comprobado que la  $T_\beta$  disminuye desde  $0$  °C hasta  $-37$  °C para los ésteres metílico a octílico en los poli( $\gamma$ - $n$ -alquil  $\alpha$ ,L-glutamato)s y, Romero-Colomer y col. (1994) han obtenido resultados

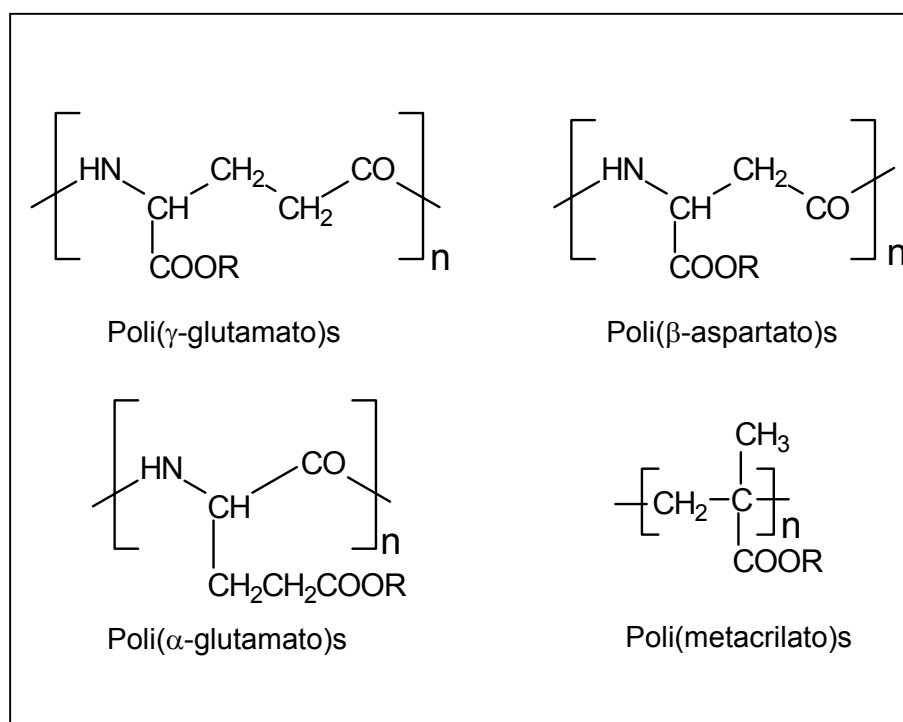
equivalentes a partir de medidas dieléctricas de la misma familia. Los autores justifican estos resultados suponiendo que parte de la cadena lateral ejerce un efecto plastificante en sus movimientos cooperativos, es decir, puesto que un grupo lateral más largo posee mayor libertad de movimiento, en general esto facilita la movilidad individual de cada una de sus partes. Otros autores (Hedvig, 1977; Mikhailov, 1958 y 1960) argumentan que al aumentar la longitud de la cadena lateral el efecto plastificante produce una disminución en la  $T_\alpha$  mientras que la  $T_\beta$  permanece prácticamente invariable con una energía de activación asociada constante. El aumento del tamaño del grupo alquilo lateral provoca un desplazamiento del pico correspondiente a la relajación  $\alpha$  hacia temperaturas más bajas y puede incluso solaparse con el pico correspondiente a la relajación  $\beta$ .

La **relajación  $\gamma$**  se atribuye generalmente a **movimientos locales** en los grupos alquilo de la cadena lateral y se encuentra estrechamente relacionada con la longitud de la misma. En los poli( $\alpha$ -glutamato)s esta relajación se sitúa a una temperatura cercana a  $-150$  °C (110 Hz) con una energía de activación de  $6-10$  Kcal $\cdot$ mol $^{-1}$ . Valores similares fueron obtenidos por Hoff y col. (1955) en series de polimetacrilatos y por García-Alvarez (1997a) en poli( $\beta$ -aspartato)s.

Como vemos, existen numerosas investigaciones sobre el comportamiento dinamomecano-térmico, ya sea por DMTA o por relajación dieléctrica, en diferentes familias de polímeros. Los polimetacrilatos fueron estudiados por Hoff y col. (1955); Hedvig (1977) y Mc Crum y col. (1991) entre otros. En estos polímeros la cadena lateral tiene una constitución idéntica a la de los poli( $\alpha$ -alquil  $\gamma$ -glutamato)s, aunque son en general de carácter amorfo. Ya hemos comentado que Watanabe y col. (1985) y Romero-Colomer y col., (1994) trabajaron con poli( $\alpha$ -glutamato)s, García-Alvarez (1997a) con poli( $\beta$ ,L-aspartato)s de cadenas laterales con número impar de átomos de carbono, lineales y ramificadas y con grupos alquilo cíclicos y Melis (1999) con poli( $\alpha$ -alquil  $\gamma$ ,L-glutamato)s de cadenas laterales cortas ( $n \leq 10$ ). En la **Figura 3.2** se representan las estructuras químicas de estas familias de polímeros y se pone de manifiesto la relación entre ellas.

Los poli( $\alpha$ -glutamato)s son isómeros de los poli( $\gamma$ -glutamato)s, pero, la presencia de dos unidades metilénicas que separan el grupo éster de la cadena principal confiere mayor flexibilidad a la cadena lateral. Las dos familias de polímeros tienen la cadena

principal en conformación helicoidal. Los poli( $\beta$ -aspartato)s también tienen la cadena principal en conformación helicoidal y se diferencian de los poli( $\gamma$ -glutamato)s en que tienen un metileno menos en la cadena principal. En poli(metacrilato)s, poli( $\beta$ -aspartato)s y poli( $\gamma$ -glutamato)s el grupo alcóxicarbonilo se halla directamente unido a la cadena principal.



**Figura 3.2.** Estructuras químicas de las unidades repetitivas de diferentes familias de polímeros con estructura relacionada.

## 3.2. Resultados y discusión

### 3.2.1. Biosíntesis del ácido poli( $\gamma$ -glutámico)

Para este trabajo se han empleado dos tipos de PGGA's que difieren en la composición enantiomérica: a) ácido poli( $\gamma$ -glutámico) de composición cercana a la racémica (PG(DL)GA), cedido por H. Kubota (Meiji Co.) y b) poliácido de composición mayoritariamente D (PG(D)GA) obtenido por biosíntesis según un método puesto a

punto en nuestro laboratorio por G. Pérez-Camero y col. (1999) y que se detalla a continuación. Las características de estos polímeros se resumen en la **Tabla 3.2**.

**Tabla 3.2.** Características de los PGGAs utilizados en este trabajo para la preparación de los poli( $\alpha$ -alquil  $\gamma$ -glutamato)s.

	SEC <sup>a</sup>			[ $\eta$ ] (dL·g <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>		D:L <sup>c</sup>
	M <sub>w</sub> ·10 <sup>-3</sup>	M <sub>n</sub> ·10 <sup>-3</sup>	D	H <sub>2</sub> O <sup>a</sup>	DMSO	
PG(DL)GA <sup>d</sup>	394	148	2.6	3.5	1.8	59:41
PG(D)GA <sup>e</sup>	1030	370	2.8	8.5	5.0	89:11
PG(D)GA <sup>f</sup>	340	150	2.2	3.5	1.7	89:11

<sup>a</sup>Determinado usando agua tamponada (pH 7.0) como fase móvil. <sup>b</sup>Viscosidad intrínseca determinada en los disolventes indicados. <sup>c</sup>Composición enantiomérica determinada mediante HPLC según el método de Marfey (1984). <sup>d</sup>Cedido por el Dr. Kubota de Meiji Co (Japan). <sup>e</sup>Producido por biosíntesis en esta tesis. <sup>f</sup>Producido por biosíntesis en esta tesis y degradado mediante ultrasonidos.

En el **apartado 2.3** de la presente memoria se indica la cepa utilizada para la producción del poliácido D (PG(D)GA) y se describe cómo se prepararon los cultivos. Con la suspensión de bacterias obtenida como allí se indica, se inocularon 6 erlenmeyers que contenían cada uno 150 mL de medio E y se incubaron a 30 °C durante 6 días, en un agitador orbital aplicando una velocidad angular de 150 rpm.

El contenido altamente viscoso de los frascos de cultivo tras los 6 días de fermentación, se centrifugó a 6 °C (7500 rpm, 45 min) para eliminar las bacterias de la disolución de polímero. El sobrenadante se precipitó con 3 vol de etanol frío bajo agitación y se dejó toda la noche en una cámara a 4 °C. Al día siguiente el polímero se recolectó por decantación y se guardó en acetona a -20 °C hasta su purificación.

Para obtener el polímero puro se adoptó el procedimiento descrito por Giannos en su Tesis Doctoral (1991). El polímero precipitado se disolvió en agua milli-Q y la disolución se filtró, dializó y concentró usando un equipo de filtración tangencial Minitan-S (Millipore). Primero se hizo pasar la disolución a través de un juego de 4 filtros de 0.45  $\mu$ m para eliminar microorganismos y luego por otro de 100 000 D para dializar y concentrar. La diálisis debe llevarse a cabo hasta reacción negativa del filtrado con AgNO<sub>3</sub>. La disolución obtenida se concentró aún más por evaporación y se acidificó con



HCl 6 M hasta pH 1.5. La disolución ácida se precipitó con 3 vol de 1-propanol a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se mantuvo una noche a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , al día siguiente se centrifugó a 8 000 rpm durante 30 minutos. El polímero obtenido se lavó dos veces con acetona y se pulverizó en dietil éter. Tras centrifugar, el PGGA se recuperó como un polvo blanco. Este polvo se secó a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  bajo vacío y se almacenó a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  en el congelador hasta su uso posterior. Se obtuvieron entre 2.5-5 g de polímero puro por litro de medio E empleado.

La caracterización química de los PGGA's se realizó por RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en  $\text{D}_2\text{O}$  en medio básico, así como por espectroscopia de FTIR (en pastilla de KBr). En  $\text{D}_2\text{O}$  el NH del polímero apenas se detecta, debido al intercambio del hidrógeno por el deuterio del disolvente. En la **Figura 3.3** se muestran los espectros característicos de infrarrojo y de resonancia magnética nuclear del PG(D)GA obtenido en nuestro laboratorio, los datos espectroscópicos se resumen a continuación:

**IR (pastilla KBr):** ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3351 (NH, amida A); 3081 (amida B); 1739 (COOH); 1652 (amida I); 1540 (amida II).

**$^1\text{H}$  RMN (en  $\text{D}_2\text{O}$ , NaOD):**  $\delta$  (ppm) 8.21 (NH) (señal de intensidad muy débil que apenas se observa debido al intercambio del H con el D del  $\text{D}_2\text{O}$ ); 4.02 (q, 1H,  $\alpha$ -CH); 2.25 (t, 2H,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub>); 2.10-1.80 (m, 2H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>).

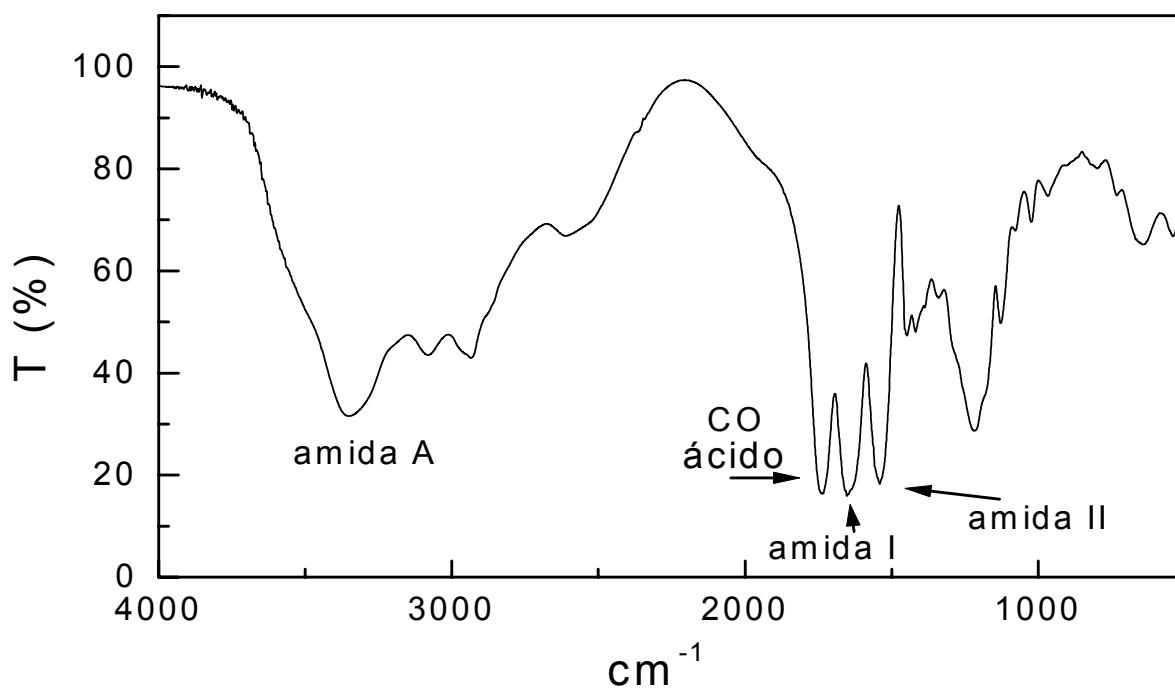
**$^{13}\text{C}$  RMN (en  $\text{D}_2\text{O}$ , NaOD):**  $\delta$  (ppm) 181.40 (CONH); 177.95 (COO); 57.88 ( $\alpha$ -CH); 35.30 ( $\gamma$ -CH<sub>2</sub>). 30.73 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub>).

Los espectros de RMN tanto de  $^1\text{H}$  como de  $^{13}\text{C}$  del PG(D)GA mostraron señales complejas. Como se puede observar en la **Figura 3.3C**, cuando se irradian los protones correspondientes al  $\beta$ -CH<sub>2</sub>, la señal del CH se simplifica ya que evitamos el acoplamiento espín-espín. El hecho de que en dicho espectro aparezcan dos señales se ha atribuido a la distribución de secuencias de unidades D y L en el PGGA. La señal más intensa correspondería a las diadas DD y su enantiómera LL y la menos intensa a las diadas LD así como su enantiómera DL.

De igual manera, todas las señales en  $^{13}\text{C}$  aparecen desdobladas por este mismo efecto (**Figura 3.3D**). Por integración de las mismas mediante deconvolución se puede concluir que el polímero presenta aproximadamente un 85% de diadas DD+LL y un 15% de diadas DL+LD.

En cuanto al PG(DL)GA, se obtuvo un resultado muy similar al obtenido para el PG(D)GA cuando se realizaron los espectros RMN.

Un reciente estudio realizado en nuestro grupo en el cual se analizan los espectros de RMN de diferentes poli( $\alpha$ -etil  $\gamma$ -glutamato)s con composición variable de unidades D y L obtenidos por vía sintética, ha permitido concluir que el PGGGA de biosíntesis tiene una microestructura bastante compleja en la que parecen coexistir mezclas de homopolímeros D y L así como un copolímero en bloques de ambas unidades (Martínez de Ilarduya y col., 2002).



**Figura 3.3A.** Espectro de IR (KBr) del PG(D)GA.

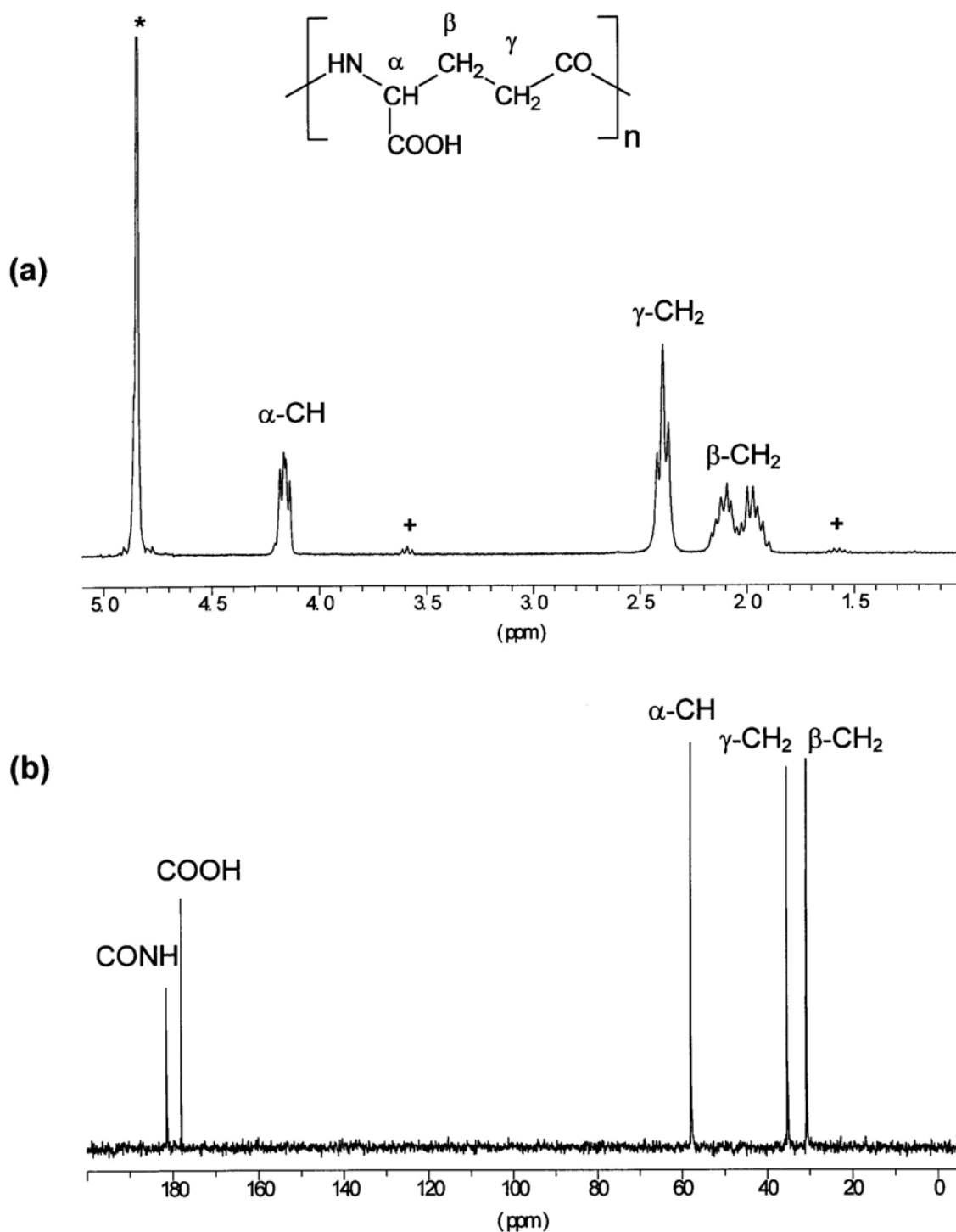
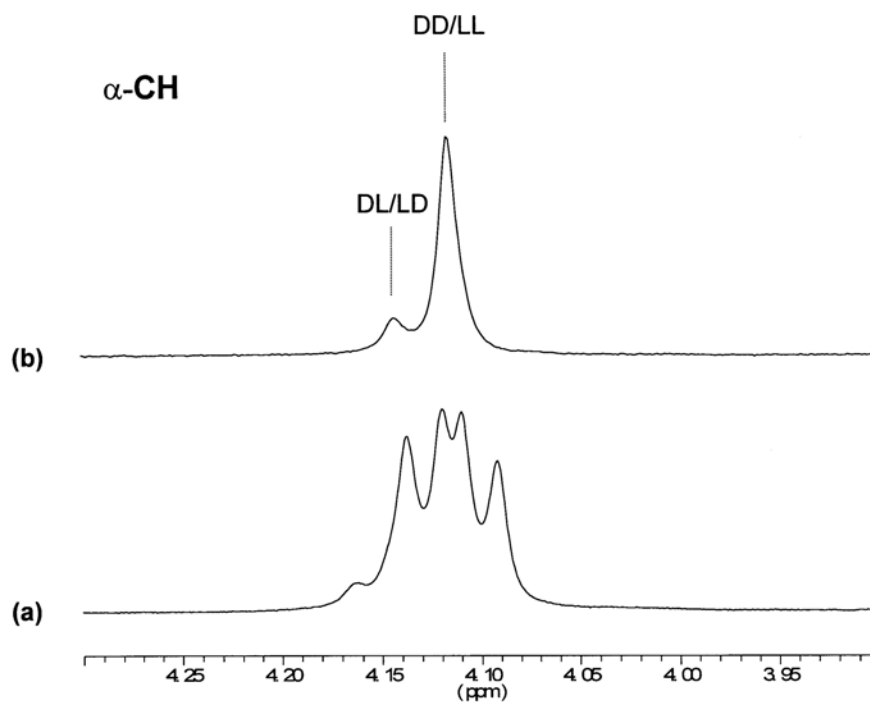
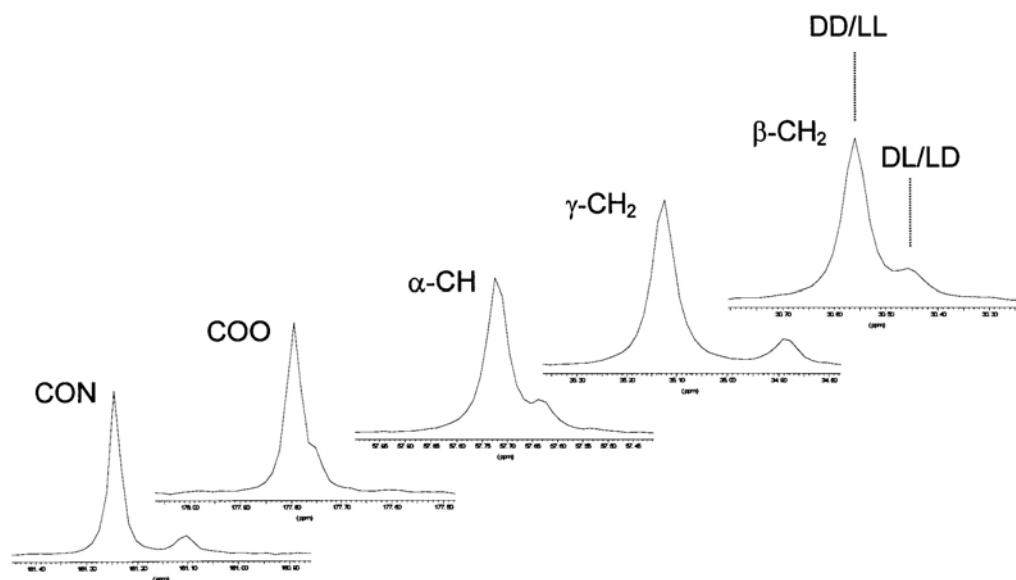


Figura 3.3B. Espectros de RMN ( $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$ ) de  $^1\text{H}$  (a) y  $^{13}\text{C}$  (b) del PG(D)GA. (\* señal del agua, + señal de la referencia).



**Figura 3.3C.** Espectros de RMN ( $D_2O/NaOD$ ) de  $^1H$  en la región correspondiente al CH. (a) espectro normal (b) espectro desacoplado irradiando el  $\beta-CH_2$ .



**Figura 3.3D.** Espectros de RMN ( $D_2O/NaOD$ ) de  $^{13}C$  ampliando la anchura espectral de las diferentes señales.

### 3.2.2. Obtención y caracterización del poli( $\alpha$ -etil $\gamma$ -glutamato)

La esterificación del ácido poli( $\gamma$ -glutámico) con bromuro de etilo en NMP se realizó de acuerdo con el método empleado por Kubota y col. (1995) (**Figura 3.1** con  $R=CH_2CH_3$ ). El procedimiento experimental se detalla a continuación.

Se suspendieron 2 g de PG(DL)GA (15.5 mmol) en 200 mL de NMP en un recipiente provisto de agitación magnética y se mantuvieron a 80 °C hasta completa disolución. Se bajó la temperatura del baño a 60 °C, se adicionaron 5.25 g de  $NaHCO_3$  (62.5 mmoles), se tapó el recipiente con un septum y se dejó durante media hora. Pasado este tiempo se adicionó a través del septum lentamente el bromuro de etilo (6 mL, 80 mmol) con ayuda de una jeringa. Se colocó una salida externa para eliminar el  $CO_2$  que se iba formando. Se siguió el curso de la reacción mediante RMN de  $^1H$  (en DMSO). La reacción se dio por terminada cuando desapareció la señal a 8.08 ppm correspondiente al NH del poliácido. El tiempo de reacción osciló entre 19-34 h.

La reacción se paró enfriando la mezcla a temperatura ambiente, el NaBr precipitado se eliminó por decantación. El polímero se precipitó del medio de reacción adicionándolo lentamente sobre 1.5 L de agua fría acidulada con HCl (pH 1.5-2). Se filtró y se lavó varias veces con agua fría, MeOH y por último con éter hasta que quedó pulverulento. El polímero así obtenido se secó a vacío a 50 °C (2.15g, 13.69 mmol, 88% de rendimiento).

La variedad enriquecida en el enantiómero D, el PG(D)GA, se pudo esterificar directamente de la misma manera, pero en general se sonicó antes del tratamiento para conseguir acortar las cadenas poliméricas y así favorecer la reacción de transesterificación que se realizará posteriormente (Melis, Tesis Doctoral 1999). Con esta finalidad, se disolvieron 2 g (15.5 mmol) de PG(D)GA de  $[\eta]_{DMSO}$  inicial  $5 \text{ dL}\cdot\text{g}^{-1}$  en 200 mL de NMP y se sonicaron durante 1 hora hasta que la viscosidad intrínseca, medida en DMSO, descendió a  $1.6\text{-}1.9 \text{ dL}\cdot\text{g}^{-1}$ .

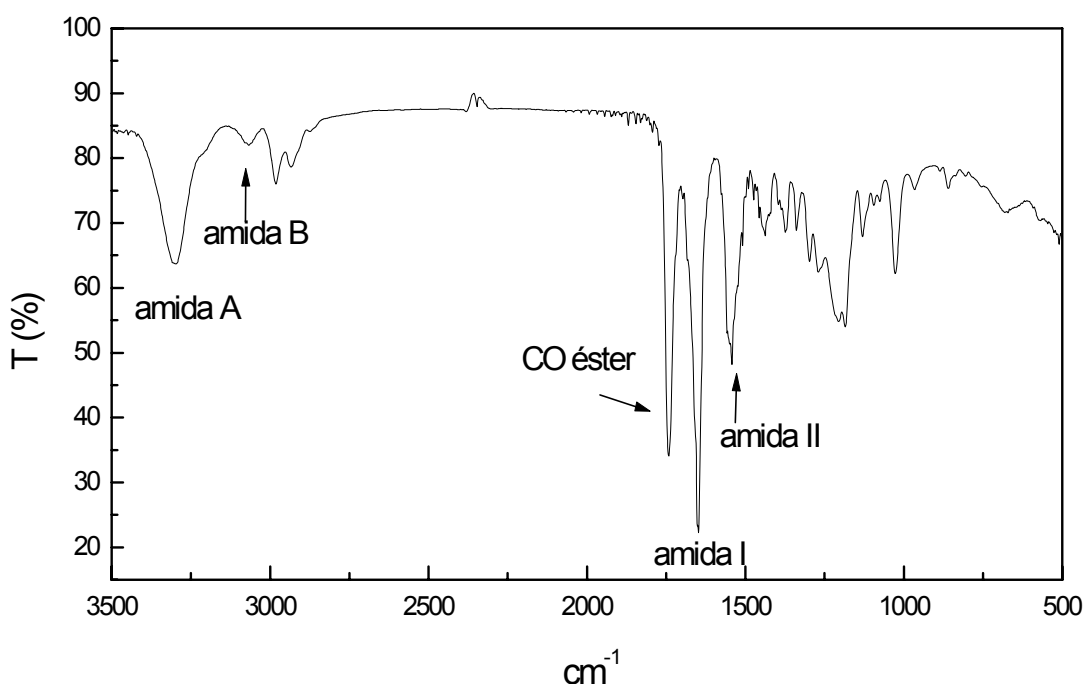
El grado de esterificación se determinó mediante RMN de  $^1H$  (en  $CHCl_3/TFA$ ) teniendo en cuenta las señales correspondientes al grupo  $CH_2$  del etilo y el  $\alpha$ -CH de la cadena principal y resultó ser, en todos los casos, superior al 99 %. El análisis elemental mostró buena concordancia con los datos teóricos (**Tabla 3.3**).

En la **Figura 3.4** se muestran los espectros de IR y RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  del PAA(D)G-2. Los desplazamientos químicos de los hidrógenos unidos a los carbonos esqueléticos son independientes de la cadena lateral y apenas cambian con la modificación del PGGa. Los espectros de IR y RMN son indistinguibles para el PAA(D)G-2 y PAA(DL)G-2, y por ello sólo se incluyen los referentes al primer producto. Los datos espectroscópicos obtenidos para el PAA(D)G-2 son los siguientes:

**IR (film en  $\text{CHCl}_3/\text{TFA}$ ):** ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3298 (NH, amida A); 3068 (amida B); 1741 (C=O, éster); 1648 (amida I); 1542 (amida II); 683 (amida V).

**$^1\text{H}$  RMN (en  $\text{CDCl}_3/\text{TFA}$ ):**  $\delta$  (ppm) 7.78 (d, 1H, NH); 4.66 (m, 1H,  $\alpha\text{-CH}$ ); 4.32 (m, 2H,  $\text{CO}_2\text{CH}_2$ ); 2.62 (t, 2H,  $\gamma\text{-CH}_2$ ); 2.35-2.17 (m, 2H,  $\beta\text{-CH}_2$ ); 1.33 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C}$  RMN (en  $\text{CDCl}_3/\text{TFA}$ ):**  $\delta$  (ppm) 177.02 (CONH); 173.81 (COO); 64.94 ( $\text{OCH}_2$ ); 53.76 ( $\alpha\text{-CH}$ ); 32.24 ( $\gamma\text{-CH}_2$ ); 27.98 ( $\beta\text{-CH}_2$ ); 13.17 ( $\text{CH}_3$ ).



**Figura 3.4A.** Espectro de IR del PAA(D)G-2.

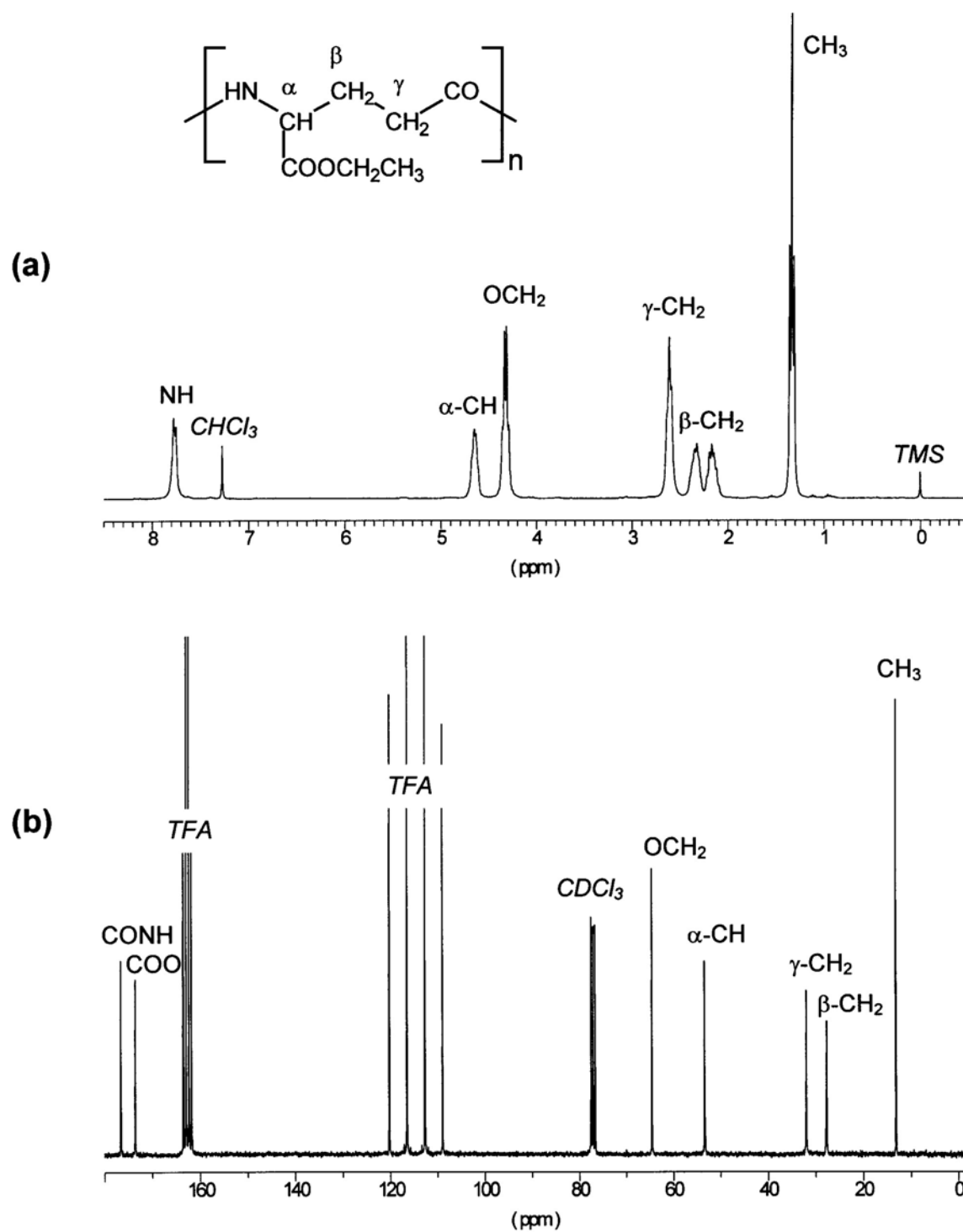


Figura 3.4B. Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (a) y de  $^{13}\text{C}$  (b) del PAA(D)G-2.

**Pesos moleculares y composición enantiomérica.** El tamaño molecular se determinó mediante viscosimetría en DMSO y en NMP que contenía LiCl al 2% p/v, y la relación D:L por HPLC según el método de Marfey (1984). Los resultados se muestran en la **Tabla 3.3**.

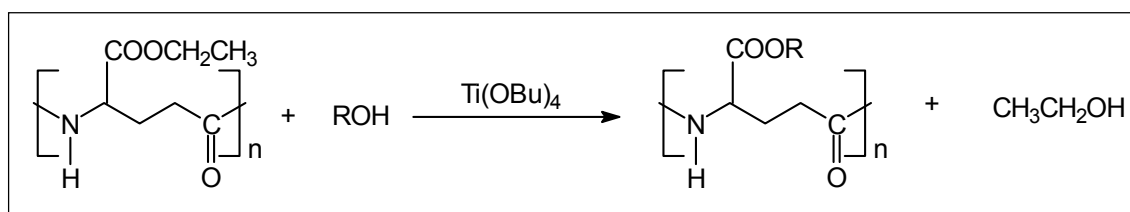
**Tabla 3.3.** Características de los PAAG-2 obtenidos por esterificación.

Polímero	$[\eta](\text{dL}\cdot\text{g}^{-1})$			$M_v \cdot 10^{-3b}$	Análisis elemental <sup>c</sup>			D:L <sup>d</sup>
	NMP <sup>a</sup>	DMSO	DCA		C(%)	H(%)	N(%)	
PAA(DL)G-2	n.d.	0.7	1.32	88	52.10	6.89	8.90	60:40
PAA(D)G-2	1.80	1.40	2.36	192	n.d.	n.d.	n.d.	88:12
PAA(D)G-2 <sup>e</sup>	1.00	0.90	1.64	118	53.20 (53.50)	7.03 (7.00)	8.98 (8.90)	88:12

<sup>a</sup>Contiene un 2% p/v de LiCl. <sup>b</sup>Peso molecular viscosimétrico determinado utilizando la ecuación establecida para el poli( $\gamma$ -metil  $\alpha$ ,L-glutamato)  $[\eta] = 2.9 \cdot 10^{-4} M_v^{0.74}$ . <sup>c</sup>Los valores teóricos del análisis elemental se dan entre paréntesis. <sup>d</sup>Determinado según el método de Marfey (1984). <sup>e</sup>Obtenido a partir de un PG(D)GA sonificado en NMP durante 1 h.

### 3.2.3. Transesterificación del poli( $\alpha$ -etil $\gamma$ -glutamato)

Como ya hemos indicado en el **apartado 3.1.1**, los  $\alpha$ -alquil ésteres del ácido poli( $\gamma$ -glutámico) se prepararon según un proceso en dos etapas. En el primer paso, el PGGA se esterifica con bromuro de etilo en presencia de un exceso de  $\text{NaHCO}_3$ . A continuación, el grupo etilo se reemplaza por un alquilo de cadena larga utilizando el correspondiente alcohol y en presencia de  $\text{Ti}(\text{OBu})_4$  (**Figura 3.5**).



**Figura 3.5.** Procedimiento general de transesterificación del PAAG-2.



El procedimiento para la obtención de los diferentes ésteres del PGGA es prácticamente el mismo para todos ellos y sólo varían las condiciones de la reacción (tiempo, temperatura, concentración del alcohol y de  $\text{Ti}(\text{OBu})_4$ ). La transesterificación se lleva a cabo bajo corriente de  $\text{N}_2$  para desplazar el aire y favorecer la eliminación del etanol formado en el transcurso de la reacción.

La relación molar alcohol/polímero osciló entre un 50/1 para el dodecanol y un 12.5/1 para los alcoholes más largos. La proporción molar de catalizador/PAAG-2 estuvo comprendida entre un 0.1/1 para los alcoholes más cortos y un 0.25/1 para los más largos. Las reacciones se llevaron a cabo a temperaturas comprendidas entre 150 y 190 °C.

En el recipiente de reacción (balón de dos bocas o erlenmeyer con entrada y salida de gases) se introdujo un elevado exceso del alcohol seleccionado para transesterificar y se colocó en el baño termostatizado. Cuando el alcohol fundió se suspendió en él el poli( $\alpha$ -etil  $\gamma$ -glutamato) y se añadió el tetrabutóxido de titanio. A medida que avanzó el proceso, el polímero se fue disolviendo en el alcohol quedando al final una disolución viscosa y transparente. Algunas de las reacciones se siguieron mediante RMN de  $^1\text{H}$ . Para ello fue necesario purificar las alícuotas de la manera habitual que veremos más adelante.

Los tiempos de reacción oscilaron entre 4 y 22 horas. En el caso de los homopolímeros se dejó proseguir la reacción hasta que la conversión fue total y en el caso de los copolímeros hasta que la conversión fue la deseada. Cuando la reacción se dio por finalizada, se retiró el recipiente de reacción del baño térmico y se pasó a un erlenmeyer donde se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. La mezcla de reacción se trató con EtOH caliente, se dejó enfriar lentamente durante 15 minutos y el precipitado que quedó en el fondo se separó por decantación. El proceso se repitió dos veces. El precipitado obtenido se redisolvió en  $\text{CHCl}_3$  o  $\text{CHCl}_3/\text{TFA}$ , se filtró y se reprecipitó con MeOH. Finalmente se filtró de nuevo, se secó y se almacenó a vacío.

### 3.2.3.1. Obtención y caracterización de los poli( $\alpha$ -alquil $\gamma$ -glutamato)s

En la **Tabla 3.4** se resumen las experiencias realizadas, las condiciones empleadas y los resultados que se obtienen en cada caso. Como se observa, a medida que aumenta el número de carbonos del alcohol, es necesario incrementar el tiempo de reacción para conseguir conversiones completas.

Los resultados obtenidos muestran que el procedimiento de transesterificación puede aplicarse de forma general a la obtención de ésteres del ácido poli( $\gamma$ -glutámico). Los tiempos de reacción empleados son cortos si los comparamos con los de esterificación y, además, el alcohol que utilizamos como nucleófilo hace también de disolvente por lo que disminuye el número de componentes necesario para llevar a cabo la reacción.

La caracterización química de los ésteres obtenidos por transesterificación se realizó por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y los pesos moleculares fueron evaluados por viscosimetría capilar en  $\text{CHCl}_3$  y THF y por SEC/LS. La composición enantiomérica se determinó por HPLC a partir de muestras hidrolizadas de los polímeros. Todas estas técnicas están detalladas en el **Capítulo 2**.

Tabla 3.4. Datos de la reacción de transesterificación del poli( $\alpha$ -etil  $\gamma$ -glutamato) con alcoholes lineales largos.

Polímero	Condiciones de reacción		Rdto. (%)	Viscosimetría <sup>a</sup>		SEC-LS <sup>b</sup>		Análisis elemental <sup>c</sup>		
	t (h)	T (°C)		$[\eta]$ (dL g <sup>-1</sup> )	$M_v \cdot 10^{-3}$	$M_w \cdot 10^{-3}$	PD	C (%)	H (%)	N (%)
PAAG-12	D	150	84	0.56	140	150	1.31	67.98	10.99	4.86
	DL	150	63	0.48	125	150	1.27	67.72 (68.70)	10.63 (10.44)	4.81 (4.71)
PAAG-14	D	170	48	0.49	126	250	1.33	68.62	10.84	4.40
	DL	190	70	0.28	66	89	1.22	68.94 (70.20)	10.77 (10.78)	4.41 (4.31)
PAAG-16	D	190	82	0.44	116	140	1.36	70.84	11.45	4.04
	DL	190	70	0.21	95	100	1.40	70.90 (71.40)	11.52 (11.05)	4.06 (3.97)
PAAG-18	D	190	85	0.50	130	170	1.42	70.71	11.31	3.70
	DL	190	69	0.14	45	32	1.52	71.73 (72.40)	11.74 (11.29)	3.77 (3.67)
PAAG-20	D	190	80	0.34	95	100	1.40	72.26	11.76	3.48
	DL	190	69	0.30	86	86	1.45	72.78 (73.30)	11.94 (11.49)	3.52 (3.40)
PAAG-22	D	190	80	0.21	66	66	1.30	74.23	12.30	3.27
	DL	190	68	0.16	52	42	1.28	74.23 (74.14)	12.33 (11.67)	3.32 (3.20)

<sup>a</sup>Peso molecular viscosimétrico determinado utilizando la ecuación de Poché y col. (1990),  $[\eta] = (1.29 \pm 0.35) \cdot 10^{-5} M_v^{(1.29 \pm 0.09)}$  para  $[\eta]$  en mL·g<sup>-1</sup>, viscosidad medida en THF. <sup>b</sup>Peso molecular promedio en peso determinado mediante dispersión de la luz. <sup>c</sup>Los valores teóricos de análisis elemental se dan entre paréntesis.

Los espectros de RMN, como es de esperar, presentan un patrón común correspondiente a la cadena principal del polímero, observándose en cada uno las señales correspondientes a los átomos de la cadena lateral. En los espectros de  $^1\text{H}$  RMN se observan con claridad las señales del  $\text{OCH}_2$ , así como del  $\text{CH}_2$  unido a este y del  $\text{CH}_3$  terminal. No obstante, las señales de los metilenos interiores, presentan el mismo desplazamiento químico apareciendo solapados entre sí, resultado del entorno químico similar.

En los espectros de IR se observan las señales correspondientes al grupo amida, principalmente la amida A, amida B, amida I, amida II y amida V, así como también al grupo éster lateral. En la **Figura 3.6** se muestran a modo de ejemplo los espectros de IR,  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN del PAA(D)G-22 obtenido por transesterificación.

A continuación detallamos las condiciones de reacción para cada polímero y los datos específicos de su caracterización.

***Poli( $\alpha$ -n-dodecil  $\gamma$ ,D-glutamato) (PAA(D)G-12).*** La transesterificación del PAA(D)G-2 con dodecanol (relación molar alcohol/polímero 50/1) se realizó calentando a 150 °C durante 11 h. Se adicionó una relación molar de  $\text{Ti}(\text{OBu})_4/\text{PAAG-2}$  de 0.1/1. El seguimiento de la reacción mediante RMN de  $^1\text{H}$  reveló que a las 8 h de reacción la conversión fue sólo del 88 %. El producto se aisló según el procedimiento general. El rendimiento de la reacción fue del 88 %. Para el isómero DL el tiempo de reacción necesario para la conversión total fue de 6.5 h (rdto. 63%).

**IR (film en  $\text{CHCl}_3$ ):** ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3306 (NH, amida A); 3067 (amida B); 1743 (C=O); 1652 (amida I); 1557 (amida II).

**$^1\text{H}$  RMN (en  $\text{CDCl}_3/\text{TFA}$ ):**  $\delta$  (ppm) 7.60 (d, 1H, NH); 4.60 (m, 1H,  $\alpha$ -CH); 4.2 (m, 2H,  $\text{OCH}_2$ ); 2.54 (t, 2H,  $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ); 2.35-1.90 (m, 2H,  $\beta$ - $\text{CH}_2$ ); 1.67 (m, 2H,  $^2\text{CH}_2$ ), 1.5-1.1 (banda ancha, 18H,  $^{3-11}(\text{CH}_2)_9$ ); 0.87 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C}$  RMN (en  $\text{CDCl}_3/\text{TFA}$ ):**  $\delta$  (ppm) 176.29 (CONH); 173.68 (COO); 68.54 ( $^1\text{CH}_2$ ); 53.43 ( $\alpha$ -CH); 32.33 ( $^{10}\text{CH}_2$ ); 32.19 ( $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ); 29.96 ( $^{4-9}(\text{CH}_2)_6$ ); 28.49 ( $^2\text{CH}_2$ ); 27.75 ( $\beta$ - $\text{CH}_2$ ); 25.88 ( $^3\text{CH}_2$ ); 23.04 ( $^{11}\text{CH}_2$ ); 14.19 ( $\text{CH}_3$ ).

***Poli( $\alpha$ -n-tetradecil  $\gamma$ ,D-glutamato) (PAA(D)G-14).*** El PAA(D)G-2 se transesterificó con *n*-tetradecanol (relación molar 25/1) calentando la mezcla a 170°C durante 3 h. La relación molar  $\text{Ti}(\text{OBu})_4/\text{PAAG-2}$  fue de 0.10/1. El producto se aisló según el

procedimiento general. El rendimiento de la reacción fue del 48 %. El DL poliglutamato se obtuvo de la misma forma pero calentando la mezcla a 190 °C durante 2 h (rdto. 70%).

**IR (film en  $\text{CHCl}_3$ ):** ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3306 (NH, amida A); 3066 (amida B); 1748 (C=O); 1652 (amida I); 1557 (amida II).

**$^1\text{H}$  RMN (en  $\text{CDCl}_3/\text{TFA}$ ):**  $\delta$  (ppm) 7.60 (d, 1H, NH); 4.55 (m, 1H,  $\alpha$ -CH); 4.19 (m, 2H,  $^1\text{CH}_2$ ); 2.51 (t, 2H,  $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ); 2.40-1.90 (m, 2H,  $\beta$ - $\text{CH}_2$ ); 1.65 (m, 2H,  $^2\text{CH}_2$ ), 1.5-1.1 (banda ancha, 22H,  $^{3-13}(\text{CH}_2)_{11}$ ); 0.90 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C}$  RMN (en  $\text{CDCl}_3/\text{TFA}$ ):**  $\delta$  (ppm) 176.32 (CONH); 173.74 (COO); 68.57 ( $^1\text{CH}_2$ ); 53.42 ( $\alpha$ -CH); 32.16 ( $^{12}\text{CH}_2$ ); 32.10 ( $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ); 29.52 ( $^{4-11}(\text{CH}_2)_8$ ); 28.46 ( $^2\text{CH}_2$ ); 27.74 ( $\beta$ - $\text{CH}_2$ ); 25.88 ( $^3\text{CH}_2$ ); 23.08 ( $^{13}\text{CH}_2$ ); 14.23 ( $\text{CH}_3$ ).

***Poli( $\alpha$ -*n*-hexadecil  $\gamma$ ,*D*-glutamato) (PAA(D)G-16).*** La transesterificación del PAA(D)G-2 con *n*-hexadecanol (relación molar 25/1) se llevó a cabo calentando la mezcla a 190 °C durante 4.5 horas. La relación molar  $\text{Ti}(\text{O}i\text{Bu})_4/\text{PAAG-2}$  fue de 0.15/1. El producto fue precipitado con metanol y se purificó por reprecipitación en un sistema disolvente/precipitante  $\text{CHCl}_3$ -TFA / EtOH. El rendimiento de la reacción fue del 82 %. Para el isómero DL el rendimiento fue del 70%.

**IR (film en  $\text{CHCl}_3$ ):** ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3305 (NH, amida A); 3067 (amida B); 1742 (C=O); 1648 (amida I); 1554 (amida II).

**$^1\text{H}$  RMN (en  $\text{CDCl}_3/\text{TFA}$ ):**  $\delta$  (ppm) 7.57 (d, 1H, NH); 4.56 (m, 1H,  $\alpha$ -CH); 4.22 (m, 2H,  $^1\text{CH}_2$ ); 2.51 (t, 2H,  $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ); 2.30-2.00 (m, 2H,  $\beta$ - $\text{CH}_2$ ); 1.65 (m, 2H,  $^2\text{CH}_2$ ), 1.3 (banda ancha, 26H,  $^{3-15}(\text{CH}_2)_{13}$ ); 0.88 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C}$  RMN (en  $\text{CDCl}_3/\text{TFA}$ ):**  $\delta$  (ppm) 176.22 (CONH); 173.65 (COO); 68.47 ( $^1\text{CH}_2$ ); 53.33 ( $\alpha$ -CH); 32.31 ( $^{14}\text{CH}_2$ ); 32.09 ( $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ); 29.95 ( $^{4-13}(\text{CH}_2)_{10}$ ); 28.41 ( $^2\text{CH}_2$ ); 27.67 ( $\beta$ - $\text{CH}_2$ ); 25.84 ( $^3\text{CH}_2$ ); 23.03 ( $^{15}\text{CH}_2$ ); 14.22 ( $\text{CH}_3$ ).

***Poli( $\alpha$ -*n*-octadecil  $\gamma$ ,*D*-glutamato) (PAA(D)G-18).*** Se obtuvo por transesterificación del PAA(D)G-2 con *n*-octadecanol (relación molar alcohol/polímero 25/1) calentando a 190 °C durante 6h. La relación molar  $\text{Ti}(\text{O}i\text{Bu})_4/\text{PAAG-2}$  se incrementó a 0.3/1. El polímero obtenido se precipitó con metanol y se separó por filtración. La purificación se realizó disolviendo en  $\text{CHCl}_3$ -TFA, filtrando y precipitando con MeOH. El rendimiento fue del 85 %. Para obtener el isómero DL se trabajó a 190 °C durante 22 horas (rdto. 69%).

**IR (film en CHCl<sub>3</sub>):** (cm<sup>-1</sup>) 3307 (NH, amida A); 3066 (amida B); 1747 (C=O); 1652 (amida I); 1558 (amida II).

**<sup>1</sup>H RMN (en CDCl<sub>3</sub>/TFA):** δ (ppm) 7.60 (d, 1H, NH); 4.57 (m, 1H, α-CH); 4.16 (m, 2H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>); 2.53 (t, 2H, γ-CH<sub>2</sub>); 2.30-1.90 (m, 2H, β-CH<sub>2</sub>); 1.67 (m, 2H, <sup>2</sup>CH<sub>2</sub>), 1.3 (banda ancha, 30H, <sup>3-17</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>); 0.90 (t, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C RMN (en CDCl<sub>3</sub>/TFA):** δ (ppm) 176.22 (CONH); 173.65 (COO); 68.47 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>); 53.33 (α-CH); 32.31 (<sup>14</sup>CH<sub>2</sub>); 32.09 (γ-CH<sub>2</sub>); 29.95 (<sup>4-15</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>); 28.41 (<sup>2</sup>CH<sub>2</sub>); 27.67 (β-CH<sub>2</sub>); 25.84 (<sup>3</sup>CH<sub>2</sub>); 23.03 (<sup>17</sup>CH<sub>2</sub>); 14.22 (CH<sub>3</sub>).

***Poli(α-n-eicosil γ,D-glutamato) (PAA(D)G-20).*** La transesterificación del PAA(D)G-2 con *n*-eicosanol (relación molar alcohol/polímero 12.5/1) se realizó calentando la mezcla a 190 °C durante 8 horas. La relación molar Ti(OBu)<sub>4</sub>/PAAG-2 fue de 0.23/1. El producto precipitó al enfriarse la disolución y se eliminó el exceso de *n*-eicosanol con EtOH caliente. Se purificó por reprecipitación en un sistema disolvente/precipitante CHCl<sub>3</sub>TFA / MeOH. El rendimiento de la reacción fue del 81 %. El isómero DL se obtuvo tras 4 h de reacción y el rendimiento fue del 84%.

**IR (film en CHCl<sub>3</sub>):** (cm<sup>-1</sup>) 3307 (NH, amida A); 3065 (amida B); 1748 (C=O); 1652 (amida I); 1558 (amida II).

**<sup>1</sup>H RMN (en CDCl<sub>3</sub>/TFA):** δ (ppm) 7.60 (d, 1H, NH); 4.57 (m, 1H, α-CH); 4.18 (m, 2H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>); 2.53 (t, 2H, γ-CH<sub>2</sub>); 2.40-2.00 (m, 2H, β-CH<sub>2</sub>); 1.66 (m, 2H, <sup>2</sup>CH<sub>2</sub>), 1.3 (banda ancha, 34H, <sup>3-19</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>); 0.88 (t, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C RMN (en CDCl<sub>3</sub>/TFA):** δ (ppm) 176.53 (CONH); 173.73 (COO); 68.72 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>); 53.50 (α-CH); 32.33 (<sup>18</sup>CH<sub>2</sub>); 32.19 (γ-CH<sub>2</sub>); 30-29.5 (<sup>4-17</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>); 28.4 (<sup>2</sup>CH<sub>2</sub>); 27.72 (β-CH<sub>2</sub>); 25.88 (<sup>3</sup>CH<sub>2</sub>); 23.04 (<sup>19</sup>CH<sub>2</sub>); 14.19 (CH<sub>3</sub>).

***Poli(α-n-docosil γ,D-glutamato) (PAA(D)G-22).*** La transesterificación del PAA(D)G-2 con *n*-docosanol (relación molar alcohol/polímero 12.5/1) se realizó calentando la mezcla a 190 °C durante 8-8.5 h. La relación molar Ti(OBu)<sub>4</sub>/PAAG-2 utilizada fue de 0.25/1. El producto precipitó al enfriarse la disolución y se purificó mediante el procedimiento general. El rendimiento de la reacción fue del 79 % ( para el isómero DL el rendimiento fue del 68 %).

**IR (film en CHCl<sub>3</sub>):** (cm<sup>-1</sup>) 3305 (NH, amida A); 3065 (amida B); 1743 (C=O); 1649 (amida I); 1551 (amida II).

$^1\text{H}$  RMN (en  $\text{CDCl}_3/\text{TFA}$ ):  $\delta$  (ppm) 7.60 (d, 1H, NH); 4.58 (m, 1H,  $\alpha$ -CH); 4.1 (m, 2H,  $^1\text{CH}_2$ ); 2.55 (t, 2H,  $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ); 2.35-2.00 (m, 2H,  $\beta$ - $\text{CH}_2$ ); 1.68 (m, 2H,  $^2\text{CH}_2$ ), 1.3 (banda ancha, 38H,  $^{3-21}(\text{CH}_2)_{19}$ ); 0.88 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  RMN (en  $\text{CDCl}_3/\text{TFA}$ ):  $\delta$  (ppm) 176.53 (CONH); 173.73 (COO); 68.72 ( $^1\text{CH}_2$ ); 53.50 ( $\alpha$ -CH); 32.33 ( $^{20}\text{CH}_2$ ); 32.19 ( $\gamma$ - $\text{CH}_2$ ); 30-29.5 ( $^{4-19}(\text{CH}_2)_{16}$ ); 28.4 ( $^2\text{CH}_2$ ); 27.72 ( $\beta$ - $\text{CH}_2$ ); 25.88 ( $^3\text{CH}_2$ ); 23.04 ( $^{21}\text{CH}_2$ ); 14.19 ( $\text{CH}_3$ ).

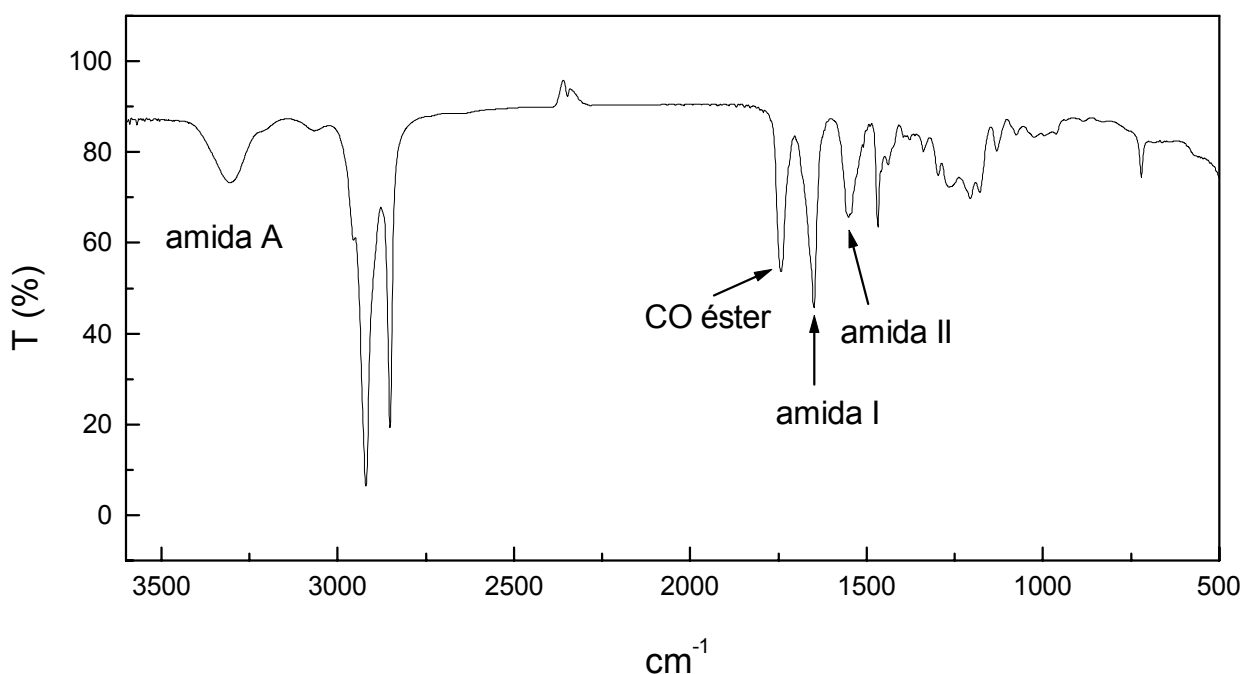


Figura 3.6A. Espectro de IR del PAA(D)G-22.

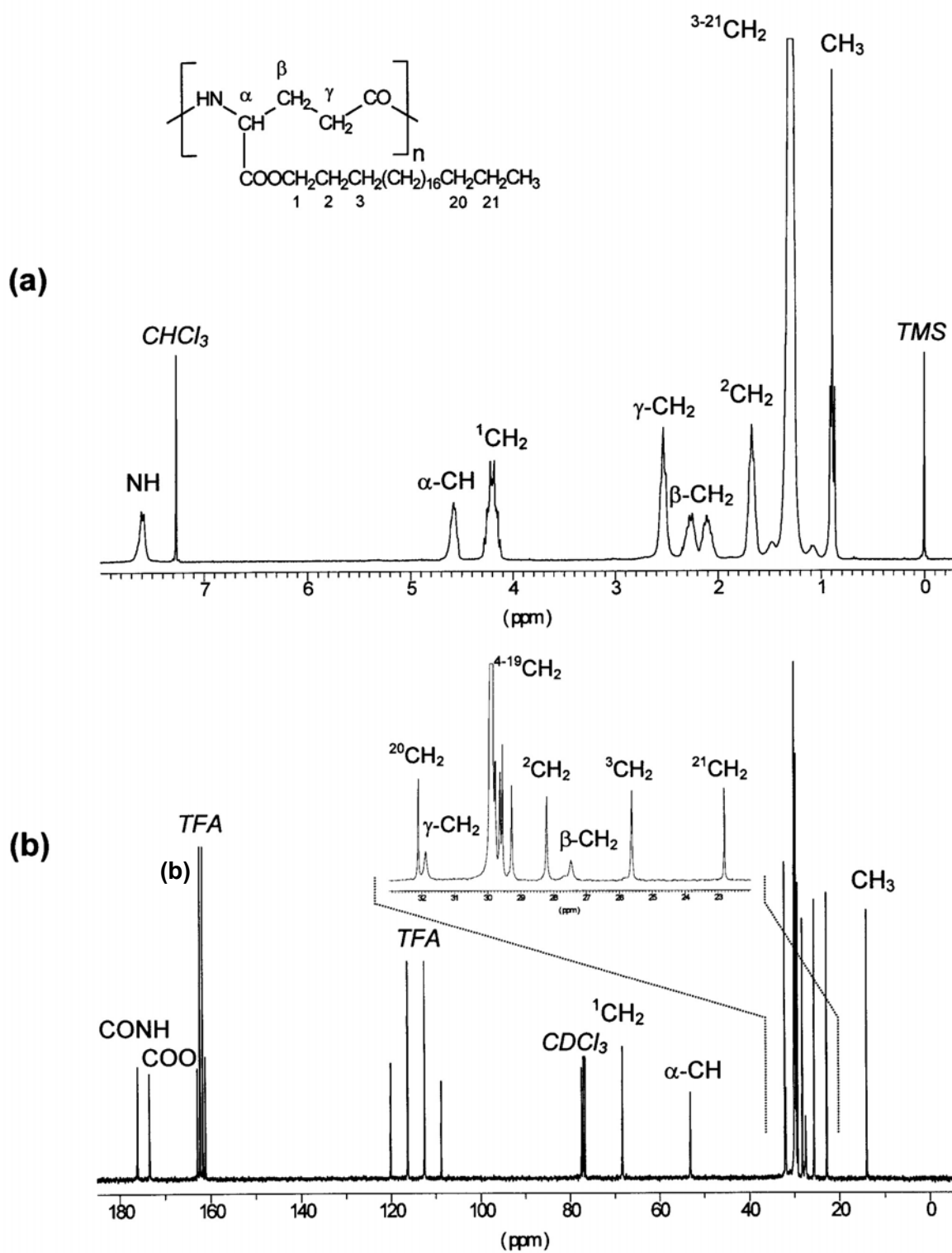


Figura 3.6B. Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (a) y de  $^{13}\text{C}$  (b) del PAA(D)G-22.



**Pesos moleculares.** Se determinaron por viscosimetría y por SEC/LS para averiguar si existe algún tipo de alteración en el peso molecular durante el transcurso de la esterificación o de la transesterificación. Las medidas viscosimétricas se realizaron en THF y los pesos moleculares se estimaron de acuerdo con la ecuación de Poché y col. (1990) obtenida para el poli( $\gamma$ -estearil  $\alpha$ ,L-glutamato) en THF. La técnica empleada se describe en el **Capítulo 2** y los resultados se detallan en la **Tabla 3.4**.

Si comparamos los pesos moleculares de los poliglutamatos de cadena larga con los pesos moleculares de los PAAG-2 y de los PGGAs de partida, puede pues deducirse que ocurre cierta fragmentación molecular tanto durante el proceso de esterificación como durante el de transesterificación.

**Composición enantiomérica.** Fue evaluada con el objetivo de determinar si ocurre racemización durante el transcurso de la esterificación o de la transesterificación. La técnica utilizada corresponde a una modificación de la desarrollada por Marfey (1984) y ha sido aplicada para la determinación de la composición enantiomérica del PGGa de biosíntesis por Cromwick y Gross, (1995a). Este método se detalla en el **Capítulo 2**.

Los polímeros analizados se limitaron a los poliácidos de partida y los poliglutamatos de etilo y de octadecilo. Si en estos casos no existe racemización, es de suponer que en los otros casos tampoco la habrá, por esta razón se creyó innecesario realizar el ensayo para todos los poliglutamatos de cadena larga. Los resultados se muestran en la **Tabla 3.5**.

**Tabla 3.5.** Determinación de la composición enantiomérica mediante HPLC.

	Isómero L		Isómero D		D:L <sup>c</sup> (%)
	t <sub>ret</sub> (min) <sup>a</sup>	área <sup>b</sup> ·10 <sup>6</sup>	t <sub>ret</sub> (min) <sup>a</sup>	área <sup>b</sup> ·10 <sup>6</sup>	
PG(DL)GA	6.75	19.1	10	27.3	58.8:41.2
PAA(DL)G-2	6.75	10.3	10	15.7	60.4:39.6
PAA(DL)G-18	6.75	11.9	10	17.7	59.8:40.2
PG(D)GA	6.75	3.56	10	27.7	88.6:11.4
PAA(D)G-2	6.75	6.57	10	48.2	88.0:12.0
PAA(D)G-18	6.75	5.98	10	42.2	87.6:12.4

<sup>a</sup>Tiempo de retención. <sup>b</sup>Áreas de los picos observados en los cromatogramas de HPLC, expresadas en mV.s. <sup>c</sup>Calculados a partir de las áreas.

### 3.2.3.2. Obtención y caracterización de los copoli( $\alpha$ -alquil $\gamma$ -glutamato)s

#### 3.2.3.2.1. Copoli( $\alpha$ -alquil $\gamma$ -glutamato)s en bloques

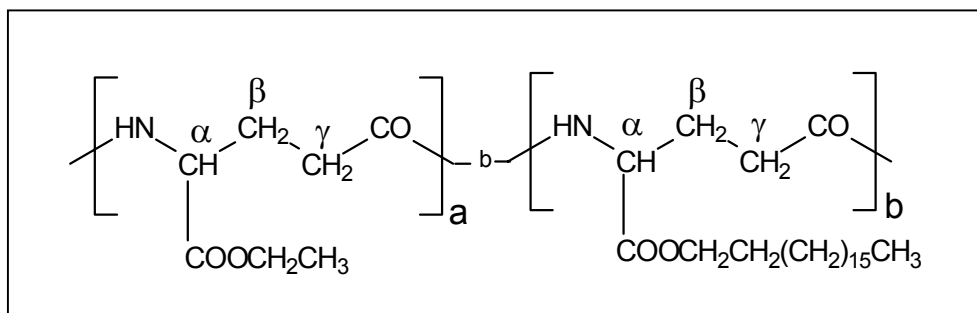
El PAA(DL)G-2 se transesterificó con 1-octadecanol según el método de obtención desarrollado por nuestro grupo para la obtención de homopolímeros pero, como se ha indicado en el apartado anterior, se siguió la reacción mediante RMN de <sup>1</sup>H y se paró cuando la conversión intermedia fue la deseada. Dado que no queremos que el grupo etilo se reemplace totalmente, no es necesario forzar tanto las condiciones y por eso la temperatura a la que se trabajó (150 °C) fue inferior a la utilizada para la obtención de los homopolímeros. La relación molar 1-octadecanol/polímero fue de 25/1 y la proporción molar de Ti(OBu)<sub>4</sub>/PAAG-2 fue de 0.20/1.

Para eliminar el exceso de 1-octadecanol se procedió como en el caso de los homopolímeros: la mezcla de reacción se trató con EtOH caliente, se dejó enfriar durante 10-15 minutos y el polímero que queda en el fondo se separa por decantación. El proceso se repite dos veces para eliminar la mayor parte del alcohol. El precipitado obtenido se disuelve en CHCl<sub>3</sub>, se filtra y se reprecipita en MeOH. El polímero se filtra y se seca a vacío durante varios días. Los datos referentes a la reacción de transesterificación se muestran en la **Tabla 3.6**. La estructura de estos copolímeros se muestra en la **Figura 3.7**.

**Tabla 3.6.** Datos referentes a la obtención de los copolímeros coPAAG-18,2 (a:b).

a:b <sup>a</sup>	C <sup>b</sup> (%)	Rdto. (%)	[ $\eta$ ] (dL·g <sup>-1</sup> )		Mv·10 <sup>-4</sup> <sup>c</sup>	A. E. <sup>d</sup>				
			DCA	CHCl <sub>3</sub>		% N	% C	% H		
90:10	92	60	0.32	0.56	1.3	3.85	70.53	11.56		
						(0.48) <sup>e</sup>	(12.4) <sup>f</sup>	(3.85)	(71.78)	(11.14)
							(14.5) <sup>g</sup>			
80:20	80	64	0.52	0.67	2.49	4.11	70.76	11.89		
						(4.16)	(70.67)	(10.89)		
70:30	70	57	0.55	0.69	2.70	4.56	69.33	10.68		
						(4.46)	(69.60)	(10.64)		
60:40	61	60	0.60	0.87	3.06	5.03	67.61	10.42		
						(4.77)	(68.49)	(10.39)		
20:80	22	55	1.07	i	6.61	6.90	60.05	8.65		
						(6.79)	(61.20)	(8.74)		

<sup>a</sup>Copolímero coPAAG-18,2 (a:b) con composición redondeada a las decenas. <sup>b</sup>Conversión determinada mediante RMN de <sup>1</sup>H. <sup>c</sup>Peso molecular viscosimétrico determinado utilizando la ecuación de Tanaka (1972), [ $\eta$ ]<sub>DCA</sub> = 2.9·10<sup>-4</sup>M<sub>w</sub><sup>0.74</sup>. <sup>d</sup>Los valores teóricos del análisis elemental (A. E.) se dan entre paréntesis. <sup>e</sup>Valor de la viscosidad intrínseca en THF para el único copolímero soluble en este disolvente. <sup>f</sup>Mv determinado en THF utilizando la ecuación de Poché y col. (1990). <sup>g</sup>Mw determinado mediante SEC/LS en THF, la polidispersidad fue de 1.26. La temperatura de reacción fue en todos los casos 150 °C. i: insoluble.

**Figura 3.7.** Unidad estructural de los copolímeros octadecilo-etilo coPAAG-18,2 (a:b).

**Espectroscopia IR y RMN.** En los espectros de IR se observan las señales correspondientes al grupo amida, principalmente la amida A, amida B, amida I, amida II, así como también el éster lateral. A medida que aumenta la sustitución por octadecilo se observa un incremento de la señal a 2990 cm<sup>-1</sup> debida a la vibración de tensión C-H.

Los espectros de RMN de los copolímeros presentan las mismas señales que los homopolímeros y, como es de esperar, lo que varía es la integración relativa de las señales asociadas al grupo alquilo lateral.

En la **Figura 3.8** se muestran los espectros de IR y de RMN de  $^1\text{H}$  del coPAA(DL)G-18,2 de composición 60:40 obtenido por transesterificación.

**Determinación de la composición mediante RMN de  $^1\text{H}$ .** Si observamos la **Figura 3.8**, a la integral del  $\alpha\text{-CH}$  le llamamos  $A^1_{\text{CH}}$ . Los tres protones del metilo de las unidades  $\alpha$ -etil  $\gamma$ -glutamato se solapan con la señal de los protones de la cadena lateral de octadecilo ( $^{3-17}\text{CH}_2$ ). A la integral de todos los hidrógenos entre 0.7-1.8 ppm le llamamos  $A^{38}_{\text{CH}_2+\text{CH}_3}$ . Por tanto, si  $A^1_{\text{CH}}$  es igual a 1, la relación entre las dos áreas  $R_A$  es

$$R_A = \frac{A^{38}_{\text{CH}_2+\text{CH}_3}}{A^1_{\text{CH}}} = \frac{3a + 35b}{1} \quad a + b = 1$$

siendo **a** la composición molar en unidades de etilo y **b** la composición molar en unidades de octadecilo, de donde

$$b = \frac{R_A - 3}{32}$$

Así, directamente a partir de la relación de áreas  $R_A$  se puede determinar la composición de los copolímeros mediante RMN.

**Microestructura.** Desafortunadamente las diferencias en la microestructura de estos copolímeros no han podido ser distinguidas en los espectros de RMN al campo magnético aplicado en nuestro análisis. Para aclarar si los copolímeros coPAAG-18,2 tienen una microestructura en bloques o al azar, se prepararon dos copolímeros modelo al azar tal y como se indica en el apartado siguiente.

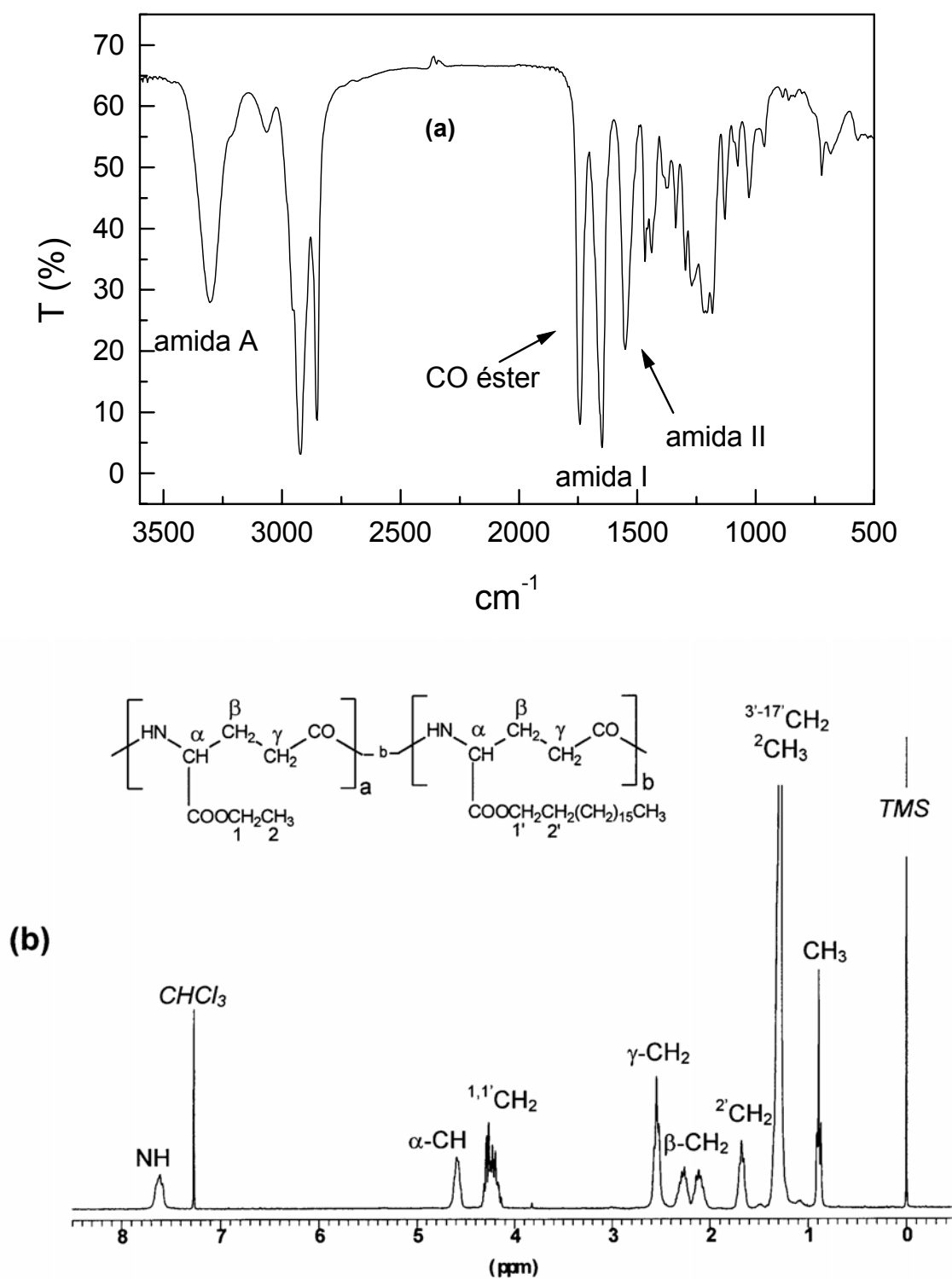


Figura 3.8. Espectros de IR (a) y de  $^1\text{H}$  RMN (b) del coPAA(DL)G-18,2 (60:40) obtenido por transesterificación.

**Solubilidad.** Todos los copolímeros, excepto el de composición (20:80) son solubles en  $\text{CHCl}_3$ . Este último copolímero se puede solubilizar en  $\text{CHCl}_3/\text{TFA}$  o  $\text{CHCl}_3/\text{TFE}$ . El único copolímero soluble en THF es el de composición aproximada (90:10).

**Pesos moleculares.** Como hemos indicado, tan sólo el copolímero (90:10) es soluble en THF, por eso es el único para el que se ha podido determinar el  $M_v$  utilizando la ecuación de Poché y col. (1990) y también se pudo determinar el  $M_w$  mediante SEC-LS. Para los restantes copolímeros se determinó la  $[\eta]$  en DCA y en  $\text{CHCl}_3$ .

Como se observa en la **Tabla 3.6**, a medida que aumenta el contenido en octadecilo disminuye el peso molecular de los copolímeros, aunque hay que tener en cuenta que la composición del sistema cambia y, por tanto, la ecuación no tiene por qué ser válida para todos los copolímeros, no podemos descartar que tenga lugar cierta fragmentación molecular tal y como ocurre en los homopolímeros a medida que aumenta el tiempo de reacción.

#### 3.2.3.2.2. Copoli( $\alpha$ -alquil $\gamma$ -glutamato)s al azar

La esterificación parcial del ácido poli( $\gamma$ -glutámico) con bromuro de etilo en NMP se realizó de acuerdo con el método empleado por Kubota y col. (1995). El procedimiento experimental para la obtención de los copolímeros 18,2 de composiciones aproximadas (10:90) y (35:65) se detalla a continuación.

La reacción se llevó a cabo por triplicado. Se suspendieron 0.5 g de PG(DL)GA (3.875 mmol) en 50 mL de NMP en un recipiente provisto de agitación magnética y se mantuvo a 80 °C hasta completa disolución. Se bajó la temperatura del baño a 60 °C, se adicionaron 1.31 g de  $\text{NaHCO}_3$  (15.6 mmoles), se tapó el recipiente con un septum y se dejó durante media hora. Pasado este tiempo se adicionó lentamente el bromuro de etilo, con ayuda de una jeringa, a través del septum. Se colocó una salida externa para eliminar el  $\text{CO}_2$  que se iba formando. Las cantidades de EtBr adicionadas sobre cada recipiente se muestran en la **Tabla 3.7**. A las 27 h se determinó la conversión mediante RMN de  $^1\text{H}$  (en DMSO). Los resultados se muestran también en la **Tabla 3.7**. La muestra que presentó una conversión del 45%, se purificó precipitando en acetona y se utilizó para determinar el grado de azar del copolímero. En la **Tabla 3.8** se muestra la composición y la microestructura de este copolímero que hemos denominado coPAAG-

H,2 (55:45), determinadas a partir de los espectros de RMN y en la **Figura 3.9** se muestran sus espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$ . A raíz de los resultados mostrados en la **Tabla 3.8** podemos asegurar que el copolímero obtenido presenta una distribución al azar de unidades  $\gamma$ -glutámico y  $\alpha$ -etil- $\gamma$  glutamato.

**Tabla 3.7.** Condiciones de reacción para la esterificación parcial del PGGa con bromuro de etilo.

$V_{\text{EtBr}}$ (mL)	EtBr (mmoles)	PAAG/EtBr (mol/mol)	Conversión (%) <sup>a</sup>
0.15	2.0	1/0.52	45
0.23	3.1	1/0.79	65
0.5	6.7	1/1.73	90

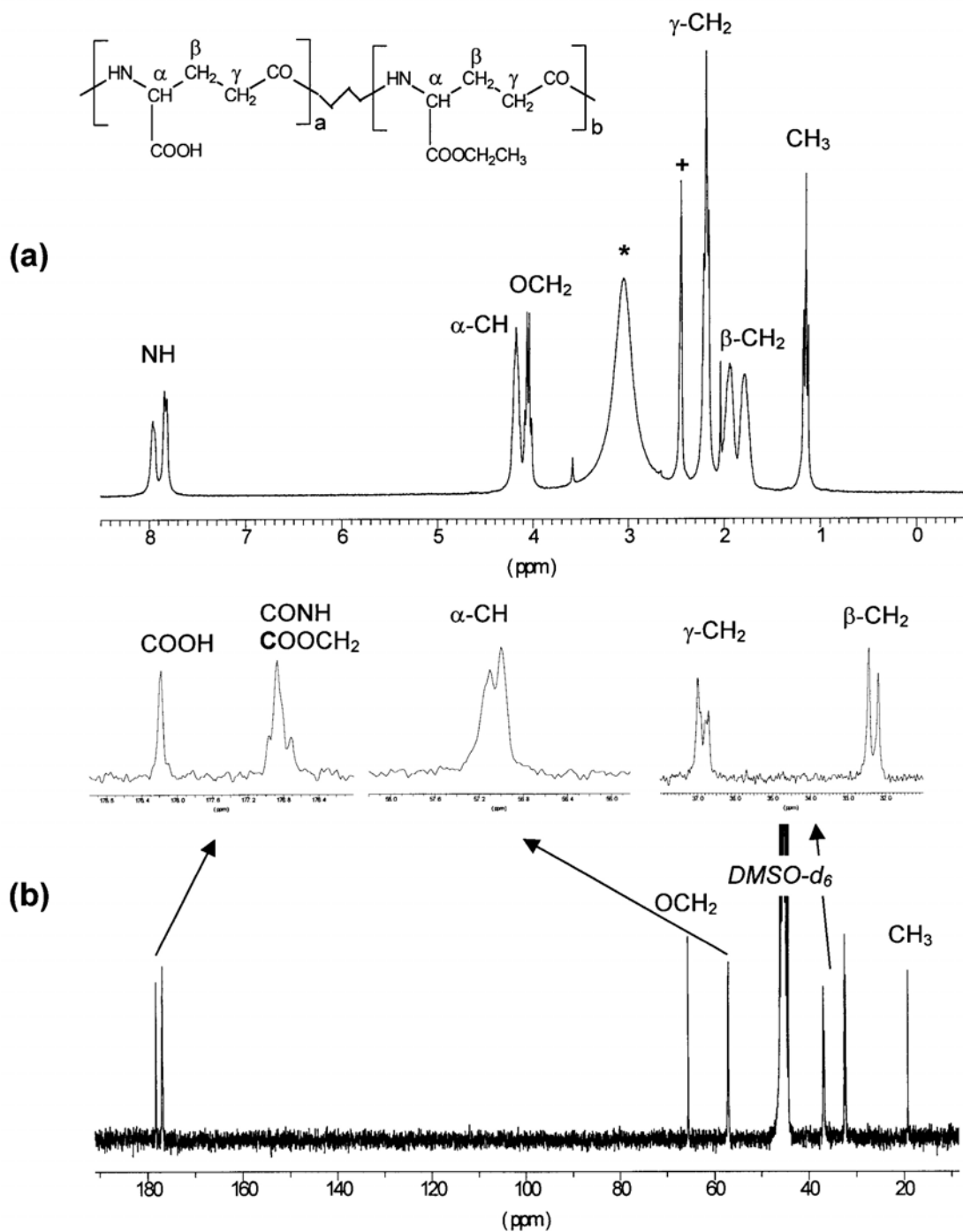
<sup>a</sup>Conversión a las 27 h de reacción.

**Tabla 3.8.** Composición y microestructura del coPAAG-H,2 (55:45).

	Composición		Diadas (%)			Longitud media de secuencias		Grado de azar
	$x_{\text{H}}$	$x_{\text{E}}$	HH	HE, EH	EE	$n_{\text{H}}$	$n_{\text{E}}$	
Exp.	55.7	44.3	35.3	41.7	23.0	2.69	2.10	0.85
Teór.	55.7	44.3	31.0	49.4	19.7	2.26	1.80	1

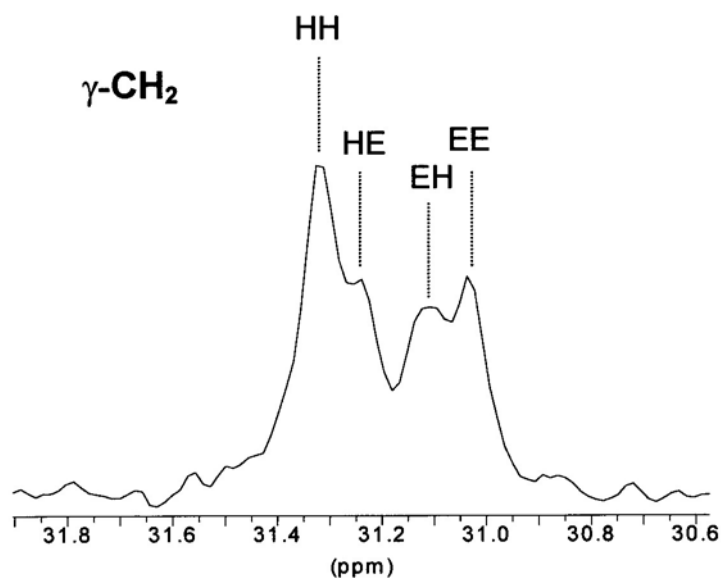
Exp. Experimental, obtenidos por deconvolución de la señal correspondiente al  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> en  $^{13}\text{C}$ . Teór. Teórico, para una distribución al azar de las unidades  $\gamma$ -glutámico y  $\alpha$ -etil  $\gamma$ -glutamato.

Sobre las otras dos mezclas de reacción se adicionó el bromuro de octadecilo en las cantidades que se indican en la **Tabla 3.9**. Las reacciones se mantuvieron 6 días a 55-60 °C. Pasado este tiempo los polímeros se precipitaron sobre 3 volúmenes de éter, se filtraron, se redisolviaron en  $\text{CHCl}_3$  y se reprecipitaron en éter, se lavaron varias veces con este disolvente y se secaron a vacío. En la misma **Tabla 3.9** se muestran los datos referentes a la obtención de estos copolímeros. La composición final, determinada mediante RMN de  $^1\text{H}$ , para estos coPAAG-18,2 fue de (35:65) para uno y de (10:90) para el otro. En la **Figura 3.10** se muestran los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  del copolímero de composición (35:65).



**Figura 3.9A.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (a) y de  $^{13}\text{C}$  (b) del coPAAG-H,2 (55:45) en DMSO a 80 °C. (\*, +: señales de agua y DMSO).





**Figura 3.9B.** Ampliación de la zona correspondiente al  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> del espectro de RMN de <sup>13</sup>C del coPAAG-H,2 (55:45) en DMSO a 80 °C.

**Tabla 3.9.** Condiciones de reacción para la esterificación de los coPAAG-H,2 con bromuro de octadecilo (RBr).

RBr (mmoles) <sup>a</sup>	Grupos ácido libres/RBr (mol/mol)	Conversión (%)	Rdto. (%)	Composición Final (a:b) <sup>b</sup>
2.70 (0.9)	1/2	>95	60	35:65
0.78 (0.26)	1/2	100	85	10:90

<sup>a</sup>Entre paréntesis se indica el peso en gramos. <sup>b</sup>Composición de los copolímeros al azar coPAAG-18,2.

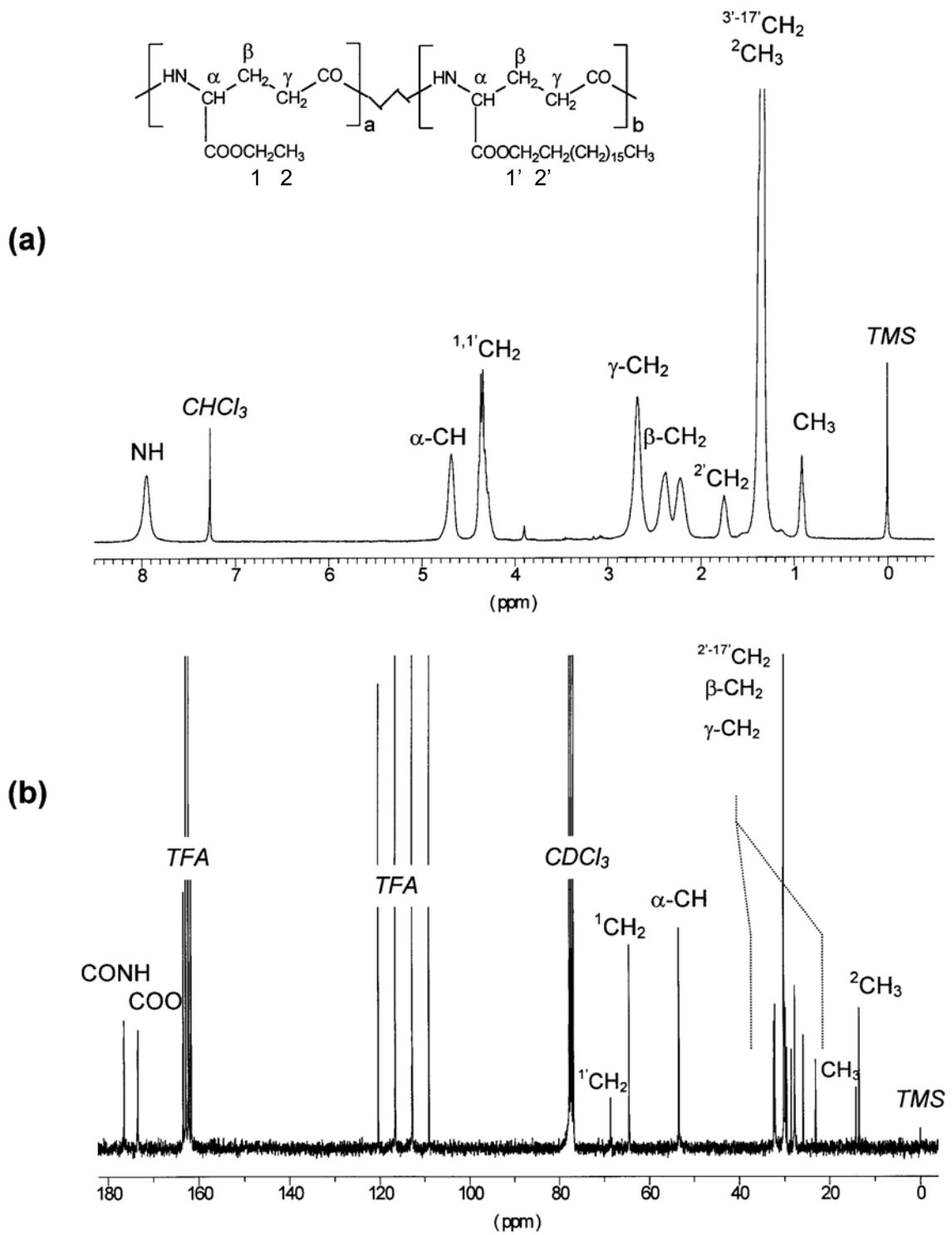


Figura 3.10. Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (a) y de  $^{13}\text{C}$  (b) del coPAAG-18,2 (35:65).

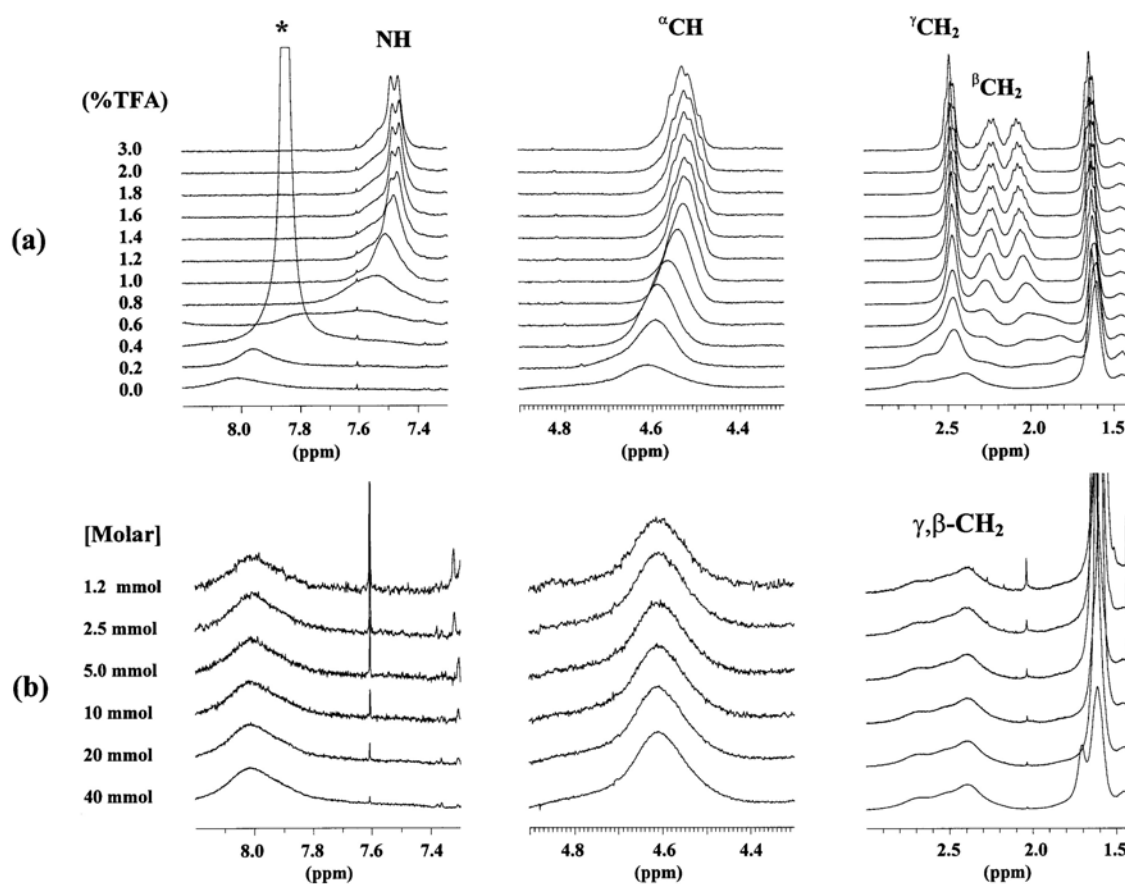
### 3.2.4. Estudio conformacional en disolución

Los PAAG-*n* tipo peine muestran un comportamiento en cuanto a solubilidad claramente distinto al que presentan los PAAG-*n* de cadena corta. Son solubles en  $\text{CHCl}_3$ , THF, pero son insolubles en alcoholes fluorados tales como TFE o hexafluoroisopropanol. Los miembros de la serie con cadenas laterales más largas (20, 22) pueden disolverse en *n*-heptano caliente. Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  mostraron diferencias en la anchura de las señales dependiendo del disolvente y de la temperatura utilizados. Este comportamiento fue observado previamente para el poli( $\alpha$ -*n*-pentil  $\gamma$ ,D-glutamato) por Shah y col., (1992) y los autores interpretaron que se debía a cambios conformacionales aunque no descartaron que tuvieran lugar por efecto de la agregación.

Hemos examinado la estructura de los PAAG-*n* tipo peine en disolución por RMN de  $^1\text{H}$  observando la formación de conformaciones plegadas regulares y la presencia de agregaciones moleculares inespecíficas. La evolución de los desplazamientos químicos de los grupos NH, CH y  $\text{CH}_2$  de la cadena principal del PAA(D)G-20 disuelto en  $\text{CHCl}_3$  tras la adición de TFA se muestra en la **Figura 3.11a**. El espectro se resuelve mejor cuando se adiciona un disolvente que rompe los puentes de hidrógeno de la hélice tal como el TFA y las señales correspondientes al NH y al CH de la cadena principal se desplazan a campos más altos. Por otro lado, cuando se diluye la muestra de 40 mM hasta 1.2 mM no se detectan cambios ni en la forma ni en la posición de las señales (**Figura 3.11b**) por lo que se descarta que la agregación sea el origen de los cambios observados por RMN.

La variación en los desplazamientos químicos de las señales de protón del NH y del CH con la concentración de TFA se representa en la **Figura 3.12**. Alrededor del 0.7% de TFA para ambas señales tiene lugar el punto de inflexión, lo que indicaría cambios en la conformación molecular. Tales cambios en forma y posición de los picos se observaron también en poli( $\beta$ ,L-aspartato)s y se interpretaron como una transición hélice-ovillo que tiene lugar tras la adición de TFA. Así, puede asumirse razonablemente la existencia de estructuras plegadas regulares de PAA(D)G-*n* en disolución. Este es un fenómeno común a todos los polipéptidos capaces de adoptar conformaciones helicoidales estabilizadas por enlaces de hidrógeno intramoleculares. La estabilidad de la hélice se puede correlacionar con la cantidad de ácido requerido para promover la transición. Puesto que la transición hélice-ovillo en poli( $\beta$ -péptido)s tiene lugar a,

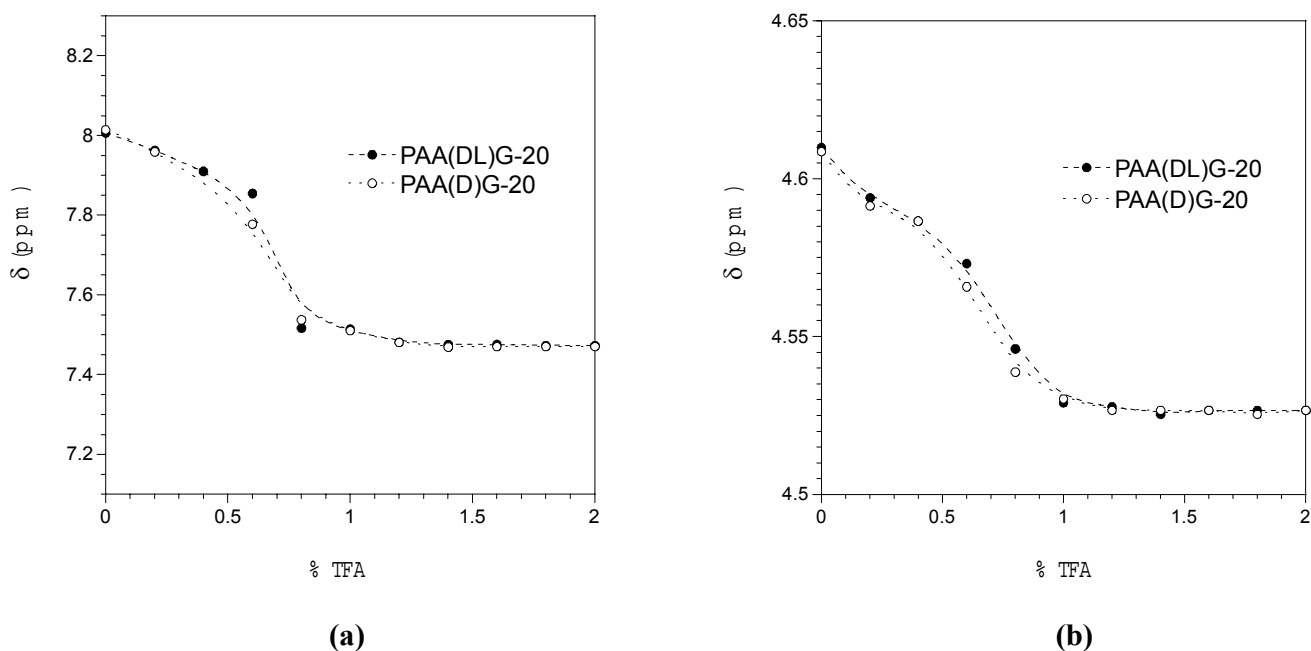
aproximadamente, un 2% de TFA, puede concluirse que la estabilidad de la hélice de los poli( $\gamma$ -péptido)s es menor de acuerdo con una menor densidad de puentes de hidrógeno presente en este último caso.



**Figura 3.11.** Cambios observados en el RMN de  $^1\text{H}$  para el PAA(D)G-20 a 25 °C en  $\text{CHCl}_3$  tras adición de TFA (a) y dilución (b). (\*) TFA.

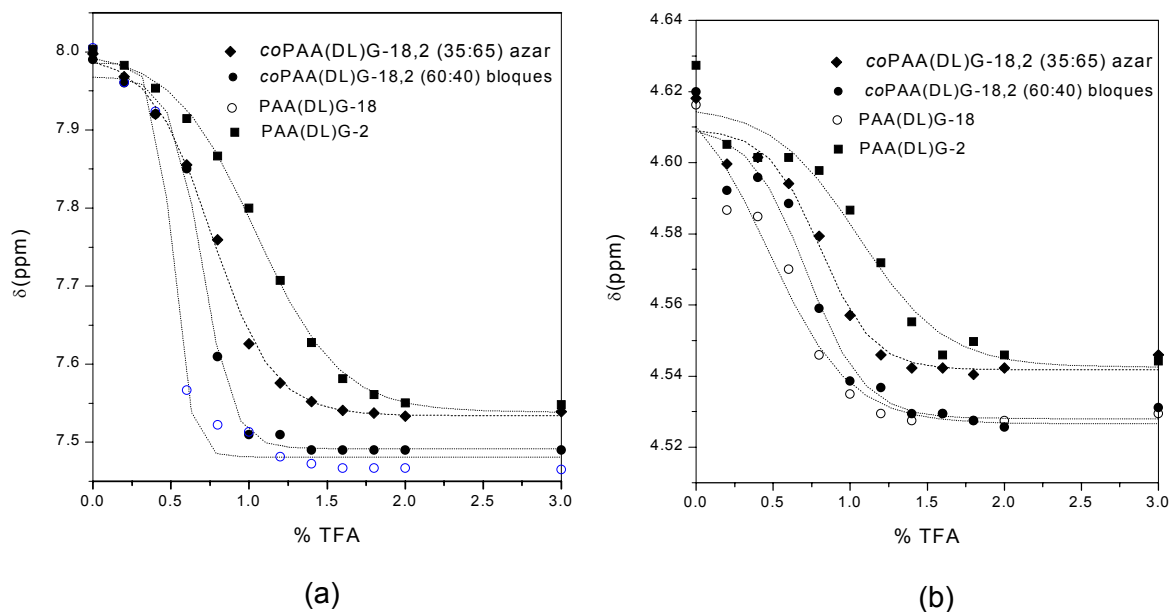
Idénticos resultados de RMN de  $^1\text{H}$  se observaron cuando el polímero racémico PAA(DL)G-20 se sometió al mismo estudio tal y como se muestra en la **Figura 3.12**. La independencia de estos cambios con la composición enantiomérica es ciertamente extraña debido a que, en polipéptidos, la estabilidad de las hélices depende de la estereorregularidad de la cadena polipeptídica. De hecho, un estudio sobre estereocopoli( $\beta$ ,L-aspartato)s en bloques (Martínez de Ilarduya y col., 1999) mostró que la concentración de TFA necesaria para la transición decreció rápidamente con la pérdida de estereorregularidad y que no se observó transición en los estereocopolímeros al azar. Los resultados obtenidos con los poli( $\gamma$ ,DL-glutamato)s de

biosíntesis reforzarían la presencia de un copolímero de largos estereobloques o bien la existencia de una mezcla de dos homopolímeros uno enriquecido en el enantiómero D y otro en el L (Tanaka, 1997).



**Figura 3.12.** Variación en los desplazamientos químicos del NH (a) y CH (b) para el PAA(D)G-20 y para el PAA(DL)G-20 tras adición progresiva de TFA.

La transición hélice-ovillo también se ha estudiado para el copolímero en bloques *co*PAA(DL)G-18,2 (60:40) y para el copolímero al azar *co*PAA(DL)G-18,2 (35:65). En la **Figura 3.13** se compara la variación en los desplazamientos químicos del NH y del CH para estos copolímeros y para los homopolímeros PAA(DL)G-2 y PAA(DL)G-18 tras adición de cantidades incrementadas de TFA. Como se observa, el punto de inflexión de las curvas lo encontramos para el copolímero en bloques alrededor del 0.7 % de TFA, para el PAA(DL)G-18 cerca del 0.6% de TFA, para el copolímero al azar alrededor de un 0.9 % de TFA y para PAA(DL)G-2 cerca del 1.2% lo que indicaría que para este último polímero la conformación helicoidal es ligeramente más estable que para los otros casos.



**Figura 3.13.** Variación en los desplazamientos químicos del NH (a) y CH (b) para el coPAA(DL)G-18,2 (60:40) en bloques, para el coPAA(DL)G-18,2 (35:65) al azar y para los PAA(DL)G-18 y PAA(DL)G-2 tras adición progresiva de TFA.

### 3.2.5. Propiedades térmicas y dinamomecano-térmicas de los poli ( $\alpha$ -alquil $\gamma$ -glutamato)s

#### a) Análisis térmico y termogravimétrico

Los resultados del análisis térmico de los PAAG- $n$  llevados a cabo mediante DSC y TGA se muestran en la **Tabla 3.10**. Los valores para las dos series (D y DL) son similares indicando que el comportamiento térmico no se ve afectado por la composición enantiomérica. Las pequeñas diferencias detectadas se deberían más a factores experimentales no controlados que a efectos configuracionales.

Los termogramas de DSC para PAAG- $n$  con  $n \geq 14$  revelaron la presencia de un proceso de fusión-cristalización que tiene lugar entre 20-80 °C con una entalpía de fusión asociada entre 10 y 100 J·g<sup>-1</sup>. En la **Figura 3.14** se muestran las curvas de calentamiento para los polímeros PAA(DL)G-14 y 22.

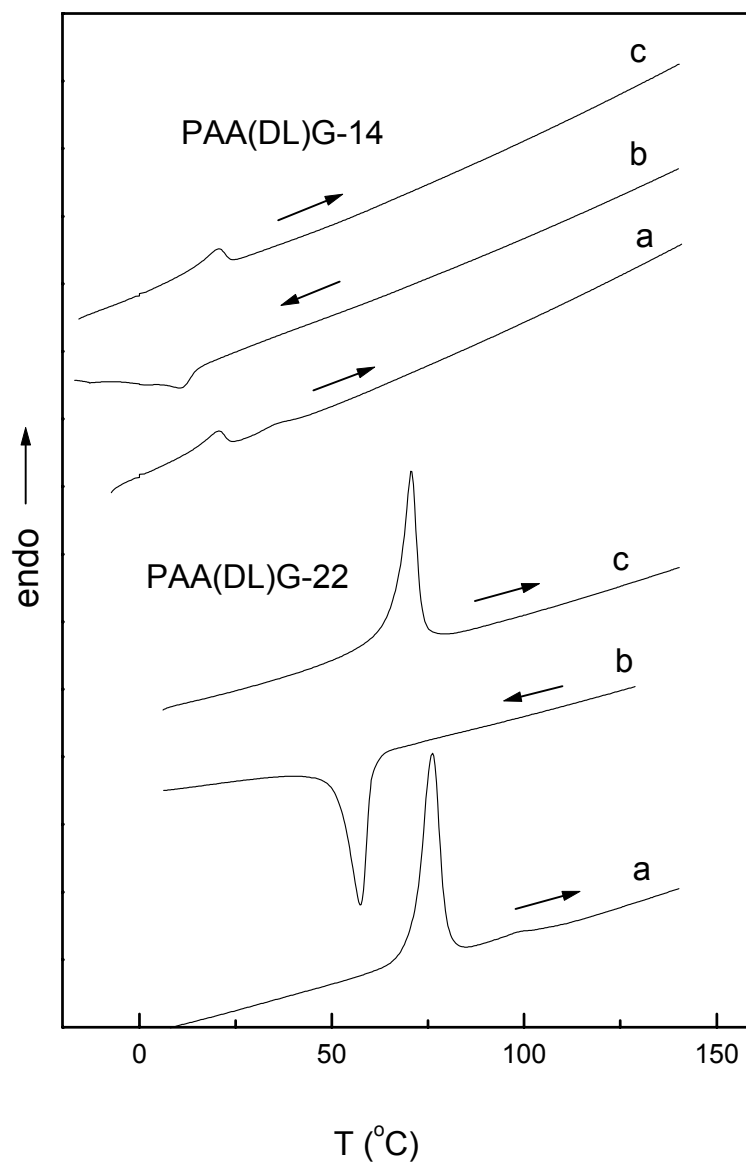
**Tabla 3.10.** Datos térmicos de los poli( $\alpha$ -alquil  $\gamma$ -glutamato)s.

	$T_m^a$ (°C)	$\Delta H^a$ (J·g <sup>-1</sup> )	$T_c^b$ (°C)	$T_m^b$ (°C)	$\Delta H^b$ (J·g <sup>-1</sup> )	$T_d^{oc}$ (°C)	$T_d^c$ (°C)
PAAG-12							
D	-/-	-/-	-	-	-	312	341
DL	-/-	-/-	-	-	-	330	327
PAAG-14							
D	-/-	-/-	-	-	-	310	338
DL	20	14/-	11	21	16	317	341
PAAG-16							
D	43/40	35/36	32	36	11	321	350
DL	38/42	36/35	32	38	10	320	355, 330h
PAAG-18							
D	55/49	74/48	37	42	17	311	330
DL	53/54	74/50	44	51	22	311	330, 365h
PAAG-20							
D	61/57	96/82	49	55	48	319	360, 330h
DL	59/59	67/45	55	58	31	330	370, 330h
PAAG-22							
D	72/76	92/85	61	68	49	326	370, 330h
DL	71/70	96/50	64	69	34	329	370, 330h

<sup>a</sup>Temperatura y entalpía medida en el primer calentamiento para el polvo de síntesis y para un film obtenido a partir de cloroformo. <sup>b</sup>Temperatura de cristalización, temperatura de fusión y entalpía medida en el segundo calentamiento para un film de cloroformo. <sup>c</sup> Temperatura de descomposición *onset* y temperatura de descomposición medida en la curva derivada para la máxima pérdida de peso. h: hombro.

La comparación de los valores obtenidos de muestras provenientes directamente de síntesis con las que se obtuvieron a partir de films de CHCl<sub>3</sub> mostró que las muestras de síntesis son más cristalinas. La temperatura y la entalpía de fusión aumentan a medida que aumenta la longitud de la cadena lateral. Por analogía a los poli( $\alpha$ -glutamato)s y poli( $\beta$ -aspartato)s tipo peine, esta transición debería asociarse a la presencia de una fase parafínica cristalizada. A diferencia con las otras familias de polímeros relacionadas, para el PAAG-12 no se observó cristalización de la cadena lateral.

Por otro lado, en algunos casos, se detectaron endotermas muy pequeñas, con entalpías menores a 1 J·g<sup>-1</sup> por encima de la temperatura de fusión de la cadena lateral. La presencia de estos pequeños picos en poli( $\alpha$ -glutamato)s y poli( $\beta$ -aspartato)s se interpretó que se debía a la existencia de una segunda transición que implica la interconversión entre dos fases cristal-líquido. La investigación de tales picos se detalla en el **capítulo 4**.

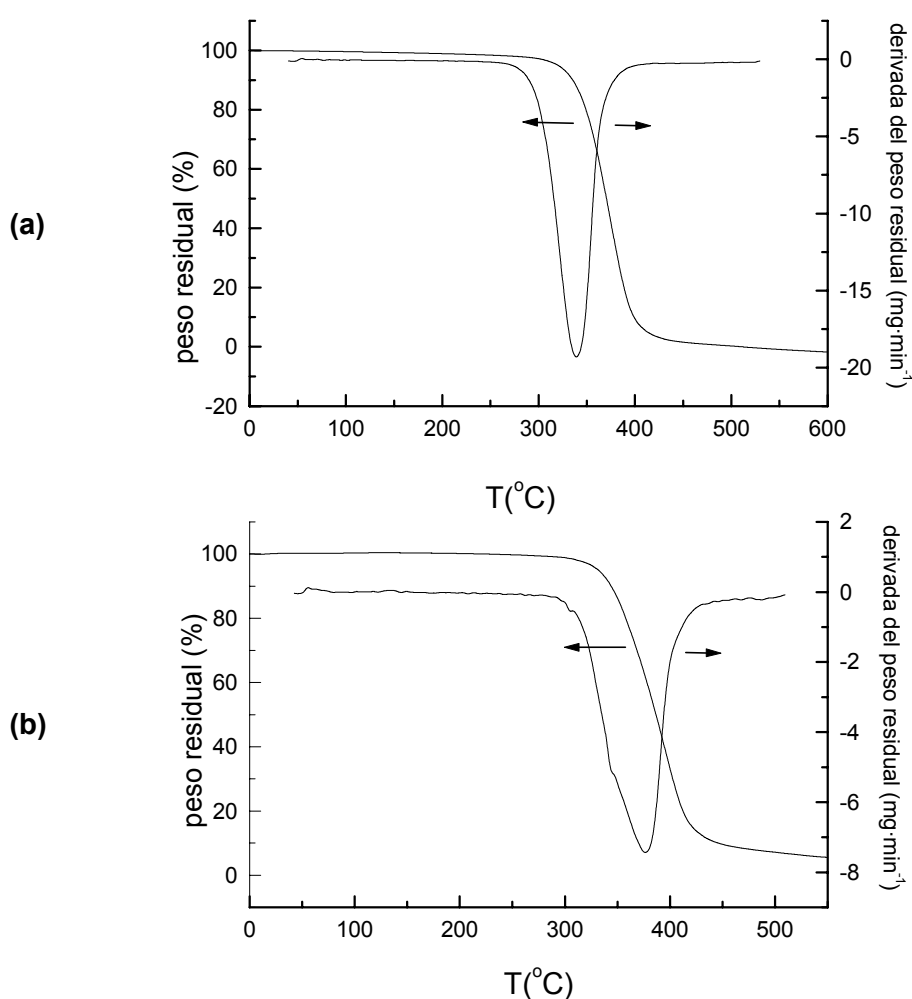


**Figura 3.14.** Termogramas de DSC para el PAA(DL)G-14 y para el PAA(DL)G-22.

El análisis mediante TGA de los PAAG- $n$  mostró que la descomposición de los polímeros empezó a ser apreciable por encima de los 300  $^{\circ}\text{C}$  y que la temperatura de descomposición *onset* es prácticamente independiente de la longitud de la cadena lateral. A temperaturas más altas se encontró un comportamiento más desigual, específicamente a aquellos valores para los que el proceso de degradación alcanza la



velocidad más elevada. Se encontró que la descomposición tenía lugar en uno o dos pasos y a temperaturas que levemente aumentan con  $n$ . La muestra se dejó a 500 °C y la pérdida de peso a esta temperatura fue proporcional al tamaño de la cadena lateral. Un reciente estudio sobre la degradación térmica del PGGA y sus ésteres (Melis y col., 2001) ha revelado que la descomposición de estos polipéptidos implica la liberación de la cadena de alquilo junto con la escisión de la cadena principal. Las curvas de TGA para los PAA(DL)G-14 y PAA(DL)G-22 se muestra en la **Figura 3.15**.



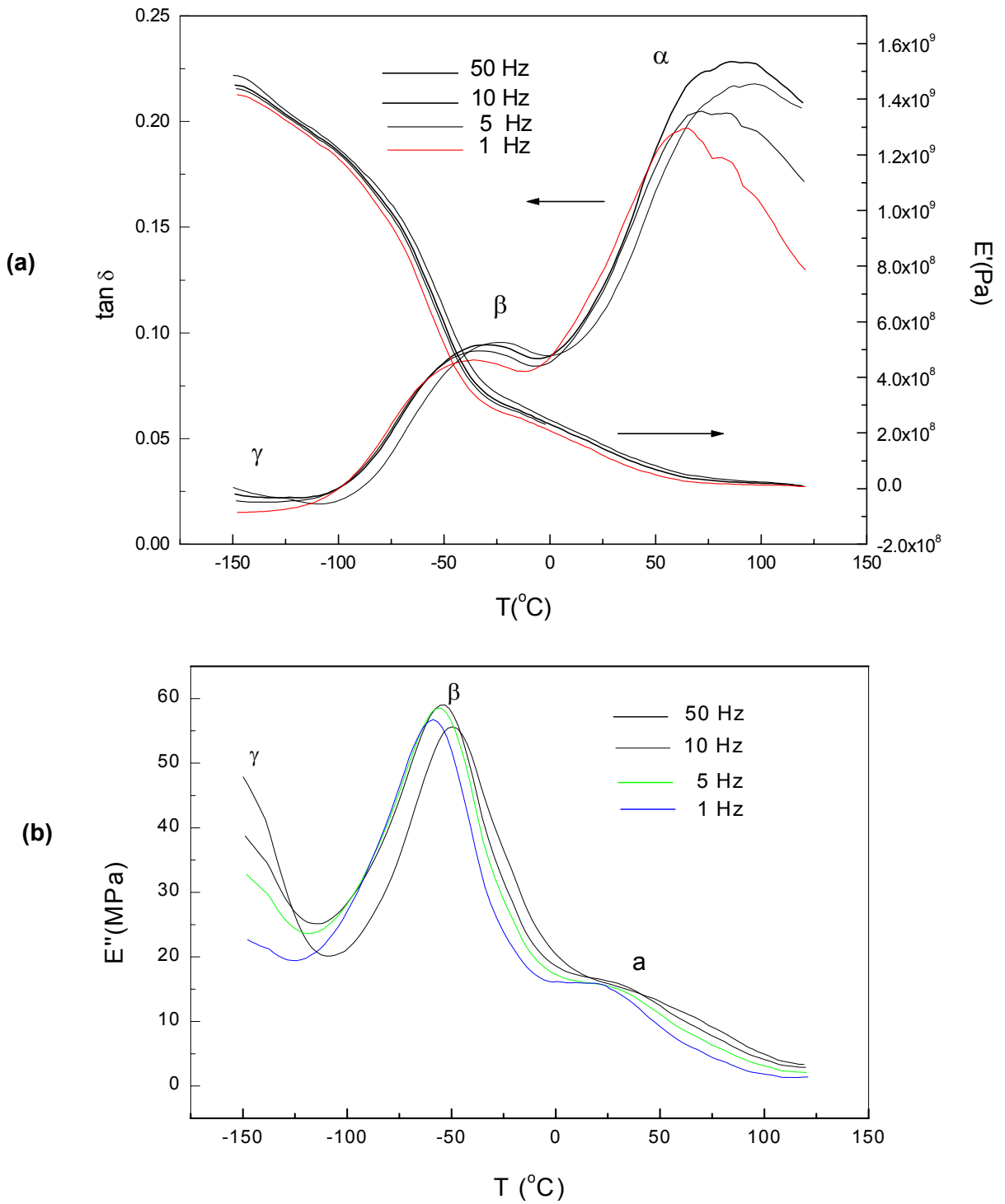
**Figura 3.15.** Curvas de TGA para el PAA(DL)G-14 (a) y para el PAA(DL)G-22 (b).

## b) Análisis dinamomecano-térmico

Los filmes utilizados para DMTA se prepararon por prensado en caliente tal como se detalla en el **apartado 2.12**. Los PAA(DL)G-12, 14 y 16 se calentaron hasta 60 °C. El PAA(DL)G-18 y el PAA(D)G-18 se calentaron hasta 80 °C y al llegar a los 60 °C se aplicó una presión de 1 atm. A continuación se comentan los resultados obtenidos para cada polímero.

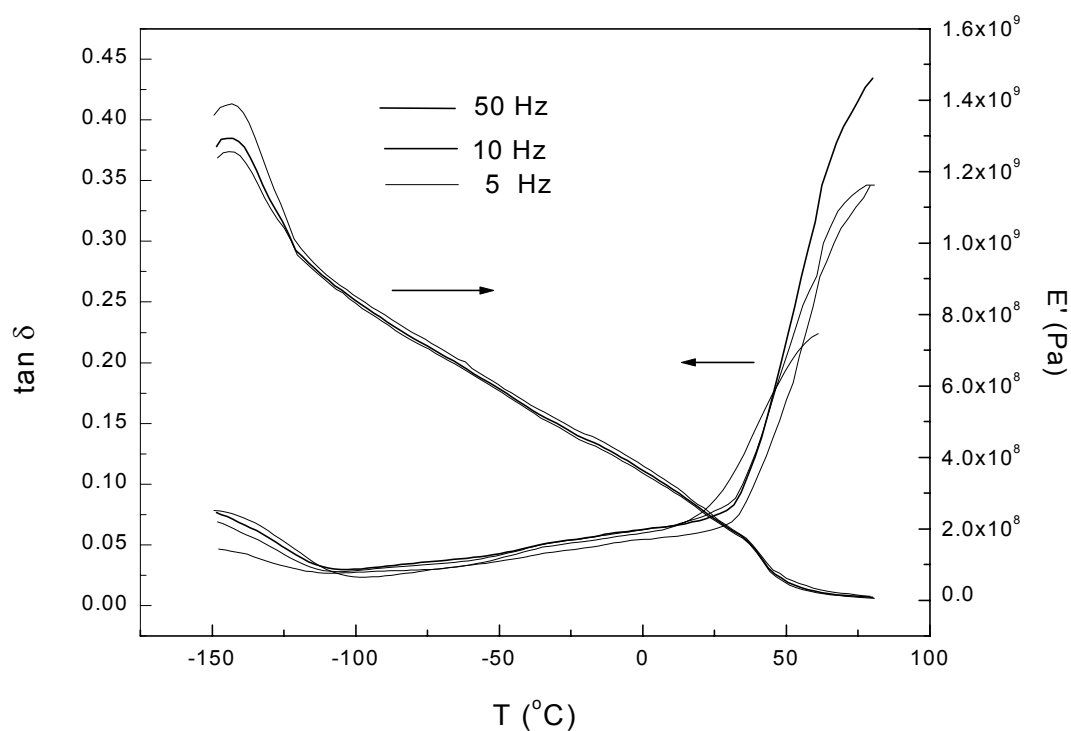
**Poli( $\alpha$ -n-dodecil  $\gamma$ ,DL-glutamato).** La curva de  $\tan \delta$  frente a la temperatura a 10 Hz muestra dos transiciones a 70 y -42 °C identificadas como  $\alpha$  y  $\beta$  (**Figura 3.16a**). En esta misma figura se ha representado el módulo de almacenamiento ( $E'$ ) frente a la temperatura y, como se observa, para las dos transiciones se observa un descenso moderado de  $E'$ . En la **Figura 3.16b** la gráfica de  $E''$  frente a la temperatura nos permite comparar la importancia relativa de cada proceso de relajación en el comportamiento viscoelástico del material. La relajación  $\gamma$  también se aprecia pero no puede calcularse la temperatura máxima correspondiente a esta transición, ya que como hemos comentado, nuestro equipo no permite trabajar a temperaturas inferiores a -150 °C. El cálculo de la energía de activación para la relajación  $\beta$ , realizado a partir de los valores máximos de  $\tan \delta$  a las frecuencias de 50, 10, 5 y 1 Hz da un valor de 42.5 Kcal·mol<sup>-1</sup>. Si el cálculo se realiza a partir de los máximos de las curvas de  $E''$  se obtiene un valor de 35.6 Kcal·mol<sup>-1</sup>. Valores similares han sido obtenidos para esta transición por otros autores (Hoff y col., 1955; Watanabe y col., 1985; García-Alvarez, 1997a) en diversas familias de polímeros. Para la relajación  $\alpha$  no se pudo calcular  $E_a$ .

**Poli( $\alpha$ -n-tetradecil  $\gamma$ ,DL-glutamato).** Las curvas de los ensayos de DMTA realizados a 10 Hz han mostrado dos transiciones a -25.5 y a aproximadamente -142 °C. Estas transiciones se han identificado, respectivamente, como  $\beta$  y  $\gamma$ . La transición que aparece justo antes de la rotura de la probeta se identificaría, sobre la base de los resultados obtenidos mediante DSC, con la fusión de la cadena lateral que tendría lugar a unos 20 °C a una frecuencia de 10 Hz. El cálculo de la energía de activación para la relajación  $\beta$  se ha realizado a partir de los valores máximos de  $\tan \delta$  para los ensayos realizados a las frecuencias de 50, 10, 5 y 1 Hz. El valor obtenido para esta relajación es de 17.6 Kcal·mol<sup>-1</sup> (18.6 Kcal·mol<sup>-1</sup> si el cálculo se realiza a partir de las curvas de  $E''$ ), para la relajación  $\gamma$  no se ha podido determinar la  $E_a$ . La transición  $\beta$  observada se debería a la movilidad de la fracción de cadena lateral que no ha cristalizado.

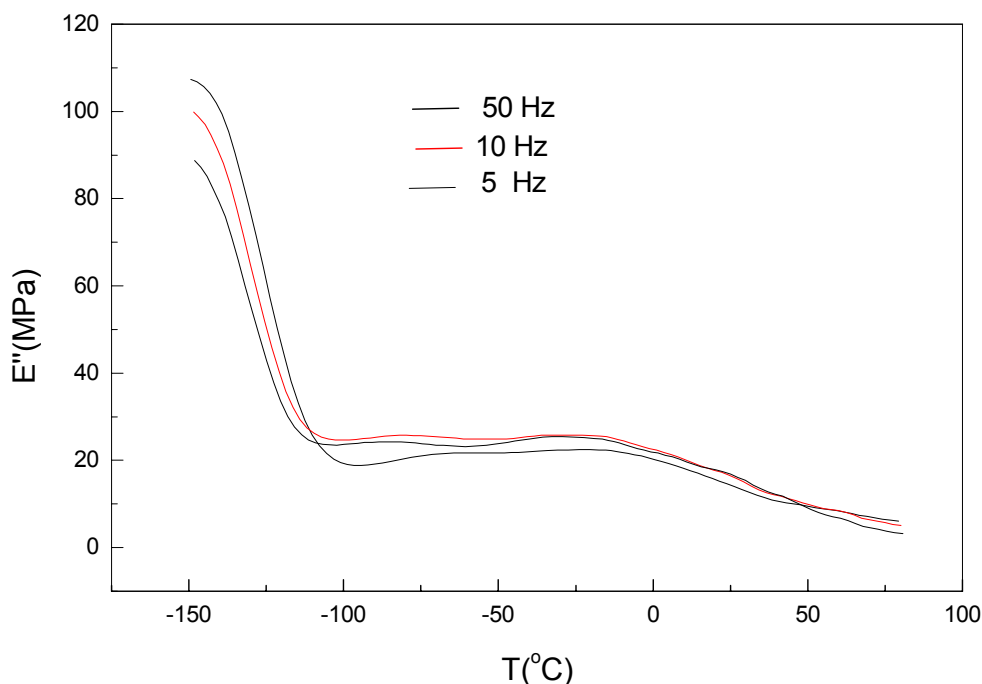


**Figura 3.16.** Variación de la tangente de pérdidas ( $\tan \delta$ ), del módulo de almacenamiento ( $E'$ ) (a) y del módulo de pérdidas ( $E''$ ) (b) en función de la temperatura para el PAA(DL)G-12 a diferentes frecuencias.

**Poli( $\alpha$ -*n*-hexadecil  $\gamma$ ,DL-glutamato) y poli( $\alpha$ -*n*-octadecil  $\gamma$ ,DL-glutamato).** Las curvas de los ensayos de DMTA realizados para estos polímeros son muy similares. En ambos casos se observa la transición  $\gamma$  y la fusión de la cadena lateral. La representación de la  $\tan \delta$ ,  $E'$  y de  $E''$  para el PAA(DL)G-16 se muestra en la **Figura 3.17**. Como se observa, el  $E'$  cae de manera brusca cuando funde la cadena lateral, este comportamiento se ha observado en los PAAG-*n* con  $n \geq 14$ . La caída brusca del módulo de almacenamiento se relaciona con la existencia de una transición de primer orden (Fukuzawa y col., 1974; Watanabe y col., 1984 y 1985). La gráfica de  $E''$  frente a la temperatura pone de manifiesto la importancia que ha tomado la relajación  $\gamma$ . La energía de activación de estos procesos no pudo ser determinada. Para el PAA(D)G-18 los resultados fueron muy parecidos a los del PAA(DL)G-18.



**Figura 3.17A.** Tangente de pérdidas ( $\tan \delta$ ) y módulo de almacenamiento ( $E'$ ) en función de la temperatura para el PAA(DL)G-16 a diferentes frecuencias.



**Figura 3.17B.** Variación del módulo de pérdidas ( $E''$ ) en función de la temperatura para el PAA(DL)G-16 a diferentes frecuencias.

En la **Tabla 3.11** se resumen todas las transiciones encontradas para estos polímeros y en la **Figura 3.18** se muestran las curvas de  $\tan \delta$  y de  $E''$  en función de la temperatura para los PAAG- $n$  a 10 Hz.

En la **Figura 3.19** se muestran las temperaturas de los máximos de las transiciones  $\alpha$  y  $\beta$  a 10 Hz para los PAAG- $n$ , medidas en las gráficas de  $\tan \delta$ , y la temperatura de fusión de la cadena lateral para los PAAG-14-18. Para comparar, se han incluido los valores correspondientes a los ésteres con  $n \leq 10$  que han sido tomados del trabajo del Dr. Melis (1999).

La relajación  $\alpha$  se observa a 70 °C para el PAA(DL)G-12, por lo que seguiría la tendencia general de los PAA(DL)G- $n$  más cortos estudiados por el Dr. Melis. Este autor encontró que tenía lugar una disminución en el valor de la  $T_\alpha$  a medida que aumentaba el número de átomos de carbono en el grupo alquilo lateral. El mismo efecto

fue observado por otros autores en los poli( $\gamma$ -alquil  $\alpha$ ,L-glutamato)s (Watanabe, 1985; Kakizaki, 1986). Esta tendencia se atribuye a que los movimientos de traslación y rotación de la hélice  $\alpha$  en la región cristalina están facilitados por la movilidad de la cadena lateral.

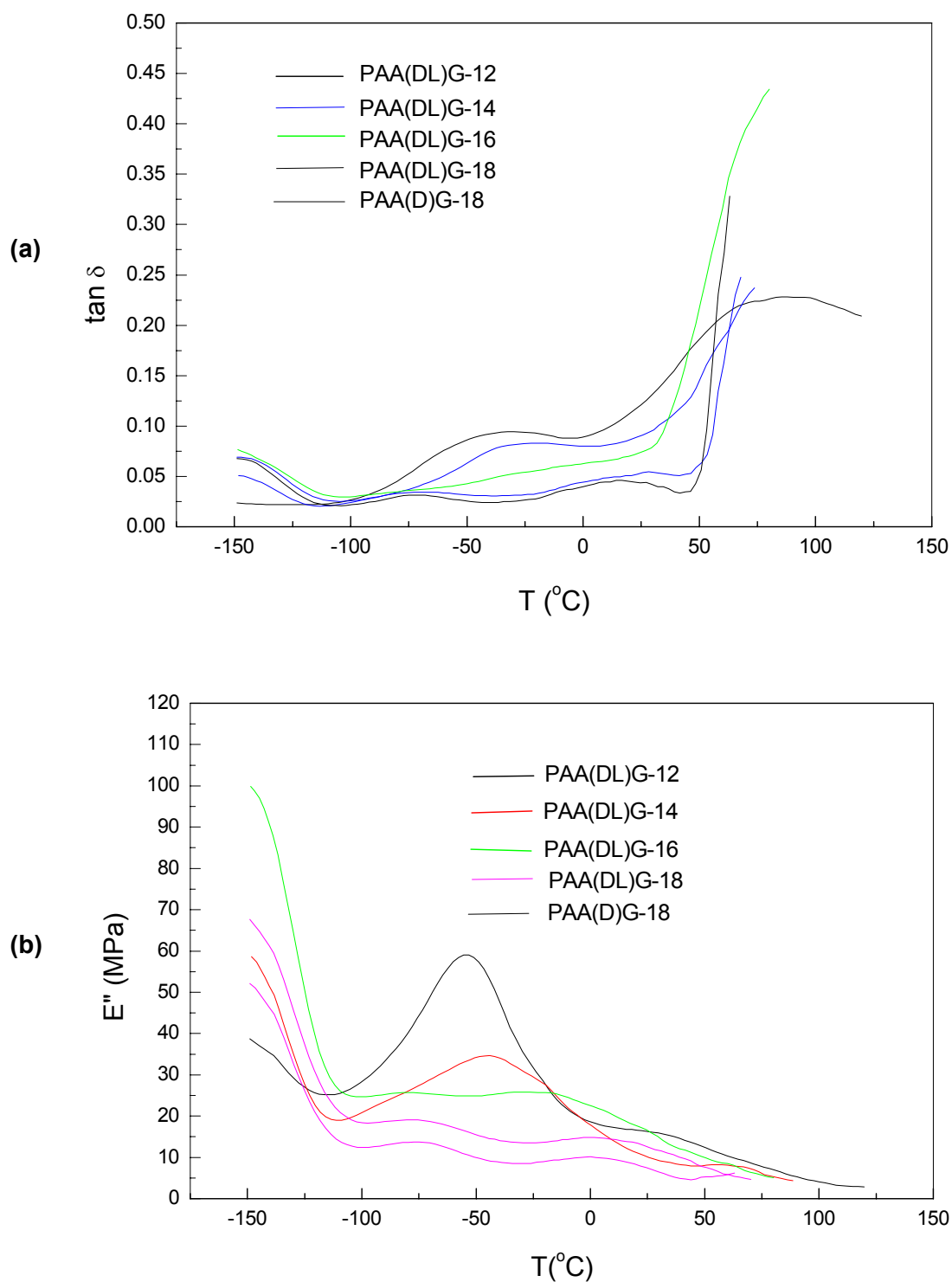
La relajación  $\beta$  apareció para el PAA(DL)G-12 a  $-42\text{ }^{\circ}\text{C}$  y para el PAA(DL)G-14 a  $-25.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Comparando con los ésteres de cadena más corta, se advierte que también en estos casos se sigue la tendencia general de un aumento en la  $T_{\beta}$  a medida que aumenta la longitud del grupo éster lateral. Este comportamiento, es el esperado teniendo en cuenta que la relajación  $\beta$  se atribuye a movimientos globales del grupo lateral. No obstante, como indicamos en el **apartado 3.1.2**, el efecto contrario se explicaría por la acción plastificante de la cadena lateral.

**Tabla 3.11.** Datos correspondientes a los ensayos de DMTA para los PAAG- $n$ .

Polímero	Relajación $\gamma$		Relajación $\beta$			Relajación $\alpha$ o Transición A $\rightarrow$ B		$T_1^e$ ( $^{\circ}\text{C}$ )
	$T^a$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta E'/E'^b$	$T^a$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta E'/E'^k$	$E_a^c$	$T^d$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta E'/E'^b$	
PAA(DL)G-12	n.d.	n.d.	-42.0	4.2	42.5/ 35.5	70 <sup>a</sup>	29.3 <sup>d</sup>	-
PAA(DL)G-14	$\approx$ -142	n.d.	-25.5	4.2	17.6/ 18.6	10 <sup>d</sup>	20.5	20
PAA(DL)G-16	$\approx$ -147	0.56	-	-	-	30 <sup>d</sup>	n.d.	38
PAA(DL)G-18	$\approx$ -147	1.2	-	-	n.d.	50 <sup>d</sup>	n.d.	53
PAA(D)G-18	$\approx$ -147	1.2	-	-	n.d.	48 <sup>d</sup>	n.d.	55

<sup>a</sup>Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) calculada según los máximos de las gráficas de  $\tan \delta$  en función de la temperatura a 10 Hz.

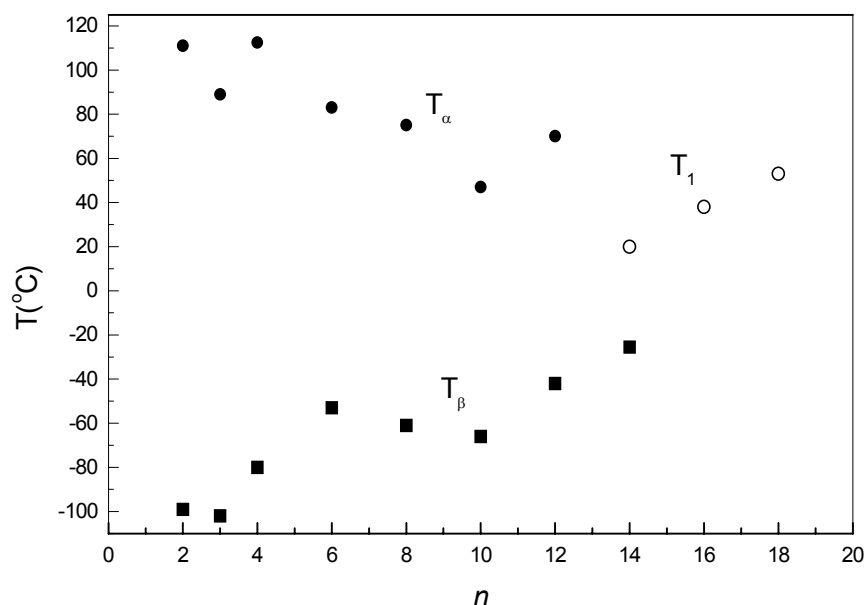
<sup>b</sup>Calculadas según la expresión  $(E'_U - E'_R)/E'_R$ . <sup>c</sup>Energía de activación ( $\text{Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) calculada según la ecuación de Arrhenius ( $\ln f = \ln f_0 - E_a/RT$ ) para las curvas de  $\tan \delta$  y de  $E''$ . <sup>d</sup>Temperatura a la que empieza la fusión de la cadena lateral medida a 10 Hz. <sup>e</sup>Temperatura de fusión de la cadena lateral determinada mediante DSC.



**Figura 3.18.** Tangente de pérdidas (a) y módulo de pérdidas (b) en función de la temperatura para los PAAAG-n a 10 Hz.

Para los PAA(DL)G- $n$  con  $n \geq 14$  se observa una transición, que como ya hemos indicado, por comparación con los resultados de DSC y por analogía con los poli( $\alpha$ -glutamato)s, correspondería a la fusión de la cadena lateral. Como se observa en la **Figura 3.19**, la temperatura de fusión de la cadena lateral aumenta con la longitud de la misma, comportamiento que ya fue observado por Watanabe y col. (1985) en los isómeros de los compuestos que estudiamos, los poli( $\alpha$ -glutamato)s. Este autor observó que para las transiciones  $T_1$  y  $T_2$  tenía lugar una brusca caída de  $E'$ . Mientras que para las transiciones  $\alpha$  y  $\beta$  esta caída era gradual. La caída brusca de  $E'$  se ha relacionado con una transición de primer orden (Fukuzawa y col., 1974; Watanabe y col., 1984 y 1985).

La transición  $\gamma$ , atribuida a movimientos locales de los grupos laterales se observa claramente en todos los polímeros estudiados. El valor de la temperatura a la que tiene lugar esta transición no se puede determinar con precisión dado que el equipo utilizado no nos permite trabajar a temperaturas inferiores a los  $-150$  °C y, por tanto, no se observa bien la forma del pico, por lo que los valores presentados en la **Tabla 3.11** son aproximados.



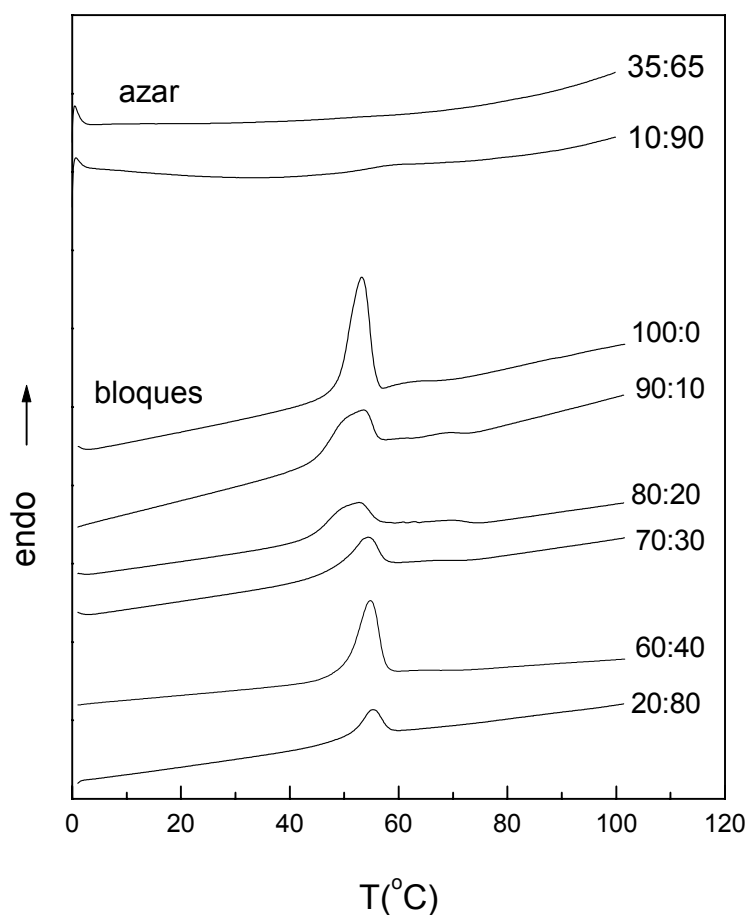
**Figura 3.19.** Temperaturas de los máximos de las transiciones  $\alpha$  y  $\beta$  a 10 Hz para los PAAAG- $n$  y temperaturas de fusión de la cadena lateral ( $T_1$ ) determinadas mediante DSC para los PAAAG-14, 16, 18. Los valores de los ésteres con  $n \leq 10$  han sido tomados de Melis, 1999, Tesis Doctoral.



### 3.2.6. Propiedades térmicas de los copoli( $\alpha$ -alquil $\gamma$ -glutamato)s

Las curvas de calentamiento obtenidas para los coPAAG-18,2 entre 20 y 100 °C se muestran en la **Figura 3.20**. En todos los copolímeros en bloques aparece una endoterma ancha localizada alrededor de 40-60 °C.

Las temperaturas y entalpías de los picos para la serie de copolímeros coPAA(DL)G-18,2 (a:b) y para los homopolímeros PAAG-2 y PAAG-18 sintetizados de manera análoga se muestran en la **Tabla 3.12**. También se ha incluido en esta tabla los resultados calorimétricos encontrados para los coPAA(DL)G-18,2 al azar cuya distribución al azar de unidades  $\alpha$ -*n*-octadecil  $\gamma$ -glutamato y  $\alpha$ -etil  $\gamma$ -glutamato ha sido confirmada mediante RMN (**apartado 3.2.3.2.2**).



**Figura 3.20.** Termogramas de DSC para los coPAA(DL)G-18,2 (a:b).

La entalpía asociada a la fusión de la cadena lateral aumenta gradualmente con el contenido en  $\alpha$ -*n*-octadecil  $\gamma$ -glutamato. De acuerdo con los resultados de DSC obtenidos para el PAAG-18, tal endoterma se atribuye a la fusión de los cristalitas de cadenas de octadecilo. Es sorprendente que incluso el coPAA(DL)G-18,2 (20:80) muestre una pequeña endoterma alrededor de los 50 °C. Este hecho es difícil de entender a no ser que estos copolímeros presenten una distribución en bloques de unidades  $\alpha$ -*n*-octadecil  $\gamma$ -glutamato y  $\alpha$ -etil  $\gamma$ -glutamato puesto que en los copolímeros al azar no se observa fusión de la cadena lateral. La temperatura de fusión de la cadena lateral permanece aproximadamente constante para todas las composiciones. Estos resultados permiten concluir que la reacción de transesterificación del PAAG-2 con el *n*-octadecanol es heterogénea. A medida que reacciona con el alcohol se solubiliza y la parte soluble es la que transesterifica mejor.

**Tabla 3.12.** Datos de DSC y TGA referentes a los coPAA(DL)G-18,2 (a:b)

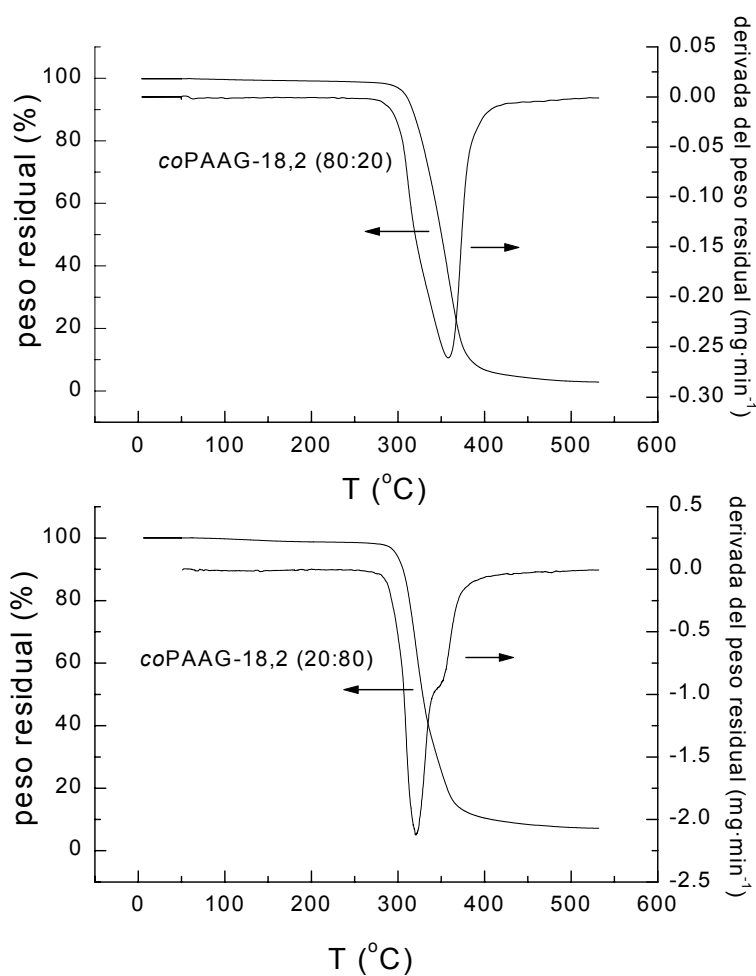
a:b	T <sub>m</sub> <sup>a</sup> (°C)	$\Delta H^a$ (J·g <sup>-1</sup> )	T <sub>c</sub> <sup>b</sup>	T <sub>m</sub> <sup>b</sup>	$\Delta H^b$ (J·g <sup>-1</sup> )	T <sub>d</sub> <sup>c</sup> (°C)
Bloques						
100:0	53	64	44	51	31	330, 365h
90:10	53	57	47	52	15	368, 325h
80:20	52	48	46	52	13	357, 325h
70:30	54	40	46	52	8	365, 335h
60:40	55	43	46	52	2	354, 330h
20:80	55	18	45	-	-	320, 350h
0:100	-	-	-	-	-	318
Azar						
10:90	-	-	-	-	-	291
35:65	-	-	-	-	-	293, 327h

<sup>a</sup>Temperatura y entalpía medida en el primer calentamiento para el polvo de síntesis.

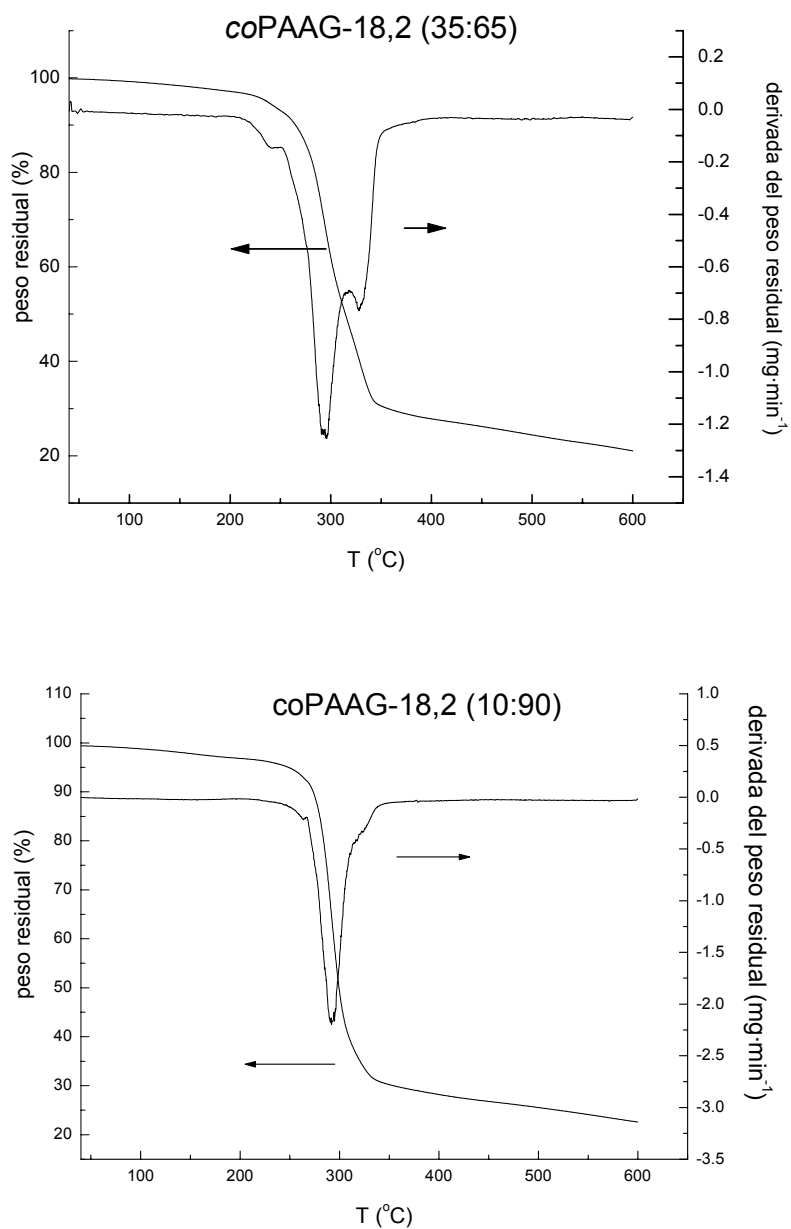
<sup>b</sup>Temperatura de cristalización, temperatura de fusión y entalpía medida en el segundo calentamiento para el polvo de síntesis. <sup>c</sup> Temperatura de descomposición medida en la curva derivada para la máxima pérdida de peso. h: hombro.

La estabilidad térmica de los coPAAG-18,2 bajo atmósfera inerte fue evaluada por TGA. Las curvas representativas se muestran en la **Figura 3.21** para el caso específico de los coPAAG-18,2 (80:20) y (20:80) en bloques y en la **Figura 3.22** para los copolímeros al azar.

Las temperaturas de descomposición de los copolímeros se muestran en la **Tabla 3.12**. Al igual que en los homopolímeros, la descomposición de los copolímeros en bloques se encontró que tenía lugar por encima de los 300 °C y en todos los casos se observa un pico con un hombro. La temperatura de descomposición de los copolímeros al azar es inferior a 300°C.



**Figura 3.21.** Curvas de TGA para el coPAA(DL)G-18,2 (80:20) y el coPAA(DL)G-18,2 (20:80) en bloques.



**Figura 3.22.** Curvas de TGA para el coPAA(DL)G-18,2 (35:65) y el coPAA(DL)G-18,2 (10:90) al azar.

### 3.3. Conclusiones parciales

1. A partir de ácido poli( $\gamma$ -glutámico) de biosíntesis de dos composiciones enantioméricas diferentes, se han obtenido y caracterizado los ésteres lineales de dodecilo, tetradecilo, hexadecilo, octadecilo, eicosilo y docosilo. El método utilizado se basa en dos reacciones sucesivas, esterificación y transesterificación.
2. La reacción de esterificación transcurre con cierta degradación del polímero. También el proceso de transesterificación ocurre con degradación parcial de la cadena principal, que se traduce en una disminución del peso molecular del polímero. Este hecho se debe probablemente a la existencia de reacciones secundarias de alcoholisis del grupo amida a las elevadas temperaturas que se aplican.
3. Las dos reacciones de esterificación y transesterificación transcurren con resultados similares, tanto para los ésteres preparados a partir del PG(DL)GA como del PG(D)GA, por lo que puede concluirse que la composición enantiomérica del polímero no ejerce influencia apreciable en la modificación química que se introduce. Tanto en el proceso de esterificación como en el de transesterificación no se ha observado racemización para ninguno de los casos examinados.
4. Utilizando el mismo método con el que se han obtenido los homopolímeros (esterificación con EtBr y transesterificación del PAAG-2 con alcohol octadecílico), se han sintetizado copolímeros octadecilo-etilo (coPAA(DL)G-18,2) (a:b) de diferente composición. Este procedimiento permite obtener copolímeros con una distribución en bloques de unidades  $\alpha$ -*n*-octadecil  $\gamma$ -glutamato y  $\alpha$ -etil  $\gamma$ -glutamato y son más heterogéneos. Mediante esterificación directa con bromuro de etilo y con bromuro de octadecilo se han obtenido dos copolímeros octadecilo-etilo (coPAA(DL)G-18,2) de composición aproximada 10:90 y 35:65 que presentan una distribución al azar de unidades  $\alpha$ -*n*-octadecil  $\gamma$ -glutamato y  $\alpha$ -etil  $\gamma$ -glutamato.
5. Los PAAG-*n* y los coPAA(DL)G-18,2 (a:b) mostraron conformaciones helicoidales en disolución menos estables que los poli( $\beta$ -péptido)s, puesto que la cantidad de TFA necesaria para que tenga lugar la transición hélice-ovillo es superior para los poli( $\beta$ -péptido)s.

6. Los termogramas de DSC para PAAG- $n$  con  $n \geq 14$  revelaron la presencia de un proceso de fusión-cristalización que tiene lugar entre 20-80 °C, con una entalpía de fusión asociada que aumenta con la longitud de la cadena lateral y que oscila entre 10 y 100 J·g<sup>-1</sup>.
7. Todos los copolímeros preparados por esterificación con EtBr y posterior transesterificación del PAAG-2 resultante con alcohol octadecílico, incluso los que presentaron contenidos en  $\alpha$ - $n$ -octadecil  $\gamma$ -glutamato tan pequeños como el 20%, mostraron fusión de la cadena lateral al efectuar la calorimetría diferencial de barrido. Este hecho indicaría que los copolímeros presentan una distribución en bloques de unidades  $\alpha$ - $n$ -octadecil  $\gamma$ -glutamato y  $\alpha$ -etil  $\gamma$ -glutamato. Como es lógico, los copolímeros al azar, no mostraron fusión de la cadena lateral.
8. Para los PAA(DL)G- $n$  con  $n \geq 12$ , la relajación  $\alpha$  sólo se observa para el PAA(DL)G-12. La temperatura a la que aparece esta transición sigue la tendencia general de los PAAG- $n$  con  $n \leq 10$  estudiados anteriormente en este Departamento. Para los PAA(DL)G- $n$  con  $n \geq 14$  se observa mediante DMTA una transición que, por comparación con los resultados de DSC y por analogía con los poli( $\alpha$ -glutamato)s, corresponde a la fusión de la cadena lateral. La temperatura de fusión de la cadena lateral aumenta con la longitud de la misma. La relajación  $\gamma$  se observa, en los poli( $\gamma$ -glutamato)s alrededor de -150 °C.