

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

**“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOCAPSULAS
POLIMÉRICAS CON CARÁCTER ANFIFÍLICO Y SU
POTENCIAL APLICACIÓN EN EL ENCAPSULAMIENTO
DE FÁRMACOS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE
MATERIALES

P R E S E N T A:

I.Q. JORGE ARMANDO CRUZ MORALES

TUTOR: DRA. PATRICIA GUADARRAMA ACOSTA





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

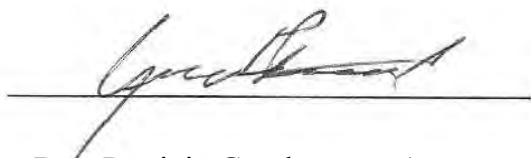
JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dra. Martha Albores Velasco.
1er Vocal: Dr. Mikhail Zolotukhin.
2º Vocal: Dra. Patricia Guadarrama Acosta.
3er Vocal: Dra. Pilar Carreón Castro.
Secretario: Dra. América Vázquez Olmos.

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Instituto de Investigaciones en Materiales, Departamento de Polímeros.

Laboratorio E-102.



Dra. Patricia Guadarrama Acosta

Tutora



I.Q. Jorge Armando Cruz Morales

Sustentante

A MIS PADRES

Raúl Cruz Santos y Carmen Morales Vilchis

Por todo su apoyo incondicional, consejos, amor, alegría y comprensión que me han brindado a lo largo de mi vida

GRACIAS.

A mi hermano Juan Carlos

Y todos aquellos que me han brindado su amistad y cariño en este sendero que llamamos vida

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis Patricia Guadarrama por todo su apoyo en el laboratorio, tiempo dedicado, ideas y sugerencias durante esta investigación.

A Manuel Stivalet y Sergei Fomine, por sus valiosas sugerencias durante el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del jurado por sus aportaciones y sugerencias.

A Alejandrina Acosta, Gerardo Cedillo, Salvador López y Teresa Ramírez-Apan por las determinaciones realizadas, fundamentales en la realización de ese trabajo.

A CONACYT y a DGEP por el apoyo económico brindado y a todo el personal del Instituto de Investigaciones en Materiales-UNAM por las facilidades otorgadas.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	3
1.1. Dendrimeros y polímeros hiper-ramificados	5
1.2. Polímeros hiper-ramificados	11
1.3. Propiedades de los polímeros hiper-ramificados y dendrimeros	17
1.4. Glicidol	22
1.5. Caracterización de macromoléculas	24
1.7. Aplicaciones	26
1.8. Polímeros con aplicaciones farmacéuticas	29
1.9. Taxol	32
CAPÍTULO II. OBJETIVOS Y ESTRATEGIA SINTÉTICA	35
2.1. OBJETIVOS	35
2.2. ESTRATEGIA SINTÉTICA	36
CAPÍTULO III. DESARROLLO EXPERIMENTAL	41
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	56
4.1. Síntesis de polímeros	56
4.2. Protección de polímeros	69
4.3. Esterificación de polímeros	76
4.4. Pesos moleculares	81
4.5. Desprotección de polímeros	82
4.6. Esterificación controlada	87
4.7. Complejos huésped-anfitrión	93

CAPITULO V. CONCLUSIONES	110
CAPITULO VI. PERSPECTIVAS	113
ANEXO 1	114
Mecanismos de reacción	114
ANEXO II	117
Modelado molecular	117
REFERENCIAS	122

INTRODUCCIÓN.

En años recientes los polímeros hiper-ramificados han tenido un creciente auge debido a su potencial aplicación como acarreadores de fármacos o en procesos catalíticos de reacciones químicas. Estas moléculas representan una alternativa a los dendrímeros, ya que mientras las moléculas dendriméricas necesitan de muchos pasos de reacción según la generación a la que se pretenda llegar y la purificación inherente en cada uno de estos pasos, los polímeros hiper-ramificados se pueden obtener con pocos pasos de reacción lo que implica que disminuya el número de etapas de purificación. Estos polímeros pueden presentar bajas polidispersidades (cuando se polimerizan por apertura de anillo (ROMBP)), formas globulares y un gran número de grupos funcionales terminales.

Debido a todo esto es posible concebir la idea de obtener sistemas poliméricos hiper-ramificados funcionalizados de manera específica con el fin de encapsular moléculas huésped mediante interacciones intermoleculares.

Con base en la propuesta antes mencionada, en el presente trabajo se plantea la síntesis de diferentes polímeros hiper-ramificados con un balance hidrofóbico/hidrofílico controlado, conocidos como cápsulas anfifílicas, mediante la adición de cadenas alifáticas no polares a un esqueleto polar rico en grupos OH, evaluando su potencial aplicación como sistemas encapsulantes de moléculas hidrofóbicas tipo huésped tales como el fármaco taxol (medicamento anticancerígeno insoluble en agua) mejorando su solubilidad en medios acuosos, lo que representa un mejor aprovechamiento de sistemas biológicos bajo el tratamiento de esta droga.

Por otro lado, se llevaron a cabo cálculos teóricos de análisis conformacional, previo a la formación de complejos huésped-anfitrión, con la finalidad de establecer cuántas moléculas de fármaco puede albergar una sola cápsula anfifílica. También se realizaron pruebas biológicas de citotoxicidad in vitro en líneas celulares sanas y cancerígenas, a fin de seleccionar cual de los polímeros obtenidos será usado en el encapsulamiento para una posible aplicación en sistemas vivos.

Para la síntesis de estos materiales se partió de 2 núcleos aromáticos trifuncionales y un núcleo epóxido, los cuales se hicieron reaccionar con el monómero glicidol para obtener 3 tipos de polímeros hiper-ramificados, posteriormente se utilizó el agente protector cloruro de tritilo para bloquear selectivamente alcoholes primarios, en un tercer paso se esterificó con cloruro de palmitoilo y finalmente se removió el grupo protector con bromuro de zinc. Alternativamente se realizaron esterificaciones controladas directamente sobre los polímeros obtenidos en el primer paso de reacción. De acuerdo a la caracterización empleada y a los datos en líneas celulares se comprobó que solo un tipo de estos polímeros forma compuestos huésped-anfitrión con taxol.

CAPITULO I.

ANTECEDENTES.

Los dendrímeros y polímeros hiper-ramificados representan una nueva clase de moléculas con propiedades muy diferentes en comparación con las moléculas lineales; tan diferentes, que hoy en día la química de moléculas altamente ramificadas es un campo separado del área de la química de polímeros¹. Los dendrímeros y polímeros hiper-ramificados se caracterizan por un alto grado de ramificación y como consecuencia un gran número de grupos terminales.

Mientras que un dendrímero es una molécula de arquitectura bien definida con una ramificación perfecta, las moléculas de un polímero hiper-ramificado presentan cierta distribución tanto en el tamaño como en el grado de ramificación. Esta diferencia entre dendrímeros y polímeros hiper-ramificados tiene su origen en el método de síntesis para cada uno de ellos; los dendrímeros se sintetizan por métodos de más de un paso de reacción, empleando la química orgánica convencional, mientras que un polímero hiper-ramificado se prepara por una polimerización de un monómero de tipo AB_x ($x \geq 2$) en un solo paso². Aunque menos perfectas, las moléculas de polímeros hiper-ramificados tienen varias propiedades en común con los dendrímeros, tales como alta solubilidad, baja viscosidad y alta concentración de grupos terminales.

Desde el punto de vista histórico, el progreso hacia la construcción bien dirigida de moléculas con arquitectura ramificada se ha dado en tres etapas. La primera de ellas comprende de 1860 hasta principios de 1940, cuando las estructuras ramificadas eran consideradas responsables de la insolubilidad y difícil manejo de los materiales formados en las reacciones de polimerización. El control sintético, las separaciones mecánicas y la caracterización eran primitivos mientras que el aislamiento y la determinación de la estructura eran prácticamente imposibles.

De 1940 hasta 1970 se define la segunda etapa, en la cual las estructuras ramificadas fueron consideradas teóricamente ventajosas y se hicieron los primeros intentos para sintetizarlas. Sin embargo, la imposibilidad para lograr separar selectivamente la amplia distribución de moléculas con diferentes pesos moleculares formadas durante la polimerización impidió lograr mayores avances en el área.

Es hasta 1980 cuando se dan los primeros avances significativos en la síntesis de macromoléculas basados en el método iterativo que llegó a convertirse en una herramienta poderosa de la química de dendrímeros y marca el inicio del tercer período, y es gracias al avance científico que se ha podido llegar al punto donde es factible diseñar una macromolécula con propiedades químicas y físicas para una aplicación específica.

1.1. DENDRÍMEROS Y POLÍMEROS HIPER-RAMIFICADOS.

A partir de 1980 el interés por la síntesis y caracterización detallada de moléculas con arquitecturas diferentes a las lineales, ha aumentado considerablemente. Entre los compuestos que han despertado mayor interés, por la gran variedad de aplicaciones potenciales, son las moléculas altamente ramificadas: dendrímeros y polímeros hiper-ramificados.

Los dendrímeros son macromoléculas con forma, tamaño y peso molecular bien definidos que poseen una arquitectura perfectamente regular. La estructura de estos compuestos se puede controlar con facilidad pero se obtienen cantidades limitadas de los mismos ya que su elaboración involucra muchos pasos de síntesis y purificación. A diferencia de los dendrímeros, los polímeros hiper-ramificados se obtienen en un solo paso por la polimerización directa de monómeros AB_x donde $x \geq 2$. Los polímeros hiper-ramificados presentan una ramificación menos perfecta (Figura 1.1), y muestran mayor polidispersidad⁴.

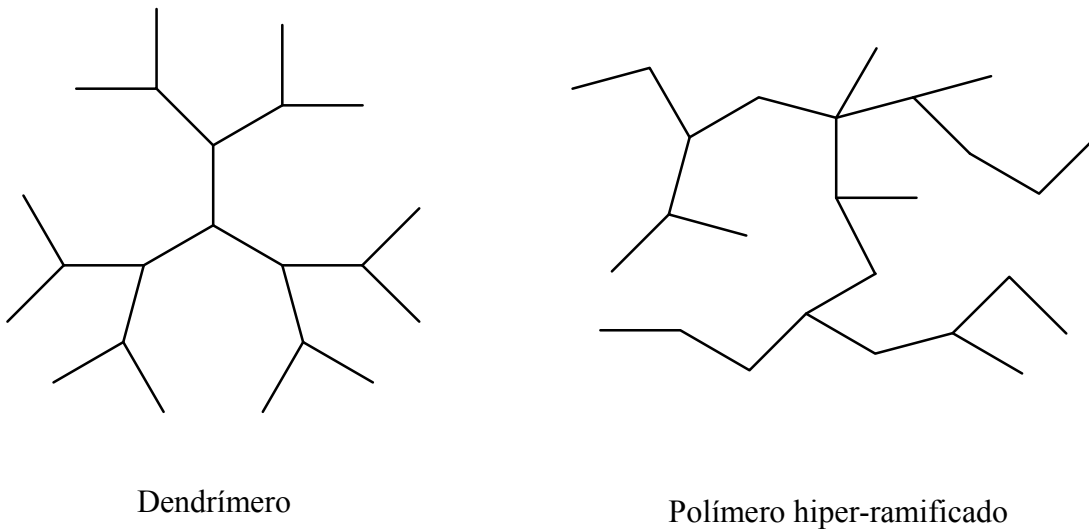


Fig. 1.1. Diferencias estructurales entre dendrímeros y polímeros hiper-ramificados.

1.1.1. Dendrímeros.

En los años 80's uno de los pioneros en el estudio y síntesis de estas moléculas hiper-ramificadas fue Donald Tomalia⁵, quien llamó a estos compuestos dendrímeros.

La palabra *dendrímero* que proviene del griego *dendrón* (árbol), se asignó a estas macromoléculas debido a su forma, cuyo patrón estructural es semejante al de las copas de un árbol (figura 1.2); sin embargo, también se les conoce como moléculas cascada. En general los dendrímeros son globulares (presentan una geometría esferoidal), altamente ramificados, tienen un tamaño y estructura tridimensional bien definida y presentan un gran número de grupos funcionales en su periferia. El método de síntesis de los dendrímeros permite un alto control de las ramas y la obtención de materiales monodispersos, es decir, con todas las moléculas de exactamente el mismo peso molecular, estructura y dimensiones. Estas características los hacen diferenciar de las llamadas moléculas hiper-ramificadas o de los polímeros convencionales.

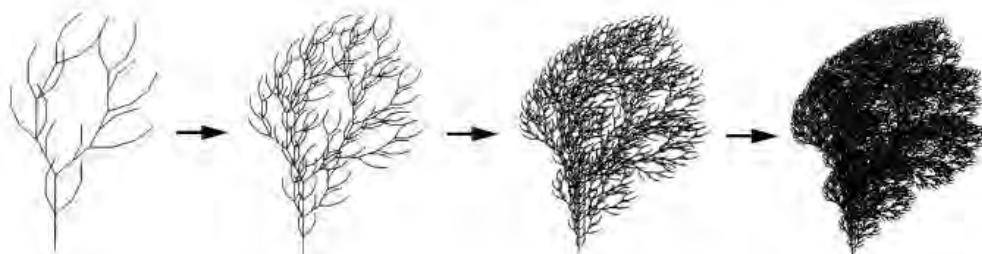


Figura 1.2. Los árboles presentan los mismos patrones estructurales de los dendrímeros.

En la figura 1.3 se describe esquemáticamente un dendrímero típico, en el que se pueden distinguir el núcleo, del cual emergen las ramas (cuatro en la figura), el nudo en el cual se separan las ramas, tres en cada nudo de la figura, los grupos terminales localizados en la periferia y las generaciones o capas completas concéntricas al núcleo.

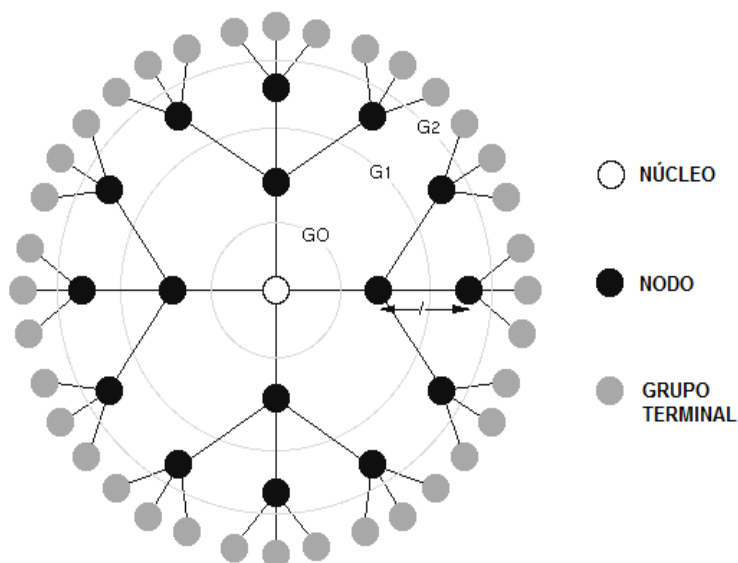


Figura 1.3. Esquema de un dendrímtero.

Los parámetros esenciales de un dendrímtero como el de la figura son:

- Multiplicidad del núcleo (número de ramas que surgen del núcleo),
- Multiplicidad de la rama (número de ramas que surgen en cada nodo),
- Longitud l de cada rama
- Generación (número de capas de ramas nacidas en los nudos)

Estos parámetros están relacionados entre sí, de tal manera que, ramas demasiado cortas o un excesivo número de ramificaciones en cada nodo puede llevar a una congestión de la superficie que impida el posterior crecimiento de todas las ramas, lo que implicaría un defecto estructural, produciendo una macromolécula dendrimérica que ya no es monodispersa.

El estudio de la geometría molecular es una de las herramientas más poderosas para entender muchas de las propiedades físicas en los compuestos químicos.

Algunas propiedades que exhiben los dendrímeros gracias a su geometría globular a altas generaciones ($G > 4$) son:

- Número elevado de grupos funcionales.
- Baja viscosidad.
- Alta solubilidad.
- Capacidad de formar sistemas huésped-anfitrión (debido a sus cavidades).

Los dendrímeros, en particular, poseen una geometría muy familiar a nuestra vida cotidiana, debido a que presentan el mismo patrón estructural observado en varios eventos o formas en la naturaleza. A dicho patrón se le conoce también como patrón fractal (fig.1.4) que viene del latín "fractus", que significa: roto o fragmentado, presentando similitudes. Una forma intuitiva de ver lo que es un fractal¹⁸ es mediante el concepto de autosimilitud; esto es: si ampliamos o disminuimos la escala tanto como queramos, la estructura será similar y presentará el mismo detalle.

Ejemplos de dicho patrón podemos encontrarlos en fenómenos tales como los rayos producidos en una tormenta eléctrica o en sistemas biológicos donde el patrón dendrítico puede ser encontrado en escalas tan variadas como en metros, en el caso de los árboles (tanto en las ramas como en las raíces), en milímetros, centímetros y micrómetros que es el caso de las neuronas. La razón de la extensa imitación de estas topologías dendríticas a todos los tamaños es aún desconocida; sin embargo, se tiene la teoría que concibe a estas estructuras como arquitecturas evolucionadas que han sido optimizadas con el paso de varios millones de años para el máximo aprovechamiento de energía (extracción-distribución de nutrientes en plantas, distribución-almacenamiento en neuronas, etc.).

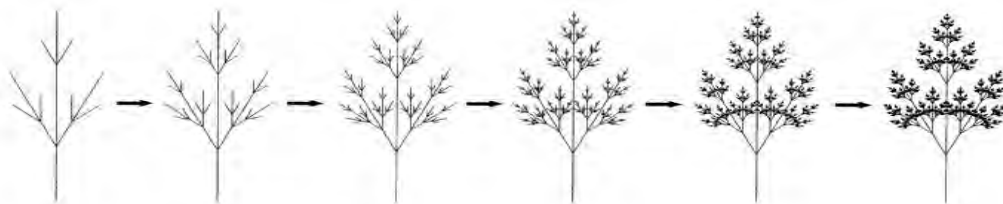


Figura 1.4. Algoritmo de crecimiento del patrón fractal.

1.1.2. Métodos de obtención de los dendrímeros.

Los dendrímeros se construyen etapa por etapa mediante la repetición de una secuencia de reacciones, a lo que también se le conoce como síntesis cascada, que permite la multiplicación del número de unidades repetitivas y grupos funcionales terminales, existiendo dos metodologías básicas: divergente y convergente.

En el método divergente⁶ el dendrímero crece hacia fuera desde el centro multifuncional de la molécula. El centro de la molécula reacciona con moléculas de monómero, que contiene un grupo reactivo y dos ó más grupos inactivos, dando lugar a la primera generación dendrímica.

Entonces la nueva periferia de la molécula es activada y se hace reaccionar con más moléculas de monómero. El proceso se repite por varias generaciones y por lo tanto el dendrímero es construido capa por capa. (fig. 1.5A).

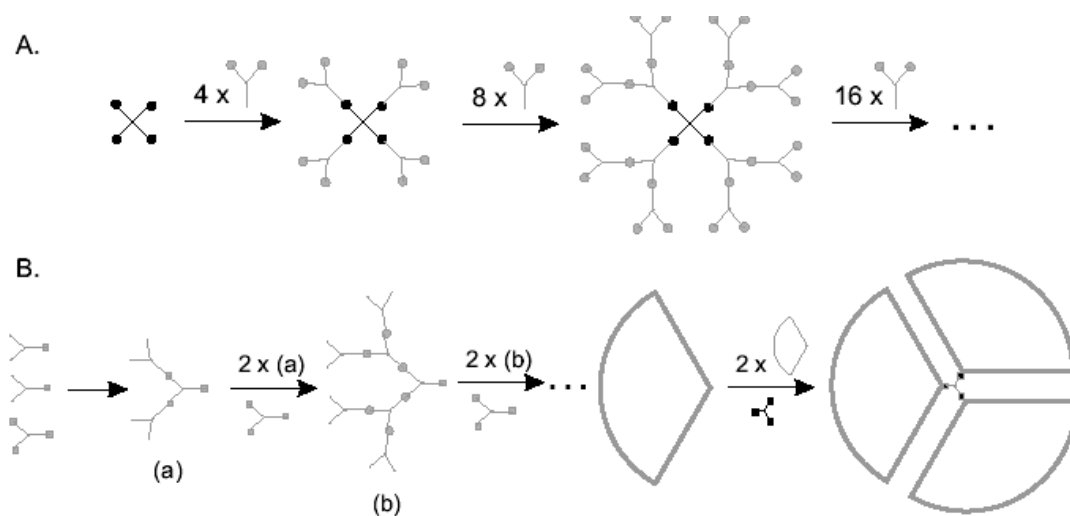


Fig. 1.5. Síntesis dendrímica A) método divergente, B) método convergente.

Los problemas que presenta esta síntesis son debidos a reacciones incompletas y a reacciones colaterales de los grupos funcionales terminales que ocasionan defectos estructurales. Para prevenir dichas reacciones y obtener buenos resultados, es necesario el uso de un gran exceso de reactivos, lo que dificulta aun más su posterior purificación Sin embargo, el método divergente es exitoso en la producción de grandes cantidades de dendrímeros.

El método convergente⁷ fue desarrollado como una respuesta a la limitación de la síntesis divergente.

En este método el dendrímero es construido por etapas, comenzando desde los grupos finales hasta llegar al centro. Cuando los brazos poliméricos ramificados, llamados dendrones, son lo suficientemente grandes, son acoplados al centro multifuncional de la molécula. (fig. 1.5B). Este tipo de síntesis tiene muchas ventajas tales como la disminución de defectos estructurales, lo que hace que la purificación sea más fácil con respecto a la síntesis divergente.

1.2. POLÍMEROS HIPER-RAMIFICADOS.

Los polímeros hiper-ramificados representan una alternativa a los dendrímeros⁸, ya que éstos también presentan propiedades similares y además pueden ser preparados en un solo paso mediante la polimerización de monómeros tipo AB_x donde x es mayor o igual a 2. Esto ofrece un ahorro de tiempo pero en cambio, se pierde control tanto en la estructura como en el peso molecular de las macromoléculas⁹.

Los polímeros hiper-ramificados tienden a presentar isomerismo, por lo que se distinguen de sus análogos lineales, ya que cada adición de monómero se realiza en forma aleatoria generando isómeros geométricos con determinado peso molecular, generándose mayor polidispersidad, donde la variación en la geometría afecta a nivel de empaquetamiento del polímero en solución y en estado sólido, modificando las propiedades de solubilidad del polímero.

La estructura de estos polímeros está compuesta por unidades lineales (L), terminales (T) y dendríméricas (D), las cuales se distinguen por el número de grupos funcionales que no reaccionan por unidad monomérica.

En 1957 Flory⁹ reportó los primeros experimentos y cálculos estadísticos para la síntesis de polímeros hiper-ramificados utilizando un monómero AB_2 ; sin embargo, las técnicas de separación y caracterización de su época no le permitieron aislar o caracterizar los polímeros que sintetizó para corroborar sus predicciones. El primer reporte exitoso con respecto a la síntesis y caracterización de un polímero hiper-ramificado se debe a Young H. Kim en 1987¹⁰. A pesar que el peso molecular determinado por GPC no pudo ser reproducido por otros grupos de investigadores, este reporte estableció el punto de partida para la síntesis planeada y bien dirigida de polímeros hiper-ramificados.

Con la finalidad de predecir y conocer la composición aproximada de un polímero hiper-ramificado, algunos investigadores han tratado de encontrar una analogía con la estructura de los dendrímeros, como lo hizo Plummer, J. et al.¹¹ quienes reportan los parámetros para un polímero hiper-ramificado, correlacionando el tamaño de la molécula y el equivalente al número de generación dendrímica (pseudo-generación) que correspondería al polímero preparado por

condensación del ácido 2,2-bishidroximetilpropionico (Bis MPA), con un núcleo tetrafuncional de etoxilato de pentaeritritol, según se muestra en la siguiente tabla.

Pseudo generación	Mn (g/mol)	Tg (K)	Gps OH /molecula
2	1740	298	16
3	3588	309	32
4	7284	313	64

Tabla 1.1. Parámetros para polímeros hiper-ramificados.

Algunas de las propiedades más significativas para los polímeros hiper-ramificados son las siguientes¹²:

- Facilidad de síntesis.
- Poseen una forma globular.
- Pueden presentar variaciones en el grado de ramificación.
- Son moléculas de gran peso molecular cuya estructura es predominantemente amorfa pero sin presentar entrecruzamiento.
- Presentan una gran cantidad de aplicaciones.

1.2.1. Métodos de obtención de polímeros hiper-ramificados.

Actualmente se cuenta con tres metodologías principales para la obtención de polímeros hiper-ramificados, estas son la polimerización por condensación, por apertura de anillo y finalmente por autocondensación vinílica como lo muestra la figura 1.6.

Polímeros AB₂

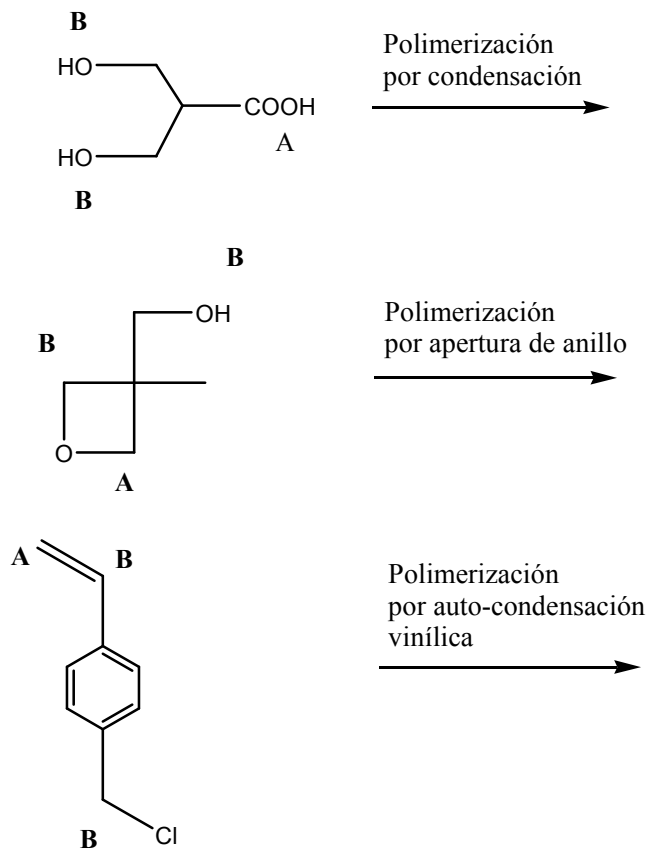


Fig.1.6 Diferentes métodos de polimerización para monómeros tipo AB₂.

Polimerización por condensación.

Fue desarrollada por Kim y Webster¹³ durante la década de los 80's. Este tipo de polimerización se lleva a cabo en solución, adicionando poco a poco el monómero AB_x, lo cual afecta de manera importante el grado de ramificación, así como la distribución de pesos moleculares. Un ejemplo es la siguiente síntesis de poliamidas realizada por Ishida¹⁴ (fig. 1.7).

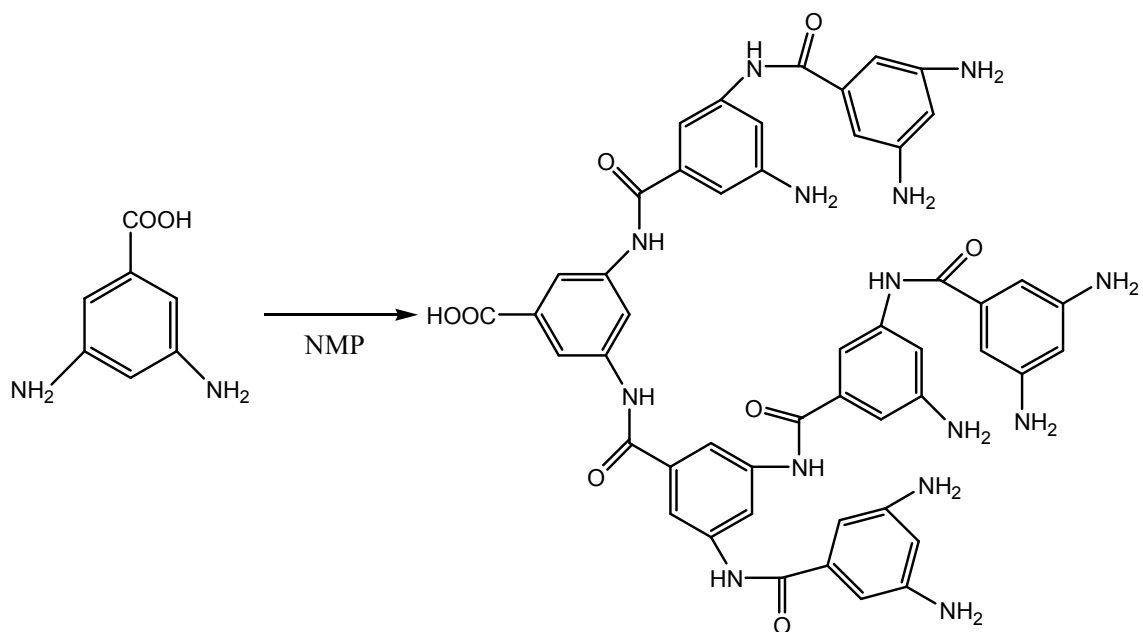


Fig. 1.7. Síntesis de una poliamida por policondensación.

Polimerización por apertura de anillo.

Este método fue implementado por Suzuki¹⁵ en 1992 y consiste en la polimerización por apertura de anillo de monómeros cíclicos potencialmente del tipo AB₂. Suzuki lo denominó polimerización multi-ramificada o MBP, (Multi Branched Polymerization). Posteriormente en 1999 Sunder y Frey¹⁶ renombraron este método como polimerización multi-ramificada por apertura de anillo ROMBP ya que la apertura de anillo es la fuerza motriz del proceso.

La característica más importante de esta reacción es la multiplicación de los grupos terminales en cada paso del proceso (fig. 1.8).

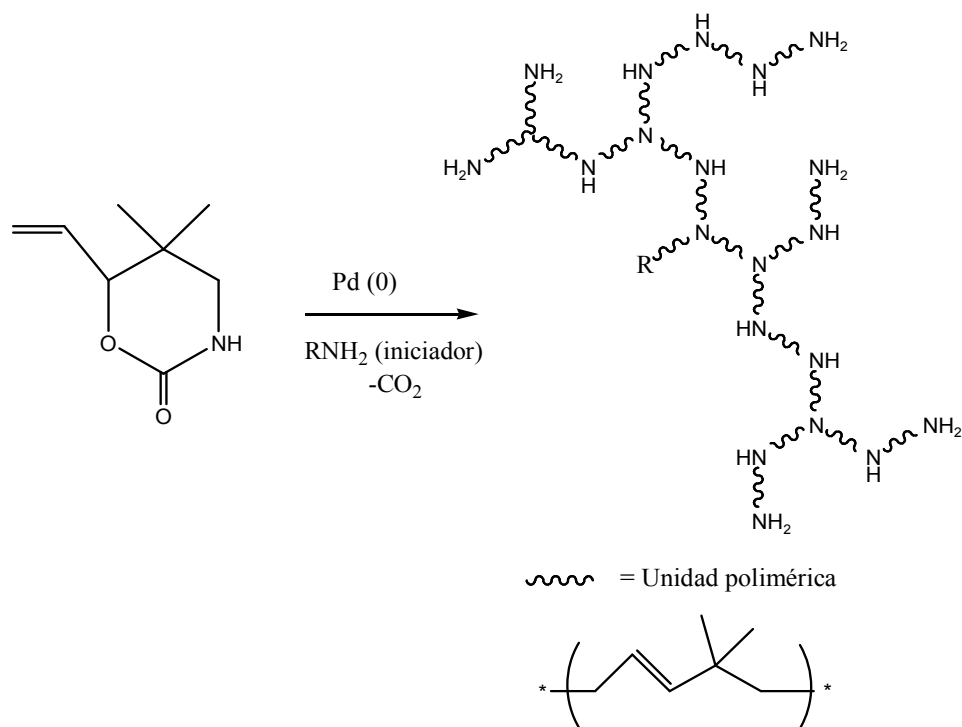
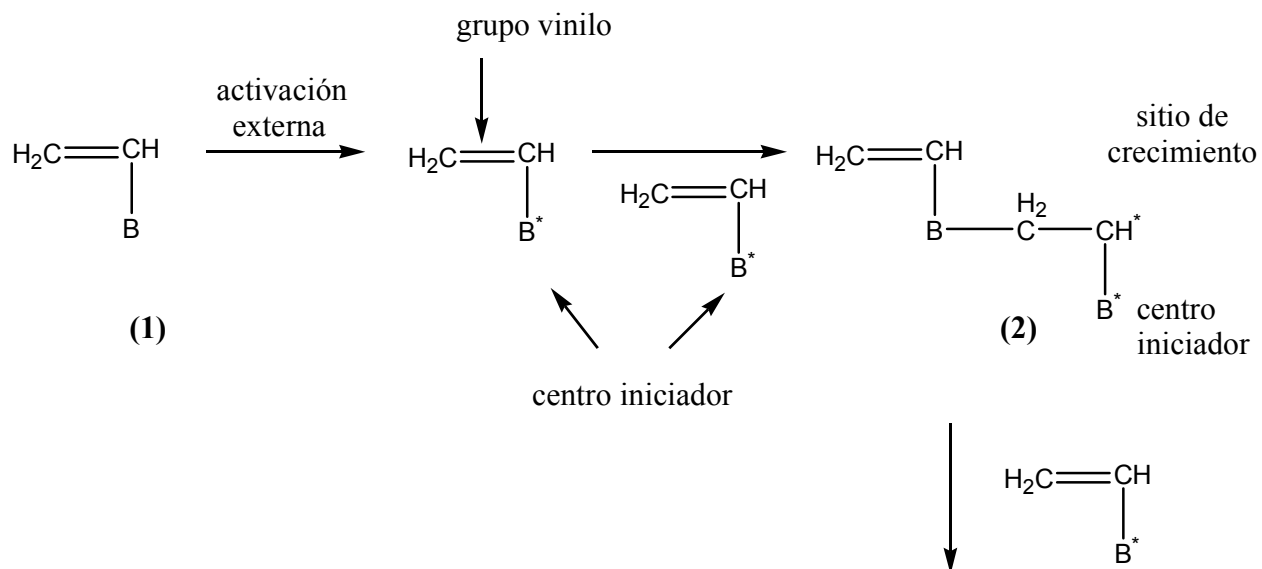


Fig. 1.8. Polimerización multi-ramificada, NBP.

Polimerización por auto-condensación vinílica.

Fue desarrollada en 1995 por Fréchet y colaboradores¹⁷ y se basa en el uso de un monómero vinílico que posee un grupo iniciador dentro del propio monómero. Puesto que el grupo vinilo se consume durante la reacción y al mismo tiempo la polimerización muestra rasgos característicos de una poli condensación, se le denominó polimerización por auto-condensación vinílica SCVP (Self Condensation Vinilic Polymerization). Una representación general de este proceso se muestra a continuación.



POLÍMERO HIPER-RAMIFICADO

Fig. 1.9. Polimerización por autocondensación vinílica.

El monómero vinílico AB (1), que es del tipo lineal, tiene un grupo que puede ser activado por un estímulo externo para producir una especie iniciadora (B^*), que a su vez es capaz de iniciar el proceso de polimerización de un monómero vinílico. La polimerización comienza cuando la especie iniciadora reacciona con el doble enlace de (1) de otra molécula similar (también activado en el grupo B), lo cual genera un dímero (2), que posee además de un doble enlace, un centro de iniciación (B^*) y un nuevo centro de crecimiento ($-\text{CH}^*$), por lo tanto se dice que el monómero vinílico inicial AB se transformó en un monómero AB_2 que, como se sabe, da lugar a polímeros hiper-ramificados. Se denomina polimerización por auto condensación vinílica porque se lleva a cabo mediante el acoplamiento entre diferentes cadenas crecientes, utilizando pasos típicamente observados en las polimerizaciones vinílicas clásicas.

1.3 PROPIEDADES DE LOS POLÍMEROS HIPER-RAMIFICADOS Y DENDRÍMEROS.

Dentro de las propiedades mas importantes que caracterizan a los polímeros hiper-ramificados podemos encontrar las siguientes:

- Peso molecular (M).
- Grado de ramificación (DB).
- Grado de polidispersidad (DP).
- Temperatura de transición vítrea (TG).

De estas propiedades depende el comportamiento y potencial aplicación de los polímeros hiper-ramificados.

La estructura de los dendrímeros y polímeros hiper-ramificados, su forma relativamente esférica, su simetría y el gran número de ramificaciones en la periferia, da como resultado una elevada flexibilidad conformacional en comparación con sus análogos lineales. En la tabla 2 se muestran las principales diferencias entre los polímeros lineales y dendriméricos¹⁸.

	Polímero lineal	Polímero dendrimérico
Viscosidad	Alta	Baja
Solubilidad	Baja	Alta
Funcionalidad	Baja	Alta
Reactividad	Baja	Alta
Control en la estructura	Baja	Alta

Tabla 1.2. Comparación de las propiedades de los polímeros lineales y dendriméricos.

De acuerdo con estudios teóricos realizados por Muthukumar, Mansfield y Klushin¹⁹ y por los estudios experimentales realizados por Wooley, K. et al.²⁰, se ha demostrado que existe la tendencia de algunas ramificaciones a plegarse hacia el interior, dirigiéndose al centro de la macromolécula. Lo anterior pone de manifiesto la flexibilidad conformacional de los dendrímeros y polímeros hiper-ramificados.

Los dendrímeros son considerados macromoléculas monodispersas, ya que todas las moléculas presentan al mismo peso molecular y estructura. Salvo pequeños defectos estructurales durante el

proceso de síntesis, el índice de polidispersidad es de alrededor de 1.001. En el caso particular del PAMAM (dendrúmero comercial de poliamidoamina) se han observado polidispersidades de 1.0007²¹ (hasta la 3ª generación). En el caso de los polímeros hiper-ramificados, la polidispersidad varía dependiendo del tipo de síntesis empleado, reportándose valores ≤ 1.5 ²².

La viscosidad intrínseca para el caso de los dendrímeros se incrementa conforme se incrementa el peso molecular (con el número de generaciones) hasta alcanzar un valor máximo, y de ahí disminuye, esto se debe a la transición que experimenta la forma de las moléculas, de un arreglo extendido en las primeras generaciones, a una forma globular en generaciones elevadas, lo cual no sucede con los polímeros lineales. Esto se debe a que en el caso de los dendrímeros y polímeros hiper-ramificados no se presentan interacciones de las ramas entre las moléculas de una generación superior.²³

La forma de los dendrímeros y polímeros hiper-ramificados los hace completamente amorfos y solubles en una gran variedad de disolventes. Para los dendrímeros de generaciones superiores, la solubilidad depende principalmente de las propiedades de los grupos de la periferia.²⁴

1.3.1. Grado de ramificación (DB).

El grado de ramificación de los polímeros hiper-ramificados es un parámetro muy importante, ya que es una medida del grado de imperfección de los polímeros dendriméricos. En la figura 1.10 se muestra la clasificación de los polímeros de acuerdo a su grado de ramificación.

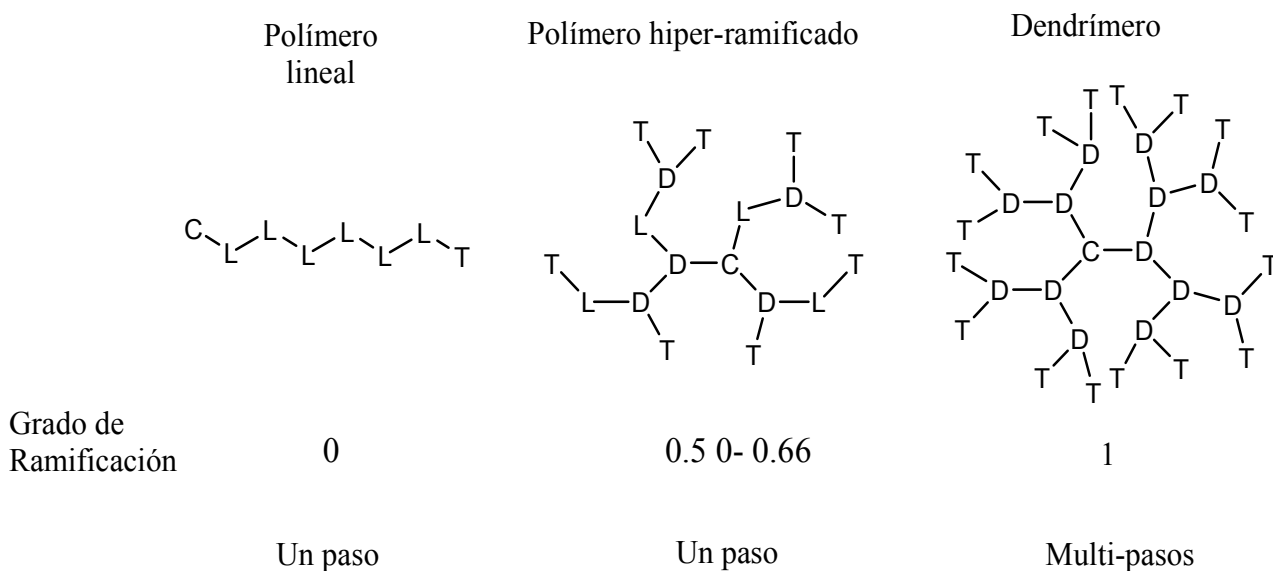


Fig. 1.10. Clasificación de los polímeros hiper-ramificados de acuerdo a su grado de ramificación²⁵, las letras denotan unidades estructurales (C: núcleo, L: lineal, D: dendrímico y T: terminal).

Dependiendo del método de síntesis utilizado se obtendrá el tipo de estructura dendrímica; si utilizamos una metodología convergente se obtendrá una estructura regular ó bien, al utilizar una metodología divergente se obtendrá una estructura irregular, donde existen sitios activos sin reaccionar, y en las que se consideran tres tipos de subunidades estructurales, aparte del sitio focal de crecimiento (fig. 1.11).

- (T) unidades terminales, donde no se considera sustitución
- (D) unidades dendrímicas, donde se considera una sustitución completa y ramificación

- (L) unidades lineales, las cuales presentan una sustitución parcial y por lo tanto una semi-ramificación.

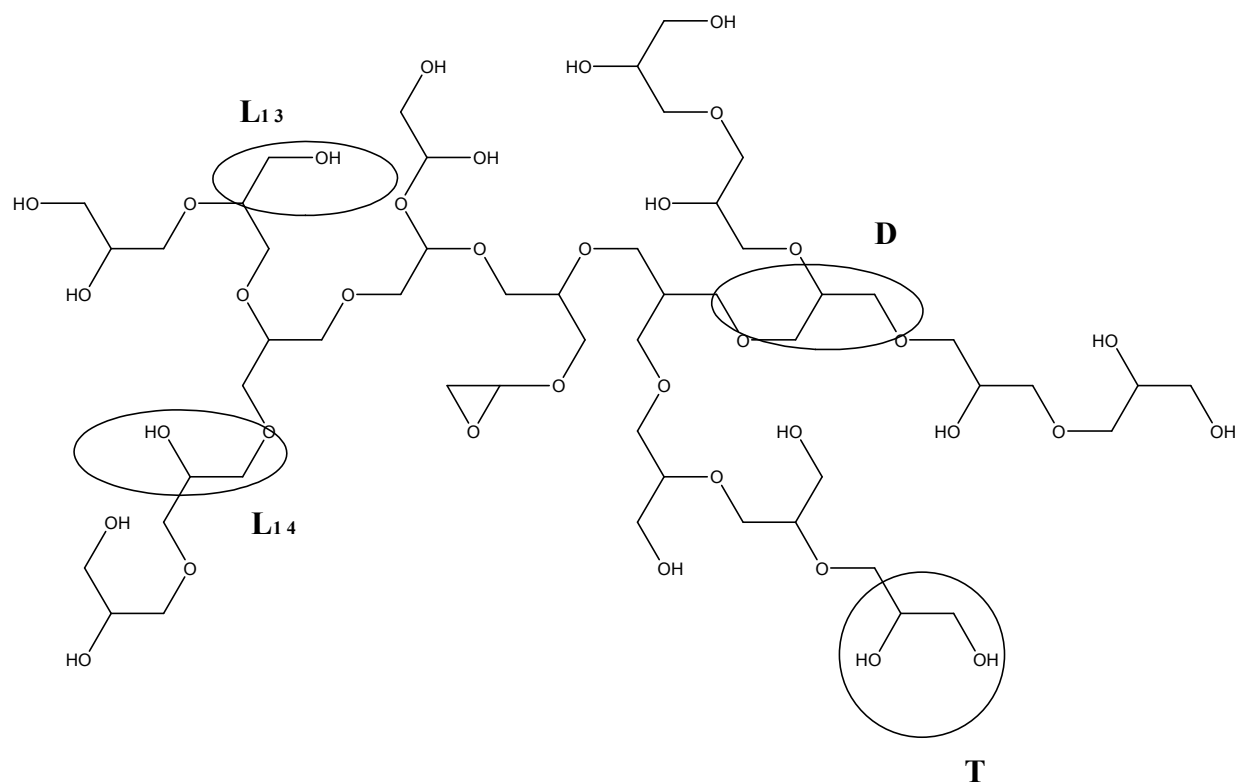


Fig. 1.11. Tipos de sub-unidades estructurales de una molécula hiper-ramificada.

De acuerdo a Frechet y Hawker²⁶, el grado de ramificación (DB) describe qué tan regular es la arquitectura del polímero hiper-ramificado y lo describen de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$DB = \frac{D+T}{D+T+L} \quad (\text{eq.1})$$

El grado de ramificación varía entre 0 y 1, dependiendo del tipo de molécula. En el caso de una molécula lineal de alto peso molecular, su valor sería de 0; por otro lado, si se tratara de un dendrímero perfecto, su valor sería de 1.

Frey²⁷ reportó que para la polimerización de un monómero AB₂ se obtiene estadísticamente un DB de 0.5, considerando que la reactividad de los grupos funcionales en cada unidad es la misma.

1.3.2. Grado de polimerización (DP).

El grado de polimerización promedio (DP_m), se define como el número total de unidades estructurales, incluyendo el grupo terminal. Matemáticamente es definido como el número total de moléculas de monómero presentes inicialmente dividido por el número total de moléculas presentes en un determinado intervalo de tiempo.

$$(DP_m) = \frac{\text{número total de unidades monoméricas}}{\text{número total de moléculas}}$$

Para el caso de los polímeros dendriméricos, el grado de polimerización depende del número de generación elevado a una doble función exponencial, por lo que en términos de la generación (n), Inoue²⁸ propone la siguiente ecuación:

$$DP_m = 2^{2n} - 1 \quad (\text{eq. 2})$$

En el caso de los polímeros hiper-ramificados, el grado de polimerización promedio puede ser calculado de la distribución de unidades estructurales²⁹ así:

$$DP_m = (T+L+D)/(T-D) f_c \quad (\text{eq.3})$$

Donde:

T= unidades terminales.

L= unidades lineales.

D= unidades dendriméricas.

f_c = funcionalidad de la molécula central.

1.4. GLICIDOL.

El glicidol es un hidroxiepóxido, comercialmente disponible y muy reactivo. Es un monómero tipo cíclico latente AB_2 . Un monómero cíclico latente es aquel que al interactuar con un iniciador presenta dos modos de propagación³⁰.

1. Crecimiento en cadena.
2. Crecimiento por pasos.

El glicidol puede ser polimerizado a poliéter hiper-ramificado con numerosos grupos terminales hidroxilo, el cual se conoce como poliglicidol. Los pioneros en la polimerización del glicidol fueron Sander y Berg³¹.

El glicidol se considera una molécula trifuncional de acuerdo con el número de sitios activos que tiene la molécula. Es un epóxido con una gran reactividad química debido a la facilidad de apertura de anillo, por estar sometido a tensión (ángulos de enlace de anillo aprox. 60°). Su gran reactividad le permite formar moléculas tipo AB_2 , según la figura 1.12:

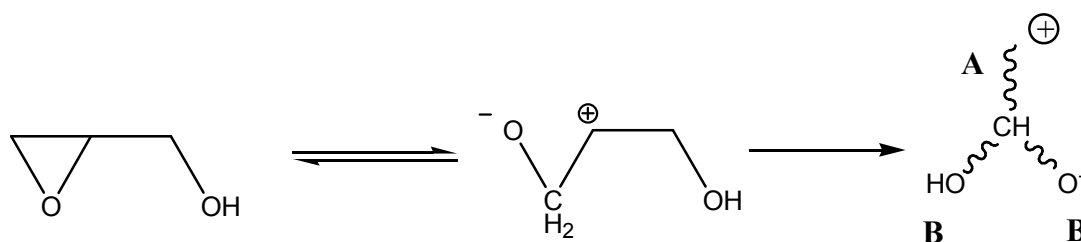


Fig.1.12. Molécula de glicidol tipo AB_2 .

Dicha molécula puede ser polimerizada en un polímero hiper-ramificado por apertura de anillo por sus siglas ROMBP³².

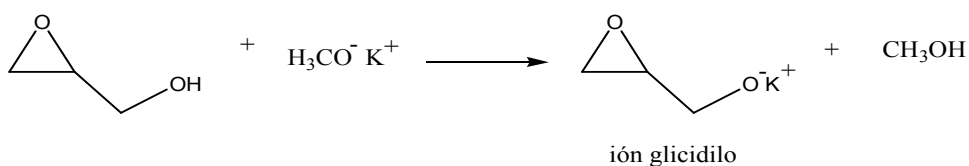
1.4.1. Métodos de polimerización del glicidol.

La polimerización del glicidol se puede llevar a cabo por medio de dos mecanismos diferentes, el catiónico³³ y el aniónico³⁰, en la presente tesis se polimerizo al glicidol mediante el mecanismo aniónico el cual involucra tres pasos como lo describió H. Frey³⁰ en 1999:

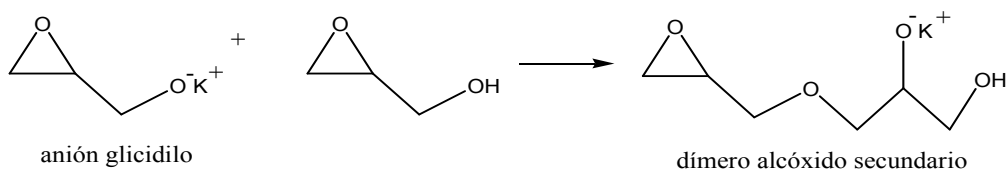
- Iniciación, donde se forma el ión glicidol por medio de la acción de un iniciador.
- Propagación, en donde ocurre el crecimiento del polímero.
- Transferencia intramolecular, en donde se generan alcóxidos primarios y/o secundarios debido a la transferencia intramolecular durante la polimerización.

La siguiente figura muestra el mecanismo de polimerización aniónico ilustrando estos 3 pasos

Iniciación:



Propagación



Transferencia intramolecular

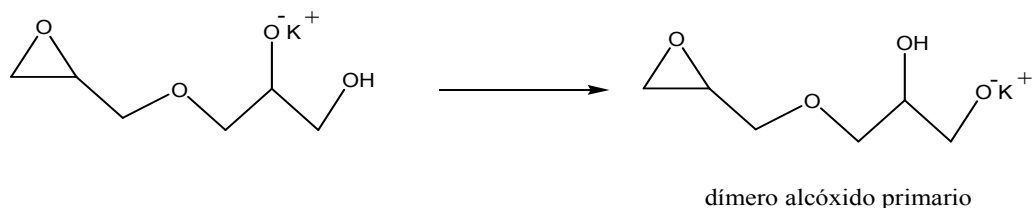


Fig.1.13. Mecanismo de polimerización aniónica del glicidol.

1.5. CARACTERIZACIÓN DE POLÍMEROS.

La caracterización de las moléculas poliméricas mediante diferentes técnicas proporciona información cualitativa y cuantitativa sobre las diferentes propiedades que éstas poseen. Tales propiedades son:

- La estructura química de polímeros.
- Grupos funcionales.
- El peso molecular del polímero.
- La distribución de pesos moleculares.
- Tamaño y forma de las moléculas poliméricas.
- Temperaturas de transición (Tg: transición vítrea; Tm: fusión; Td: descomposición).

Esta información es indispensable para conocer las propiedades de los materiales sintetizados y si es el caso optimizar los procesos utilizados para su obtención.

Algunas de las técnicas más comunes para la caracterización de moléculas poliméricas³⁵ son:

TÉCNICA ESPECTROSCÓPICA	INFORMACIÓN OBTENIDA
Ultravioleta-Visible	Existencia de cromóforos y/o conjugación en la molécula a partir de las absorciones observadas.
Infrarrojo	Grupos funcionales a partir de las absorciones observadas.
Espectrometría de masas	Formula molecular y subestructuras a partir de los iones observados.
Resonancia magnética nuclear (C,H,N,F,P) en una o dos dimensiones	Grupos funcionales, subestructuras, conectividades, estereoquímica, etc. a partir de datos de desplazamiento químico, áreas de los picos y constantes de acoplamiento observadas.

TÉCNICAS NO ESPECTROSCÓPICAS	INFORMACIÓN OBTENIDA
Cromatografía por exclusión de tamaños (SEC)	Masa molecular (M_n, M_w, M_z) y su distribución (polidispersidad)
Dispersión de luz	Medida directa de las masas moleculares, radio de giro, radio hidrodinámico
Calorimetría diferencial de barrido	Temperaturas de transición (vítreas, cristalización y fusión)
Viscosimetría	Viscosidades (relativa, inherente, reducida e intrínseca)

Tabla 1.3 técnicas de caracterización de moléculas poliméricas.

Los polímeros hiper-ramificados que se sintetizaron en la presente tesis se caracterizaron mediante RMN ^1H y ^{13}C ; FT-IR, SEC acoplado a dispersión de luz y viscosimetría, DSC y UV-Vis.

1.7 APLICACIONES.

Hoy en día existen más de cien familias de dendrímeros, cada una con propiedades únicas, desde la superficie, en el interior y en el centro de la molécula. Estas propiedades pueden ser vinculadas a diversas clases de aplicaciones, muchas de ellas están basadas en la uniformidad molecular que poseen, en la superficie multifuncional y en la presencia de cavidades internas. Estas propiedades específicas hacen a los dendrímeros aptos para usarse en una gran variedad de aplicaciones de alta tecnología tanto en la biomedicina como en la industria así como en la investigación científica. Algunos ejemplos son los siguientes:

- Diseño de sensores de gas basados en metalodendrímeros.
- Recubrimientos.
- Agentes descontaminantes.
- Simulación de comportamiento enzimático.³⁶
- Como antenas moleculares.
- En el área de medicina como agentes terapéuticos en la “técnica de captura de neutrón de boro”; lo que representa un método para el tratamiento de formas poco curables de cáncer.³⁷
- Con fines de diagnóstico.
- Como vehículos para medicamentos.³⁸
- Como catalizadores.³⁹
- Para diagnósticos in “Vitro”.- los anticuerpos de dendrímeros conjugados se usan como dispositivos para la rápida detección de señales de padecimientos cardiacos.

Por otra parte, las aplicaciones basadas en polímeros hiper-ramificados han crecido exponencialmente en los últimos años, ya que su alta funcionalidad permite el desarrollo de nuevos productos, con una gran variedad de arquitecturas moleculares y aplicaciones. Estas características, junto al hecho de que su síntesis se realiza en un solo paso, hacen que estos polímeros se contemplen como una alternativa económica y viable a los dendrímeros. La modificación de los grupos terminales de los polímeros hiper-ramificados permite variar algunas de sus propiedades, tales como la temperatura de transición vítrea, la solubilidad y la viscosidad, del mismo modo que determina muchas de sus posibles aplicaciones, que van desde aditivos hasta aplicaciones de vanguardia como materiales de conducción iónica.

Esquemáticamente estas aplicaciones son⁴⁰:

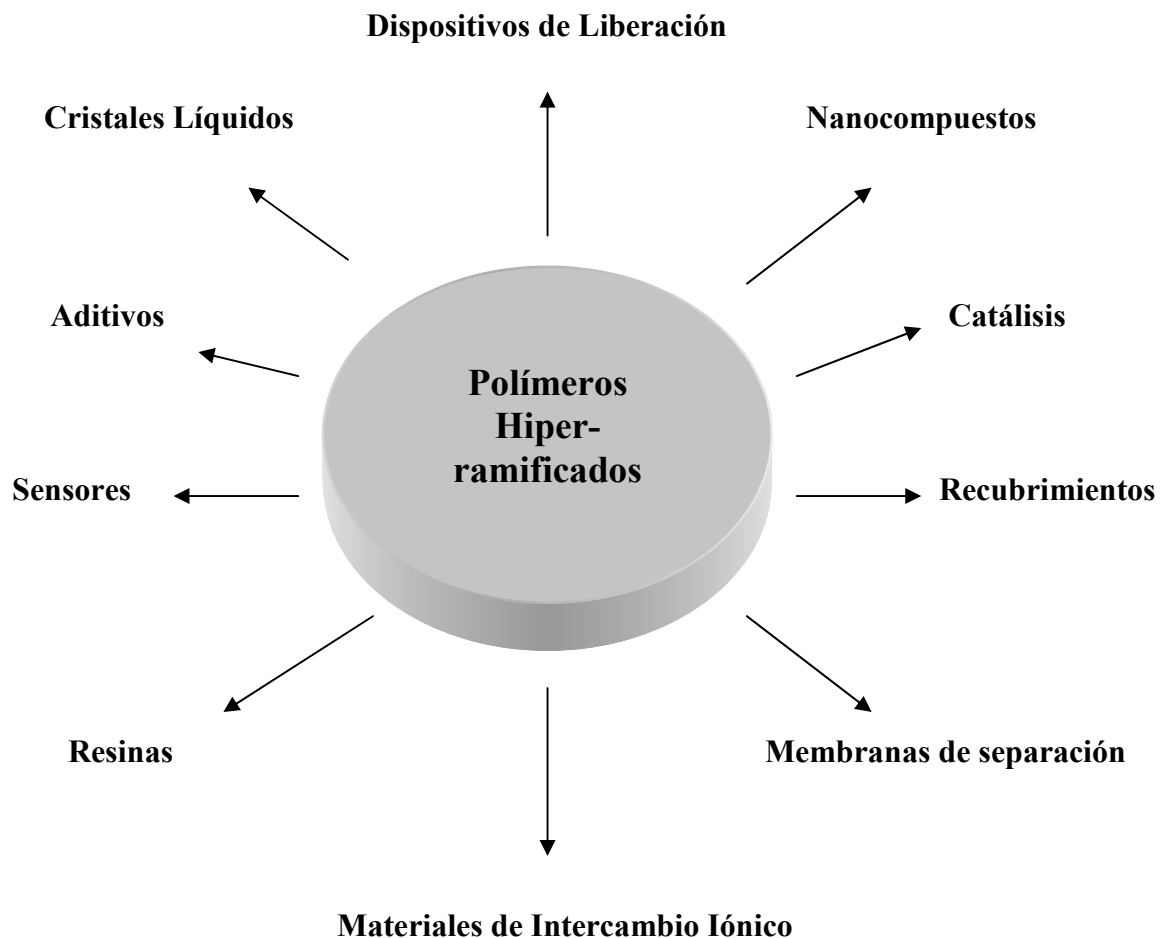


Fig. 1.14. Aplicaciones de los polímeros hiper-ramificados.

Mientras que la arquitectura perfecta de los dendrímeros conquistó el corazón de los químicos sintéticos desde su descubrimiento, tuvo que pasar cierto tiempo para que los polímeros hiper-ramificados pudieran cobrar importancia. Se ha observado que los polímeros hiper-ramificados tienen propiedades muy similares a aquellas que presentan los dendrímeros⁴⁰, como por ejemplo gran solubilidad en una amplia gama de disolventes, baja viscosidad y forma. Por ello, para fines industriales y farmacéuticos, los polímeros hiper-ramificados son una prometedora alternativa a los dendrímeros.

Si bien es cierto que la aplicación de los polímeros hiper-ramificados es relativamente nueva, es notable mencionar que su potencial es muy grande ya que su relación costo-beneficio supera en algunas áreas a los dendrímeros. De ahí que solo la investigación sobre estos materiales podrá en un futuro maximizar dicho potencial.

1.8. POLÍMEROS CON APLICACIONES FARMACÉUTICAS.

Como se sabe, los polímeros son la clase más versátil de la ciencia de materiales, éstos han cambiado nuestra forma de vida durante las últimas décadas. Sin embargo, en los últimos años nuevos tipos de polímeros han adquirido una distinción especial por tener potenciales aplicaciones en el ramo biomédico.

Es gracias a la unión de dos disciplinas, ciencia de polímeros y la farmacéutica, que ha ido aumentando la investigación en los sistemas de acarreamiento de fármacos a base de sistemas poliméricos.

Uno de los primeros polímeros sintéticos usados en estos sistemas fue el ácido poliglicólico, concretamente en 1962 fue utilizado para desarrollar la primera sutura absorbible sintética⁵², lo cual puso de manifiesto que sistemas poliméricos biodegradables podrían en principio interaccionar de manera no tóxica en las membranas celulares.

Las consideraciones para la selección y diseño de polímeros son una tarea desafiante, algunas de estas son:

- Biocompatibilidad con tejidos y sangre en organismos vivos.
- Propiedades de superficie (hidrofilicidad y/o hidrofobicidad).
- Resistencia a la degradación y/o erosión (en polímeros para el uso a largo plazo para ortopedia y odontología).

Debido a esto y a la inherente diversidad de estructuras y propiedades que presentan estos materiales es requerido un amplio conocimiento en sus propiedades físico-químicas.

En trabajos recientes, Angelova y Hunkeler⁵³ proponen una clasificación de polímeros que, aunado con ensayos clínicos, puede facilitar la elección de éstos en aplicaciones biológicas (tabla 1.4).

CLASIFICACIÓN	POLÍMERO
Polímeros Naturales	
Polímeros basados en proteínas	Colágeno, albúmina, gelatina,
Polisacáridos	Agarosa, alginato, carragenina, ácido hialurónico, dextrano, quitosán, ciclodextrinas
Polímeros sintéticos	
Biodegradables	
Poliésteres	Poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(hidroxi-butirato), poli(ϵ -caprolactona), poli(β -ácido málico), poli(dioxanonas)
Poli anhídridos	Poli(ácido sebácico), poli(ácido adípico), poli(ácido tereftálico) y varios copolímeros
Poliamidas	Poli(imino carbonatos), poliamino ácidos
Polímeros fosforados	Polifosfatos, polifosfonatos, polifosfacenos
Otros	Poli(ciano-acrilatos), poliuretanos, poliorto ésteres, polidihidropiranos, Poliacetales, poligliceroles
No-biodegradables	
Derivados de celulosa	Celulosa de carboximetilo, etil celulosa, acetato de celulosa, acetato-propionato de celulosa, hidroxipropil metil celulosa
Silicones	Polidimetilsiloxano, sílica coloidal
Polímeros acrílicos	Polimetacrilatos, poli(metil metacrilato), poli-hidro(etil-metacrilato)
Otros	Polivinil pirrolidona, etil vinil acetato, polioxámeros, polioxaminas

Tabla 1.4. Lista representativa de polímeros con aplicación biológica según Angelova y Hunkele.

Por otro lado, en los polímeros hiper-ramificados se ha observado que poseen propiedades de tipo cooperativo que no se encuentran en compuestos de bajo peso molecular, esto a consecuencia del gran número de grupos funcionales, lo que permite la manipulación de sus capacidades encaminadas a un fin específico.

La simple manipulación de la solubilidad en agua de algunos polímeros ya sea por el incremento de cadenas alifáticas, entrecruzando ó copolimerizando, da como resultado una gran variedad de materiales con un amplio espectro de aplicación. Dichos materiales son capaces de aumentar y/o mejorar características farmacológicas de determinados compuestos. Siguiendo con este concepto, en el presente trabajo (como se explicará más adelante) se pretende mejorar la solubilidad del taxol (fármaco anticancerígeno usado en quimioterapia) mediante su encapsulamiento con un polímero hiper-ramificado a base de glicidol.

1.9. TAXOL.

El Taxol, también llamado Paclitaxel, es un fármaco utilizado para el tratamiento del cáncer. Fue descubierto por el Research Triangle Institute (RTI) en 1967 cuando Monroe E. Wall y Mansukh C. Wani⁴¹ aislaron el compuesto que se encuentra en la corteza del árbol llamado Tejo del pacífico, *Taxus brevifolia*, y observaron su actividad antitumoral en diferentes tipos de cáncer.

En 1970, los dos científicos dilucidaron la estructura del Paclitaxel. Desde entonces ha sido una herramienta muy valiosa para los médicos que tratan pacientes con cáncer de pulmón, ovario, mama^{42,43,44}, y formas avanzadas del Sarcoma de Kaposi (Saville et. al 1995)⁴⁵. Se vende con el nombre comercial de Taxol, forma parte de la categoría de drogas denominada Taxanos. Es un diterpeno cíclico derivado del núcleo del taxano. Posee un anillo oxetano de cuatro miembros y una cadena amídica.

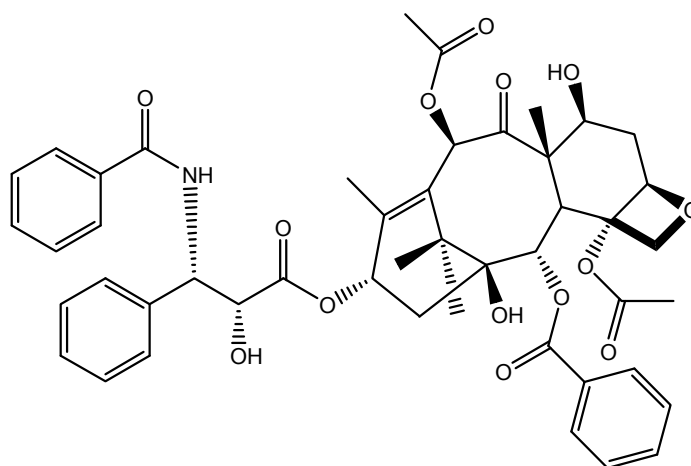


Fig. 1.15. Paclitaxel, fármaco antitumoral.

Por otro lado, la obtención de este tipo de fármacos, representa un costo muy alto en tiempo y dinero y muchas veces se presenta la problemática de que la alta eficiencia inherente en dichos fármacos, se ve drásticamente disminuida por problemas de solubilidad, y el taxol no es la excepción.

Debido a su poca solubilidad en agua, su uso clínico extensivo se ha visto detenido debido a la falta de vehículos apropiados para su liberación en el sitio requerido. Existe entonces una necesidad clara de desarrollar formulaciones alternativas del taxol para mejorar su solubilidad en medios acuosos. Hasta ahora se han desarrollado varias aproximaciones como el uso de emulsiones⁴⁶, micelas⁴⁷, liposomas (pequeñas vesículas lipídicas encapsulantes)⁴⁸, nanopartículas^{49,50}, ciclodextrinas⁵⁰, pastas e implantes⁵¹; sin embargo, y después de revisar la literatura, se observa que queda mucho trabajo por realizarse para encontrar el medio encapsulante y de transporte óptimo del taxol.

Los dendrímeros y polímeros hiper-ramificados, con sus posibilidades de forma y funcionalización, se presentan como posibles agentes encapsulantes con mejores propiedades de solubilidad que los fármacos por si solos.

En el presente proyecto se considerará al poliglicidol³⁰ como esqueleto molecular para llevar a cabo la preparación de nanocápsulas anfifílicas (con regiones hidrofílicas e hidrofóbicas en la misma entidad molecular).

Se pretende preparar y caracterizar polímeros hiper-ramificados que posean, por un lado, una periferia hidrofílica polar, afín a medios fisiológicos, y por otro lado, un interior con carácter más hidrofóbico que permita el encapsulamiento de fármacos (hidrofóbicos por naturaleza). En la figura 1.16 se ilustra resumidamente la preparación de una nanocápsula anfifílica:

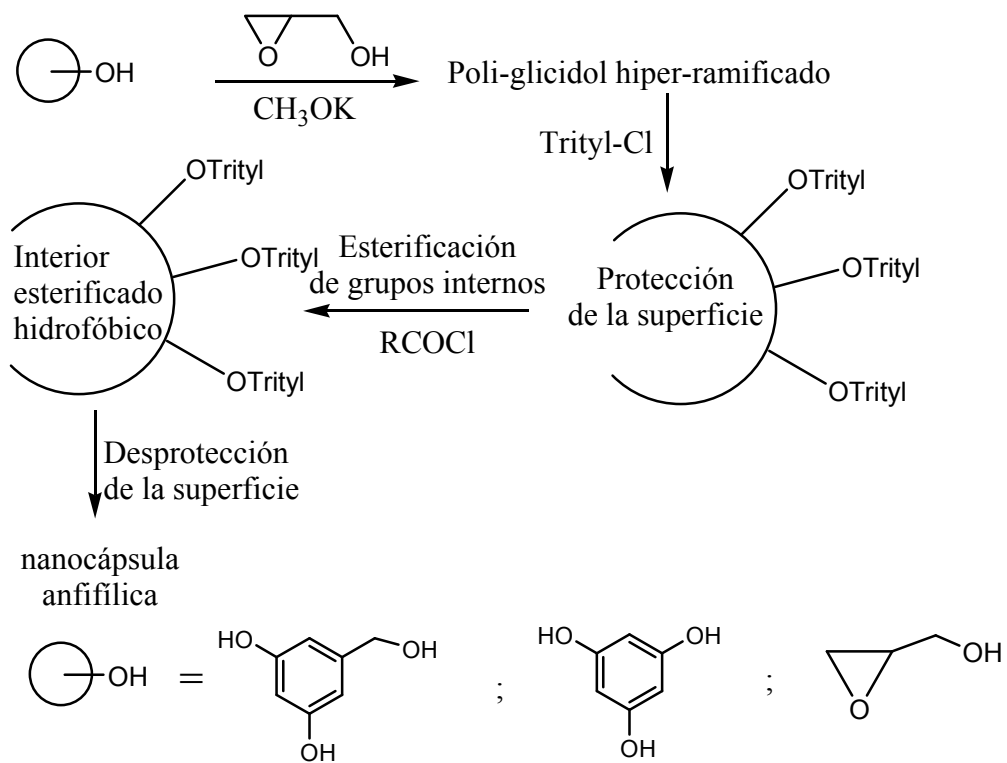


Fig. 1.16. Esquema resumido de síntesis.

CAPITULO II.

OBJETIVOS Y ESTRATEGIA SINTÉTICA.

2.1. OBJETIVOS.

Debido al gran número de grupos terminales que poseen las moléculas hiper-ramificadas y con el propósito de impartirles propiedades particulares se les hará una funcionalización adecuada mediante los siguientes pasos de reacción: protección, esterificación y desprotección.

Una de las posibilidades más interesantes es la modificación de estas macromoléculas tanto en su interior como en su exterior para obtener posibles agentes encapsulantes capaces de mejorar la solubilidad de moléculas no polares.

Con base en lo anterior se proponen los siguientes objetivos:

- Llevar a cabo la síntesis y la caracterización de polímeros hiper-ramificados a base de glicidol.
- Modificar la periferia de los polímeros obtenidos para obtener compuestos anfifílicos (con regiones hidrofílicas e hidrofóbicas en la misma entidad molecular).
- Llevar a cabo el encapsulamiento del fármaco taxol para evaluar sus propiedades como posible acarreador de fármacos.

Con base en estos objetivos se plantea la siguiente hipótesis:

La obtención de polímeros hiper-ramificados con un balance de grupos funcionales hidrofóbicos (cadenas de 16 carbonos) /hidrofílicos (grupos OH's), serán capaces de formar entidades huésped-anfitrión con el taxol mediante interacciones intermoleculares.

2.2 ESTRATEGIA SINTÉTICA.

La síntesis de los polímeros se llevo a cabo a partir de 2 diferentes centros aromáticos y un epóxido, teniendo como esqueleto al glicidol.

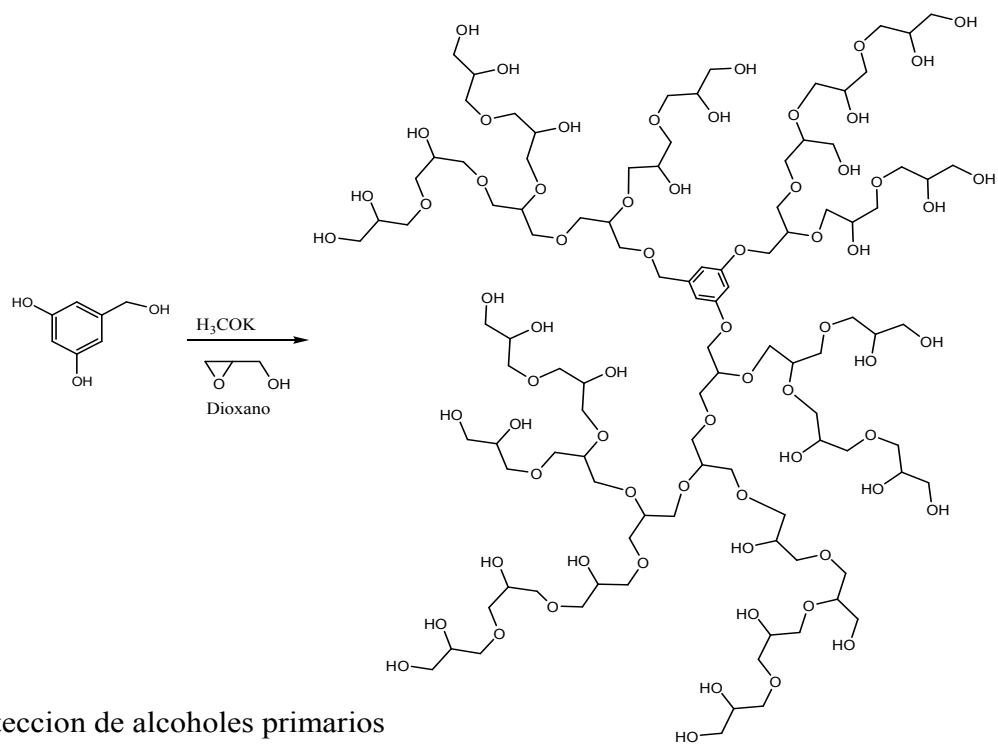
2.2.1. Ruta sintética.

La síntesis de las cápsulas anfífilas se llevó a cabo mediante una metodología que involucra básicamente cuatro pasos de reacción:

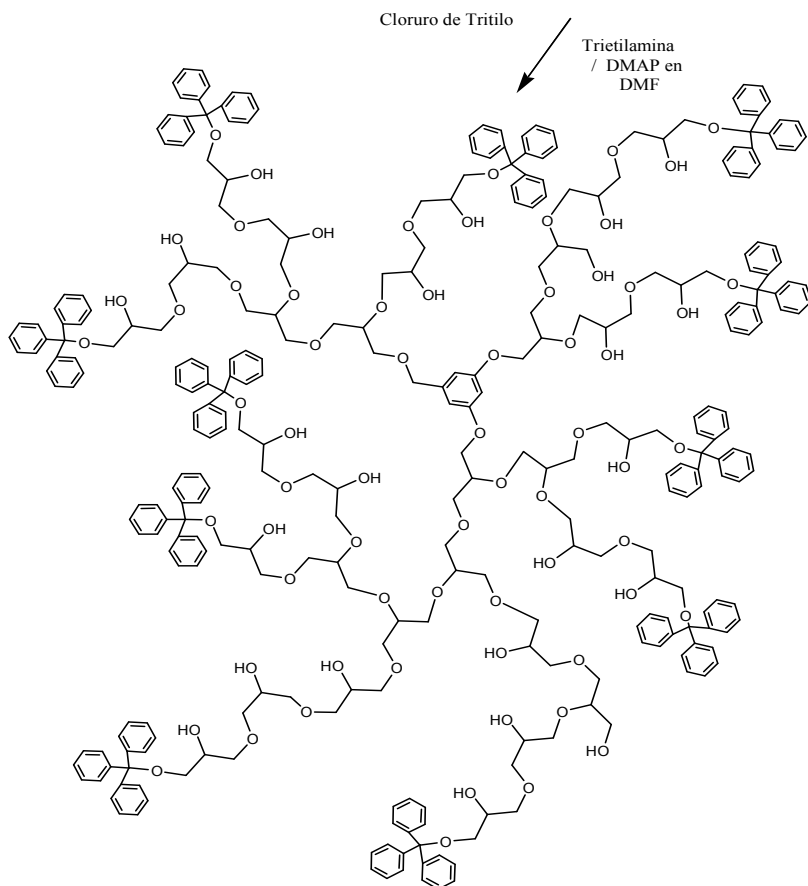
- 1. Polimerización*
- 2. Protección*
- 3. Esterificación*
- 4. Desprotección*

A continuación se esquematizan las reacciones que se efectuaron y los polímeros que se obtuvieron:

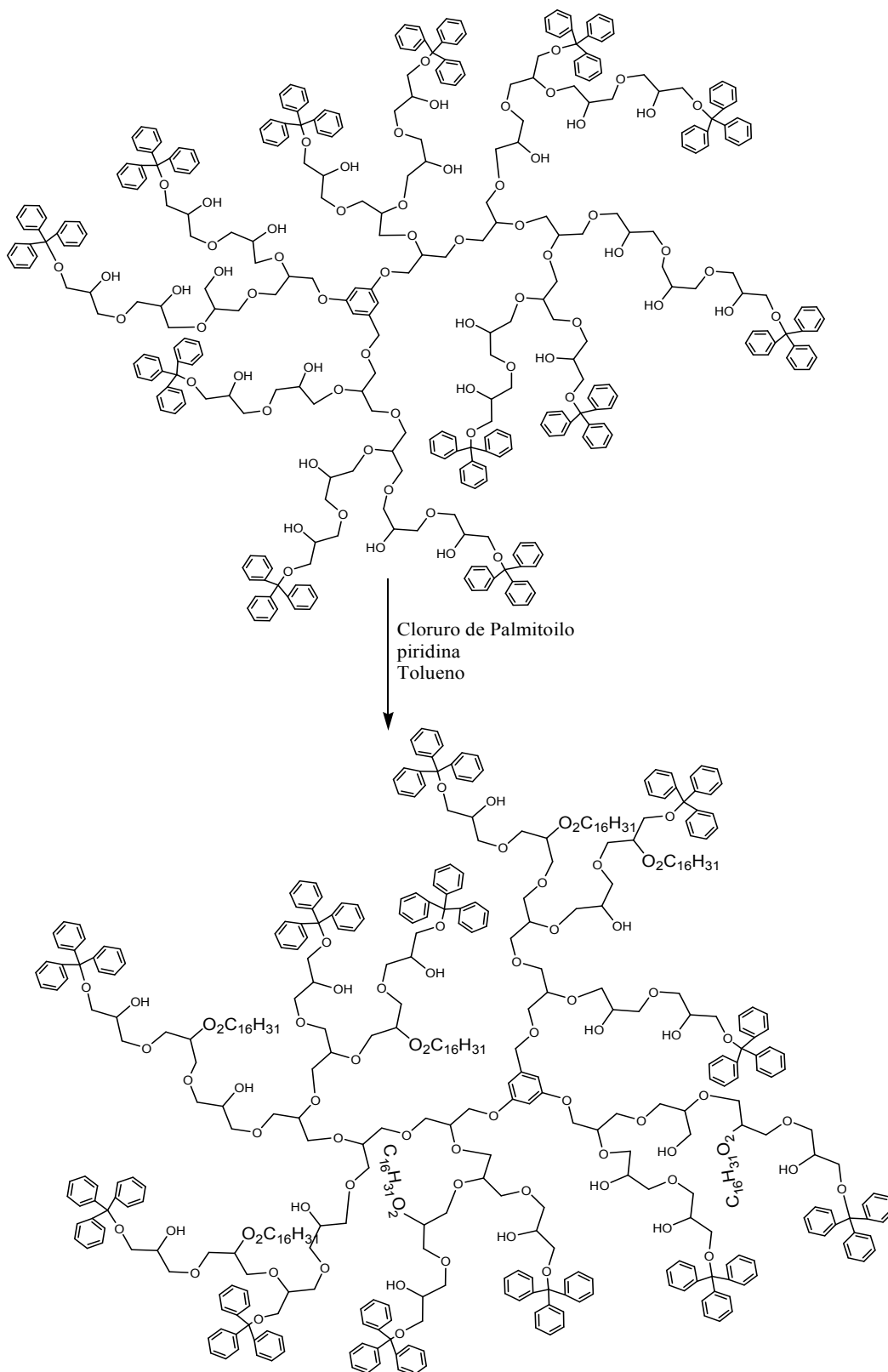
1.- Polimerización del glicidol usando el alcohol 3,5-dihidroxibencílico.



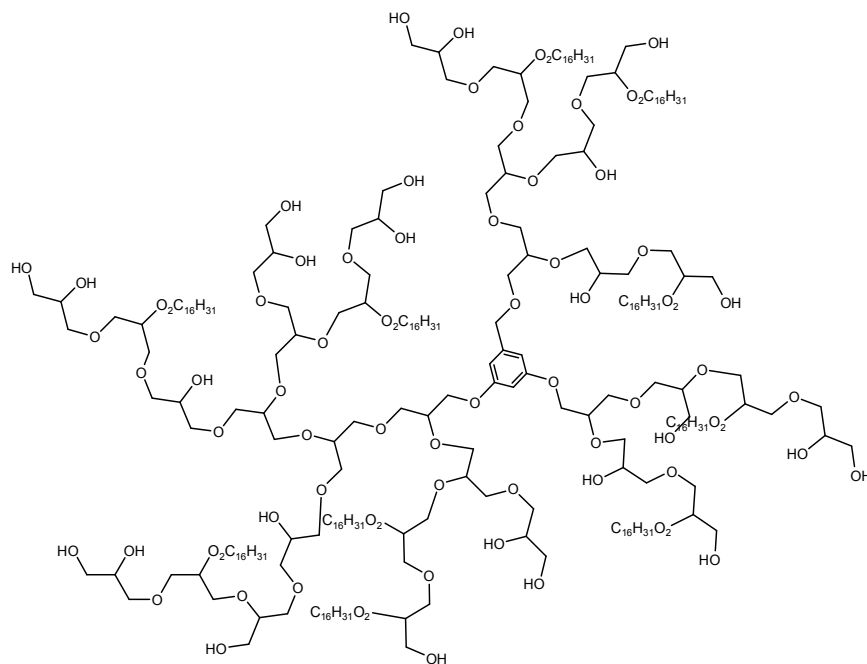
2.- Protección de alcoholes primarios



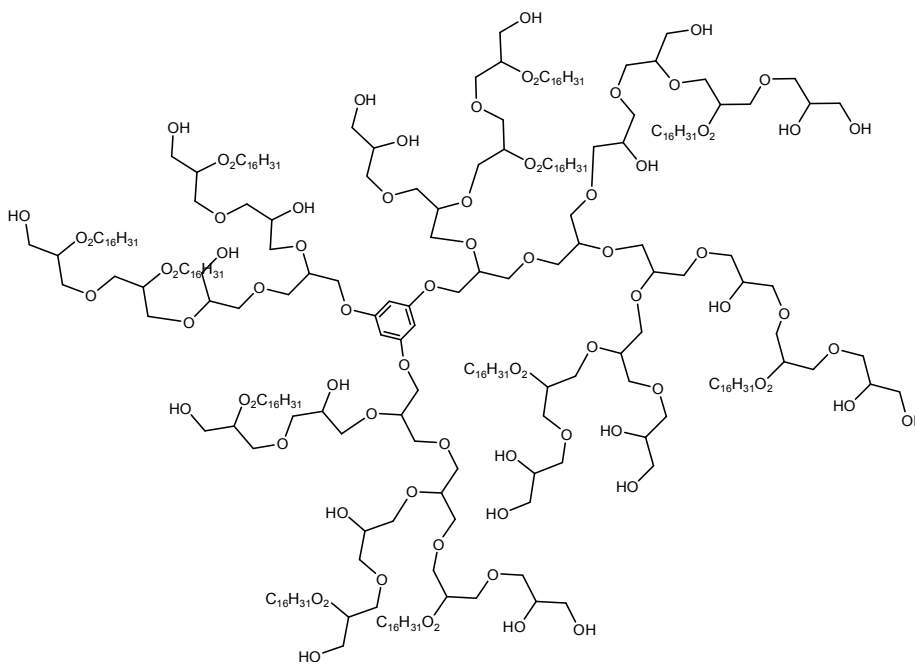
3.- Esterificación de alcoholes secundarios con cloruro de palmitoilo.



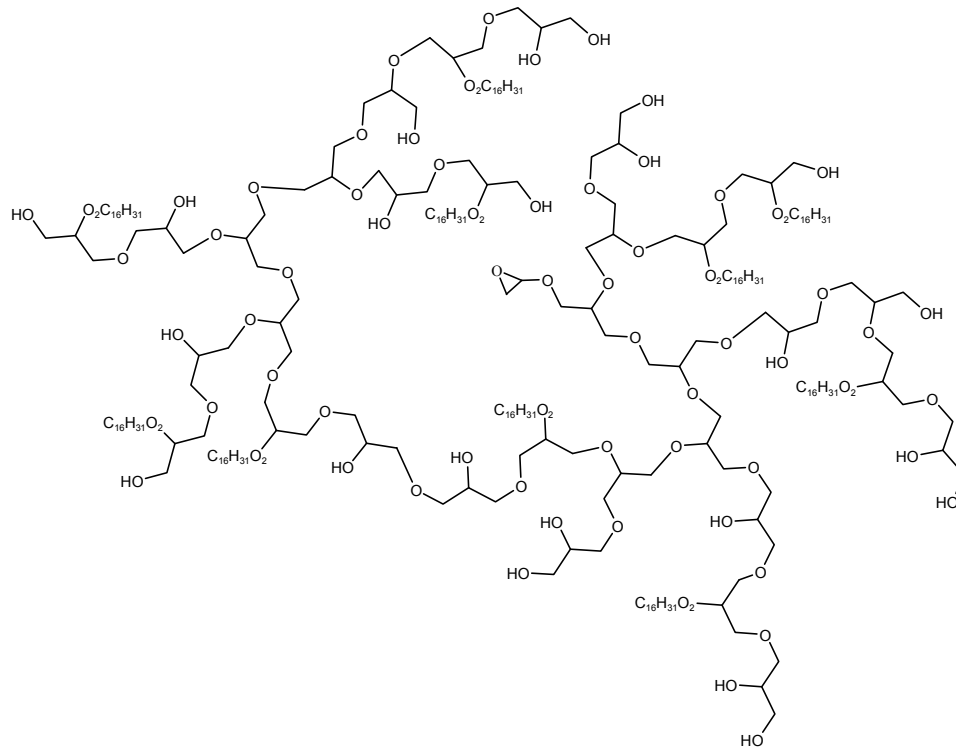
4.- Desprotección de alcoholes de los polímeros obtenidos con HCl.



Poliglicidol con núcleo de alcohol 3,5-dihidroxibencilico.



Poliglicidol con núcleo de floroglucinol.



Poliglicidol con núcleo epóxido.

CAPITULO III.

DESARROLLO EXPERIMENTAL.

Reactivos: los reactivos fueron usados tal como se recibieron de los proveedores.

(Aldrich, Proveedor científico y Baker); algunos de los disolventes fueron secados con malla molecular e hidruro de calcio (DMF y Metanol).

Equipo: La caracterización se llevó a cabo usando los siguientes equipos:

- Espectros FT-IR: Espectrómetro Perkin-Elmer de la serie Paragon Para muestras líquidas y sólidas.
- Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C : Espectrómetro Bruker de 400 MHz y 300 MHz con sonda para líquidos, sólidos y geles, Varian Unity de 200MHz.
- Cromatografía de permeación en gel: GPC Waters 510C acoplado a viscosímetro Viscostar 4000 Waters.
- Calorimetría diferencial de barrido (DSC): Universal V4.5A TA Instruments USA con una temperatura inicia de -100°C , con una velocidad de calentamiento de 10°C por minuto.

Material: En todas las reacciones se emplearon matraces bola de 250 y 200ml,

embudos de adición de 15ml, refrigerantes, parrilla con agitación, barras de agitación magnéticas de aprox. 2cm, pipetas de 5 y 10ml, probetas de 100ml, jeringas de vidrio de 2 y 5ml, tanque de nitrógeno y argón, usados en las reacciones de polimerización y esterificación según los protocolos optimizados.

PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA SÍNTESIS DE LOS POLÍMEROS OBTENIDOS.

POLIMERIZACIÓN.

En un matraz de tres bocas de 100mL se preparó una solución de metóxido de potasio (CH_3OK) 0.8g (14 mmol) con 0.5g (3.56 mmol) del centro utilizado en cada caso* (alcohol 3,5-dihidroxibencilico o floroglucinol) en 15mL de dioxano previamente secado y destilado. La solución se mantiene en agitación y atmósfera inerte. La mezcla se lleva a 60 °C durante 10min. Posteriormente se adicionaron 9.5mL (142.7 mmol) del monómero de glicidol diluido en 5mL de dioxano durante 3hrs. Después de la adición se calienta a 85 °C durante un periodo de 24hrs. Una vez concluido este periodo se enfría a temperatura ambiente y se agrega HCl al 10% hasta alcanzar un PH=7, la disolución se filtra y se concentra a vacío.

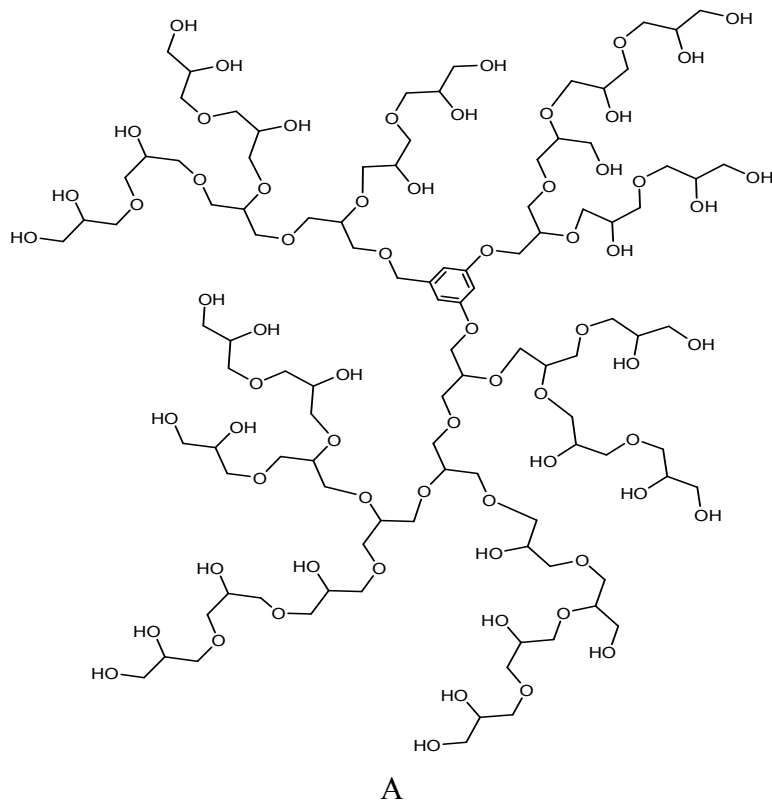
*En el caso del centro epóxido solo se agrega el monómero de glicidol diluido en tolueno a la solución de metóxido de potasio.

TRITILACION.

Se preparó una solución de cloruro de tritilo (0.82g, 2.94mmol) en 10mL de DMF seca y recién destilada, la cual fue adicionada gota a gota y bajo atmósfera inerte, a una solución de 1g de polímero (sea A,B, o C, 0.431mmol), con 0.057g de DMAP (0.4665 mmol) y 1.2mL de trietilamina (8.6mmol) en 2.5mL de DMF secado y destilado. El procedimiento se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 24 hrs. Posteriormente se adicionan 5mL de metanol y se evapora el disolvente a vacío, el polímero se disuelve en cloroformo y se lava con agua (3X10mL) y finalmente se evapora la parte orgánica para dar el producto.

ESTERIFICACIÓN.

En un matraz de 3 bocas de 100mL se preparó una solución de 1g de producto (compuestos D,E y F), mas 6 gotas de 1-metilimidazol en 20mL de piridina previamente secada; a esta solución se le adicionaron gota a gota 2.33mL (7.7mmol) de cloruro de palmitoilo en 10mL de tolueno a 80 °C, bajo atmósfera inerte. Después de 1 hora la mezcla de reacción se calienta a 130 °C por 20 hrs. Durante este periodo se apreció un cambio de color de negro a café. Una vez que se alcanzó la temperatura ambiente se agregó 1g de NaHCO₃, la piridina se removió mediante una destilación azeotrópica usando 50mL de tolueno. La solución remanente se filtra y se concentra a vacío para después lavar con acetato de etilo (3 X 30mL).



Compuesto A, poliglicidol con núcleo derivado del alcohol 3,5-dihidroxibencílico.

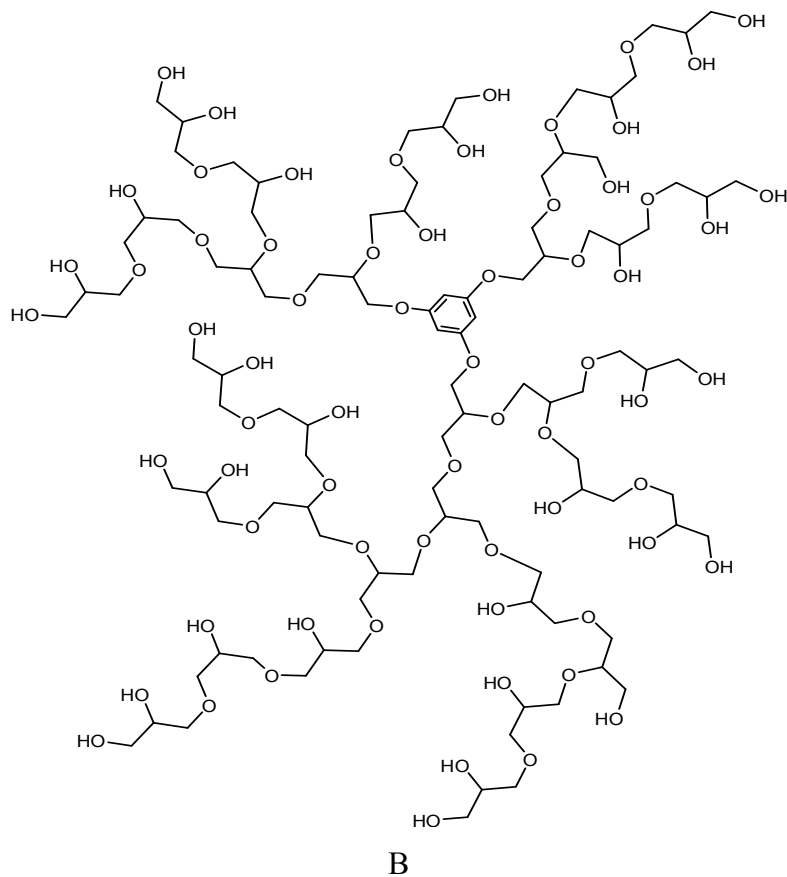
Aspecto: líquido viscoso color café claro.

Solubilidad: H₂O, CH₃OH.

PM =: 3003, PD = 1.35, Tg = - 45°C, Rendimiento: 88%

IR (cm⁻¹): 3384 (OH), 2875 (CH₂,CH), 1020 y 1165 (C-O).

RMN: (D₂O) ¹H (δ(ppm)): 3.08-3.7 (m, CH, CH₂), 6.2 (Arom. núcleo, s 4H) 6.4 (Arom. núcleo, s 2H) **¹³C:** 59.01-62.9 (CH₂OH), 79.9-80.1 (C-HOR) 74.1-71.1(CH₂OR), 72.1-69.8(CHOH).



Producto B, poliglicidol con núcleo derivado del 3,5-Dihidroxifenol (floroglucinol)

Aspecto: líquido viscoso color rojizo oscuro.

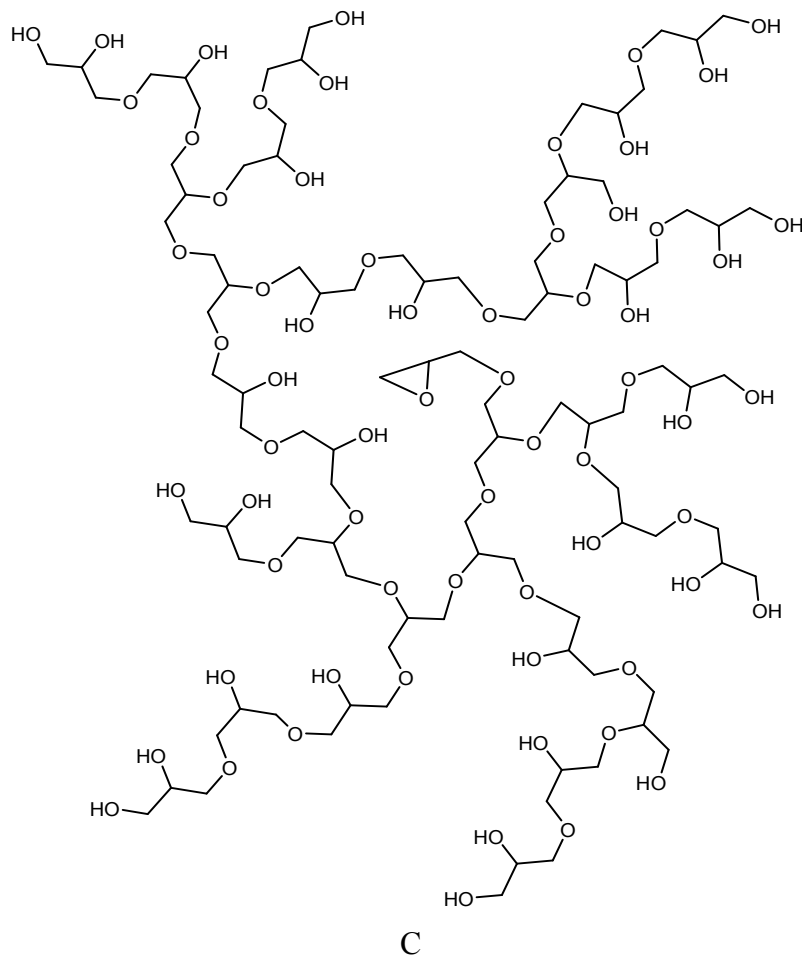
Solubilidad: H₂O, CH₃OH.

PM =:2318, PD = 1.34, Tg = - 47°C, Rendimiento: 85%

IR (cm⁻¹): 3291 (OH), 2938 (CH₂,CH), 1060 y 1166 (C-O).

RMN: (D₂O) ¹H (δ(ppm)): 3.10-3.75 (m, CH, CH₂), 6.4 (Arom., 3 CH₂)

¹³C: 58.01-62.9 (CH₂OH), 79.2-79.9 (C-HOR) 73.9-70.9(CH₂OR), 71.9-68.9(CHOH)



Compuesto C, poliglicidol con núcleo epóxido. En este caso el núcleo en la macromolécula es el resultado de la polimerización del monómero y no del acoplamiento con compuestos aromáticos.

Aspecto: líquido viscoso color amarillo claro.

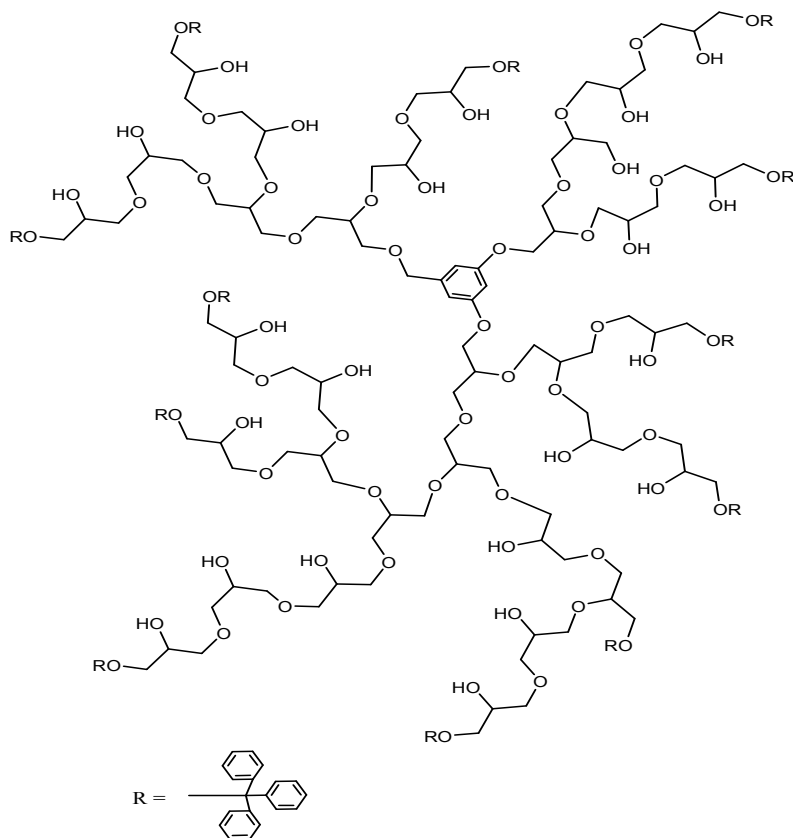
Solubilidad: H₂O, CH₃OH.

PM = 4591, PD = 1.8, Tg = - 46 °C, Rendimiento: 90%

IR (cm⁻¹): 3261 (OH), 2877 (CH₂,CH), 1059 y 1127 (C-O).

RMN: (D₂O) ¹H (δ(ppm)): 3.08-3.68 (m, CH, CH₂), 2.8-2.85 (m, CH,CH₂ anillo oxirano)

¹³C: 58.71-62.88 (CH₂OH), 79.42-78.1 (C-HOR) 71.7-73.7(CH₂OR), 71.01-68.8(CHOH)



D

Compuesto D.

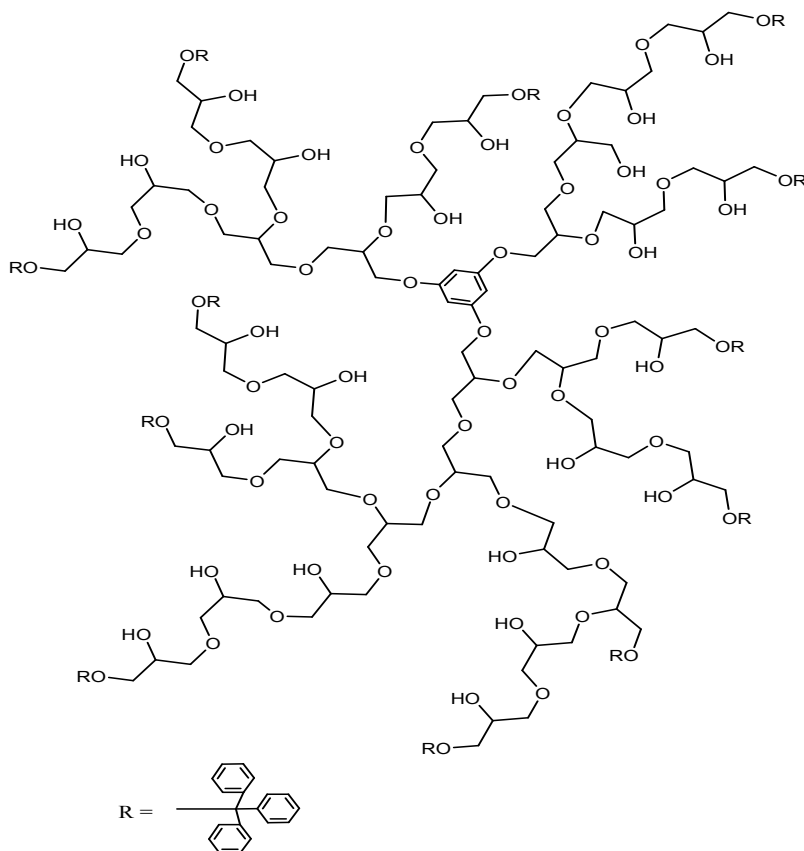
Aspecto físico: sólido café claro de consistencia pastosa.

Solubilidad: CHCl₃, Hexanos.

PM = 8421, PD = 1.37, Rendimiento: 85%

IR (cm⁻¹): 3368 (OH), 2895 (CH₂,CH), 1127 (C-O), 1562 (C=C arom).

RMN: (DMSO-d₆) ¹H (δ(ppm)): 3.10-3.58 (m, CH, CH₂), 6.5 (arom. *orto*, s 4H) 6.4 (arom. *para*, s 2H), 7.2-7.3(grupo tritilo) **¹³C:** 63.01-63.9 (CH₂OH), 79.9-80.1 (C-HOR) 74.1-75.1(CH₂OR), 73.5-72.3(CHOH), 89 -C-tritil, 127-130 (C=C arom tritil), 159 (C=C nucleo arom,)



E

Compuesto E.

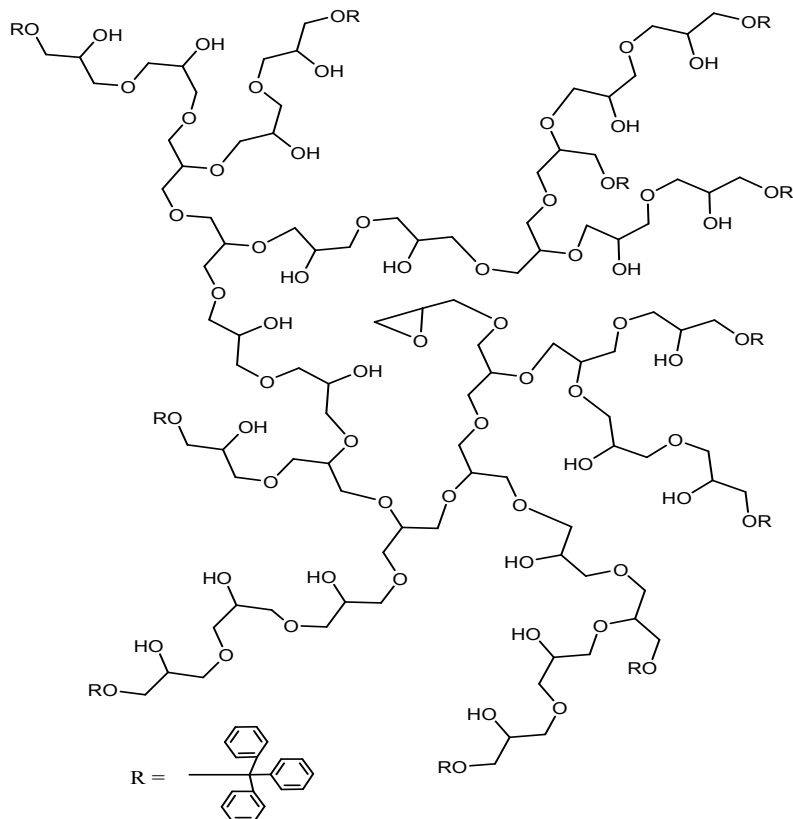
Aspecto físico: sólido roji-blaco de consistencia pastosa.

Solubilidad: CHCl_3 , Hexanos.

PM = 6502, PD = 1.34, Rendimiento: 88%

IR (cm^{-1}): 3370 (OH), 2995 (CH_2, CH), 1127 (C-O), 1580 (C=C arom).

RMN: (DMSO- d_6) ^1H (δ (ppm)): 3.21-3.70 (m, CH, CH_2), 6.5 (anillo arom, 3 CH_2) 7.23 7.4 (grupo tritilo) ^{13}C : 63.21-64.09 (CH_2OH), 78.9-80.01 (C-HOR) 75.1-76.1(CH_2OR), 73.5-73.3(CHOH), 89.09 (-C-tritilo), 127-03-130.99 (C=C arom tritilo), 159.9 (C=C núcleo arom,)



F

Compuesto F.

Aspecto físico: sólido blanquecino de consistencia pastosa.

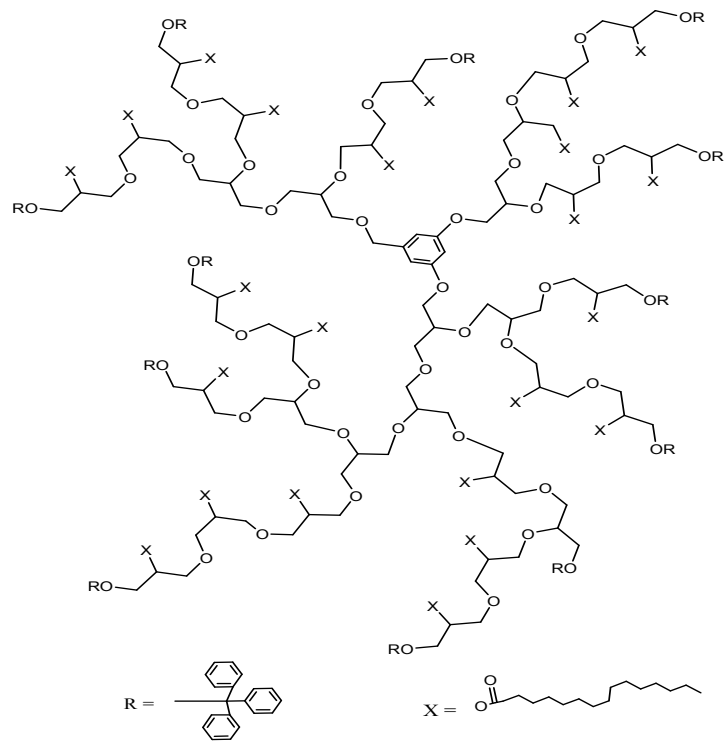
Solubilidad: CHCl₃, Hexanos.

PM = 12559, PD= 1.88, Rendimiento:78%

IR (cm⁻¹): 3270 (OH), 2809 (CH₂,CH), 1139 (C-O), 1599 (C=C arom).

RMN: (DMSO-d₆) ¹H (δ(ppm)): 3.11-3.69 (m, CH, CH₂), 7.30 7.4 (grupo tritilo)

¹³C: 61.21-63.09 (CH₂OH), 77.9-79.01 (C-HOR) 76.1-77.3(CH₂OR), 72.5-73.3(CHOH), 88.09 (–C-tritil), 130-03-130.99 (C=C arom tritil).



G

Producto G.

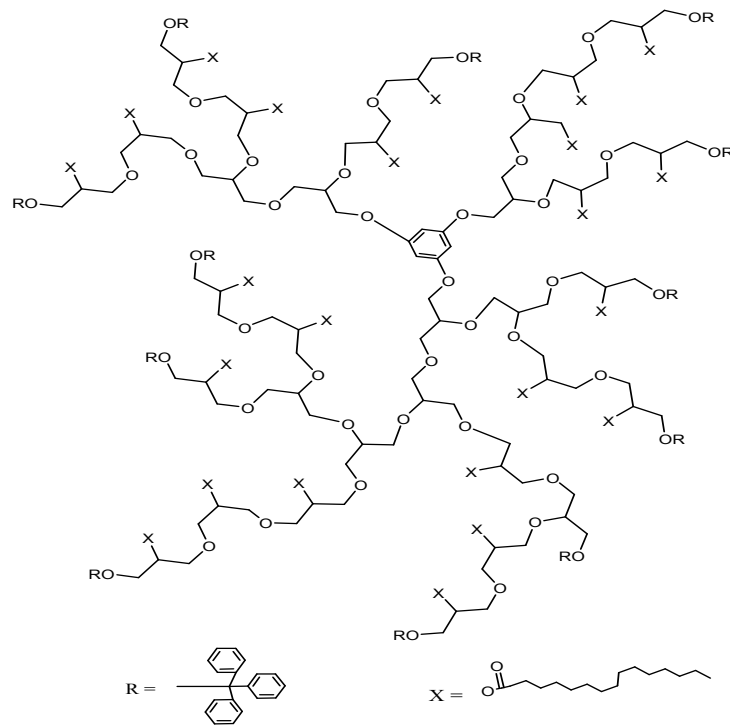
Aspecto físico: sólido pastoso de color café.

Solubilidad en medios orgánicos: CHCl_3 , Hexanos.

PM= 12222, PD= 1.38, Rendimiento: 80%

IR (cm^{-1}): 2905.98 (CH, CH_2), 1702.56 (C=O), 1596 (C=C arom).

RMN: (CDCl_3) ^1H (δ (ppm)): 0.910 (t, ester, $-\text{CH}_3$), 1.27 (s, ester, $-(\text{CH}_2)_{12}-$), 1.65 (t, ester, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 2.36(t, ester, $-\text{O}-\text{CH}_2-$), 3.25-3.64 (m, CH, CH_2), 7.2-7.3(grupo tritilo) ^{13}C : 14.34 (ester, R- CH_3), 22.90 (ester, R- CH_2-), 24.89 (CO- CH_2-CH_2-), 29.58-30.01 (ester, $-(\text{CH}_2)_9-$), 32.03-34.05 (ester, $-\text{CO}-\text{CH}_2-$) 63.01-63.9 (CH_2OH), 77.9-79.1 (C-HOR) 75.1-76.1(CH_2OR), 127-138 (C=C arom tritil), 148 (C=C nucleo arom.), 180 ($-\text{C}=\text{O}-$).



H

Producto H.

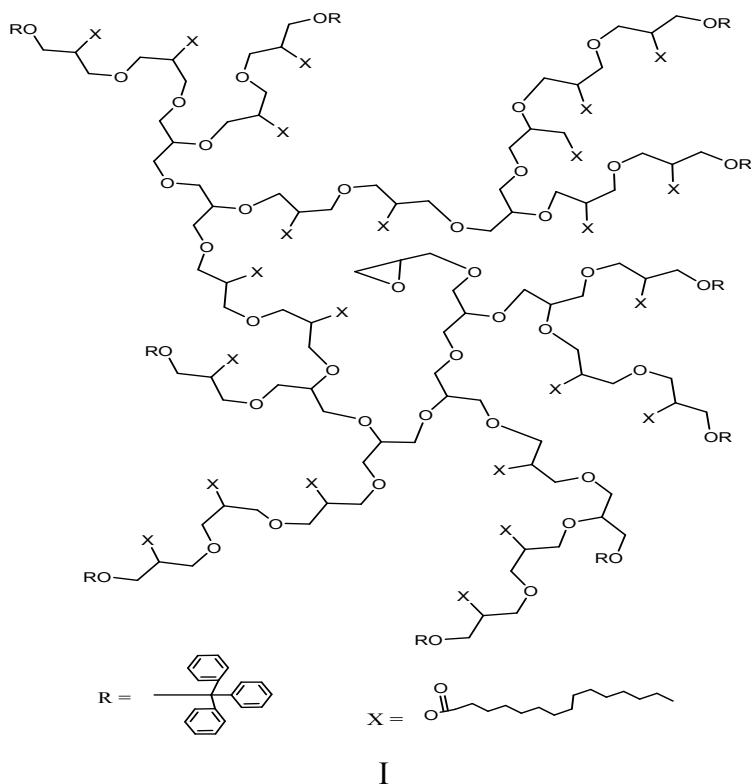
Aspecto físico: sólido pastoso de color café claro.

Solubilidad: CHCl_3 , Hexanos.

PM= 9741, PD= 1.35, Rendimiento: 85%

IR (cm^{-1}): 2903.98 (CH, CH_2), 1703.56 (C=O), 1599 (C=C arom).

RMN: (CDCl_3) ^1H (δ (ppm)): 0.890 (t, ester, $-\text{CH}_3$), 1.30 (s, ester, $-(\text{CH}_2)_{12-}$), 1.68 (t, ester, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 2.34(t, ester, $-\text{O}-\text{CH}_2-$), 3.26-3.64 (m, CH, CH_2), 7.4-7.5(grupo tritilo) ^{13}C : 14.34 (ester, R- CH_3), 23.00 (ester, R- CH_2-), 24.93 (CO- CH_2-CH_2-), 29.58-29.99 (ester, $-(\text{CH}_2)_9-$), 32.03-34.05 (ester, $-\text{CO}-\text{CH}_2-$) 63.01 (CH_2OH), 78.0-79.1 (C-HOR) 75.1-76.1(CH_2OR), 127-138 (C=C arom tritil), 150 (C=C nucleo arom.), 179 ($-\text{C}=\text{O}-$).



Producto I.

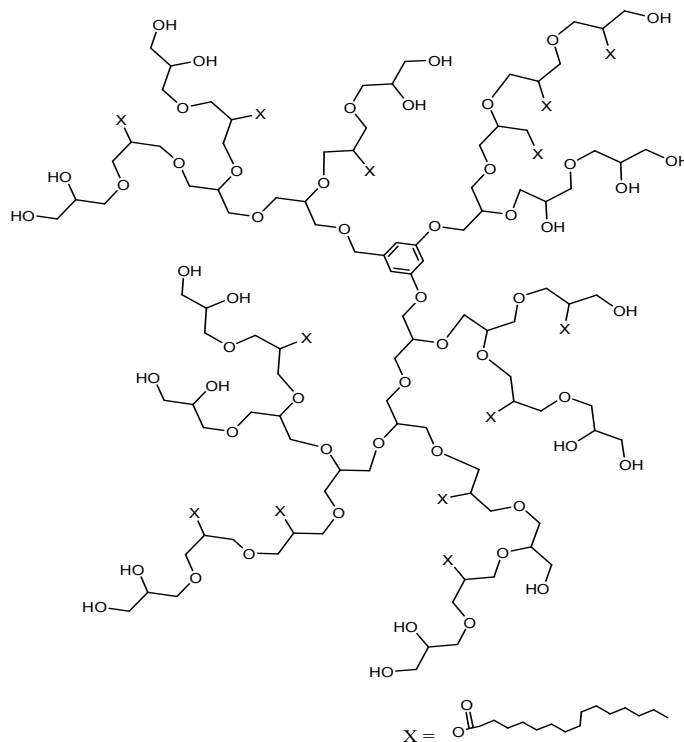
Aspecto físico: sólido pastoso de color café.

Solubilidad: CHCl₃, Hexanos.

PM= 18607. PD= 1.88, Rendimiento: 90%

IR (cm⁻¹): 2905.98 (CH, CH₂), 1702.56 (C=O), 1596 (C=C arom),

RMN: (CDCl₃) ¹H (δ(ppm)): 1.02 (t, ester, -CH₃), 1.21 (s, ester, -(CH₂)₁₂-), 1.69 (t, ester, -O-CH₂-CH₂-), 2.41(t, ester, -O-CH₂-), 3.25-3.71 (m, CH, CH₂), 7.1-7.4(grupo tritilo) ¹³C: 14.41 (ester, R-CH₃), 23.02 (ester, R-CH₂-), 24.90 (CO-CH₂-CH₂-), 29.65-31.00 (ester, -(CH₂)₉-), 32.98-33.05 (ester, -CO-CH₂-) 63.9 (CH₂OH), 77.92 (C-HOR) 75.1 (CH₂OR), 127-138 (C=C arom tritil), 180 (-C=O-).



J

Producto J.

Esterificación controlada (1/3 de grupos OH): 1.16ml (3.82mmol) de cloruro de palmitoilo

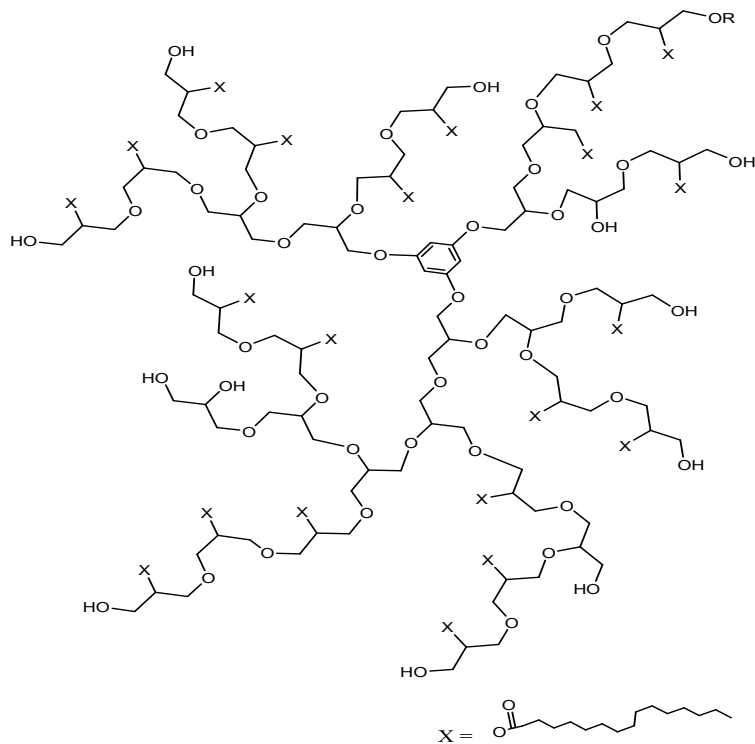
Aspecto físico: gel color café.

Solubilidad: CH₃OH, CH₃CH₂OH, H₂O.

PM=6110, PD= 1.34, Rendimiento: 70%

IR (cm⁻¹): 3250 (OH), 2849 (CH₂,CH), 1149 (C-O), 702.56 (C=O).

RMN: (CD₃OD) ¹H (δ(ppm)): 0.9 (t, ester, -CH₃), 1.28 (s, ester, -(CH₂)₁₂-), 1.65 (t, ester, -O-CH₂-CH₂-), 2.35 (t, ester, -O-CH₂-), 3.35-3.71 (m, CH, CH₂), 6.42-6.52 (núcleo aromático) **¹³C:** 14.81 (ester, R-CH₃), 24.02 (ester, R-CH₂-), 26.04 (CO-CH₂-CH₂-), 31.00 (ester, -(CH₂)₉-), 33.05, 35.02 (ester, -CO-CH₂-) 60.9 (CH₂OH), 79.9-80.1 (C-HOR) 74.1-71.1(CH₂OR), 72.1-69.8(CHOH) 160 (C=C núcleo arom), 180 (-C=O-).



K

Producto K.

Esterificación controlada (1/3 de grupos OH): 1.36ml (4.5 mmol) de cloruro de palmitoilo

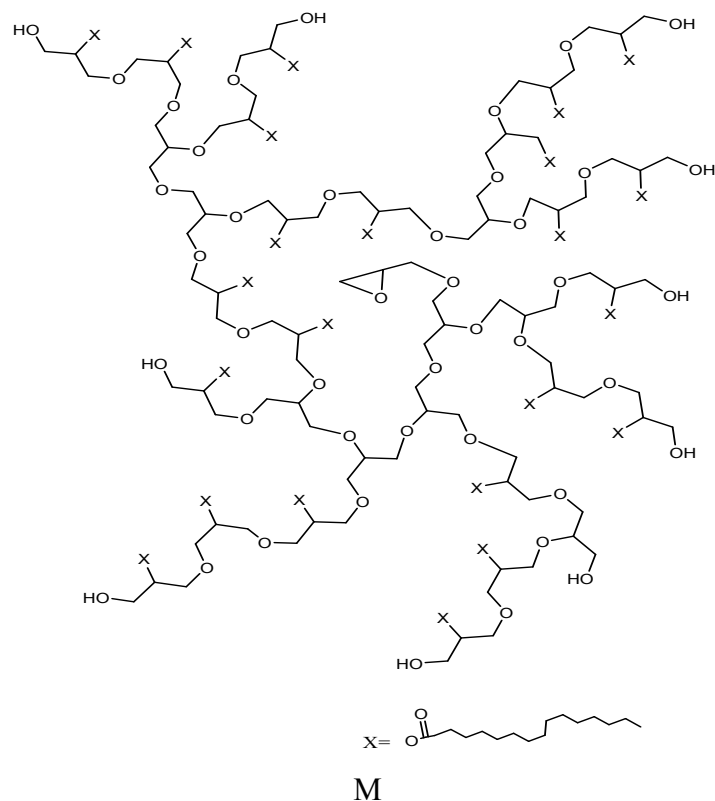
Aspecto físico: gel color café cobrizo.

Solubilidad: CH₃OH, CH₃CH₂OH, H₂O.

PM=5186, PD= 1.33, Rendimiento: 75%

IR (cm⁻¹): 3330 (OH), 2900 (CH₂,CH), 1165 (C-O), 1702.56 (C=O).

RMN: (CD₃OD) ¹H (δ(ppm)): 0.89 (t, ester, -CH₃), 1.25 (s, ester, -(CH₂)₁₂-), 1.64 (t, ester, -O-CH₂-CH₂-), 2.34 (t, ester, -O-CH₂-), 3.34-3.99 (m, CH, CH₂), 6.4 (núcleo arom.) **¹³C:** 13.99 (ester, R-CH₃), 23.87 (ester, R-CH₂-), 25.70 (CO-CH₂-CH₂-), 30.29 (ester, -(CH₂)₉-), 31.90, 36.50 (ester, -CO-CH₂-) 62.00 (CH₂OH), 78.9-79.1 (C-HOR) 75.1-72.6(CH₂OR), 72.1-70.04(CHOH) 160 (C=C núcleo arom.), 180 (-C=O-).



Producto M.

Esterificación controlada (1/3 de grupos OH): 0.9 ml (2.96 mmol) de cloruro de palmitoilo

Aspecto físico: gel color café claro.

Solubilidad: CH₃OH, CH₃CH₂OH, H₂O.

PM=7698, PD= 1.9, Rendimiento: 68%

IR (cm⁻¹): 3250 (OH), 2883 (CH₂,CH), 1099 (C-O), 1799.56 (C=O).

RMN: (CD₃OD) ¹H (δ(ppm)): 0.95 (t, ester, -CH₃), 1.24 (s, ester, -(CH₂)₁₂-), 1.62 (t, ester, -O-CH₂-CH₂-), 2.39 (t, ester, -O-CH₂-), 3.22-4.03 (m, CH, CH₂). **¹³C:** 13.99 (ester, R-CH₃), 23.87 (ester, R-CH₂-), 25.70 (CO-CH₂-CH₂-), 30.29 (ester, -(CH₂)₉-), 32.00, 34.50 (ester, -CO-CH₂-) 62.45 (CH₂OH), 77.9-78.1 (C-HOR) 74.1-71.9(CH₂OR), 73.09-70.34(CHOH) 180 (-C=O-).

CAPITULO IV.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

4.1 SÍNTESIS DE POLÍMEROS.

Se sintetizaron tres familias de polímeros con diferentes núcleos, dos de ellos fueron anillos aromáticos trifuncionalizados con alcoholes, y en el tercero se utilizó un ciclo epóxido (fig. 1.15, página 32).

La unidad estructural de todos estos polímeros fue el monómero glicidol, que al ser polimerizado en presencia de los núcleos mencionados anteriormente se obtienen, en cada caso, macromoléculas que poseen esqueletos moleculares altamente ramificados unidos a anillos epóxidos o aromáticos.

Cabe señalar que al polimerizar el glicidol en ausencia de núcleos aromáticos, el polímero resultante posee una parte central de epóxido, inherente a la polimerización del glicidol.

Para la optimización de la reacción de polimerización del glicidol se hizo una revisión exhaustiva de la literatura y se realizaron los experimentos correspondientes; se efectuaron reacciones a diferentes condiciones para identificar aquellas que nos permitieran obtener polímeros con las propiedades de diseño requeridas como son alto grado de ramificación, bajas polidispersidades y pesos moleculares entre 3000 y 5000, con el propósito de tener un material que se pudiera funcionalizar en un siguiente paso de reacción para así obtener una cápsula anfifílica con aplicaciones biológicas.

VARIABLES COMO LA TEMPERATURA, TIEMPO DE REACCIÓN, ASÍ COMO EL TIPO Y CANTIDAD DE INICIADOR (SE PROBÓ TAMBIÉN CON CH₃OK COMO CON 1,4 DIAZABICICLO(2, 2, 2) OCTANO (DABCO)), FUERON LAS VARIABLES MÁS IMPORTANTES Y POR LO TANTO MANIPULADAS PARA OBTENER LOS MATERIALES DESEADOS. LOS RANGOS DE OPERACIÓN PARA ESTAS VARIABLES SE RESUMEN EN LA TABLA 4.1:

Variable	Limite máximo	Limite mínimo
Temperatura	85	60
Tiempo	24 hrs	12 hrs
Porcentaje de iniciador respecto al monómero	10%	5%

Tabla 4.1. Intervalos de operación de las variables de polimerización para CH₃OK y DABCO.

Las condiciones óptimas después de los experimentos exploratorios (total de 12 reacciones que se repitieron 2 veces) fueron:

Temperatura: 85 °C.

Tiempo de reacción: 24hrs.

Cantidad de iniciador y tipo: 5% CH₃OK (respecto al monómero).

Todas las pruebas fueron con una adición lenta del monómero (3 hrs).

Estas condiciones también se aplicaron a los polímeros con diferentes anillos aromáticos como núcleo.

En lo que respecta a la caracterización por IR, los 3 tipos de polímeros presentan básicamente las mismas señales, alrededor de 3384 cm^{-1} se presenta la banda característica intensa del grupo hidroxilo, la banda de alcanos alrededor de 2875 cm^{-1} , y las bandas de los éteres alrededor de 1120 y 1065 cm^{-1} , además de señales adicionales para los compuestos A y B en 1650 y 1450 cm^{-1} correspondiente a los núcleos de anillos aromáticos.

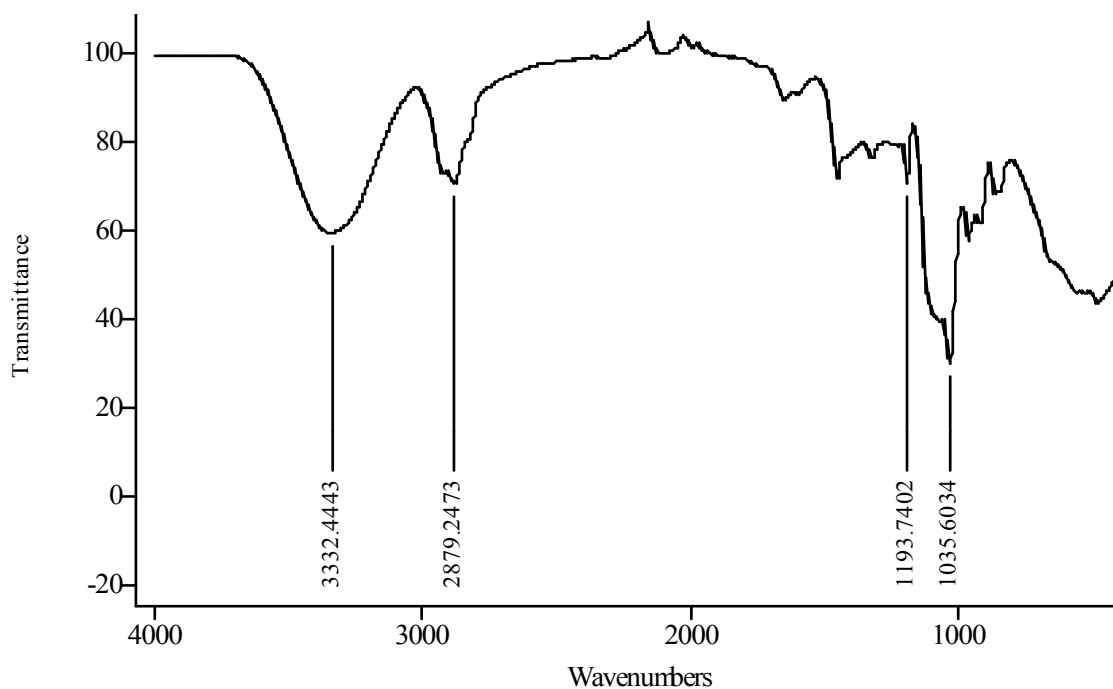


Fig. 4.1 Espectro FT-IR del polímero A.

En RMN ^1H se observa que todos los productos (A, B y C) presentan una señal muy ancha entre 3.08 y 3.80 ppm que corresponde a los hidrógenos de CH y CH₂; para el compuesto C se observan en 2.8 ppm los hidrógenos del núcleo epóxido, mientras que para los compuestos A y B las señales de sus núcleos se presentan en 6.25 y 6.4 ppm en la región de aromáticos.

Polímero A
 J.A. Cruz / Dra. Guadarrama
 1H
 D2O
 Varian Unity Inova 300 MHz

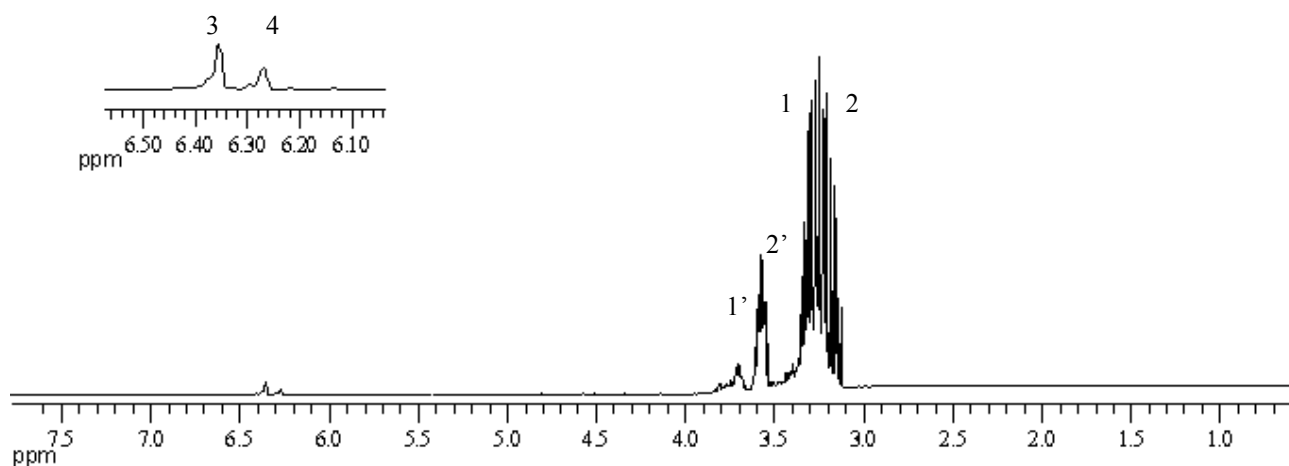
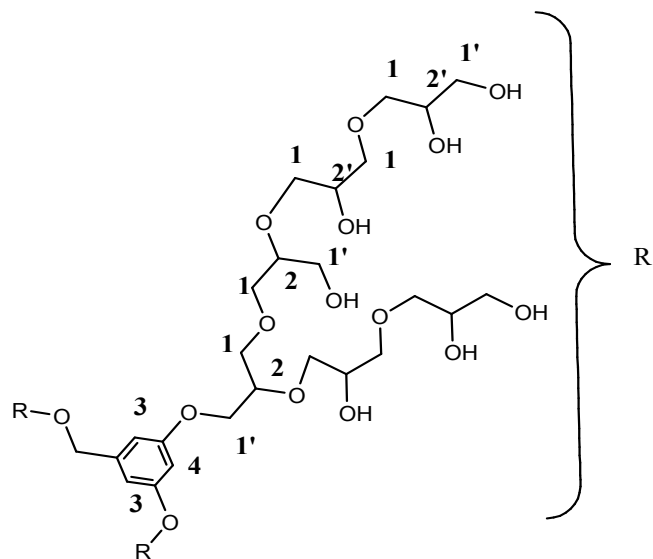


Fig. 4.2 Espectro de RMN ¹H del polímero A.

Para el caso de RMN ¹³C, el espectro muestra 7 señales que van desde 54 ppm hasta 80 ppm, lo cual sustenta la hipótesis de la formación de un polímero hiper-ramificado y no uno lineal, ya que de ser este último, se observaría un espectro de ¹³C compuesto por solo 3 señales. Para lograr una asignación confiable de señales nos apoyamos en los trabajos realizados por Dworak y Vanderberg^{54,55}, quienes caracterizaron por resonancia de carbono compuestos modelo semejantes a las unidades que componen el poli-glicidol; dichas unidades son clasificadas como: Lineales 1-3 (L₁₋₃), lineales 1-4 (L₁₋₄), dendríméricas (D) y terminales (T).

Esquemáticamente:

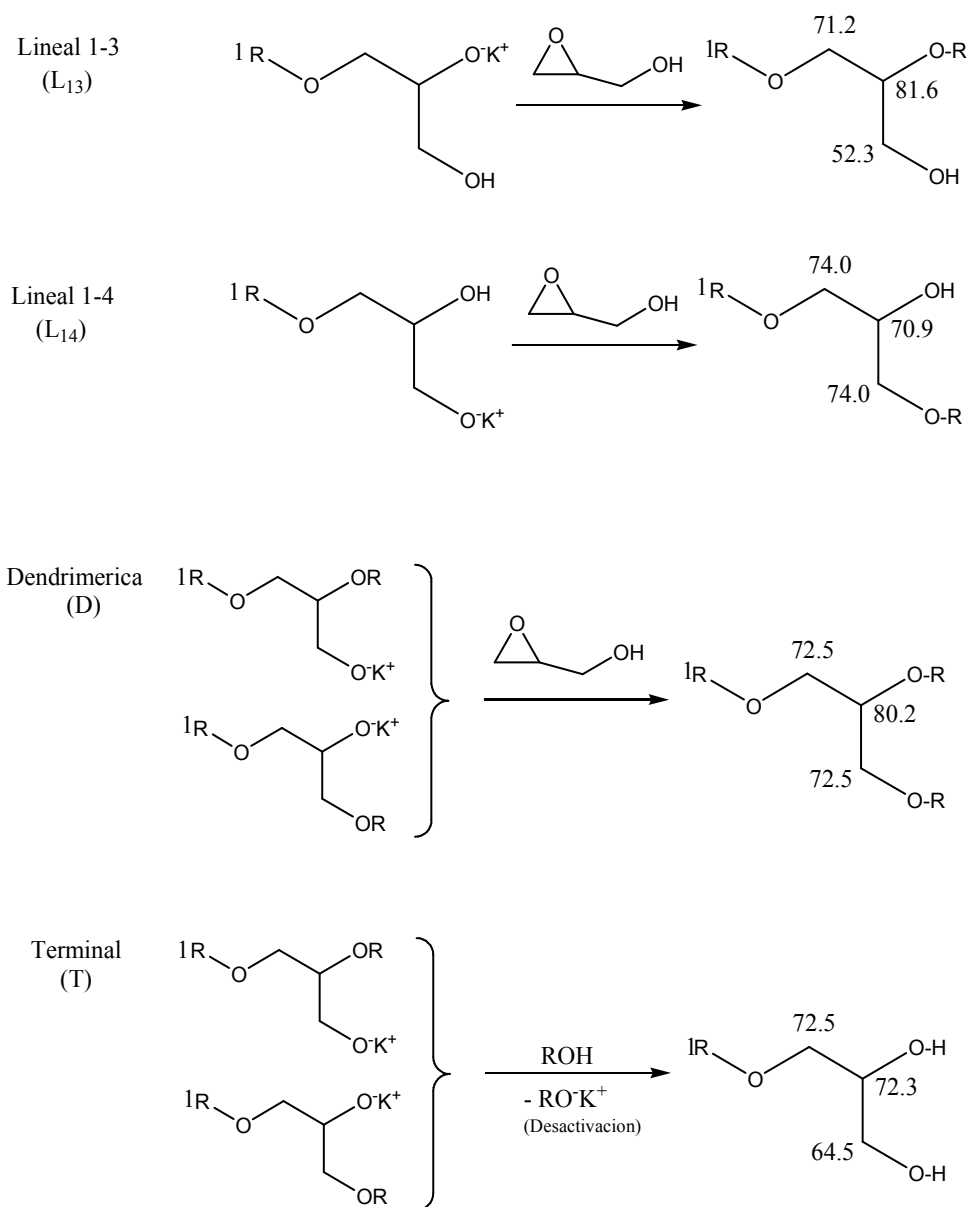


Fig.4.3 Unidades estructurales y desplazamientos en ppm de RMN ¹³C propuestas por Vanderberg y Dworak.

En la siguiente figura se muestra el espectro de carbono correspondiente a uno de los polímeros sintetizados (Producto A).

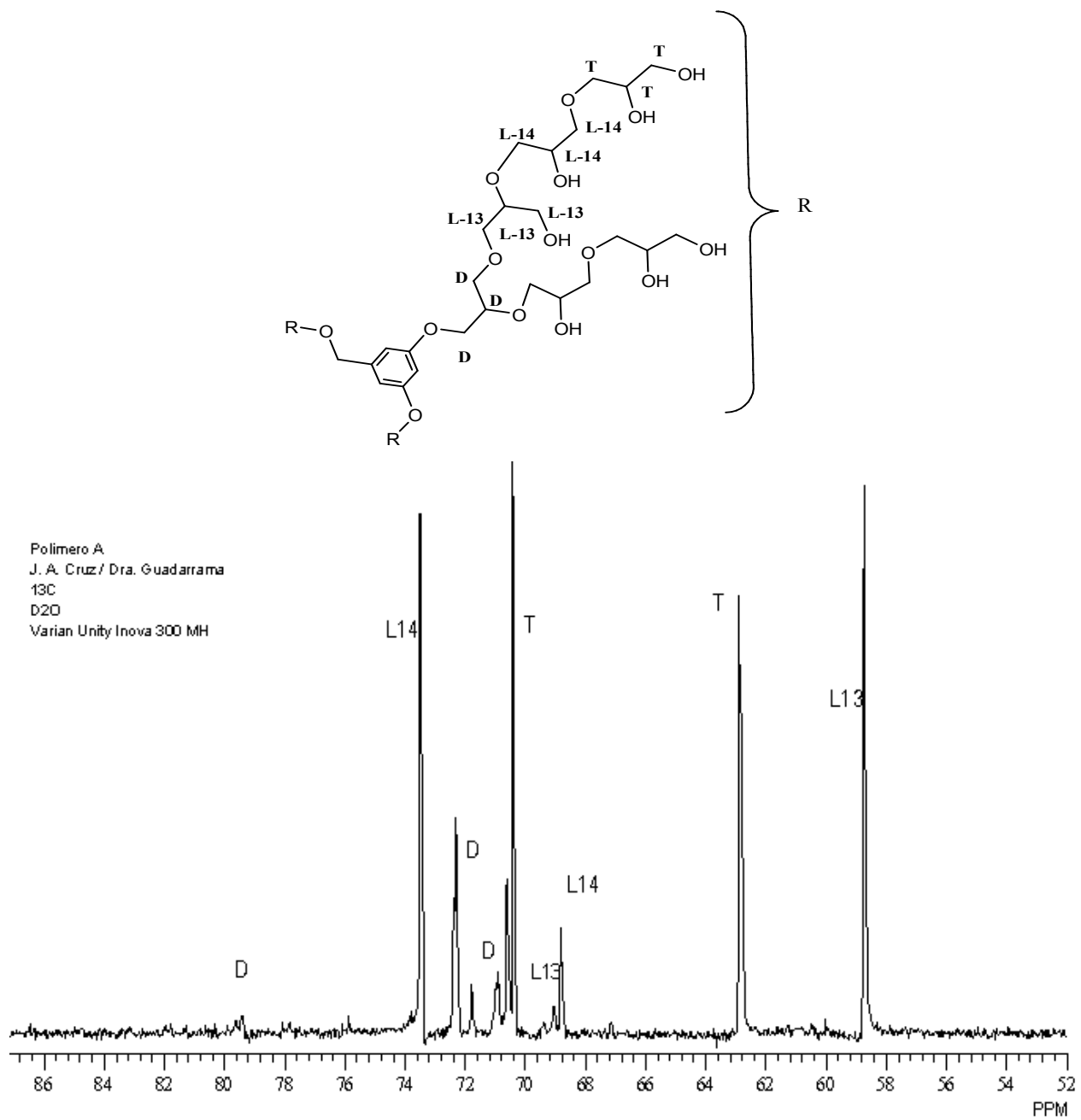


Fig. 4.4 Espectro de RMN ^{13}C del polímero A.

Como ya se mencionó anteriormente, el espectro de la figura 4.2 consta de 7 señales bien definidas, que junto con el experimento de APT, o prueba del proton unido (Attached Proton Test, APT) nos permitió asignar señales positivas a los carbonos CH_2 , y señales negativas a carbonos CH y CH_3 , los cuales constituyen las diferentes unidades estructurales mencionadas anteriormente.

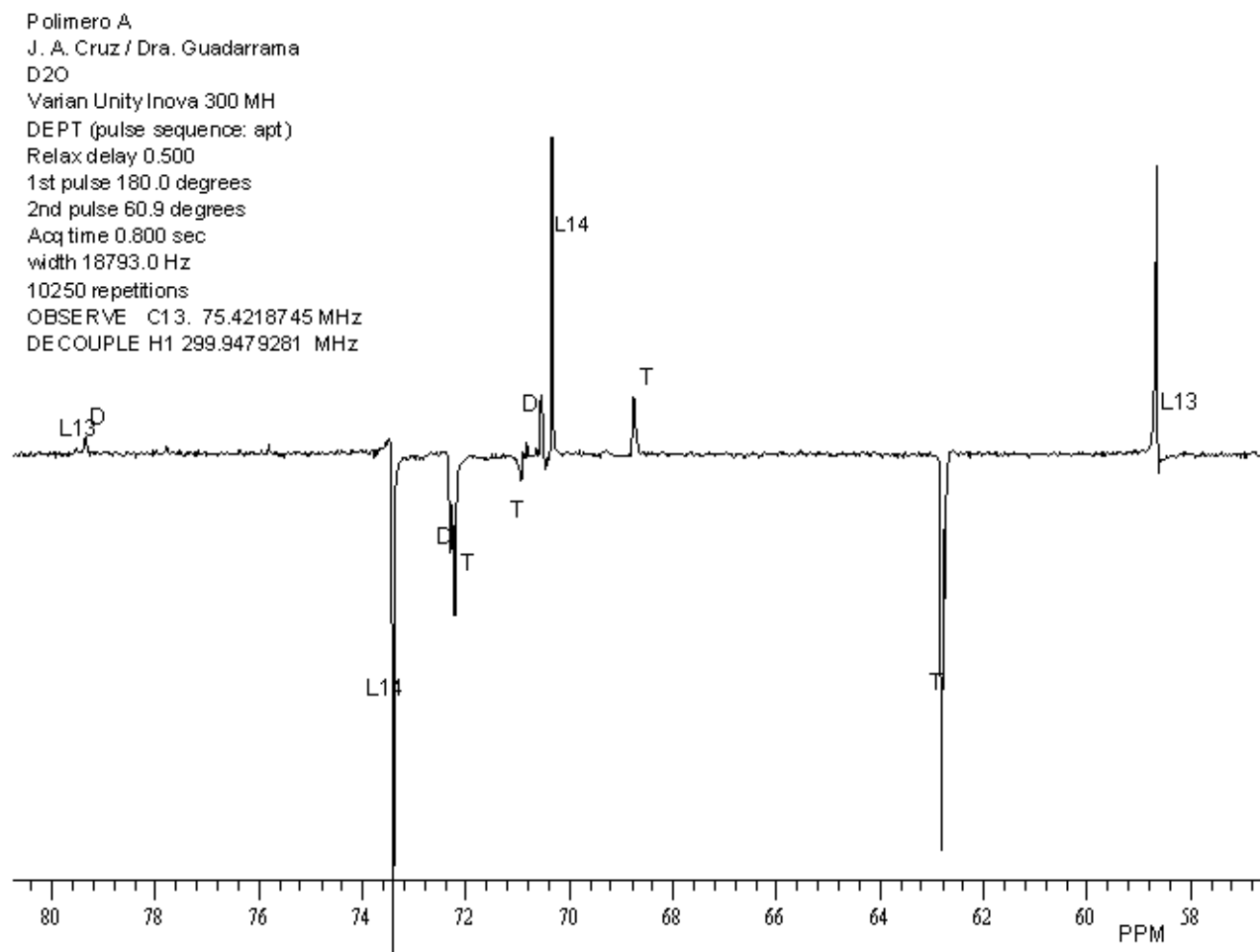


Fig.4.5 Experimento APT para la asignación de señales RMN ^{13}C de los polímeros sintetizados.

La asignación de las señales se presenta en la siguiente tabla.

Señal	CH ₂ OH	CH ₂ OR	CHOR	CHOH
L ₁₋₃	59.9	73.40	79.2	--
L ₁₋₄	--	73.86	--	70.3
T	63.8	72.2	--	68.8
D	--	72.3	79.5	--

Tabla 4.1. Asignación de las señales de RMN ¹³C de acuerdo a su desplazamiento en ppm.

En cuanto a los pesos moleculares de los polímeros obtenidos (Mw), se determinaron mediante GPC (acoplado a dispersión de luz) utilizando estándares de polietilenglicol; dicho estándar fue utilizado debido a que posee la misma naturaleza química de los productos, en cuanto a polaridad se refiere. El disolvente utilizado fue agua grado HPLC.

Para los productos A, B y C se obtuvieron pesos moleculares que van de 3003 Da, 2318 Da y 4591 Da, respectivamente. El hecho de tener pesos moleculares relativamente bajos obedece a una condición en el diseño de materiales poliméricos aplicados a medios biológicos; dicha condición establece que un biomaterial destinado a encapsular fármacos debe estar en un intervalo de peso molecular de 700 a 10000 Da, ya que materiales con pesos moleculares por encima de este valor comienzan a exhibir interacciones de tipo tóxico en medios biológicos⁵⁶.

Como se sabe, algunos de los datos más importantes en el análisis de un polímero de este tipo son, aparte de su peso molecular, su polidispersidad y grado de ramificación.

Los resultados de estas variables para los polímeros sintetizados se muestran a continuación.

Polímero	Polidispersidad PD	Grado de ramificación DB
A	1.26	0.560
B	1.29	0.585
C	1.79	0.523

Tabla 4.2. Valores de polidispersidad y grado de ramificación de los polímeros A, B, y C.

La *polidispersidad (PD)* mostrada se obtuvo con la misma técnica que para el peso molecular, es decir, se usó la cromatografía de permeación en gel. Como se observa en la tabla anterior, se exhiben polidispersidades parecidas para los polímeros A y B que están en el orden de 1.3, estos valores van en total acuerdo con los resultados obtenidos en trabajos teóricos hechos por Frey⁵⁷ et al. en donde se polimerizan monómeros de tipo AB_x por adición lenta en presencia de núcleos de diferente funcionalidad (desde 1 hasta 12).

Una manera de aproximar el valor de la polidispersidad de un monómero del tipo AB_2 (como el glicidol) en términos de la funcionalidad del núcleo iniciador, en una polimerización de adición lenta es mediante la ecuación de Schultz⁵⁸. Para polímeros hiper-ramificados ésta tiene la forma:

$$PD = 1 + \frac{1}{f}$$

Donde f representa la funcionalidad del iniciador.

Para el caso de los núcleos de los polímeros A y B se tiene que $f=3$, debido a que se encuentran funcionalizados con grupos alcohol en las posiciones 1, 3 y 5 del anillo aromático. Así para dicho valor de f corresponde un valor de PD teórico de 1.33.

Para el compuesto C se considera que $f=1$, ya que el núcleo del polímero es, en un principio el ion mismo de la molécula de glicidol (anión glicidilo) al cual se le ha abstraído un H^+ por acción de una base, y por lo tanto dicho valor de f genera en consecuencia un valor de PD teórico de 2.

Haciendo la comparación de los valores teóricos con los experimentales, se puede mencionar que nuestros resultados no distan mucho con la ecuación mostrada anteriormente en lo referente al efecto que tiene la funcionalidad del núcleo sobre el valor de la polidispersidad.

Otro parámetro importante en este tipo de polímeros es el *Grado de ramificación DB* (Degree of Branching).

Para poder estimar dicho parámetro fue indispensable contar con un espectro cuantitativo de RMN ^{13}C ; es decir, que pudiera integrarse. Para obtener una asignación confiable de las señales y en mayor medida una disminución considerable del ruido se requiere un espectro que no presente el efecto nuclear overhauser (NOE), el cual acompaña normalmente a los espectros de RMN ^{13}C . La supresión de este efecto se obtiene al usar la técnica de desacoplamiento inverso (^{13}C Inverse Gated Decoupling); este experimento, como su nombre lo dice, permite un desacoplamiento de espines, y para ello se requiere que la muestra de RMN tenga un tiempo de procesamiento aproximado de entre 16 a 25 hrs ya que es necesario asegurar la relajación de todos los núcleos de carbono los cuales tienen tiempos de relajación diferentes. Dichos núcleos presentan la siguiente tendencia: primarios < secundarios < terciarios.

Al obtener el espectro con la configuración antes mencionada se puede conocer la intensidad relativa de las diferentes unidades estructurales con lo que se puede calcular de manera confiable el grado de ramificación (DB), empleando la siguiente ecuación (Eq. 1):

$$DB = \frac{T + D}{T + D + L} \quad (\text{eq. 1})$$

Como ya se mencionó en los antecedentes, con base en un espectro de carbono cuantitativo, T, D y L denotan el valor de la integración de la señal asignada a las unidades terminales, dendríméricas y lineales respectivamente.

Estos valores se obtienen directamente de la integración en el espectro de carbono.

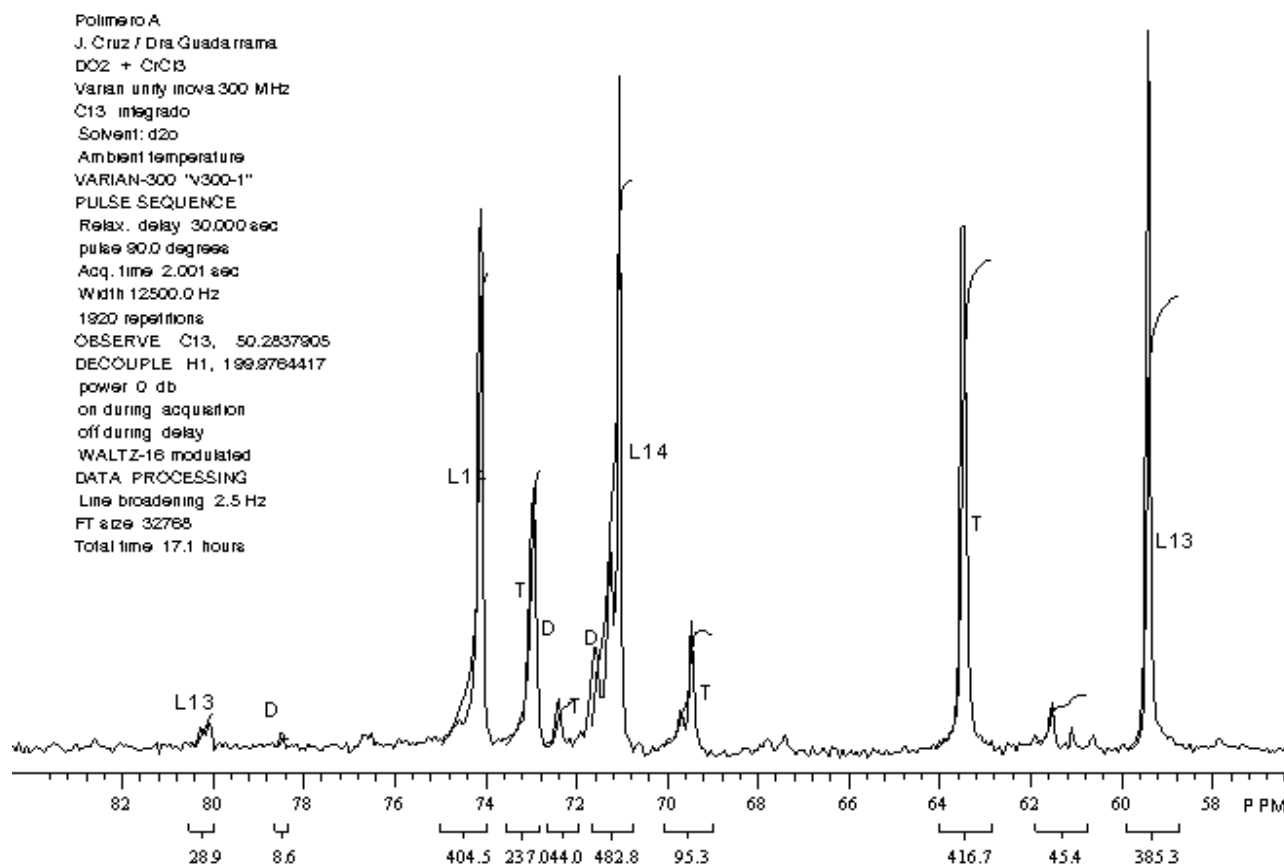


Fig.4.6 Espectro RMN ^{13}C Inverse Gated Decoupled del polimero A.

Haciendo uso de la información mostrada en la tabla 4.1 se pueden asignar las intensidades de las señales a las unidades estructurales correspondientes:

Región (ppm)	Unidad estructural	Integración
81.0-82.0	L ₁₃	1.6
79.5-80.6	D	6.69
73.0-74.5	(2)L ₁₄	118.66
71.9-73.0	(2)D, (2)T	59.31
70.0-72.0	L ₁₄	147.45
69.0-70.0	T	38.04
62.0-64.0	T	125.40
59.0-63.0	L ₁₃	113.09

Fig. 4.3. Asignación de señales y sus correspondientes valores de integración para el polímero A.

Empleando los datos de la tabla anterior y la ecuación para el grado de ramificación (eq.1) tenemos para el polímero A:

$$DB = \frac{112.62 + 755.02 + 375.70}{2202.81} = 0.56$$

No obstante que el valor de 0.56 para el polímero A cae dentro del rango teórico de estos materiales que va de 0.50 a 0.66, este grado de ramificación relativamente bajo podría indicar que la adición del monómero podría no ser lo suficientemente lenta como para alcanzar valores más cercanos al límite superior, y con esto minimizar el carácter aleatorio de la polimerización.

Para los polímeros B y C los valores de DB fueron 0.585 y 0.523 respectivamente.

Grado de polimerización (DP_m). Una vez obtenidos los datos de las integraciones para los polímeros A, B y C, de los espectros de resonancia se puede calcular el grado de polimerización (eq.3) con una formula análoga a la usada en el cálculo del grado de ramificación.

$$DP_m = \frac{(T + L + D)}{(T - D)} f_c \quad (\text{eq.3})$$

Haciendo el cálculo para cada uno de los polímeros se tiene:

polímero	DP _m	DP _m (teórica)
A	40	42
B	31	35
C	64	66

Tabla 4.4. Grado de polimerización DP_m calculado y teórico para los polímeros A, B y C.

Como lo muestra la tabla anterior, existe una ligera diferencia entre el DP_m calculado con la ecuación 3 que involucra las integraciones en resonancia y el teórico, que se calculó realizando el cociente entre el peso molecular del polímero, obtenido mediante GPC, y el peso molecular de la unidad repetitiva.

Esta diferencia observada es debido a que en la ecuación 1 se pondera cada unidad estructural, ya sea terminal lineal o dendrímica, mediante las integraciones en resonancia (RMN ¹³C), mientras que en la aproximación teórica el DP se calcula como en los polímeros lineales, que intuitivamente supone cierto error.

Solubilidad: como es de esperarse, el alto contenido de grupos polares (OH) de estas macromoléculas se traducen en una alta solubilidad en disolventes altamente polares como agua y metanol. Esta propiedad a lo largo de la ruta de síntesis diseñada, presentará variación conforme se avance en los pasos de reacción, sin embargo dicha propiedad inicial deberá conservarse para el compuesto anfílico final.

4.2. PROTECCIÓN DE POLÍMEROS.

Una vez sintetizados los polímeros A, B y C, el siguiente paso de reacción es la protección selectiva de los grupos hidroxilo de estos materiales, con el fin de “bloquear” en términos de reactividad, los grupos OH terminales⁵⁹ para posteriormente esterificar los remanentes en el interior del polímero. Bajo esta condición, se utilizó el grupo protector cloruro de tritilo (cloruro de trifenilmetilo, o trimetil clorometano), usado ampliamente en la química de péptidos, y que tiene la particularidad de mostrar cierta selectividad hacia la reacción de protección con alcoholes primarios (resultado de los impedimentos estéricos que le confieren los sustituyentes bencílicos), (fig. 4.7), por lo cual es un buen candidato para ser usado en este paso de reacción.

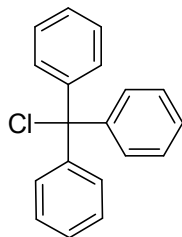


Fig. 4.7 Cloruro de tritilo.

Cabe mencionar que para optimizar este paso de reacción se realizaron experimentos con 2 protocolos diferentes, el primero de ellos (o protocolo inicial) hace referencia al uso de piridina como base, la cual en un inicio tiene como función formar junto con el cloruro de tritilo un intermediario reactivo el cual es atacado por los alcoholes contenidos en el polímero, sin embargo, a nuestro parecer, este procedimiento presenta inconvenientes tales como largos tiempos de reacción y bajos rendimientos (60%), consecuencia de la relativa baja fuerza básica que presenta la piridina en comparación con la 4-dimetilaminopiridina (DMAP), base usada en el segundo protocolo de tritilación, que mostró tener mejores rendimientos.

A continuación se muestran las estructuras de las bases usadas en el protocolo 1 y 2, así como su repercusión en la reacción de tritilación.

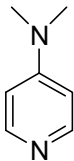

	4-Dimetilamino-piridina	Piridina
		
conversion %	88	22
Tiempo de reaccion Hr	48	60

Fig. 4.8 Efecto de la base en la reacción de tritilación.

Los resultados obtenidos demuestran claramente la ventaja de usar DMAP como catalizador en las reacciones de protección, ya que se requiere menor tiempo para lograr una buena conversión de reactivos a productos, por lo que fue usado sistemáticamente en todas las reacciones para sintetizar los polímeros D, E y F.

Los espectros de infrarrojo para estos compuestos muestran bandas características pertenecientes al grupo tritilo en la región de $1400-1560\text{ cm}^{-1}$ debidas a las vibraciones C-C presentes en el anillo aromático.

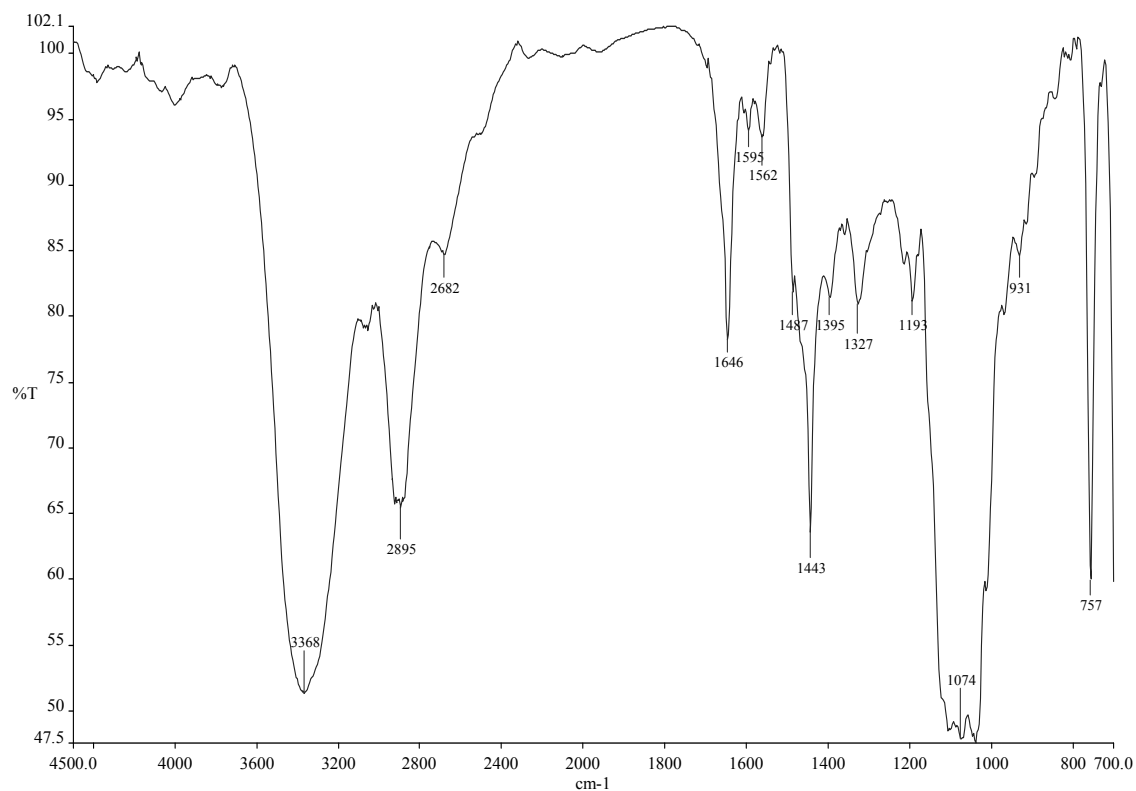


Fig. 4.9 Espectro FT-IR del polímero D.

Las señales características observadas en el espectro de RMN ^{13}C fueron: 140 ppm para los carbonos totalmente sustituidos de los anillos aromáticos, y un juego de señales que van desde 127.09 a 136.14 ppm correspondientes a los carbonos restantes de estos mismos anillo, es importante hacer notar que para estos polímeros los carbonos correspondientes a los núcleos aromáticos se aprecian a nivel de ruido ya que la proporción que guardan con los carbonos es mínima y las intensidades en el espectro son relativas.

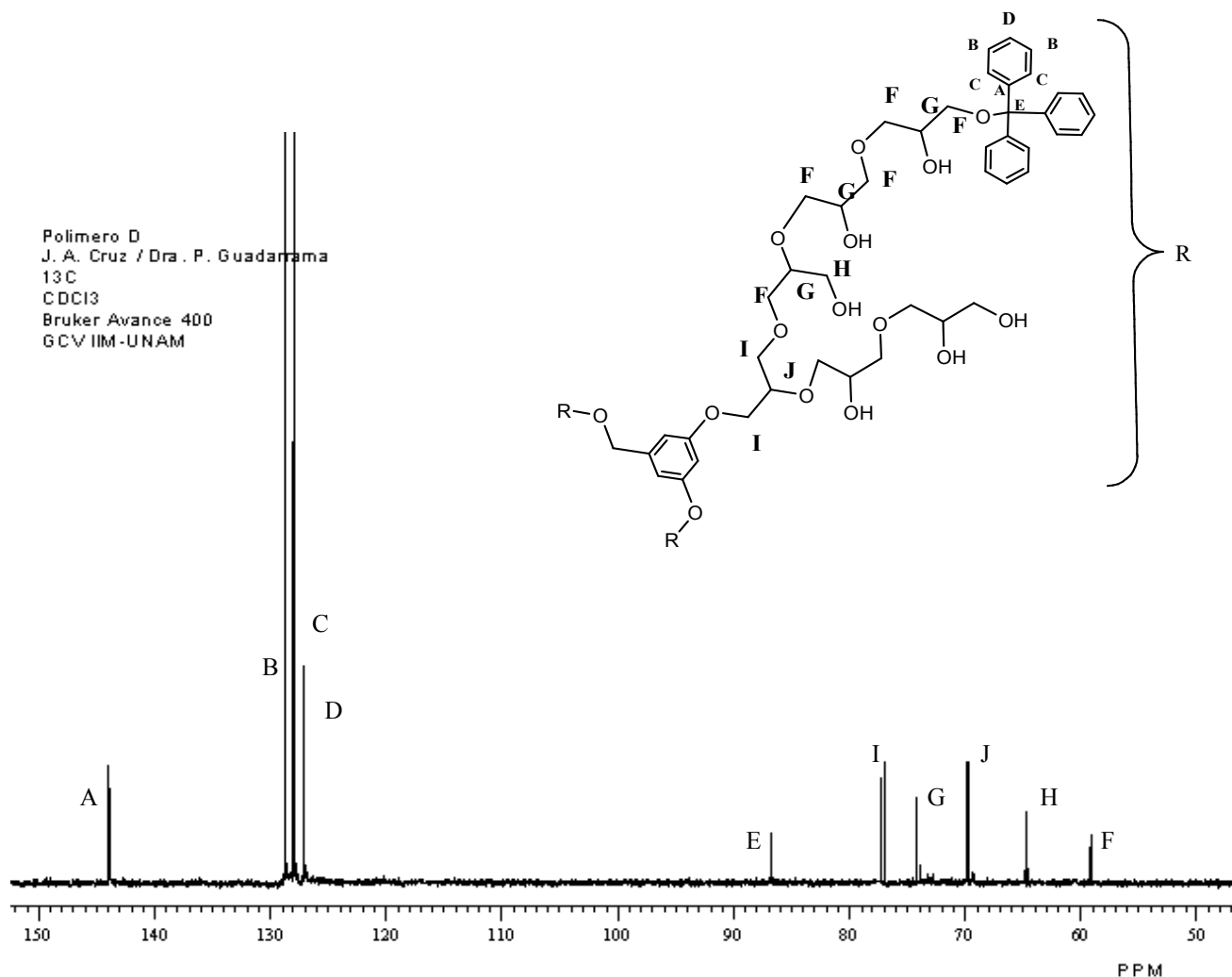


Fig. 4.11 Espectro de RMN ^{13}C del polímero D.

Con las asignaciones de las señales mostradas anteriormente se calculó el grado de sustitución aproximado de tritilación⁶⁰ de estos materiales mediante la siguiente ecuación (eq.4):

$$GS = \frac{\frac{I_{tr}}{n_{tr}}}{n_{OH} \left(\frac{I_p}{n_{urp}} \right)} \quad (\text{eq. 4})$$

Donde

GS= grado de sustitución (acotado a valores de entre 0 y 1).

I_{tr} = valor de integración de la señal debida al grupo tritilo.

n_{tr} = número de protones en el grupo tritilo (15 H).

n_{OH} = número de grupos hidróxido por unidad repetitiva de polímero (1 OH).

I_{urp} = valor de integración de la señal correspondiente al polímero (-CH₂-, CH).

n_{urp} = número de protones de la unidad repetitiva del polímero.

Así para los polímeros D, E y F en comparación con A, B y C (polímeros son proteger) el grado de sustitución y sus solubilidades fueron:

Polímero	GS	Agua	CHOH	AcOEt	Tolueno	CHCl ₃
A	0.0	+	+	x	x	x
B	0.0	+	+	x	x	x
C	0.0	+	+	x	x	x
D	0.53	x	x	+	+	+
E	0.49	x	x	++	+	+
F	0.50	x	x	+	+	+
*D	0.15	+	+	-	-	-

Tabla 4.5 Solubilidad y grado de sustitución de polímeros hiper-ramificados (A, B y C) y polímeros hiper-ramificados tritilados (D, E y F). + Soluble, x Insoluble, ++ Hinchado.

* Polímero obtenido con piridina.

Como era de esperarse, existe una correlación entre los datos GS y las solubilidades del polímero, a medida que éste aumenta la polaridad del material se ve disminuida, consecuencia de la sustitución de los grupos polares OH por grupos aromáticos voluminosos de naturaleza no polar, Así, a medida que GS aumenta se observan bajas solubilidades e incluso nulas en medios polares como el agua y alcoholes pero a su vez se ve incrementada en disolventes como el tolueno y cloroformo, de naturaleza no polar.

Es importante mencionar que los polímeros tritilados obtenidos ya poseen características propias de una cápsula anfifílica consecuencia del balance polar-no polar existente entre el interior y la periferia de estas moléculas.

Por una parte, en su interior contienen grupos OH capaces de tener interacción con moléculas polares, y por otra, en su periferia grupos trifenilo no polares afines a medios orgánicos. Dichas características harían posible la solubilización de moléculas polares en disolventes no polares.

4.3. ESTERIFICACIÓN DE POLÍMEROS.

Una vez concluida la fase de protección de grupos en la periferia, (obtención de los polímeros tritilados D, E y F), el siguiente paso de reacción en la estrategia de síntesis es la esterificación de los grupos hidroxilo contenidos en el interior de estas moléculas.

Típicamente las reacciones de esterificación entre alcoholes y cloruros de acilo se realizan en medios básicos utilizando piridina como disolvente, la cual además sirve para neutralizar el HCl formado en la reacción. Sin embargo la velocidad de estas reacciones suele ser un tanto lenta. Con el objetivo de acelerar dicha reacción se emplea 1-metilimidazol, agente acilante que disminuye el tiempo necesario hasta en un 30%.

Con base en lo anterior y aprovechando la mejora que ofrece el 1-metilimidazol, se llevó a cabo la esterificación usando cloruro de palmitoilo (cadena de 16 carbonos) en presencia de piridina como disolvente y el imidazol antes mencionado. Gracias a dicho protocolo de síntesis se lograron obtener con éxito los materiales esterificados, generando los polímeros denotados como G, H e I con conversiones superiores al 80%.

La reacción se monitoreó por FT-IR, en donde la señal correspondiente al grupo carbonilo es la determinante; a medida que avanza la reacción se hace más marcada.

La disminución casi total de la banda perteneciente a los grupos hidroxilo en 3000 cm^{-1} pone en evidencia la obtención del grupo éster en los polímeros, dichas señales se presentan a 1740, 1700 y 1659 cm^{-1} para los compuestos G, H e I respectivamente (fig. 4.12).

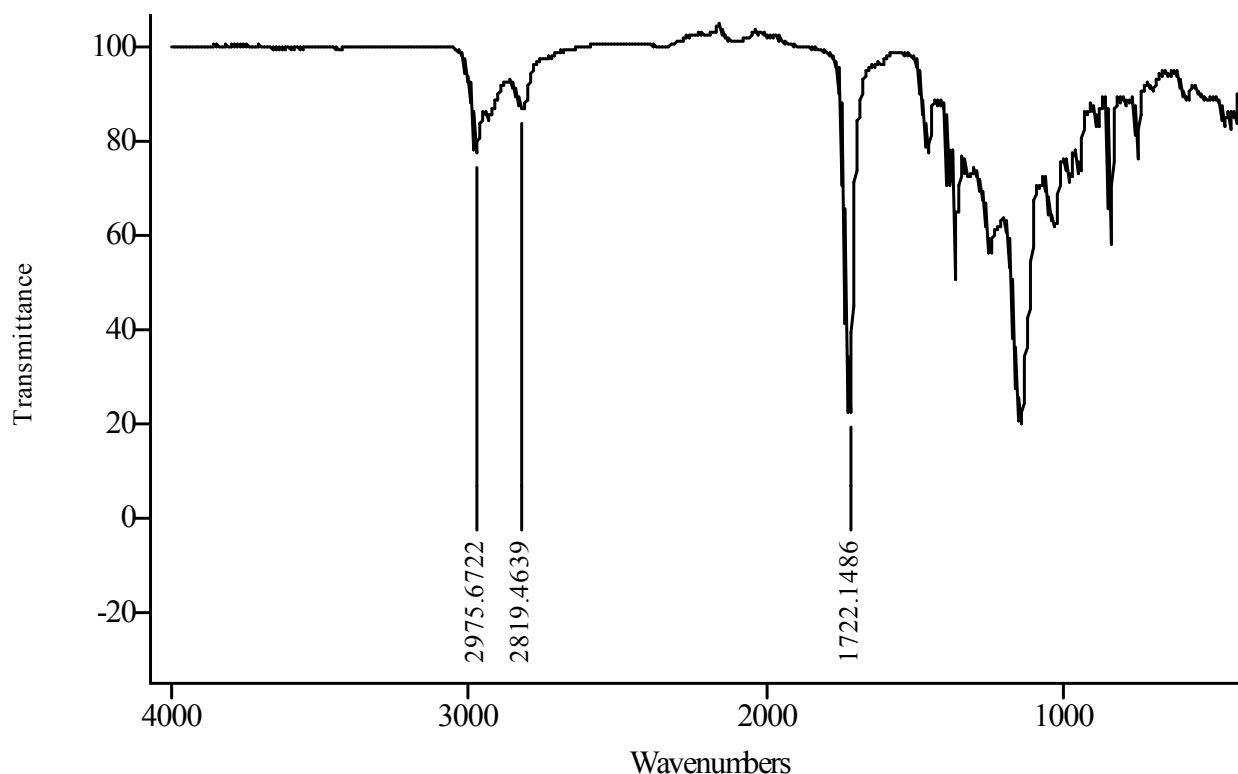


Fig. 4.12 FT-IR del polímero G.

El espectro de RMN ^1H muestra 4 señales que corresponden a los hidrógenos de la cadena alifática pertenecientes al grupo éster, una en el intervalo de 0.9 a 1.0 ppm para los metilos terminales ($-\text{CH}_3$), una más en 1.20-1.22 ppm generadas por los hidrógenos contenidos en 12 carbonos de la cadena alifática ($-(\text{CH}_2)_{12}-$), y dos más originadas por los hidrógenos de los carbonos vecinos a los oxígenos del grupo funcional. ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ y $-\text{O}-\text{CH}_2-$).

En los espectros de RMN ^{13}C , la formación del éster se manifiesta en 6 señales, 14.33 ppm correspondiente al último carbono de la cadena, entre tanto 22.91 y 24.89 ppm así como 34.23 y 32.13 ppm se atribuyen a los carbonos vecinos al último átomo contenido en la cadena y a los vecinos del carbono de carbonilo respectivamente.

Los desplazamientos de 29.20 a 29.90 ppm son las señales de los carbonos restantes en la cadena alifática $-(\text{CH}_2)_{12}-$, por último, la señal observada a 178 ppm es debida al carbono del carbonilo.

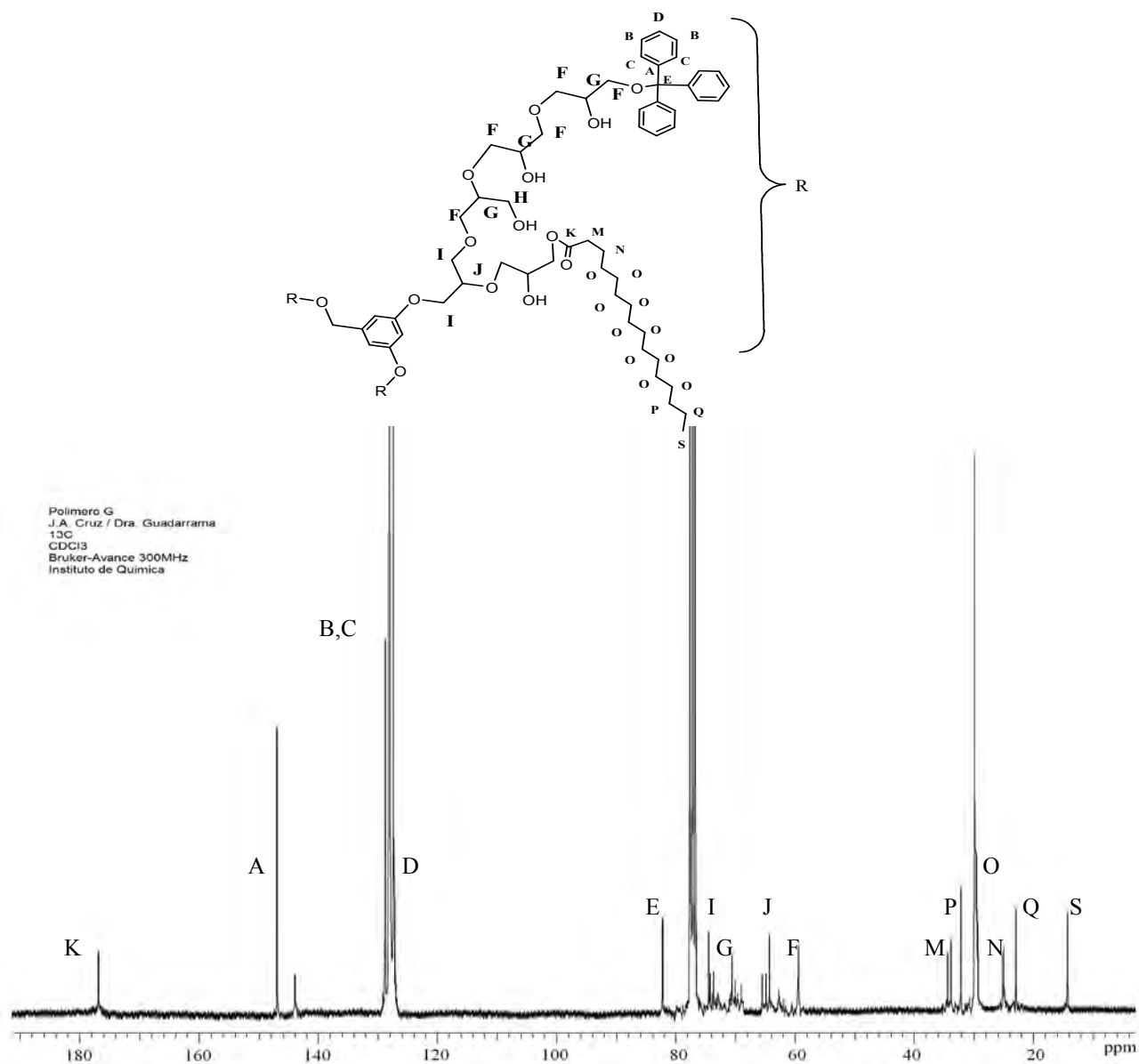


Fig. 4.14 Espectro de RMN ^{13}C del polímero G.

Con base al análisis de resonancia e infrarrojo se corrobora la obtención de los productos esterificados.

En cuanto a la solubilidad de estos polímeros, ésta no cambio mucho con respecto a sus antecesores tritilados; si bien éstos ya poseían una baja polaridad, con la esterificación esta polaridad se ve aun mas disminuida, por lo que, en consecuencia, los productos tritilados pasaron de ser solubles en acetato de etilo, cloroformo y tolueno, a solo ser solubles en los últimos dos disolventes mencionados una vez hecha la esterificación.

4.4. PESOS MOLECULARES.

Como era de esperarse, los pesos moleculares de los polímeros hasta esta etapa fueron incrementados como resultado de la tritilación y la esterificación. Debido a la sustitución de las unidades OH con una masa de 17 Da (Daltons), por unidades de trifenilmetileter Ph₃-CO y hexadecanoilo OCO-(CH₂)₁₄CH₃, con masas atómicas de 258 Da y 255 Da respectivamente, lo que demuestra que la funcionalidad de los polímeros iniciales afecta fuertemente las propiedades del polímero hiper-ramificado (como ya se ha mencionado en la solubilidad).

A continuación la siguiente tabla muestra el incremento en los pesos moleculares de estos polímeros.

Polimeros hiper-ramificados (1er paso de reacción)		Polímeros tritilados (2º paso de reacción)		Polímeros tritilados-esterificados (3er paso de reacción)	
A	3003	D	8421	G	12222
B	2318	E	6502	H	9741
C	4591	F	12559	I	18607

Tabla 4.6. Pesos moleculares Mw [Da] de los polímeros sintetizados hasta la etapa de esterificación.

La aplicación de estos polímeros como nanocápsulas requiere que los polímeros se encuentren en un intervalo de pesos moleculares de 700 a 10000 Da. Si bien algunos de estos polímeros no caen en dicho intervalo, eventualmente, y apegándonos a nuestro diseño, lo conseguirán, ya que en el siguiente paso de reacción se realizará la desprotección, es decir la eliminación de la funcionalidad trifenilmetileter, (que posee una masa 15 veces mayor que el grupo alcohol) para restituir el grupo alcohol, lo cual dará como resultado una gran disminución en peso molecular.

4.5. DESPROTECCIÓN DE POLÍMEROS.

Una vez concretada la fase de esterificación, el siguiente paso en la ruta de síntesis es la remoción de las unidades trifenilmetiléter (trilito).

Dicho proceso debe cumplir, por un lado, con ser lo suficientemente suave para evitar la descomposición de los ésteres del polímero por reacciones de hidrólisis, y por el otro, asegurar la ruptura de los enlaces tipo éter, entre el oxígeno perteneciente al polímero y el carbono del grupo trilito.

El protocolo original de desprotección de grupos trilito (que no supone la presencia de grupos éster) se hace con ácido acético concentrado⁶¹ por 48 horas a temperatura ambiente; en nuestro caso, y debido a la labilidad que presentan los ésteres contenidos en los polímeros, se recurrió al protocolo publicado por V. Kholi y H. Blocker⁶². Dicho protocolo hace uso de un ácido de Lewis, específicamente bromuro de zinc (ZnBr_2), que al reaccionar con el éter de trilito actúa como un aceptor de electrones provenientes del oxígeno de dicha unidad, generando un carbocatión trilito y un complejo-polímero, intermediarios que dan como resultado en última instancia el trifenil metanol y el polímero desprotegido.

Esquemáticamente:

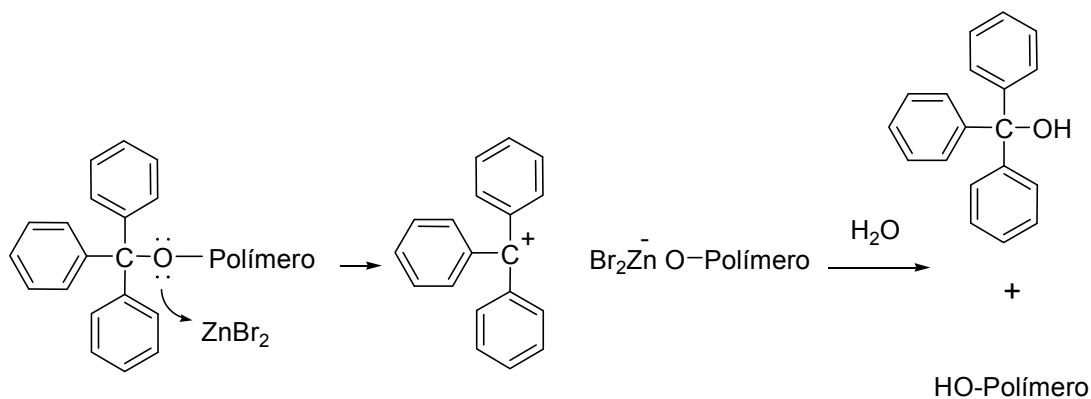


Fig. 4.15 Esquema de desprotección del polímero trilitado.

El procedimiento establecido para esta reacción menciona el uso de una solución saturada del bromuro de zinc en metanol destilado, la cual se pone en contacto con el polímero (1g) a desproteger durante 2 hrs aproximadamente, después de esto se lava con hexano y se centrifuga.

Llevado a cabo este paso de reacción se espera, en primer lugar que la espectroscopia de infrarrojo muestre nuevamente la banda de alcoholes observada a 3200 a 3300 cm^{-1} debido a la remoción del grupo tritilo.

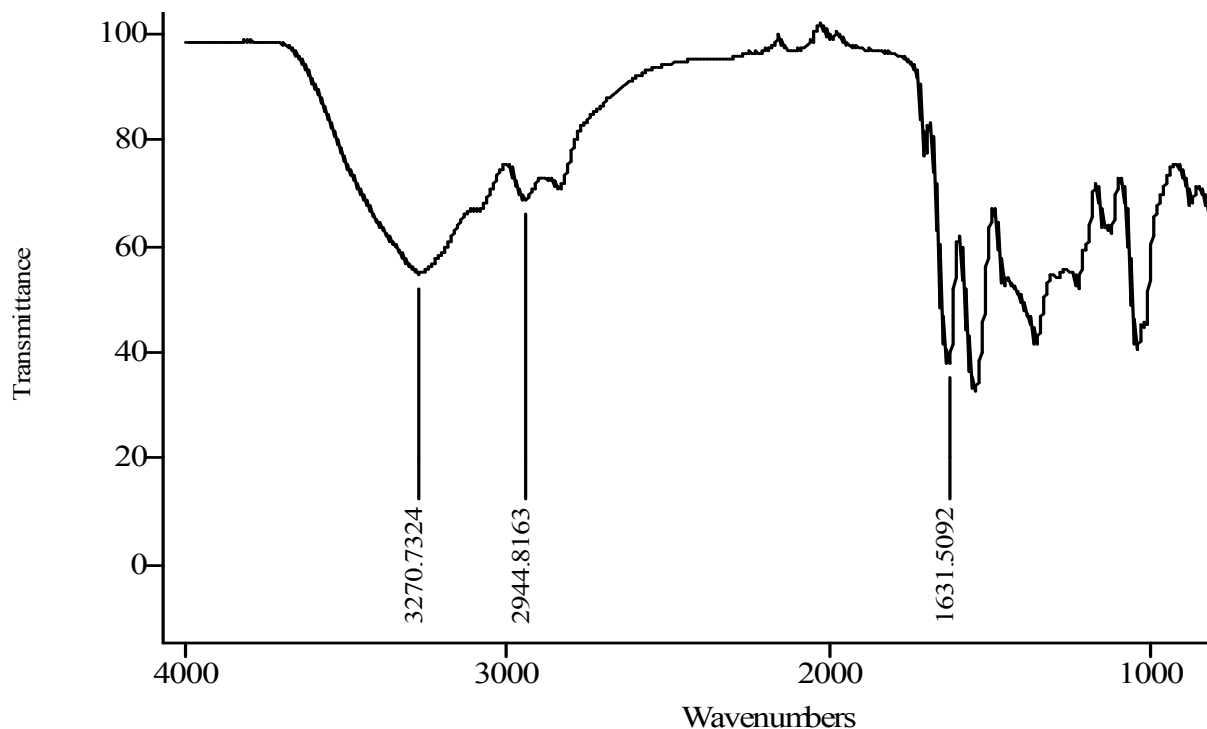


Fig. 4.16 FT-IR del polímero G-DTR

El espectro de FT-IR del polímero G-DTR pone de manifiesto la restitución de los alcoholes antes protegidos en el segundo paso de reacción, y prueba de esto es la banda observada a 3270 cm^{-1} con la forma típica de vibración de este tipo de grupos funcionales; por otro lado este espectro muestra una banda intensa a 1631 cm^{-1} asignada al carbono de carbonilo, dicha banda es evidencia clara de la preservación de los grupos éster en la desprotección con el ácido de Lewis.

Si bien la espectroscopia de FT-IR demuestra la desprotección de los alcoholes cualitativamente, la resonancia magnética, en cambio, mostró que había moléculas que seguían conteniendo el grupo tritilo en la zona de aromáticos, como lo muestra el espectro de la figura 4.17 , este evento representó un serio problema en la ruta de síntesis ya que si bien en FT-IR se muestra que existen alcoholes, éstos no son suficientes como para solubilizarse en agua, requisito necesario en el diseño original para el objetivo de solubilizar al taxol.

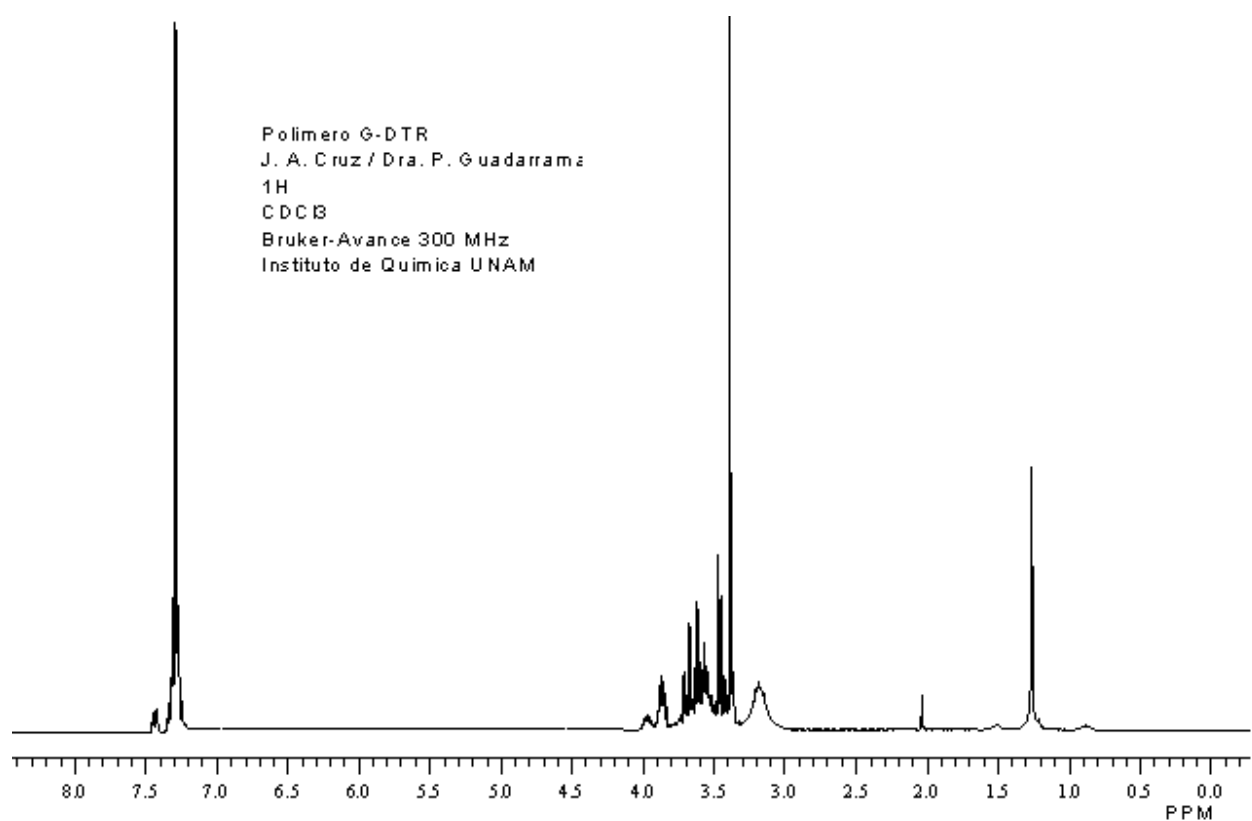


Fig. 4.17 Espectro de RMN ¹H del polímero G-DTR.

Una de las medidas correctivas para afrontar este problema fue mejorar la purificación. En este paso se buscó de alguna manera poder extraer la mayor cantidad de polímero desprotegido basándonos en la diferencia de polaridades, ya que el material con mayor cantidad de grupos OH será más afín a medios de alta polaridad. Basándonos en esta hipótesis, el producto se disolvió en cloroformo y se lavó con agua a manera de extracción (3X100ml) seguido de su evaporación a vacío, lamentablemente, este procedimiento no tuvo éxito ya que no se extrajo prácticamente nada.

Otra medida tomada para mejorar esta situación fue repetir la desprotección en metanol destilado (3 veces) para quitar cualquier rastro de agua ya que el oxígeno proveniente de ésta podría entrar en competencia con los oxígenos de la unión tritilo-polímero. Además de realizar el experimento bajo atmósfera inerte, también se incrementó el tiempo de reacción a 24 horas.

Después de varios experimentos con las especificaciones arriba mencionadas, los espectros de resonancia muestran la persistencia del grupo tritilo a 7.5 ppm; es decir, no se observan mejoras significativas en cuanto a la disminución de intensidad de esta señal con respecto al espectro obtenido inicialmente, y aunado a esto las cantidades aisladas mediante la extracción con agua no superaron la cantidad mínima para la caracterización por RMN ^1H .

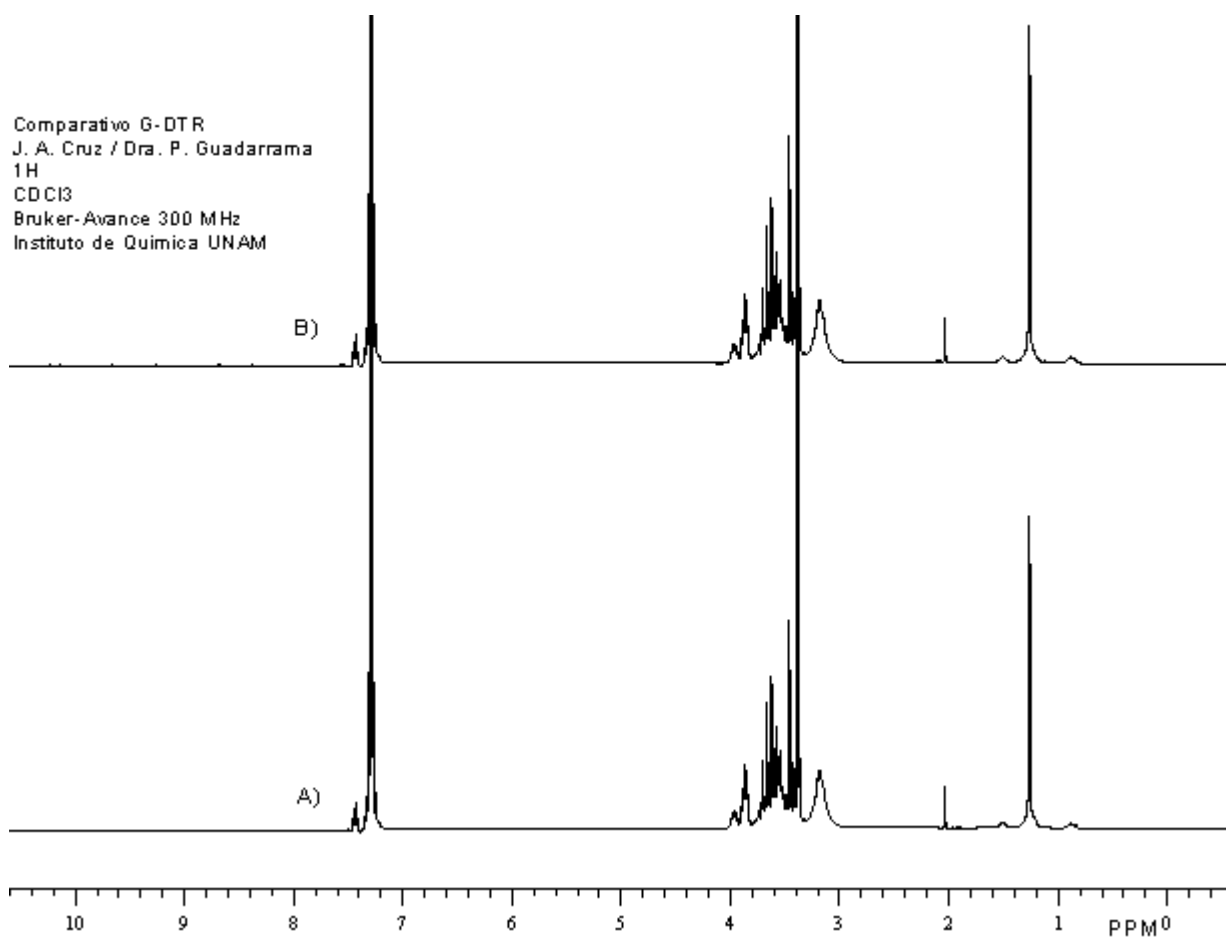


Fig.4.18 Espectro de RMN ^1H comparativo A) antes y B) después del tratamiento extra de purificación del polímero G-DTR.

Debido a este panorama y bajo la limitante de no poder usar un ácido de mayor fuerza para la desprotección, se evaluó la posibilidad de esterificar de manera controlada los polímeros obtenidos en el primer paso de reacción, para este efecto, el paso inmediato es determinar el número total aproximado de grupos alcohol contenidos en el polímero, para poder decidir qué porcentaje de estos se esterificaran en función de la solubilidad.

4.6. ESTERIFICACIÓN CONTROLADA.

Una manera práctica de determinar el número de alcoholes en los polímeros sintetizados es calculando el grado de polimerización DP_m , debido a que este parámetro se puede relacionar directamente con el número de grupos OH, ya que cada unidad repetitiva del polímero contribuye con un grupo hidroxilo a la estructura.

Para calcular este parámetro se utiliza la relación mostrada anteriormente (eq.3):

$$DP_m = \frac{(T + L + D)}{(T - D)} f_c$$

Recordando, para evaluar T, L y D se necesita caracterizar al polímero correspondiente mediante RMN ^{13}C de manera especial, asignando primeramente de manera confiable las señales que correspondan a cada unidad estructural, lo cual se logra, como ya se mencionó, obteniendo los experimentos APT y comparando los resultados publicados por Dvorak para cada unidad estructural del poliglicidol.

Una vez hechas las asignaciones, se debe hacer un experimento de carbono cuantitativo (Inverse Gated Decoupled), con la finalidad de poder obtener las intensidades de las señales mediante su integración y sumarlas de acuerdo al tipo de unidad estructural que le corresponde.

De esta manera se sustituyen los valores de las intensidades en la ecuación y se calcula el grado de polimerización. Así, para los polímeros A, B y C se obtuvieron los valores 40, 31 y 64 respectivamente, y como se sabe que cada unidad repetitiva aporta un OH al esqueleto estructural del polímero, el grado de polimerización DP_m es aproximadamente igual al número de OH's contenidos en la molécula.

Con base en los resultados obtenidos para el grado de polimerización, fue factible establecer la estequiometría adecuada de esterificación para controlar el número de cadenas que se adicionan al polímero con la finalidad de no comprometer la solubilidad en medios acuosos. De esta manera y tomando como marco de referencia los resultados de solubilidad y grado de sustitución para los

polímeros tritilados (tabla 4.5), se probaron diferentes estequiometrias de esterificación que van desde 10% hasta 50% de la cantidad de grupos hidroxilo.

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos en función de la solubilidad y el grado de sustitución para el polímero A (40 grupos OH aprox.).

Cantidad de OH Esterificados	Solubilidad en H ₂ O	Grado de sustitución GS
7	Soluble	0.16
10	Soluble	0.22
13	Soluble	0.30
16	Soluble	0.41
19	Insoluble	0.48
22	Insoluble	0.55
25	Insoluble	62.5

Tabla 4.7. Variación de la esterificación de los grupos OH y su repercusión en la solubilidad en agua. GS se calculó de manera análoga que en el paso de tritilación.

Los resultados mostrados en la tabla anterior demuestran que la esterificación de entre 13 y 16 grupos OH resulta en un balance conveniente que permite la obtención de un polímero con las cualidades anfífilas idóneas para encapsular especies químicas como el taxol. La estequiometría elegida para la esterificación fue la correspondiente a 14 grupos OH.

La espectroscopia de infrarrojo FT-IR demuestra cualitativamente la presencia tanto de los grupos hidroxilo 3100 a 3650 cm^{-1} y el carbonilo del éster observado a 1639 cm^{-1} , así como la banda debida a la vibración C-H, C-H₂ encontrada en 2915 cm^{-1} . El espectro del polímero J se muestra a continuación:

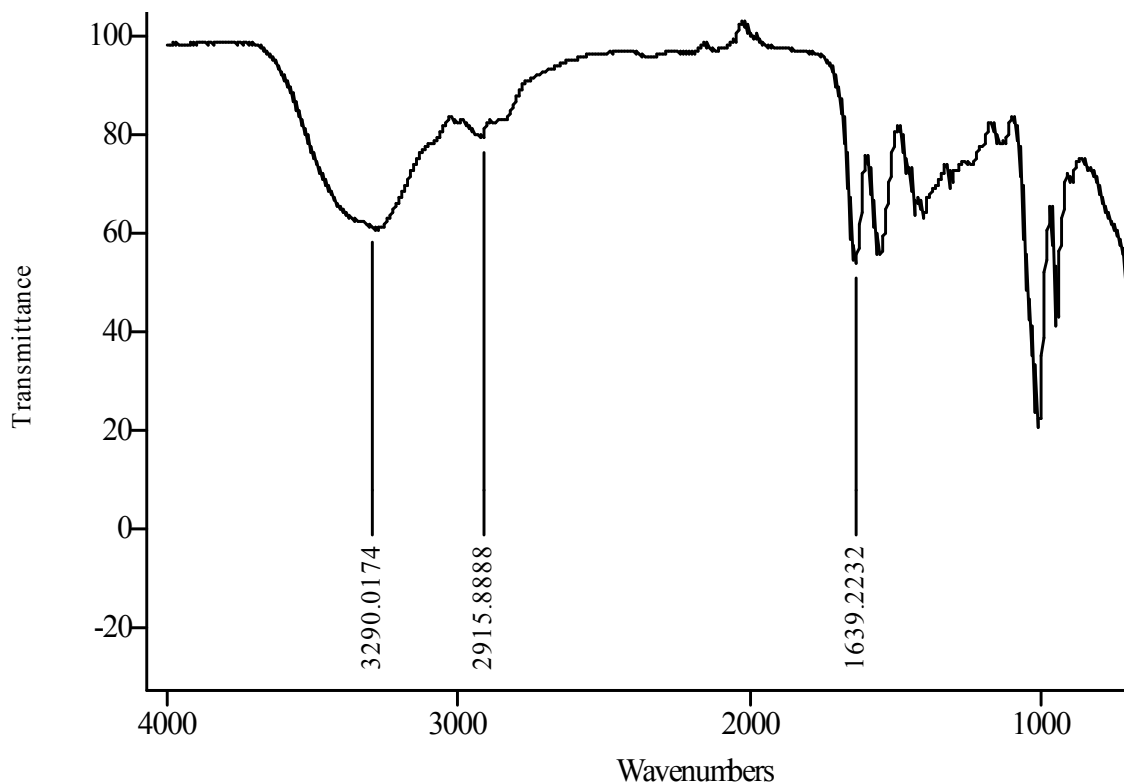


Fig. 4.19, FT-IR del polímero J.

Los espectros de RMN ^1H de los polímeros esterificados J, K y M muestran el conjunto de señales pertenecientes a los hidrógenos ($-\text{CH}-$ y $-\text{CH}_2-$) de las ramificaciones características de las materias primas, es decir, los polímeros A, B, y C en la región que va de 3 a 4 ppm. Estos espectros muestran, además, el nuevo conjunto de señales asociadas a la cadena alifática de carbonos provenientes de la esterificación, el cual va desde 0.89 ppm hasta 2.36 ppm.

En 0.912 ppm aparece la señal correspondiente a los hidrógenos de $-\text{CH}_3$ último en la cadena de 15 carbonos. En 1.28 ppm se muestra el singulete debido a los hidrógenos del cuerpo de la cadena, específicamente $(-\text{CH}_2-)_{11}$, para los hidrógenos unidos al carbono, segundo vecino de carbonilo ($-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) la señal asignada puede apreciarse como un multiplete a 1.61 ppm, finalmente la señal asociada a los hidrógenos vecinos al carbonilo ($-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) se observa a 2.31 ppm (fig. 4.20).

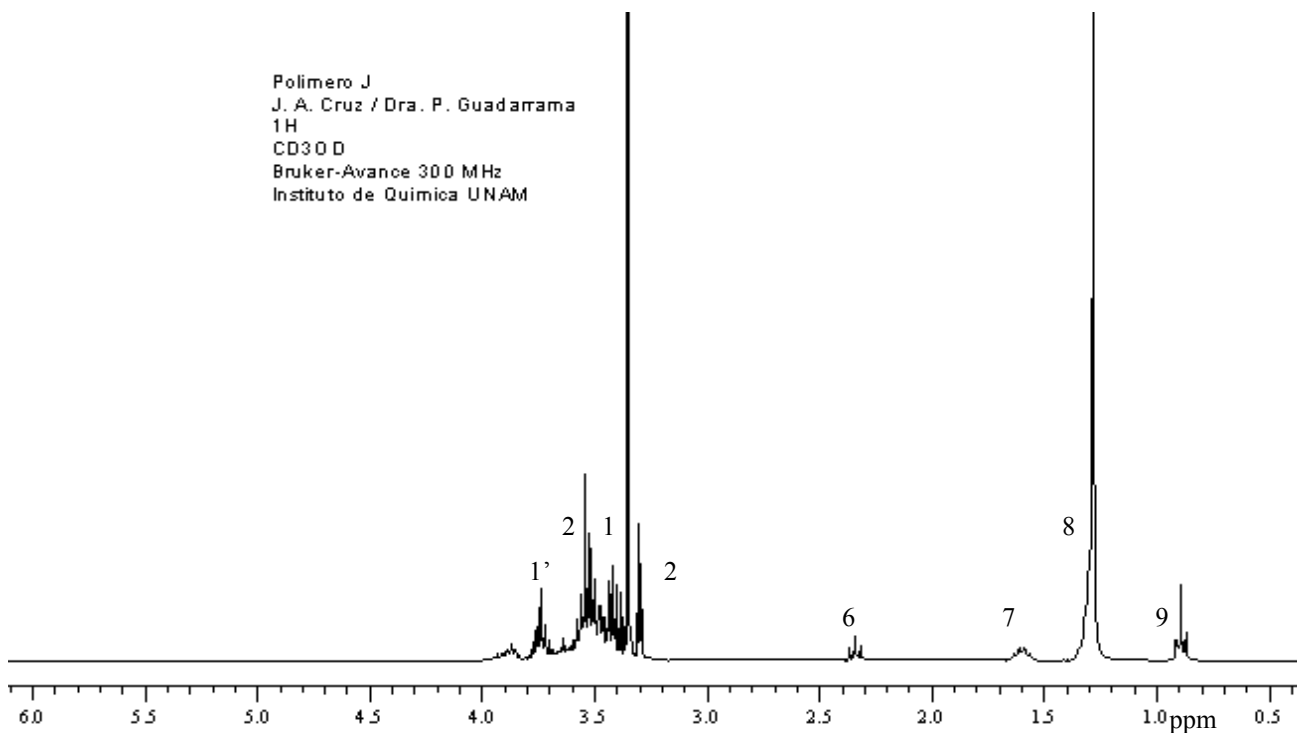
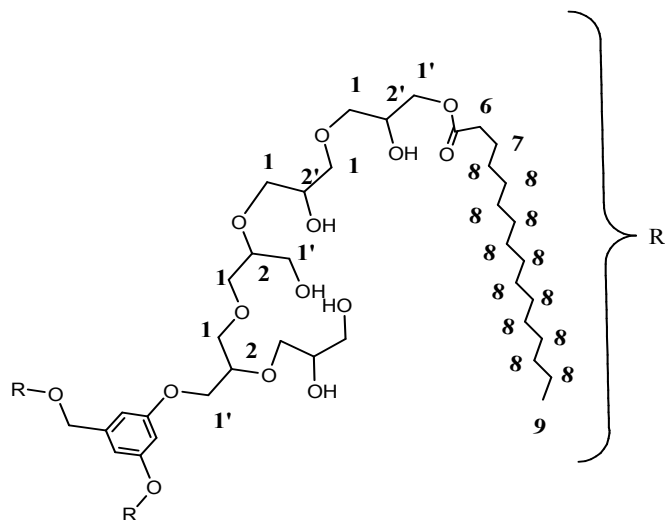


Fig. 4.20 Espectro de RMN ^1H del polímero J.

El juego de señales atribuidas a la cadena de carbonos del éster en el espectro RMN ^{13}C para estos polímeros se puede apreciar en el intervalo que va desde 14 ppm a 35 ppm, de 58 a 81 ppm se aprecian las señales de las materias primas.

En RMN ^{13}C , el polímero J tiene la señal del carbono final de la cadena en 14.40 ppm, en 23.69 ppm la correspondiente al carbono adyacente al terminal $-\text{CH}_2-\text{CH}_3-$, para el carbono secundario unido al primer vecino del carbono de carbonilo ($-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) se observa la señal asociada a 26.23 ppm, para los 9 carbonos con el mismo ambiente químico en la cadena alifática $-(\text{CH}_2)_9-$ se genera una sola señal situada en 30.50 ppm, el carbono unido a estos últimos ($-(\text{CH}_2)_9-\text{CH}_2-$) tiene su señal en 33.03 ppm, para el carbono vecino al carbono de carbonilo se presenta a 34.94 ppm y finalmente la señal correspondiente al carbono de carbonilo se encuentra en 175.48 ppm (fig. 4.21).

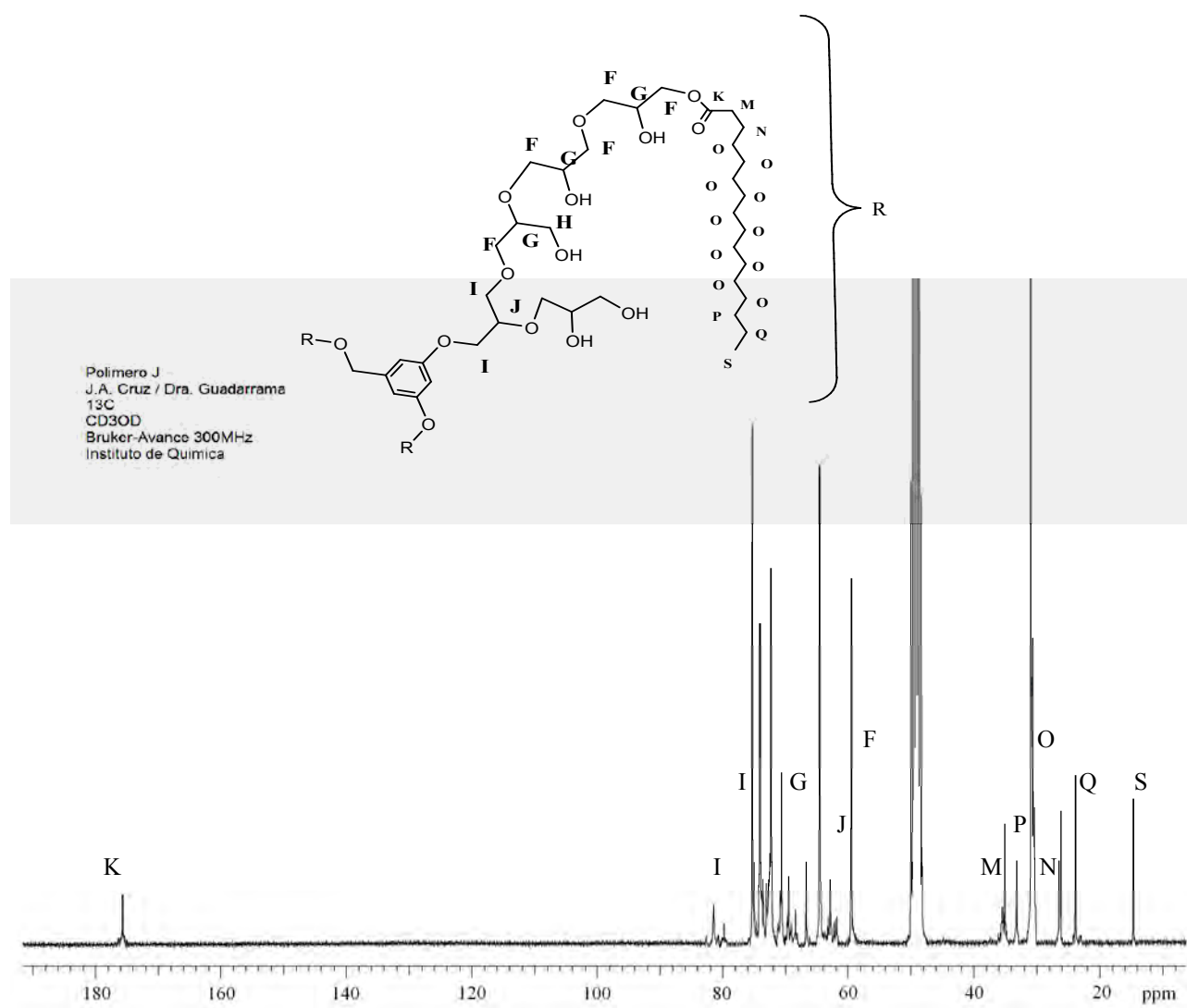


Fig. 4.21 Espectro de RMN ^{13}C del polímero J.

Con los resultados de estas técnicas espectroscópicas se confirma de manera satisfactoria la estructura de estas nanocápsulas anfifílicas que a pesar de la presencia de grupos no polares siguen siendo solubles en medios acuosos gracias al equilibrio existente entre sus grupos funcionales.

Los pesos moleculares de la tabla 4.7 ponen de manifiesto que estos materiales cumplen en su totalidad con el rango de aplicación (sección 4.4) para este tipo de nanocápsulas como agentes acarreadores de fármacos.

Compuesto	Mw g/mol
Poliéster J	6110
Poliéster K	5186
Poliéster M	7698

Tabla 4.7. Pesos moleculares de las nanocápsulas anfifílicas sintetizadas mediante la esterificación controlada.

Si bien la obtención de los compuestos J, K y M fue posible mediante la modificación de la ruta de síntesis original, debido a la problemática presentada en el paso de desprotección, dicha solución presenta una desventaja, ya que el protocolo original aseguraba que los grupos éster no polares estarían situados, en su gran mayoría, en el interior de la molécula, mientras que su contraparte polar, es decir los grupos hidroxilo, lo harían en la periferia luego de la protección-desprotección con grupos tritilo que reaccionarían preferentemente con los hidroxilos de la periferia; de esta manera quedarían como únicos puntos de esterificación los grupos OH internos. Ese escenario original sería idóneo para encapsular moléculas de taxol en las cavidades de la nanocápsula, ya que, al momento de estar en contacto con el agua, las interacciones no polares entre estas 2 especies se verían favorecidas en el interior debido al medio polar circundante.

La nueva ruta de síntesis reduce todo el proceso de obtención a solo un paso de reacción, pero ofrece un balance polar-no polar un tanto al azar, aun así manteniendo la posibilidad de producir un complejo huésped-anfitrión. Las evaluaciones de dicha característica se mostrarán en la siguiente sección.

4.7. COMPLEJOS HUÉSPED-ANFITRIÓN.

4.7.1. Análisis Conformacional.

Empleando herramientas de Química Computacional se evaluaron las conformaciones estructurales más probables de los posibles complejos huésped-anfitrión entre los polímeros sintetizados y el fármaco taxol en medios acuosos, con el propósito de profundizar en el análisis estructural de formación de dichos complejos.

Detalles computacionales.

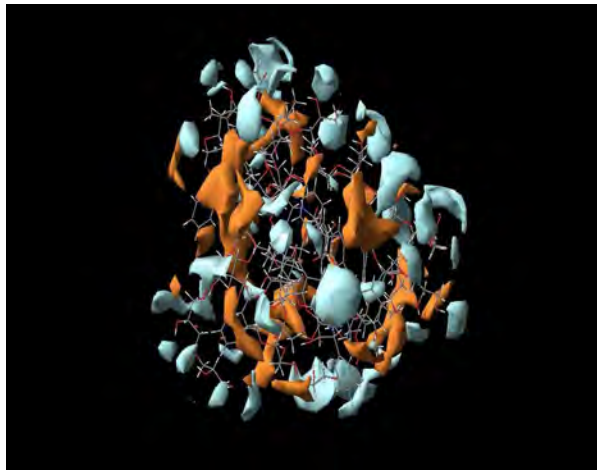
En la presente tesis se llevo una búsqueda conformacional con fines exploratorios de los posibles sistemas tipo huésped-anfitrión con la finalidad de evaluar de manera aproximada el encapsulamiento del taxol, en términos del número de interacciones intermoleculares establecidas entre el polímero y dicho fármaco.

Todas las estructuras fueron construidas y equilibradas mediante análisis conformacional en medio acuoso con una constante dieléctrica de 81 (correspondiente al agua), se empleo el método estadístico Monte Carlo⁶⁴ incluido en el software Macromodel. La búsqueda conformacional se llevó a cabo con el algoritmo de múltiples mínimos (MCMM)^{65,66} sin límites en el número de variables.

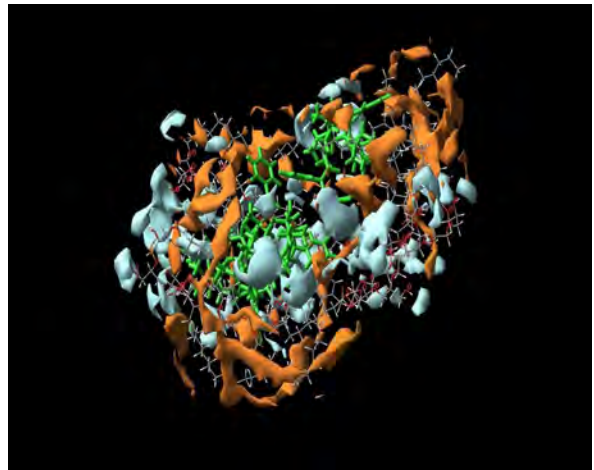
Las superficies hidrofóbico-hidrofílico fueron calculadas usando Maestro⁶⁷ en una caja de 6 Å.

Una vez que se obtuvieron las geometrías optimizadas para una relación 1:1 de polímero:taxol, suficiente para apreciar el encapsulamiento efectivo de este ultimo (fig. 4.23-A), se probaron diferentes radios, aumentando progresivamente la cantidad de moléculas de fármaco para obtener una relación limite que sirva de marco de referencia en la formación de estos complejos.

De esta manera, la relación óptima resultante fue una molécula de polímero por cada 3 de taxol, ya que una cuarta molécula del fármaco queda fuera del alcance de la matriz polimérica.



A



B

Fig. 4.22 A) nanocápsula anfifílica con una molécula taxol; B) nanocápsula anfifílica con 3 moléculas de taxol. (Azul: superficie hidrofílica del sistema. Rojo: superficie hidrofóbica. Verde: Taxol).

En las figuras anteriores se puede observar que existe una complejación atribuida principalmente a las “ramas dendriméricas” del polímero vía puentes de hidrógeno que, aunado al medio acuoso circundante, provoca que el sistema adopte una conformación globular manteniendo su parte hidrofóbica (superficie roja) al interior y su parte hidrofílica (superficie azul) al exterior, lo cual asegura que esta última tenga el suficiente contacto con el medio polar, con lo que se asegura que el sistema se estabilice y se logre solubilizar en este medio.

Los resultados de esta simulación predicen la complejación exitosa de parte de los polímeros sintetizados hacia moléculas hidrofóbicas como el taxol, con una relación de 1: 3 (polímero-taxol), dicha relación se probó experimentalmente y se caracterizó con la finalidad de proveer suficiente información que permitirá sustentar su aplicación en organismos vivos.

4.7.2 Evaluación citotóxica.

La acción tóxica de un compuesto en cultivos celulares vivos (conocidas como líneas celulares), se conoce como citotoxicidad; dicha propiedad fue evaluada para los polímeros anfifílicos mediante la prueba sulforodamida B (Prueba de tinción)⁶⁸.

Dado que el diseño de estos materiales fue concebido con la idea de aplicarlos promisoriamente en medios biológicos, resulta mandatorio probar la inocuidad de cada uno de ellos en células vivas (líneas celulares). Para lograr este objetivo se realizaron pruebas de citotoxicidad *in vitro*, que consisten en poner en contacto el material con líneas de linfocitos celulares humanos y monitorear el crecimiento de la colonia mediante el protocolo utilizado por Monks y colaboradores⁶⁸, el cual es un ensayo de la inhibición de la proliferación de células, monitoreando vía la tinción de sulforodamida B sobre las líneas celulares.

Los cultivos celulares usados fueron preservados bajo el medio celular RPMI-1640, que especifica la suplementación con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 10000 unidades/ml de penicilina sódica, 10000 µg/ml de sulfato de estreptomicina y 25 µg/ml de anfotericina, además de 1% de aminoácidos no esenciales, manteniendo el cultivo bajo una atmósfera con una humedad del 5% a temperatura de 37 °C.

Estas determinaciones se llevaron a cabo en el Instituto de Química (U.N.A.M.) en la unidad de pruebas de actividad biológica por la académica M. Teresa Ramírez Apan. Todas las líneas celulares, tanto tumorales como sanas (linfocitos), fueron suministrados por el National Cancer Institute (Estados Unidos); todos los cultivos celulares tuvieron un tiempo de exposición de 48 horas a los polímeros con una concentración de 50 µM en agua.

Los resultados obtenidos para los polímeros son mostrados en la siguiente tabla.

Muestra	% Inhibición en el crecimiento celular						
	MT2	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
Polímero-A	3.79	37.44	S.A.	11.45	S.A.	24.80	16.81
Polímero-B	4.54	5.44	S.A.	2.29	S.A.	9.09	17.03
Polímero-C	0.86	1.33	S.A.	S.A.	61.46	5.14	69.14
Polímero-J	S.A.	0.78	5.65	S.A.	46.42	7.56	21.68
Polímero-K	27.85	97.38	100	63.22	83.09	78.26	100
Polímero-M	10.00	60.34	39.63	3.67	S.A.	46.34	62.57
Taxol*	-	84.4	72.5	91.2	68.0	73.4	92.3

Tabla 4.8. Resultados de los ensayos de citotoxicidad para los polímeros sin esterificar (A, B, C) y esterificados controladamente (J, K, M) en: MT2= Línea celular de linfocitos humanos normales; Líneas celulares de cáncer humano: U251= glioblastoma (cáncer cerebral), PC-3=adenocarcinoma prostático, K562= Leucemia mielógena crónica, HCT-15=adenocarcinoma colorectal, MCF-7= adenocarcinoma mamario, SKLU-1= adenocarcinoma pulmonar, S.A.= sin actividad,
* no disponible en MT2.

De la tabla anterior se puede observar que todos los polímeros, incluso aquellos que no han sido esterificados, muestran cierta selectividad citotóxica hacia las líneas celulares cancerosas.

De los 3 polímeros precursores, el polímero C exhibe la más alta citotoxicidad a las líneas celulares de adenocarcinoma colorectal y pulmonar, sin embargo, es el compuesto que menor actividad presenta ante células sanas.

De la serie de polímeros esterificados, los compuestos J y M también presentan en promedio una alta citotoxicidad hacia las células cancerosas, dicho efecto parece tener relación con la adición de cadenas alifáticas, ya que al aumentar el peso molecular mediante la adición de éstas se vio incrementada la citotoxicidad en estas líneas celulares.

Por otro lado estos polímeros, a pesar de su comportamiento hacia células cancerígenas, no manifestaron actividad en el caso del compuesto J e inocuidad (polímero M) hacia las líneas celulares sanas.

Es importante mencionar en este contexto que un compuesto es considerado inocuo cuando cumple la condición de poseer un valor igual o menor al 10% de citotoxicidad⁶⁸.

Es de notable atención el caso del polímero K; si bien es cierto que este compuesto resultó ser levemente toxico hacia las líneas celulares sanas, mostró una remarcable citotoxicidad hacia las líneas celulares concernientes a los diferentes tipos de cáncer, con valores iguales e incluso superiores que algunos fármacos encaminados específicamente al combate de estos tipos de cáncer, por lo que dicho compuesto será objeto de estudio en trabajos posteriores no incluidos en esta tesis debido a los alcances de la misma.

En términos generales los resultados de estas pruebas dan “luz verde” a los polímeros anfifílicos J y M como viables y serios candidatos hacia la formación de complejos huésped-anfitrión con el fármaco taxol; además de que dan pista de una posible sinergia entre ellos, es decir una maximización de las cualidades anti cancerígenas por parte del taxol hacia ciertos tipos de cáncer.

4.7.3. Formación de complejos huésped-anfitrión.

Una vez completado todo el marco informativo previo a esta sección, se formaron los complejos huésped-anfitrión con los polímeros J y K con el taxol.

La metodología usada para lograr la síntesis de estos productos fue una modificación del protocolo usado por H. Namazi y M. Adeli quienes forman complejos huésped-anfitrión a base de moléculas dendriméricas y fármacos como el diclorofenaco⁶⁹. La estequiometría usada fue aquella estimada mediante cálculos teóricos (ver página 92); es decir, 1:3 polímero-fármaco.

El protocolo empleado fue el siguiente: Se preparó una disolución del polímero J, 20 mg (4.27×10^{-6} mol) en 20ml de tetrahidrofurano (THF), la cual se agregó a una disolución previamente preparada de taxol, 10 mg (1.171×10^{-5} mol) contenida en un matraz de bola de 100 ml provisto de agitación. La mezcla resultante se calentó a ebullición durante 18 hrs, posteriormente se evaporó y se re disolvió en metanol, se filtró, y se repitió el proceso por 2 hrs mas; transcurrido este tiempo se concentra a vacío y se tritura en un mortero de ágata; el producto es una pasta de color gris soluble en agua, mostrando un pH = 7.

La caracterización del material se llevó a cabo mediante FT-IR, RMN, DSC (Calorimetría diferencial de barrido) y absorción UV-VIS.

El espectro FT-IR perteneciente al taxol muestra señales características de sus grupos funcionales tales como O-H en el intervalo de 3100 a 3600 cm^{-1} , para el grupo carbonilo la vibración de alargamiento se presenta a 1724 cm^{-1} con una fuerte intensidad, para el enlace N-H del grupo amida la banda se aprecia ligeramente a 3437 cm^{-1} como una deformidad de la señal proveniente de los OH, el grupo éter produce su correspondiente banda a 1116 cm^{-1} , en 1528 cm^{-1} se observa la banda debida a los enlaces C-H aromáticos, mientras que los alifáticos lo hacen a 2960 cm^{-1} (fig. 4.23).

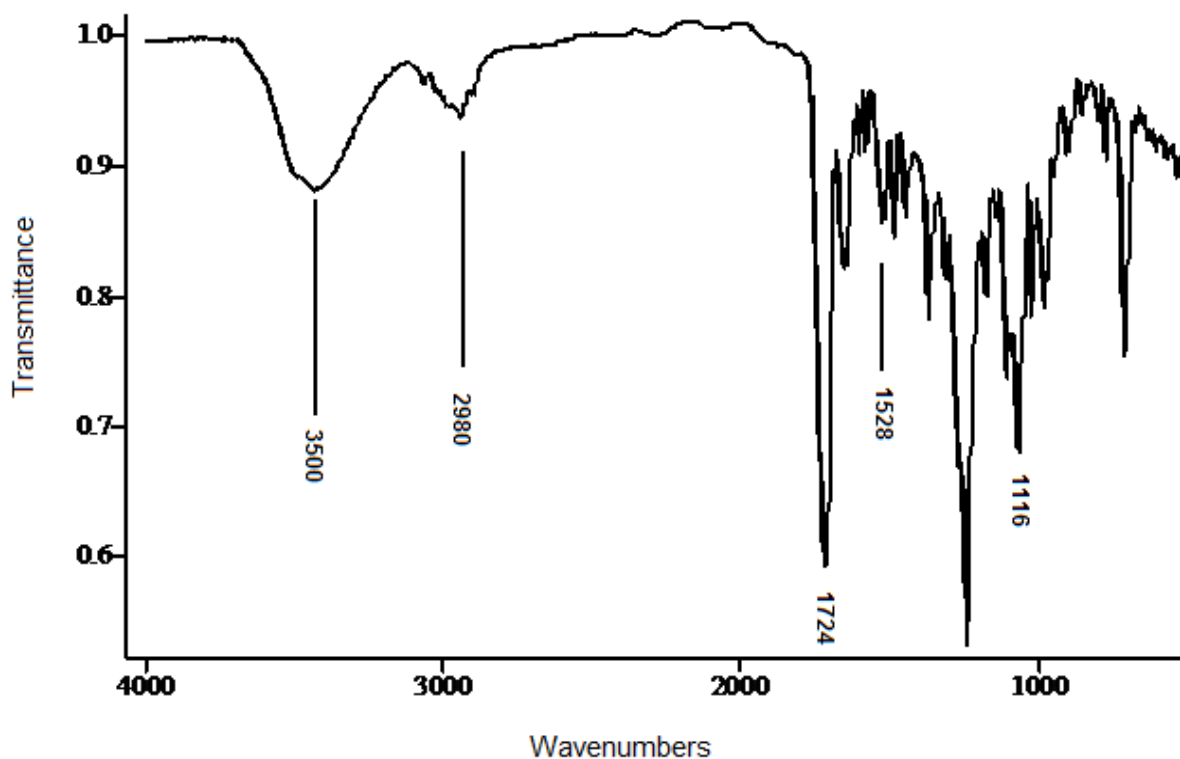


Fig. 4.23 FT-IR del Paclitaxel (Taxol).

El espectro correspondiente al complejo polímero-taxol (figura 4.24) muestra cambios en las bandas de vibración en comparación con sus predecesores; las bandas asignadas a las vibraciones de enlace O-H y C-H aumentan de manera significativa su intensidad, además de presentar un leve corrimiento mostrando un intervalo de 3031 a 3661 cm^{-1} para los hidroxilos y de 2800 a 2910 cm^{-1} para los carbonos alifáticos.

La banda C-O de carbonilo por el contrario sufre una disminución de intensidad y un ligero desplazamiento ubicándose en 1732 cm^{-1} , la banda perteneciente a los éteres C-O también tiene un corrimiento, presentándose ahora en 1036 cm^{-1} . Estos cambios proponen la existencia de interacciones en el complejo formado por el polímero J y el taxol. La comparación de los espectros se muestra a continuación.

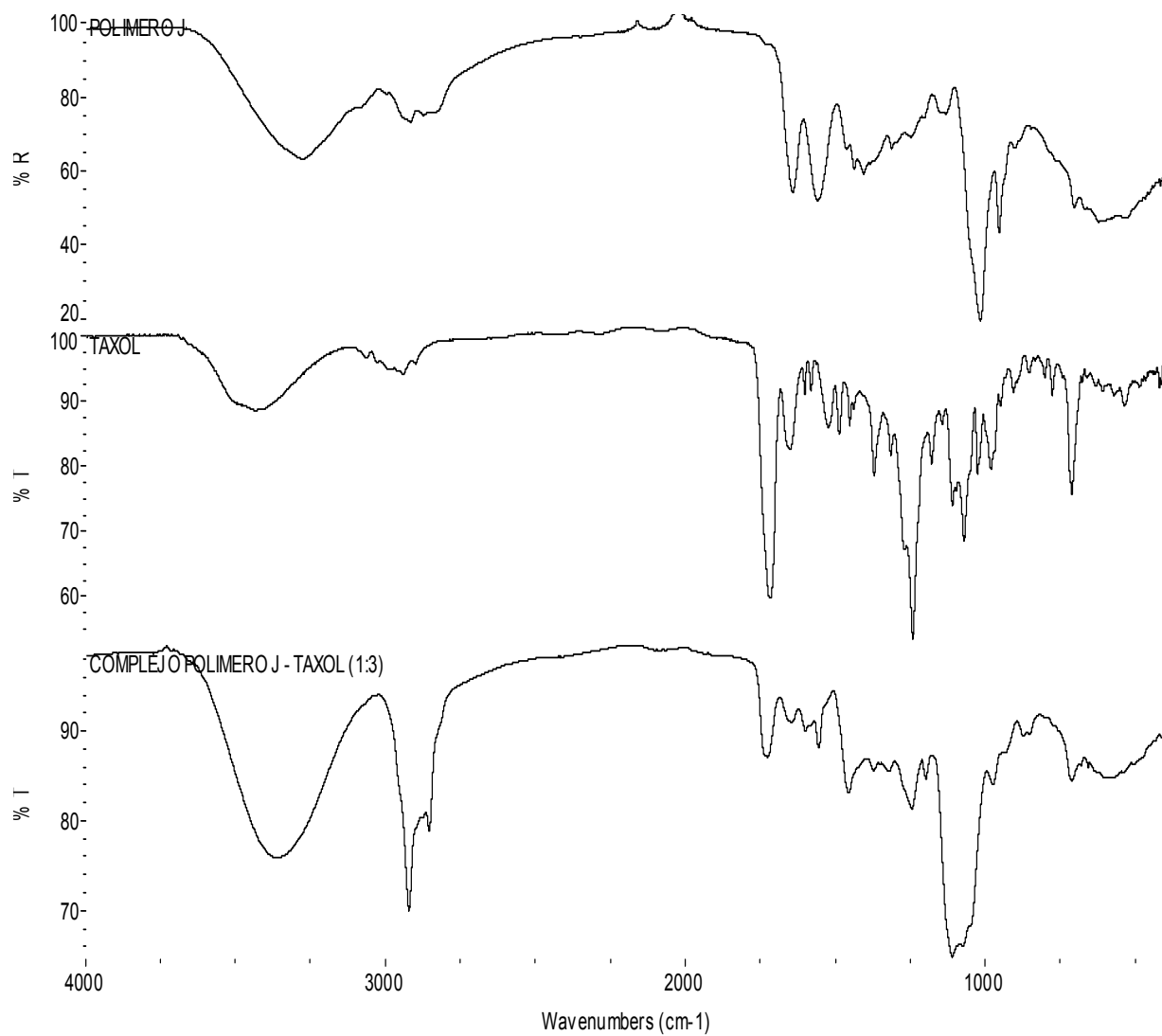
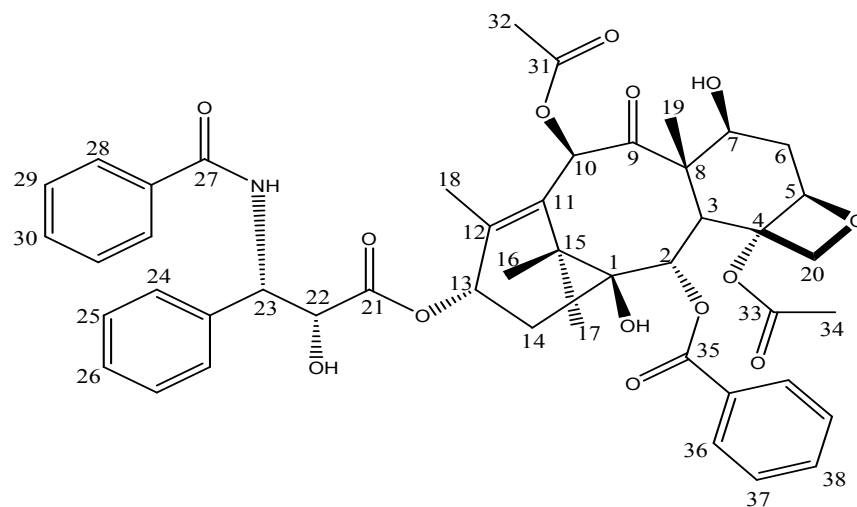


Fig. 4.24, FT-IR comparativo polímero J, taxol y complejo.

Los cambios observados en algunas bandas del espectro del complejo sugieren la existencia de interacciones intermoleculares en este compuesto. La caracterización por RMN apoya esta propuesta relacionada con la formación exitosa del complejo.

A continuación se muestra la asignación de señales para el taxol en RMN ^1H .



Paclitaxel (Taxol)
 J. A. Cruz / Dra. P. Guadarrama
 ^1H
 CD_3OD
 Bruker-Avance 300 MHz
 Instituto de Química UNAM

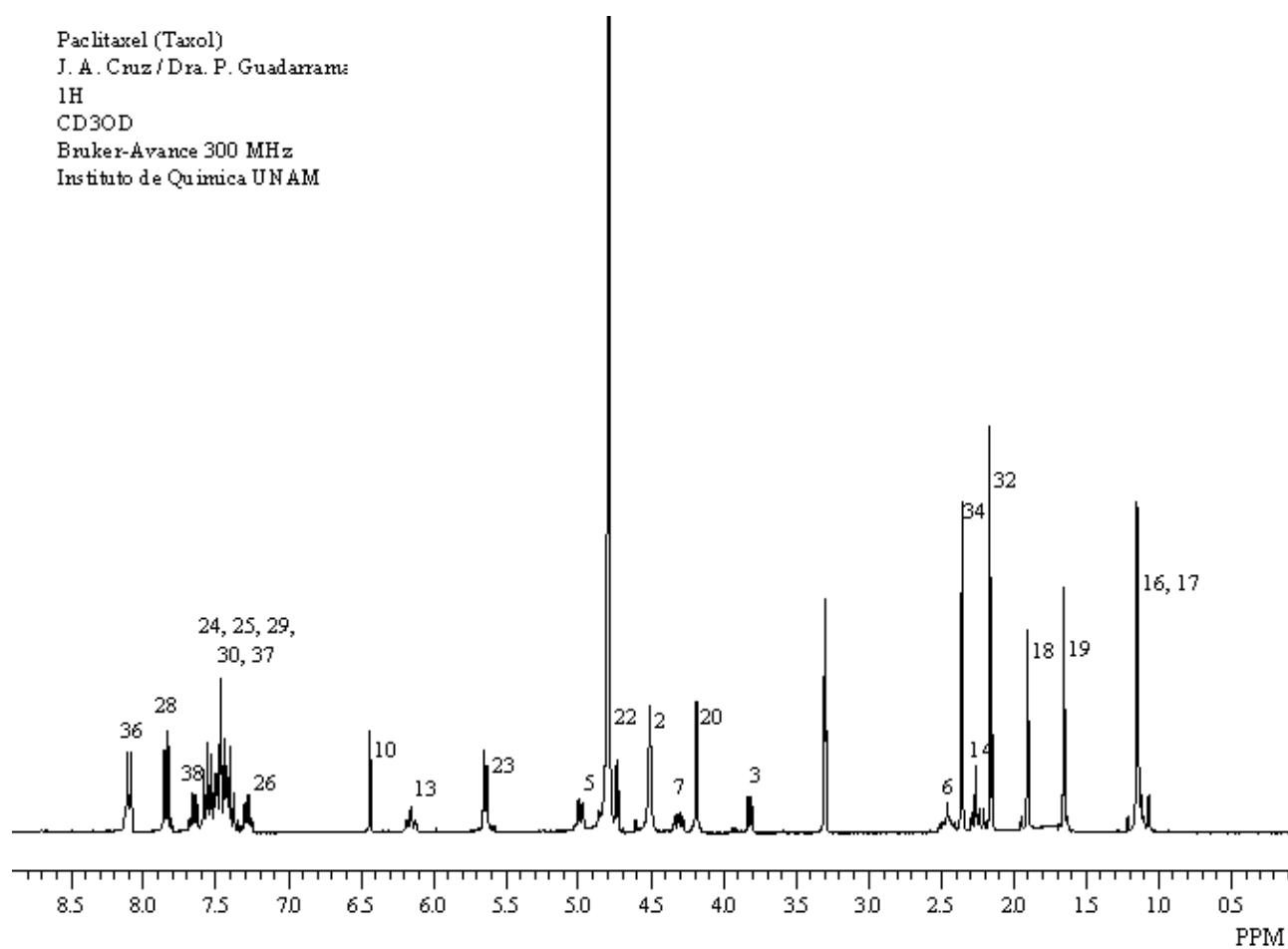


Fig. 4.25. Asignación de señales en RMN ^1H para el taxol.

Como se puede observar, el espectro anterior muestra en total un conjunto de 18 señales en las que se hace notar la correspondiente a los anillos aromáticos (3 con 15 H en total), con señales desde 7.2 ppm hasta 8.2 ppm, para los hidrógenos pertenecientes a los grupos metilo, situados en los carbonos 16, 17, 18, 19, 32 y 34 (con 18 H en total) el juego de señales se encuentra situado a campos altos, comenzado desde 1.1 ppm y terminando en 2.4 ppm. El conjunto restante de señales que parte desde 3.8 ppm hasta 6.5 ppm es producido por la parte central de la molécula conocida como núcleo de taxano de naturaleza policíclica; dicho núcleo está compuesto por 3 anillo no aromáticos (fig. 4.27), el primero está constituido de 5 miembros, el segundo de 8 y el tercero de 6.

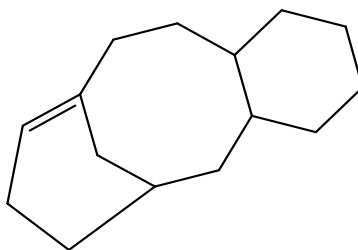


Fig. 4.26. Núcleo de taxano.

Una vez asignados todos los desplazamientos en el espectro de resonancia, se pueden establecer ciertos patrones que ratifiquen la formación del complejo entre el fármaco y el polímero, ya que al existir interacciones intermoleculares entre estas entidades es de esperarse que el ambiente químico cambie y que consecuentemente la respuesta en la espectroscopia de resonancia también lo haga, por lo tanto los patrones a seguir en este caso son los desplazamientos que en teoría sufrirán las señales del fármaco en el espectro del complejo como lo demostraron Van Gender y colaboradores⁷⁰, los cuales estudiaron y caracterizaron mediante resonancia sistemas huésped-anfitrión.

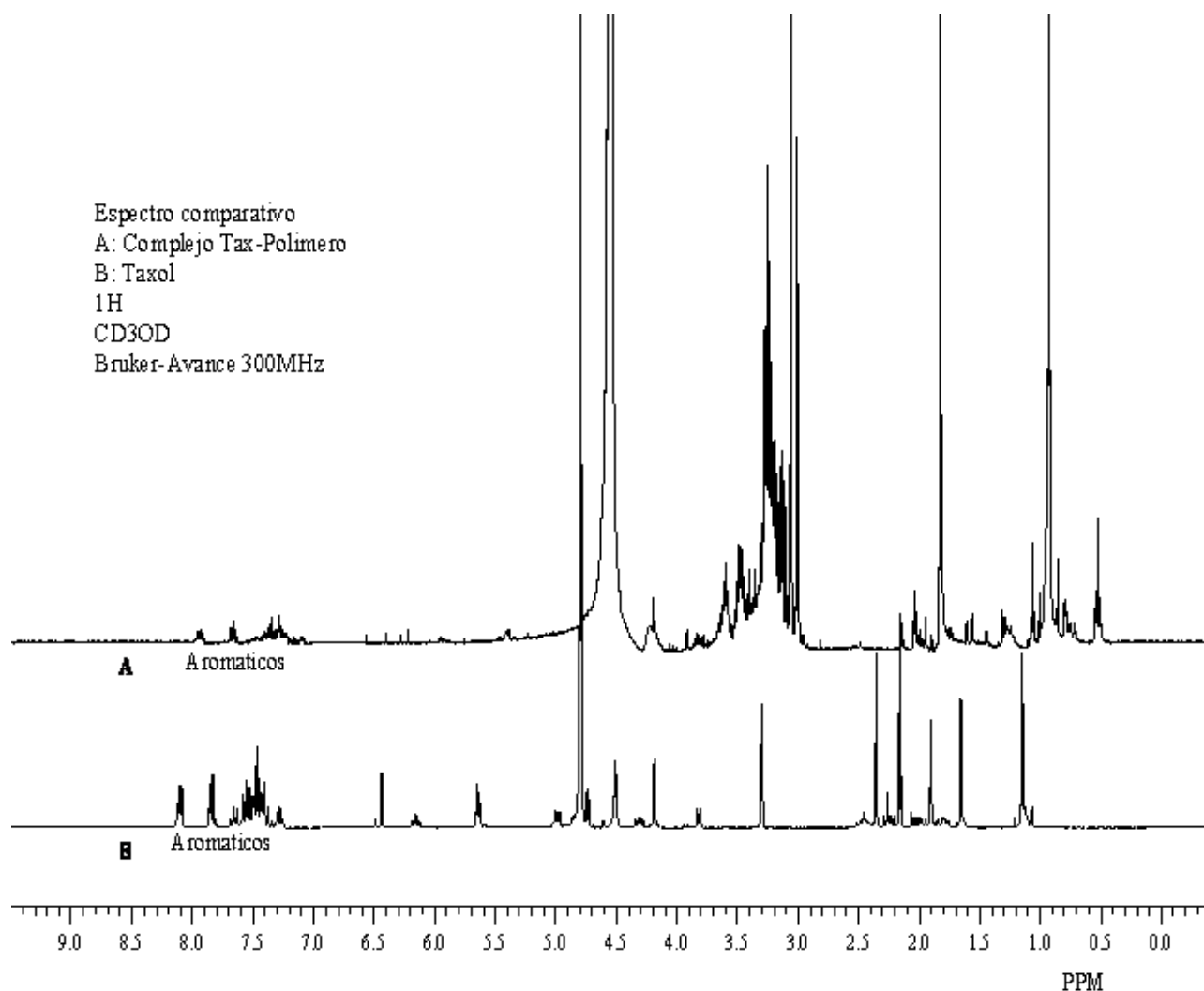


Fig. 4.27. RMN ¹H comparativo (A) complejo taxol-polímero, (B) taxol.

De la figura anterior, se puede observar que el espectro correspondiente al complejo muestra las señales asociadas a las cadenas alifáticas provenientes de los esteres del polímero en 0.9 ppm y 1.0 ppm, muy cercanas a éstas aparecen los hidrógenos de metilo (CH₃) del taxol, desde 1.5 ppm hasta 2.2 ppm, la región comprendida entre 3.0 ppm hasta 5.0 ppm muestra múltiples señales tanto para el esqueleto molecular del polímero (hidrógenos de CH y CH₂ en la región de 3.0 ppm-3.5 ppm), así como las señales del anillo de taxano del fármaco (región en 3.2 y 6.4 ppm, la mayoría traslapadas con la señales del polímero). Por último, en la región de 7.4 ppm a 7.9 ppm se aprecia el juego de señales correspondiente a los anillos aromáticos del fármaco.

Haciendo la comparación de espectros y basándonos en las señales provenientes de los anillos aromáticos (señales carentes de traslape), se puede apreciar que existe un desplazamiento de señales de aproximadamente 0.3 ppm del espectro A frente al B.

Analizando a detalle resulta claramente visible que las señales de aromáticos en el espectro A comienzan en 7.0 ppm mientras que en el correspondiente al taxol lo hacen en 7.3 ppm; por su parte las señales correspondientes al núcleo de taxano también sufren este desplazamiento, aunque no es claramente visible debido a los traslapes generados por las señales del polímero.

Este desplazamiento de señales observado en el espectro del complejo frente al del taxol, confirma la existencia de una estructura supramolecular tipo huésped-anfitrión con interacciones intermoleculares; ya que, en el caso contrario, si solo se tuviese una mezcla física entre el polímero y el fármaco dichos desplazamientos de señales no existirían debido a que no presentarían interacciones importantes entre sí⁷⁰.

La cuantificación del número aproximado de moléculas encapsuladas de fármaco por parte del polímero se obtuvo mediante las integraciones del espectro de hidrogeno (fig. 4.28). Para ello, se seleccionaron señales específicas provenientes de cada molécula y se calculó la relación molar correspondiente.

Calorimetría Diferencial de Barrido.

Siguiendo con el esquema de caracterización, se utilizó la técnica de calorimetría diferencial de barrido o *DSC* con el fin de evaluar las propiedades térmicas tanto del complejo formado así como de los precursores.

Dicha técnica resulta una herramienta muy útil en la caracterización de sistemas de esta naturaleza, ya que puede mostrar indicios de las interacciones existentes entre las moléculas de polímero y fármaco; cualquier cambio drástico o abrupto en las transiciones termodinámicas observadas en los termogramas adquiridos es indicador de que dichas interacciones están presentes⁷¹, lo que confirma la obtención del complejo huésped-anfitrión.

Los experimentos se llevaron a cabo en un equipo DSC Universal V4.5A TA Instruments USA con una temperatura inicial de -100°C , con una velocidad de calentamiento de 10°C por minuto.

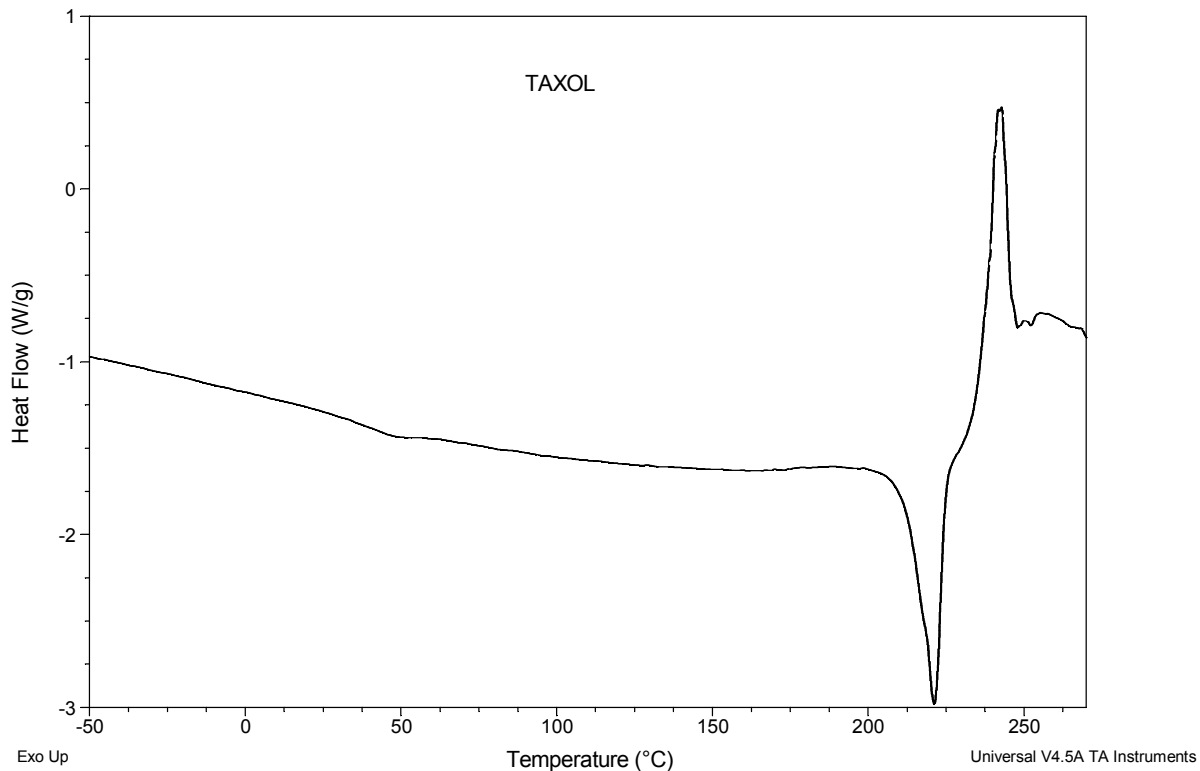


Fig. 4.28. DSC termograma del taxol.

Como se puede observar en el termograma anterior, el taxol muestra la transición endotérmica debida al punto de fusión a 221°C y una segunda transición, esta vez exotérmica la cual es asociada a la descomposición del material a 240°C .

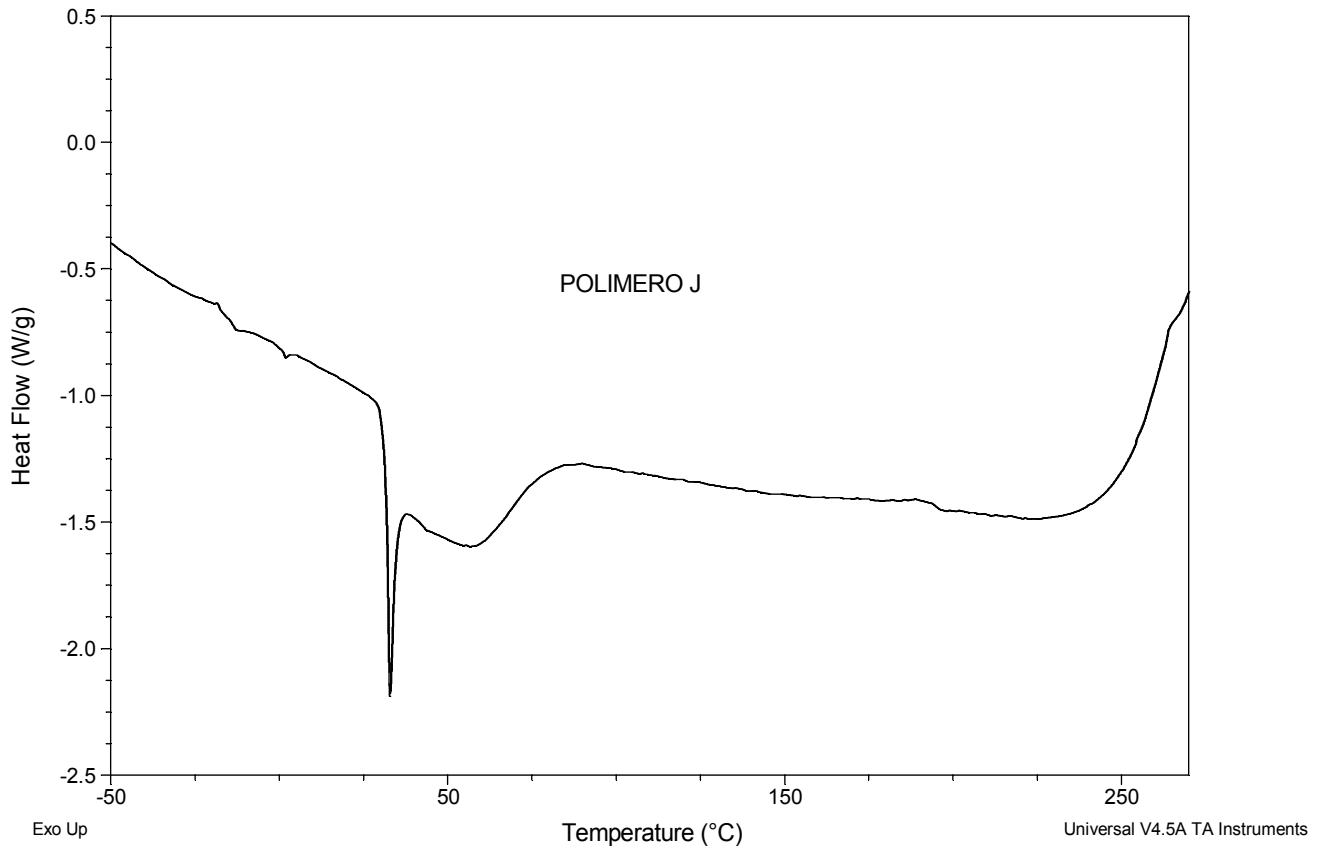


Fig. 4.29. DSC termograma del polímero J.

El termograma del polímero J muestra la transición vítrea en aproximadamente -10°C , la transición debida a su fusión se observa en 31°C , es relevante hacer notar que el material al no presentar ninguna transición exotérmica (temperatura de cristalización) se puede clasificar como un polímero completamente amorfo.

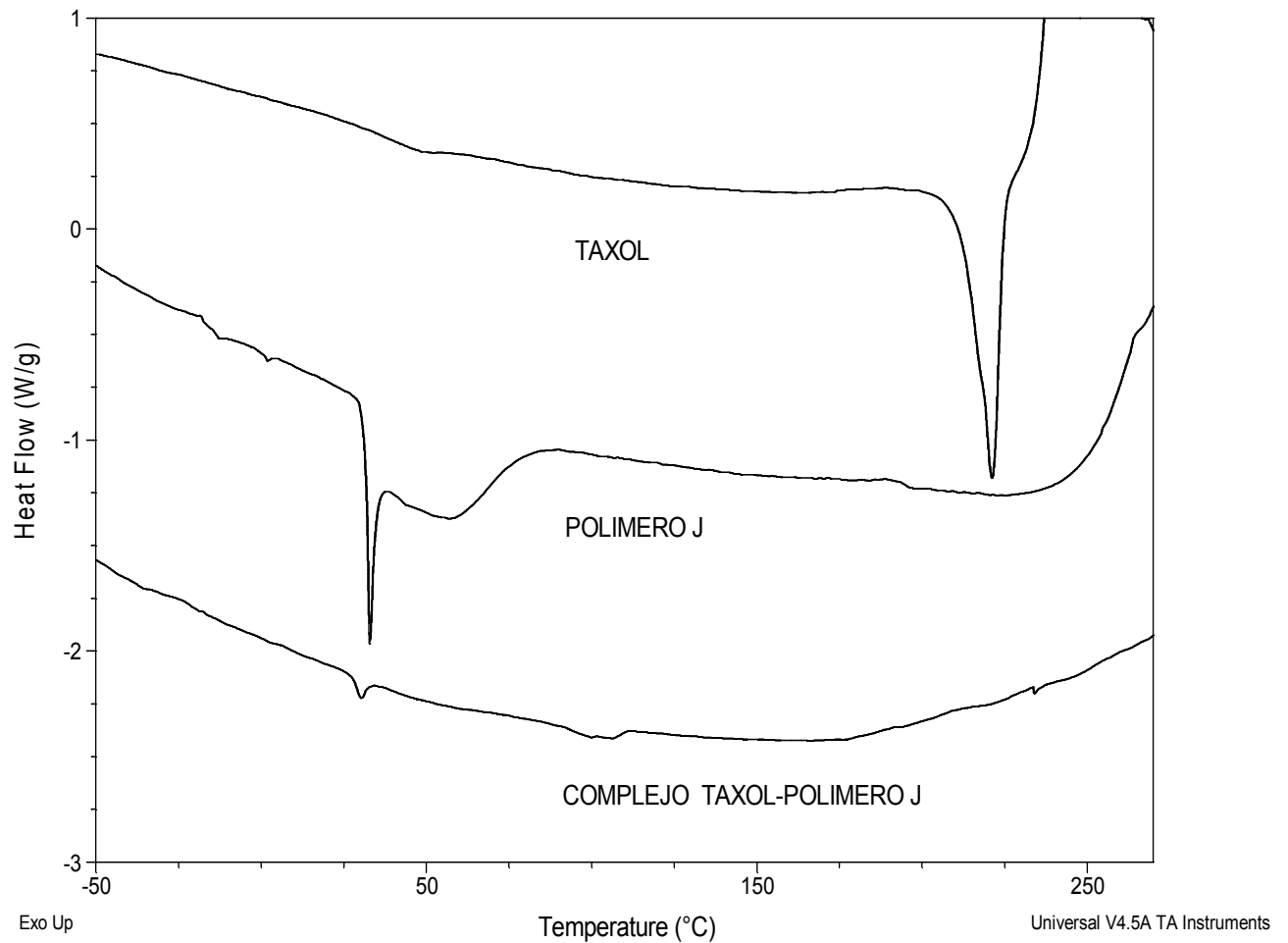


Fig. 4.30. DSC termograma comparativo del polímero J, complejo y taxol.

En el termograma de la figura 4.30 se hace una comparación de las curvas de DSC del taxol, el polímero sin fármaco y el complejo formado. Se observa que en este último, la transición de fusión del polímero sufre un ligero cambio de posición, mostrándose ahora a 29°C, mientras que la fusión del taxol se ve totalmente abatida, lo que prueba completamente que el compuesto obtenido si tiene características de un complejo huésped-anfitrión.

Otro aspecto interesante es que la pendiente referida a la Tg del polímero tiene la misma tendencia en la curva del complejo, indicio de que la Tg del polímero no fue influenciada por el procedimiento de preparación.

Hasta ahora todas las técnicas de caracterización empleadas han concordado en que la obtención del complejo se ha llevado a cabo de manera exitosa; sin embargo estos resultados se consideran cualitativos ya que aun no se sabe si en realidad estos complejos huésped-anfitri se forman con la relación estequiométrica usada o si las interacciones presentes la alteran. Para superar esta incógnita se pensó en el uso de la espectroscopia de UV-VIS y aplicar la ley de Lambert-Beer, sin embargo, no fue posible ya que los espectros de ambas entidades (polímero y taxol) tienen su máximo de absorbancia en la misma región, alrededor de 230 nm, por lo que cualquier lectura del complejo enmascararía la absorbancia máxima del fármaco, la cual es clave para determinar la concentración y la relación molar.

A continuación se muestran los espectros de UV-VIS del polímero J y el fármaco.

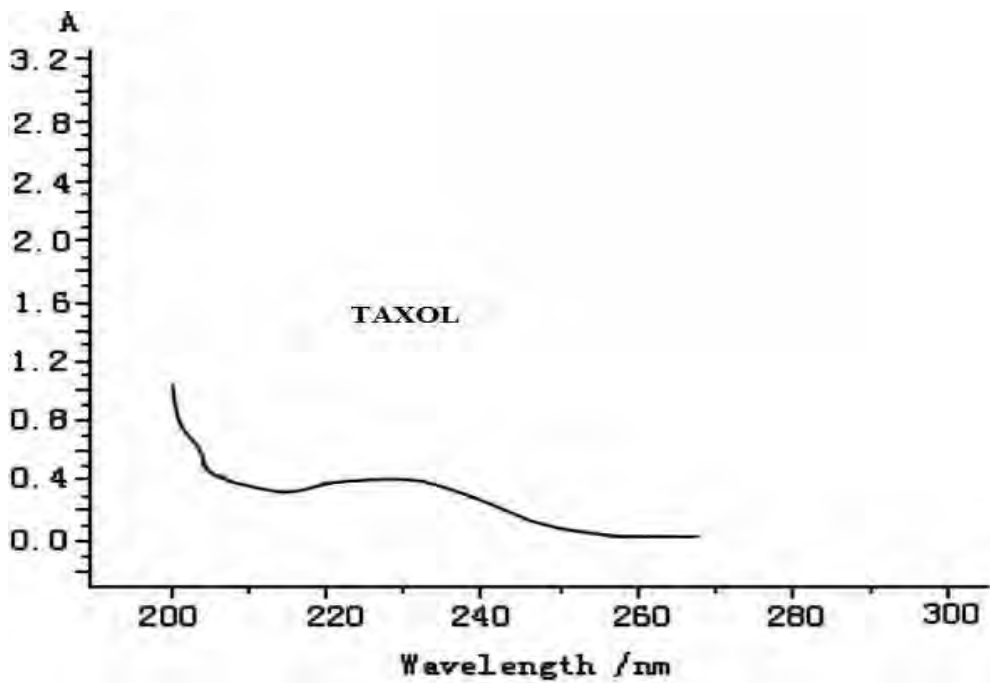
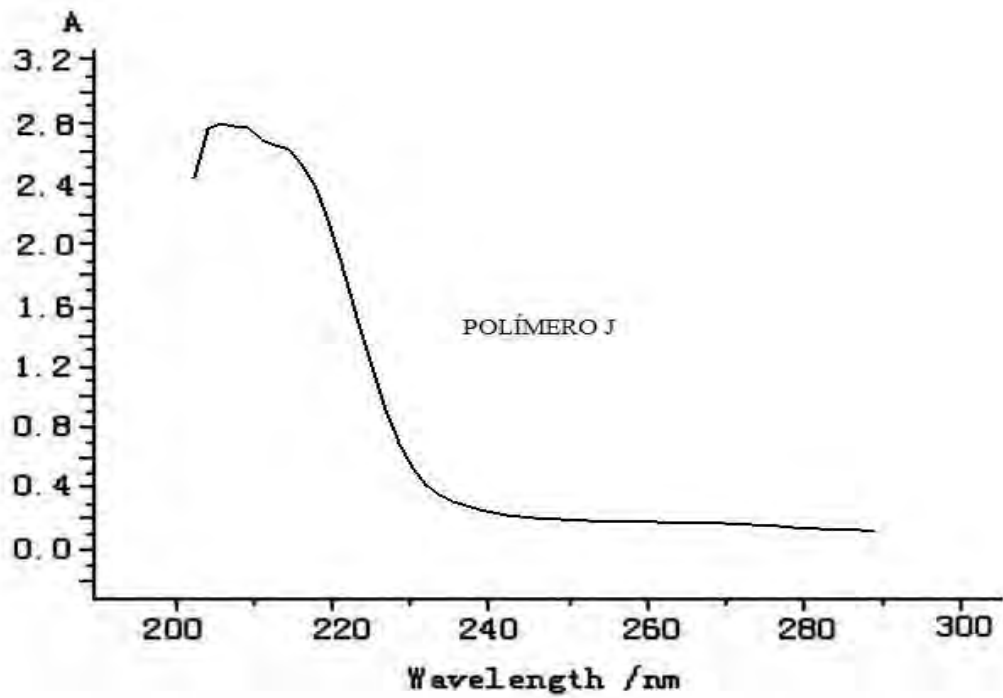


Fig. 4.31 Espectros de UV-VIS, del polímero J y Taxol.

CAPITULO V.

CONCLUSIONES.

Con el presente estudio fue posible concluir que:

- La síntesis de los polímeros hiper-ramificados a base de glicidol: poliglicidol con núcleo alcohol 3,5-dihidroxibencílico (A), poliglicidol con núcleo floroglucinol (B) y poliglicidol con núcleo epóxido (C), ha sido efectuada con éxito, gracias a la polimerización por apertura de anillo (ROMBP), usando metóxido de potasio como iniciador, obteniendo pesos moleculares M_n , en el intervalo de 3000 a 5000 con polidispersidades que van de 1.26 a 1.79 y grados de ramificación de entre 0.523 a 0.585.

- Los polímeros: poliglicidol tritilado con núcleo alcohol 3,5-dihidroxibencílico (D), poliglicidol tritilado con núcleo floroglucinol (E) y poliglicidol tritilado con núcleo epóxido (F) se obtuvieron con buenos rendimientos gracias al uso de DMAP en vez de piridina. Dicho cambio eleva el rendimiento de 22% a 88%, 88% y 78%, acortando los tiempos de reacción significativamente.

Para estos compuestos, el hecho de presentar un porcentaje de grupos trifenilo con relación a los grupos OH presentes en el esqueleto molecular, los clasifica como compuestos con propiedades anfífilas capaces de encapsular preferentemente sustancias polares en medios orgánicos, ya que al tener anillos aromáticos situados en la periferia, éstos se expondrían al entrar en contacto con medios no polares, mientras que la parte interna, rica en grupos alcohol, presentaría interacciones con moléculas de la misma polaridad formando complejos huésped-anfitrión.

- La esterificación que dio lugar a los polímeros: poliglicidol esterificado con núcleo alcohol 3,5-dihidroxibencílico (G), poliglicidol esterificado con núcleo floroglucinol (H) y poliglicidol esterificado con núcleo epóxido (I), se llevó a cabo con el cloruro de palmitoílo con una longitud de cadena de 16 carbonos, con rendimientos del 80% al 90%, modificando totalmente la solubilidad exhibida inicialmente por los polímeros.

- La desprotección incompleta de los polímeros tritilados y esterificados de más alto peso molecular (G, H e I), obligó a buscar rutas alternas de síntesis, siendo la esterificación controlada la alternativa más viable. Esta nueva ruta permite la obtención en un solo paso de reacción de las nanocápsulas anfifílicas con rendimientos aceptables (70% - 75%), esterificando 1/3 de los grupos OH con lo que se generan los polímeros esterificados: poliglicidol esterificado parcial con núcleo alcohol 3,5-dihidroxibencilico (J), poliglicidol esterificado parcial con núcleo floroglucionol (K) y poliglicidol esterificado parcial con núcleo epóxido (M), que presentan una distribución de sus partes polares y no polares, situación que se minimiza con el uso de la ruta de síntesis original.
- Los cálculos de análisis conformacional hechos para los polímeros, proporcionaron además de las estructuras de menor energía (o más probables), la relación polímero-fármaco, mostrando que una molécula de polímero es capaz de encapsular a 3 moléculas de fármaco en su interior, mediante interacciones intermoleculares, exhibiendo un equilibrio de dominios en las superficies hidrofóbicas e hidrofílicas generadas (fig 4.22 A).
- Los resultados de las evaluaciones citotóxicas ponen de manifiesto que el candidato ideal para la formación del compuesto huésped-anfitrión es el polímero J ya que éste fue el único de los 3 candidatos que no mostró actividad alguna frente a las líneas celulares sanas; por otro lado, presenta una inhibición considerable en líneas celulares de cáncer colorectal, por lo que es posible que al incorporar el fármaco a este polímero se pueda presentar un efecto sinérgico hacia la inhibición del crecimiento celular en este tipo de cáncer.

El caso del polímero K resultó en extremo interesante ya que, como demostraron los resultados, dicho polímero tiene una mediana actividad frente a líneas celulares sanas, pero en las líneas celulares provenientes de los diferentes tipos de cáncer este compuesto mostró una muy marcada actividad, lo cual fue inesperado ya que este compuesto difiere muy poco estructuralmente hablando con el polímero J, por lo que será objeto de investigación para dilucidar el mecanismo por el cual ocurre su citotoxicidad.

- Se logró sintetizar con éxito el complejo huésped-anfitrión entre la nanocápsula anfifílica (polímero J) y el taxol, teniendo como fuerza motriz las interacciones intermoleculares (electrostáticas, puentes de hidrógeno) que, asistidas por la flexibilidad de las cadenas de carbonos alifáticos, favorecen el encapsulamiento del sustrato, siendo éste completamente soluble en agua, con lo cual se cumple el objetivo planteado al inicio y valida la hipótesis planteada.

Desafortunadamente las técnicas de caracterización solo fueron cualitativas y la técnica cuantitativa (UV-VIS) para este compuesto no pudo concretarse debido a que el máximo de absorbancia del fármaco se presenta a una longitud de onda de 230 nm, mientras que el máximo del polímero está a una longitud de onda de 220 nm y decrece hasta 250 nm, por lo que cualquier lectura del complejo enmascararía la absorbancia máxima del fármaco, la cual es clave para determinar la concentración y corroborar la relación molar.

- Finalmente, con este trabajo se comprobó que los polímeros hiper-ramificados funcionalizados de manera específica son una seria alternativa a los dendrímeros en el encapsulamiento de fármacos, ya que mientras la obtención de estos últimos sugiere el uso de varios pasos de reacción, éstos se minimizan usando este tipo de polímeros y por lo tanto su relación costo-beneficio.

CAPITULO VI.

PERSPECTIVAS.

Como consecuencia de este trabajo, queda abierta una nueva etapa de investigación que consistirá en:

- Comprobar la relación estequiométrica entre polímero-fármaco, buscando una técnica de caracterización alterna a UV-VIS.
- Realizar estudios biológicos vinculados a la liberación controlada del fármaco en sistemas vivos.
- Evaluar el encapsulamiento de sustratos por los polímeros D, E y F (tritolados) ya que estudios de sorción han demostrado que estos compuestos pueden ser capaces de retener moléculas pequeñas.
- La aplicación de los polímeros J, K y M en el área de saneamiento de mantos acuíferos por captación de hidrocarburos, que al ser hidrofóbicos, en un medio hidrofílico podrían ser encapsulados por los polímeros mencionados y generar compuestos huésped-anfitrión.

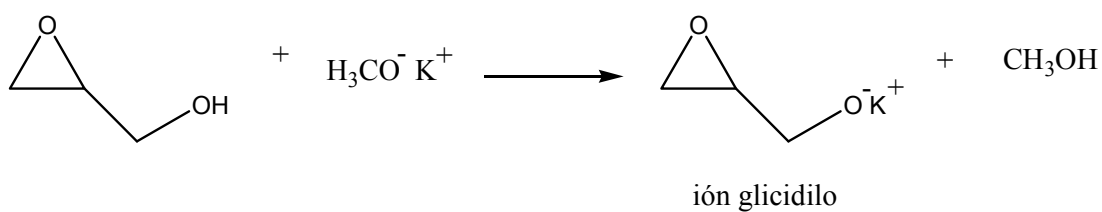
ANEXO I.

MECANISMOS DE REACCIÓN.

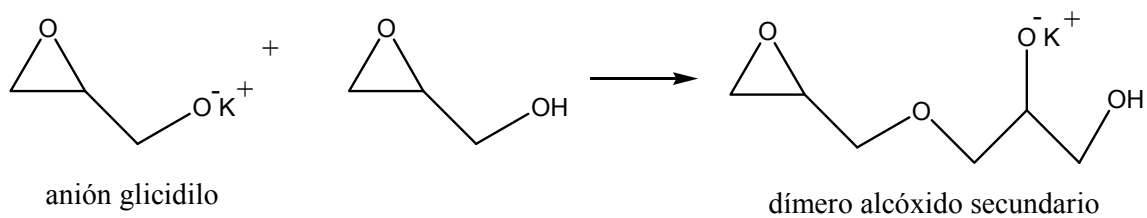
A continuación se describen los mecanismos de las reacciones empleadas en la síntesis de los compuestos obtenidos.

Mecanismo de polimerización aniónica del glicidol.

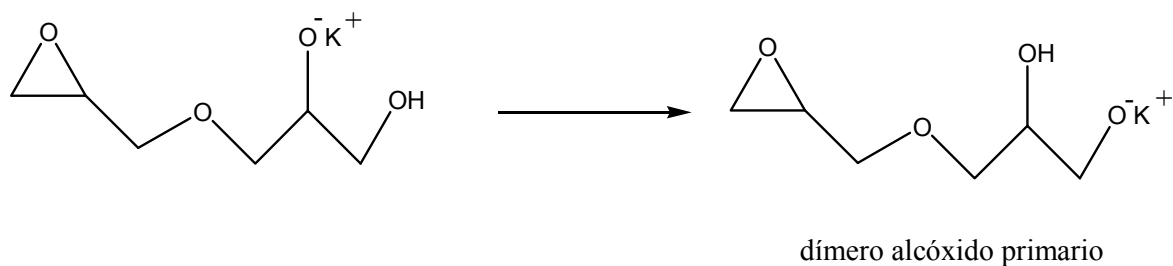
Iniciación:



Propagación



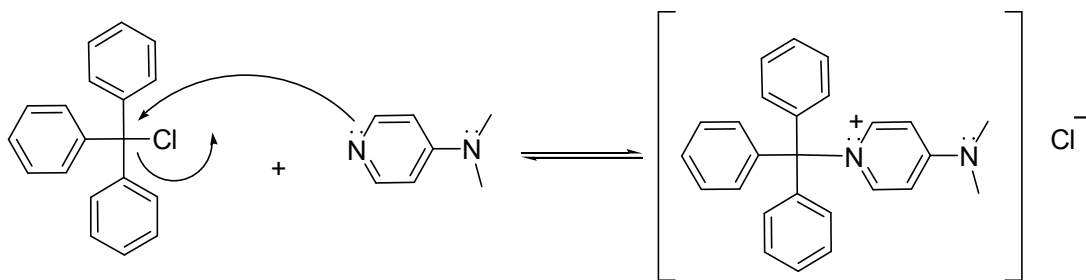
Transferencia intramolecular



Tritilación:

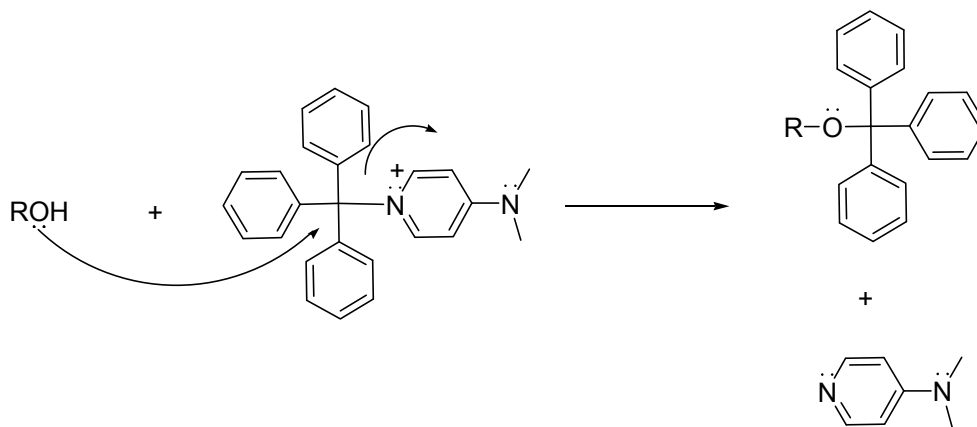
El mecanismo de tritilación se lleva a cabo de manera análoga a la acilación.

En un primer paso el nitrógeno del DMAP ataca al carbono cuaternario generando una sal de piridonio :



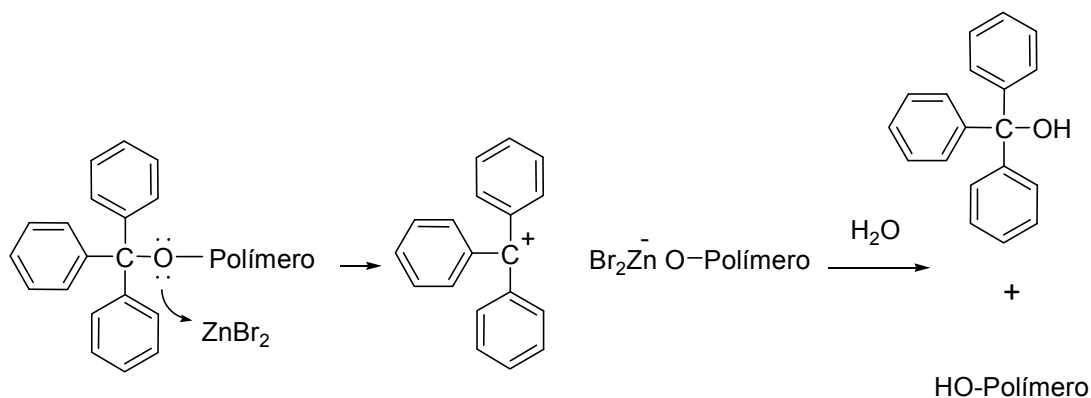
En este punto la presencia de trietilamina en el medio desplaza el equilibrio hacia el producto, al captar el ácido clorhídrico.

El segundo paso incluye el ataque del par electrónico de oxígeno proveniente del grupo alcohol hacia el carbono cuaternario, dando como resultado el alcohol tritilado y DMAP.



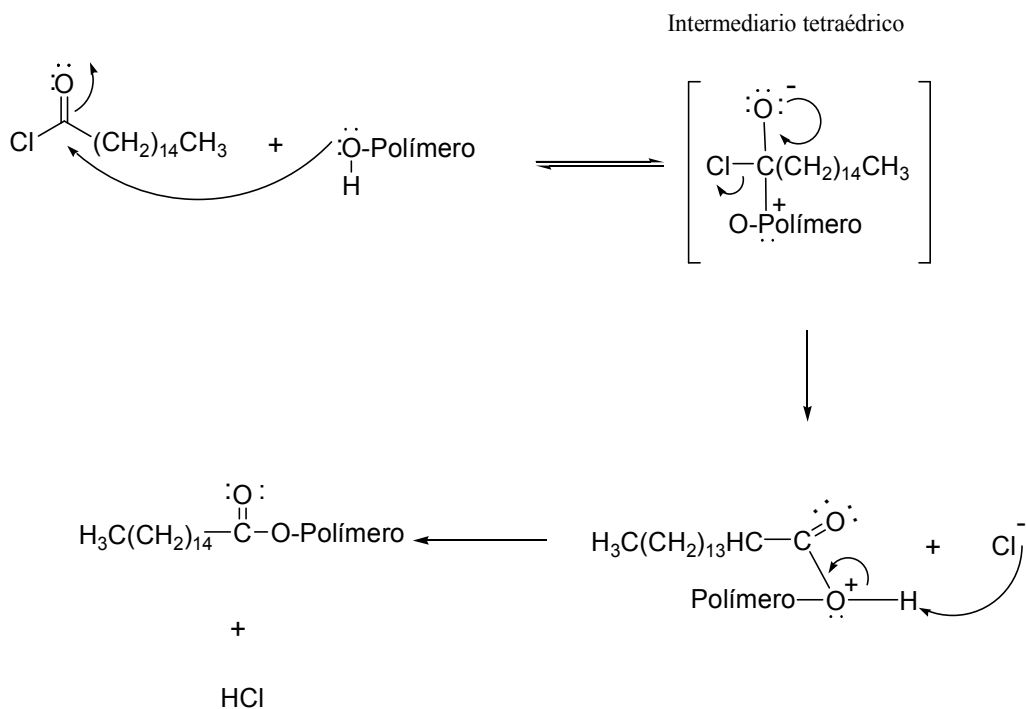
De tritilación.

La remoción del grupo protector cloruro de trifenilmetiléter usando un ácido de Lewis como el bromuro de zinc procede de la siguiente manera:



Esterificación:

En la esterificación de alcoholes, el ataque del grupo alcohol al carbonilo electrofílico del cloruro de palmitoilo da un intermediario tetraédrico, la pérdida del cloruro y la desprotonación forman el éster correspondiente.



ANEXO II.

MODELADO MOLECULAR.

Con el objetivo de predecir el comportamiento de las moléculas y definir su aplicación es necesario llevar a cabo una serie de trabajos experimentales, los cuales representan recursos tanto materiales como humanos, por otra parte la complejidad del estudio depende en gran medida de la cantidad de moléculas y del tipo de enlace presente⁷².

Para simplificar dichos experimentos o bien corroborar los resultados obtenidos se ha utilizado la química computacional, la cual representa, en la actualidad, más que una herramienta es una área de investigación en constante crecimiento debido al avance tecnológico tanto en software como en hardware.

El modelado molecular dentro de la química computacional se basa en las leyes fundamentales de la física, con el objeto de adquirir información de las moléculas y reacciones que no son tan fáciles de lograr de manera experimental.

Existen diferentes niveles de aproximación, los cuales representan la complejidad o cantidad de propiedades que se consideran durante los cálculos.

El modelado molecular se puede dividir en 3 niveles de teoría:

1. Mecánica molecular
2. Dinámica molecular
3. Métodos basados en la mecánica cuántica:
 1. Métodos semi-empíricos
 - B) Métodos AB-initio.
 - Métodos de campo autoconsistente Hartree-Fock (H-F).
 - Teoría de perturbaciones. Moller-Plesset (MPn).
 - Teoría de funcionales de la densidad (DFT).

Mecánica molecular.

Evalúa la energía de las moléculas usando para ello la física clásica, las barreras de energía son específicas para cada tipo de enlace y para cada tipo de ángulo en particular. Sin embargo, los cálculos de mecánica molecular no tratan explícitamente los electrones y sólo consideran la interacción de estos con el núcleo, por lo que con este método no se pueden estudiar procesos donde predomine el efecto nuclear electrónico (MM3, Sybyl).

Este método se caracteriza por definir un campo de fuerza, el cual tiene las siguientes consideraciones.

- Existe un conjunto de ecuaciones que definen la variación de la energía potencial de la molécula con respecto a sus componentes atómicos.
- Los parámetros o fuerzas se mantienen constantes (longitud y ángulos de enlace).

El campo de fuerza representa un modelo matemático que describe la energía potencial de las moléculas y sus relaciones en términos de sus interacciones de atracción y repulsión entre los átomos que la constituyen⁷³.

Dinámica Molecular.

En la dinámica molecular se generan configuraciones sucesivas de un sistema mediante las leyes de movimiento. El resultado es una trayectoria que especifica su variación con el tiempo, la posición y la velocidad de las partículas.

Como característica de la simulación en dinámica molecular se encuentra la longitud de la trayectoria calculada en un tiempo determinado. Esto nos permite estudiar propiedades que cambian dentro de intervalos cortos de tiempo, como las fluctuaciones de energía y posiciones atómicas.

Mecánica Cuántica.

La mecánica cuántica define la energía de una molécula mediante la resolución aproximada de la ecuación de Schroedinger:

$$H \Psi = E \Psi$$

Donde:

H= Operador Hamiltoniano.

E= Energía.

Ψ = Función de onda.

Cada método emplea una manera diferente en el cálculo del operador hamiltoniano, así como la forma de representación de los orbitales y de ello depende el tipo de evaluación realizada para el cálculo de la energía.

La energía de una molécula puede ser calculada con métodos de estructura electrónica que se evalúan de acuerdo a diferentes teorías las cuales tienen sus correspondientes limitaciones, suposiciones y grado de sofisticación.

Estas teorías se pueden clasificar como:

Ab-initio.

Métodos Hartree-Fock.

Métodos post Hartree-Fock.

Semi-empíricas.

Métodos Ab-initio.

Sus cálculos se basan en las leyes de la mecánica cuántica. Se representan a los orbitales moleculares como una combinación lineal de orbitales atómicos y cada electrón en la molécula es considerado explícitamente, los programas con esta rutina de cálculo son GAUSSIAN, GAMESS y JAGUAR entre otros.

Métodos post Hartree-Fock.

Son aquellos métodos que incluyen el cálculo de la correlación electrónica (interacción electrón-electrón).

Existen algunos métodos que calculan la energía de correlación, los cuales son clasificados de la siguiente manera:

Interacción de configuraciones (CI).

Método de las perturbaciones (MBPT.- Teoría de perturbaciones para múltiples cuerpos),
(MPPT.- Teoría de las perturbaciones de Moller Plesset. MP2).

Coupled clusters (CC).

Métodos semi-empíricos.

Son similares a lo Ab-initio, aunque estos solo tratan explícitamente a los electrones de valencia y los electrones de capa interna como una constante, entre los cuales encontramos los siguientes métodos:

CNDO (completed Neglect Differential Overlap), INDO (Intermediate Neglect of Differential Overlap), MINDO (Modified Intermediate Neglect of Differential Overlap), los métodos mas utilizados en la actualidad son: MNDO (Modified Neglect of Differential Overlap), AM1 (Austin Model 1), PM3 (Parametric Method Number 3), incluidos en el paquete MOPAC.

Los métodos semi-empíricos no consideran algunas integrales de solapamiento de orbital y de repulsión electrónica, sustituyendo el cálculo por parámetros obtenidos experimentalmente o por cálculos hechos mediante algún método Ab-initio.

Los cálculos realizados en la química computacional nos dan por resultado información importante como:

La energía de una estructura molecular (arreglo espacial de los átomos).

La optimización de la geometría, determinando la estructura molecular de más baja energía.

Frecuencias de vibración de las moléculas.

Etc.

Funcionales de la densidad.

Es un método de cálculo de estructura electrónica que toma en cuenta correlaciones electrónicas como función de las densidades electrónicas.

En DFT es conceptualmente útil dividir la energía electrónica E de un sistema químico como:

$$E = E_T + E_V + E_J + E_X + E_C.$$

Donde:

E_T = Energía cinética de los electrones.

E_V = Energía coulombica de los electrones debido a la atracción del núcleo.

E_J = Energía coulombica de los electrones que tendrían en su propio campo si se movieran de manera independiente.

E_X = Energía de intercambio de los electrones.

E_C = Energía de correlación electrónica.

Estos dos últimos términos son importantes ya que nos permiten introducir y tomar en cuenta la energía de correlación electrónica con lo que se mejoran los resultados obtenidos por Hartree-Fock.

REFERENCIAS:

1. Newkome, G.; Moorefield, C.; Vogtle F. *Dendritic Molecules*, VCH publishers, Weinheim Germany, 2- 12, 1996.
2. Young H. Kim. *Journal of Polymer Science: Part A.: Polymer Chemistry* **1998**, *36*, 1685-1698.
3. Raúl Salazar Franco, *Polímeros Hiper-ramificados con Grupos Terminales Trialkilamino*. Tesis 2001.
4. Fomine S.; Fomina L.; Guadarrama P. *Res. Adv. In Macromolecules* **2000**, *1*, 57-60.
5. Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J. R.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S. *Polym. J.* **1985**, *17*, 117-132.
6. Buhler, E.; Wehner, W.; Vogtle, F. *Synthesis* **1978**, *2*, 155-158.
7. Sayamaran, M.; Fréchet, J. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12996-12997.
8. Tomalia D. A.; Swanson, D. R.; Hedstrand, D. M. *Polymers Preparation* **1992**, *33*, 180-189.
9. Flory P. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 2718-2720.
10. Kim Y. H. US. Patent 4857630, 1987.
11. Plummer, J. G.; Garamzegi. L. *Chem Mater.* **2002**, *14*, 486-488.
12. Sunder, A.; Heinemann, J. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 14, 2499-2506.
13. Kim, Y. H.; Webster, O. W. *Polymeric Preprints (American Chemical Society, Division of Polymer Chemistry)* **1998**, *20*, 310.
14. Ishida, Y. *Macromolecules* **2000**, *33*, 2832-2838.
15. Suzuki, M.; Saegusa, T.; *Macromolecules* **1992**, *25*, 7071-7072.
16. Sunder, A.; Frey, H. *Macromolecules* **1992**, *32*, 4240-4246.

17. Fréchet, J. M. *Science* **1995**, *269*, 1080-1083.
18. <http://dendrimers.cas.usf.edu/Research/index.php3>
19. Mansfiel, M.; Klushin, L. *Macromolecules* **1993**, *26*, 4262-4262.
20. Wooley, K. *Journal of American Chemical Society* **1997**, *119*, 53-58.
21. Bosman, A. W.; Jansen, H. M.; Meijer, E. W. *Chemical Review* **1999**, 1665-1688.
22. Rainer, H.; Sunder, A.; Hebel, A. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2002**, *4*, 112-119.
23. Wooley, K.; Hawker, C. J.; Fréchet, J. M. *Pure and Applied Chemistry*, **1994**, 1627-1645.
24. Newkome, G. R. *Advances in Dendritic Macromolecules*, JAI Press., **1994**, vol.1.
25. Sunder, A.; Mulhaupt, R.; Frey, H. *Advanced Materials* **2000**, *12*, issue 3, 235-239.
26. Fréchet, J. M.; Hawker, C. J. *Journal of American Chemical Society*, **1991**, 4583-4588.
27. Frey, H.; Hoter, D. *Acta Polymerica* **1999**, *50*, 67-76.
28. Inoue, K. *Progress in Polymer Science* **2000**, *25*, 453-571.
29. Sunder, A.; Mulhaupt, R.; Frey, H. *Macromolecular Symposium*, **2000**, *153*, 187-196.
30. Sunder, A.; Frey, H.; *Macromolecules* **1992**, *32*, 4240-4246.
31. Sandler, S. R.; Berg, F. R. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **1966**, *4*, 1253-1259.
32. Sunder A. *Macromolecular Symposium*, **2000**, *153*, 187-196.
33. Tokar, R.; Kubisa, P.; Penczek, S. *Macromolecules* **1994**, *27*, 320-322.
34. Schroder; Muller; Arndt; *Polymer Characterization*, **1982**, Henzer Publishers, Munich
Vienna, New York.
35. Fried, Joel R. *Polymer Science and Technology*, Prentice Hall, Ltd.USA **1995**,
36. Reek, J. N. H.; Van Leeuwen, P. W. N. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1828-1849.

37. Vögtle, F.; Fischer M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 884-905.
38. Fréchet, J. M.; Tomalia D. A. *Dendrimers and Other Dendritic Polymers.*, John Wiley & Sons, Ltd. USA **2001**.
39. Newkome, G. R.; Weis, C. D.; Childs, B. J. *Designed Monomers and Polymers* **1998**, *1*, 3-14.
40. Yates, C. R.; Hayes, W. *European Polymer Journal*, **2004**, *40*, 1257-1281.
41. Heldman, A.; Cheng, L.; Jenkins, G.; Heller, P. *Circulation*, **2001**, *103*, 2289-2295.
42. Rowinsky, K.; Donehower, R. C. *New Engl. J. Med.* **1995**, *332*, 1004–1014.
43. Spencer, C. M.; Faulds, D. *Drugs* **1994**, *48*, 794–847.
44. Horwitz, S. B. *Trends Pharmacol. Sci.* **1992**, *13*, 134–136.
45. Chang, Y.; Cesarman, E.; Pessin, M. S.; Lee, F.; Culpepper, J.; Knowles, D. M. & Moore, *Science*, 1994, *266*, 1865-1869.
46. Tustian, A. K.; Schneider, B.; Lalji, S.; Kessler, D.; Worah, D. *Pharmaceutical Research* 2000, *17*, 175-182.
47. Chul-Kim, S.; Wook, D.; Ho Shim, Y.; Seok, J.; Hyo Seo, M. *Journal of Controlled Release* **2001**, *72*, 191–202.
48. Ceruti, M.; Crosasso, P.; Brusa, P.; Arpicco, S.; Dosio, F.; Cattel, L. *Journal of Controlled Release* **2000**, *63*, 141–153.
49. Feng, S. S.; Huang, G. *Journal of Controlled Release* **2001**, *71*, 53–69.
50. Mu L.; Feng, S.S. *Journal of Controlled Release* **2003**, *86*, 33–48.
51. Alcaro, S.; Ventura, C. A.; Paolino, D.; Battaglia, D.; Ortuso, F.; Cattel, L.; Puglisic, G.; Fresta, M.; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2002**, *12*, 1637–1641.
52. Rodriguez, D. *Actas Urol Esp.* **2004**, *28*, no. 10, 714-731.
53. Angelova, N.; Hunkeler, D.; *Trends Biotechnol* **1999**, *17*, 409-421.

54. Vandenberg, E. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **1985**, *23*, 915-949.
55. Dworak, A.; Tokar, R.; *Macromolecules* **1994**, *27*, 320-322.
56. Uchegbu, I.; Schatzlein, A., *Polymers in Drug Delivery*, **2006**, CRC Press, United States.
57. Frey, H.; Holtel, D.; *Macromolecules* **1998**, *31*, 3740-3801.
58. Schulz, G. V. *Z. Phys. Chem.* **1939**, *B43*, 25.
59. Wuts, P. G. M.; Greene, T. W., *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley-Interscience, United States of America, 2006.
60. Yoshikazu, K.; Yumiko, N.; *Polymer* **2007**, *48*, 4683-4690.
61. Gilham, P. T.; Khorana, H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 5986-5988.
62. Kohli, V.; Blöcker, H.; Köster, H. *Tetrahedron Letters*, **1980**, *21*, 2683-2686.
63. Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; Tirado-Rives, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11225-11236.
64. Kolossvary, I.; Guida, W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5011-5019.
65. Chang, G.; Guida, W. C.; Still, W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4379-4386.
66. Saunders, M.; Houk, K. N.; Wu, Y. D.; Still, W. C.; Lipton, M.; Chang, G.; Guida, W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1419-1427.
67. Maestro v 6.5.007; Schrödinger Inc., New York, **2004**.
68. Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paul, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. *Journal of the National Cancer Institute* **1991**, *38*, 757-766.
69. Namazi, H.; Adeli, M. *Biomaterials* **2005**, *26*, 1175-1183.
70. Van Genderen, M. H. P.; Banerjee, D.; Broeren, M. A. C.; Meijer, E. W.; Rinaldi, P. L. *Macromolecules* **2004**, *37*, 8313-8318.

71. Koneracka, M.; Zavisova, V. *J.Phys.Condens.Matter.* **2008**, *20*, ,204151.
72. Matthew, F.; Schlecht. *Molecular Modeling on the PC*, Wiley, VCH, **1998**.
73. Foresman, J. B. *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*, -Gaussian, Inc. Pittsburg, PA, Second Edition, **1996**.