

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA  
INDUSTRIAL DE BARCELONA

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CATALUÑA

**“Synthesis, characterization and biomedical  
applications of microbial polymalic  
and polyglutamic acids derivatives.”**

Presentado por: José Antonio Portilla Arias

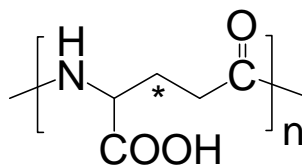
Trabajo realizado bajo la dirección de los Drs.  
Sebastián Muñoz Guerra y Montserrat García Álvarez

Barcelona, Febrero 2008

**Polímeros biotecnológicos funcionalizados para  
aplicaciones biomédicas II. El ácido poli( $\gamma$ -glutámico)**

### 3.1. Introducción

El PGGA es un nylon 4 sustituido en el carbono 4 con un grupo carboxilo. De manera informal se le denomina ácido poli( $\gamma$ -glutámico) indicando con ello que el enlace peptídico se establece entre el grupo amino y el grupo carboxilo en posición  $\gamma$ . La nomenclatura IUPAC de esta sustancia es: poli[imino-1-(2-carboxietil)-2-oxo-1,2-etanodiilo], (Chemical Abstract: poly[imino-1-(2-carboxyethyl)-2-oxo-1,2-ethanediyl]). El PGGA es isómero del ácido poli( $\alpha$ -glutámico), uno de los poli( $\alpha$ -aminoácido)s más estudiados debido a su notable incidencia bioquímica y a su interés estructural.



**Figura 1.-**Estructura química del ácido poli( $\gamma$ -glutámico) (PGGA).

En 1935 se demostraba por vez primera la existencia natural del PGGA como componente de la cápsula de la bacteria *Bacillus anthracis*.<sup>1</sup> Cinco años más tarde se describía el mismo polímero como componente principal del producto de la fermentación aeróbica de *Bacillus subtilis*. No obstante, el primer trabajo en que se lleva a cabo un estudio sistemático de la biosíntesis del PGGA se debe a Thorne.<sup>2</sup> Fujii en 1963<sup>3</sup> descubrió unos años después que el PGGA es el componente principal del mucílago conocido como *natto*, un alimento tradicional japonés consumido desde tiempos ancestrales y que también es conocido en China como *Dan-douchi*.<sup>4</sup>

El alimento *natto* goza de gran reconocimiento por sus efectos beneficiosos en la asimilación del calcio por el organismo.<sup>5</sup> El *natto* se obtiene por fermentación bacteriana en autoclave de la soja y consiste en un gel acuoso que contiene entre 0.1 y 1.0 % de PGGA acompañado del polisacárido fructana.<sup>6</sup> El hecho de que el PGGA sea comestible y de inocuidad contrastada ha incentivado su interés como polímero biodegradable para aplicaciones biomédicas.

### 3.2. Estructura y propiedades

**3.2.1. Estructura molecular.** El nylon 4 es una poliamida convencional que a pesar de sus buenas propiedades mecánicas y térmicas no ha llegado a alcanzar desarrollo comercial, en gran parte porque no presenta diferencias sustanciales con los nylons 6 y 66.

En cambio el PGGGA es un nylon 4 modificado que tiene la particularidad de ser biodegradable y que contiene un centro asimétrico, y que por consiguiente ofrece un abanico de posibilidades sin precedentes en el campo de los nylons tradicionales.

La conformación del PGGGA en disolución es fuertemente dependiente de la concentración de polímero, pH, resistencia iónica y naturaleza de la sal añadida. Si se trabaja a concentraciones de 0,1 % w/v y pH superiores a 7, las cadenas se encuentran en conformación extendida, en cambio a pH inferiores a 3 y para las mismas concentraciones de polímero se encuentran estructuras más globulares.

Actualmente se acepta la capacidad del PGGGA para asumir conformaciones regulares pero el comportamiento estructural de este polímero en disolución no está aún claramente determinado. La descripción preliminar de este comportamiento puede resumirse como sigue:

- El PGGGA-H puede adoptar conformaciones regulares tipo hélice u hoja  $\beta$ , además de las formas globulares tipo ovillo.
- El modelo conformacional adoptado depende del pH y de la naturaleza del solvente. Las conformaciones helicoidales son exclusivas del PGGGA-H. El PGGGA-Na se encuentra en forma de ovillo expandido o como hoja  $\beta$ .

**3.2.2. Propiedades físico-químicas.** El PGGGA es un poliácido de  $pK_a = 2.27$ , un valor semejante al de los ácidos fosfórico y fluoroacético.<sup>7</sup> El PGGGA es por tanto un polielectrolito, pudiendo encontrarse sin ionizar cuando está como poliácido (PGGA-H) o ionizado cuando se encuentra en forma de sal (PGGA-Na o PGGGA-K)). El grado de ionización depende del pH a que se encuentra. A pH 2.2 el grado de ionización es de un 50% y a pH 5.1 está ionizado al 100%.<sup>8</sup>

La solubilidad del PGGGA es compleja siendo fuertemente dependiente del grado de ionización. La solubilidad en agua depende del grado de estructuración secundaria que posee; la formación de puentes intermoleculares, propia de las formas desordenadas y de las hojas  $\beta$ , limita la solubilidad mientras que la ordenación en hélice la favorece.

Las preparaciones recientes de PGGGA-H suelen ser solubles en agua pero dejan de serlo cuando envejecen en estado sólido; este fenómeno se debe a la existencia de reordenaciones moleculares y es común en polipéptidos y proteínas.

Por otra parte, el PGGA-Na es perfectamente soluble en agua pero insoluble en MeOH, EtOH y DMSO. La capacidad gelificante del PGGA-Na es espectacular pudiendo coagular hasta 3,500 veces su volumen de agua.

Los únicos disolventes orgánicos conocidos a temperatura ambiente para el PGGA-H son el sulfóxido de dimetilo (DMSO)<sup>9</sup> y la hexametilfosforamida (HMPA).<sup>10</sup> En caliente es soluble en dimetilformamida (DMF) y *N*-metilpirrolidona (NMP).<sup>11</sup> No parece que disminuyendo el peso molecular se incremente la solubilidad del PGGA-H.<sup>12</sup> Kubota *et al.* en 1996 observaron que un PGGA-H fragmentado por hidrólisis presenta menos solubilidad incluso que el PGGA-H inicial, habiendo de calentarse para solubilizarlo en DMSO, DMF o NMP al 1%.

El PGGA funde con descomposición por lo que se le puede clasificar como un polímero termoestable. Su punto de fusión-descomposición descrito es de 210°C. A esta temperatura comienza a perder peso de forma que a 240°C ha perdido un 10 %.<sup>13</sup>

**3.2.3. Degradación hidrolítica y biodegradabilidad.** EL PGGA es una poliamida y por tanto es susceptible de hidrólisis química tanto en medio ácido como en medio básico. Además, la presencia del segundo grupo carboxilo aumenta la hidrofiliidad del polímero y por consiguiente su accesibilidad por parte del agua.

El PGGA se degrada rápidamente con agua a temperaturas por encima de 60°C a temperaturas por debajo de 60°C la velocidad de degradación disminuye notablemente pero sigue siendo importante.<sup>14</sup> Así un PGGA de  $M = 1,250,000$  pasa a tener la mitad de tamaño inicial cuando se deja 4 días en agua a 37° C.<sup>15</sup> La hidrólisis alcalina en caliente se utiliza como método para obtener PGGA fragmentado.<sup>12</sup>

Un PGGA de peso molecular 580,000 cae hasta 2,300 por acción de una disolución de NaOH 1.5 M a 90°C durante 6 horas. Con similar objetivo se ha empleado la degradación hidrolítica en medio ácido en condiciones relativamente suaves; la viscosidad intrínseca disminuye desde 3.9 hasta 1.42 dL g<sup>-1</sup> cuando el PGGA se deja en DMSO que contiene 5% de HCl 12 M durante tres días.<sup>16</sup>

Pérez-Camero *et al.* en 1999 encontraron que mediante radiación con ultrasonidos se puede reducir el peso molecular y al mismo tiempo estrechar la polidispersidad del PGGA de biosíntesis sin modificar la constitución química.<sup>17</sup>

A diferencia del ácido poli( $\alpha$ -glutámico), el PGGA no se digiere por las proteasas características tales como pepsinas, tripsinas o quimotripsinas.<sup>18</sup> Por el contrario es rápidamente degradado por la  $\gamma$ -glutamil depolimerasa presente en los fermentos de PGGA, la cual es en cambio inactiva frente a los poli( $\alpha$ -aminoácido)s.

King *et al.* en el 2000, identificaron la enzima poliglutamil  $\gamma$ -hidrolasa la cual cataliza la rotura hidrolítica del ácido poli( $\gamma$ -glutámico) producido a partir de *Bacillus licheniformis* 9945A. Se encontró que el enzima estaba físicamente asociado al polímero por una interacción física fuerte no covalente y que se activaba con la presencia de sales de Zn(II) y Ca(II).<sup>19</sup>

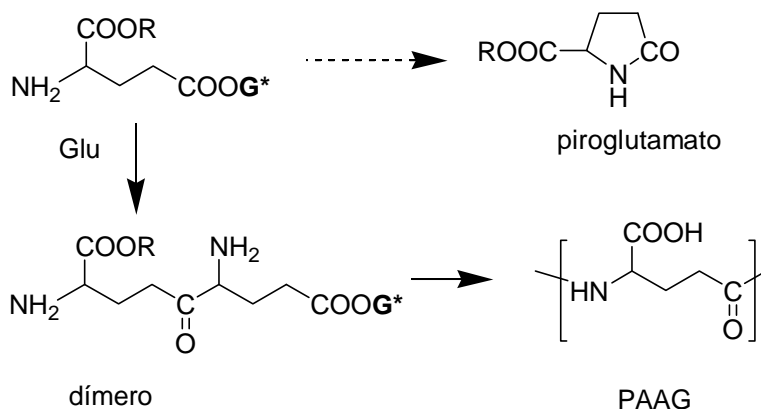
Un trabajo extenso sobre la biodegradación del PGGA fue realizado por Oppermann *et al.* en el que se aislaron y identificaron 12 especies diferentes de bacterias capaces de degradar el ácido poli( $\gamma$ -glutámico).<sup>20</sup> En este mismo trabajo se estudió de forma más exhaustiva la degradación con *B. licheniformis* ATCC9945 llegándose a la conclusión que el mecanismo de degradación se podía dividir en dos etapas. Una primera en la que hay una fragmentación aleatoria con formación de distintos oligómeros, y una segunda, en la que la proporción de ácido glutámico libre aumenta considerablemente.

### **3.3. Síntesis y biosíntesis**

**3.3.1. Síntesis química.** El interés biológico del PGGA como componente de las paredes bacterianas estimuló la preparación de este polímero por vía química con el objetivo de confirmar su estructura molecular. Para ello se aplicaron los métodos que por entonces se desarrollaban con éxito en la síntesis de poli( $\alpha$ -aminoácido)s.

**3.3.1.1. Policondensación de ésteres activos.** Las primeras síntesis del ácido PGGA se basan en la policondensación del ácido glutámico protegido en el carboxilo- $\alpha$  y activado en el carboxilo- $\gamma$ .<sup>21</sup> Dada la fuerte tendencia a la ciclación que presentan los derivados del ácido glutámico se hace indispensable utilizar como monómero el dipéptido  $\gamma$ -glutamil-glutámico debidamente modificado. Las distintas preparaciones difieren fundamentalmente en la forma de preparar los productos intermedios, en el grupo que se elige para activar el monómero y en las condiciones de polimerización.

Los últimos procedimientos que se describen en esta época activan el dipéptido como éster pentaclorofenílico.<sup>22</sup> Seleccionando la configuración del ácido glutámico de partida se obtienen homopolímeros D o L o bien estereocopolímeros D/L alternantes o estadísticos.<sup>23</sup>



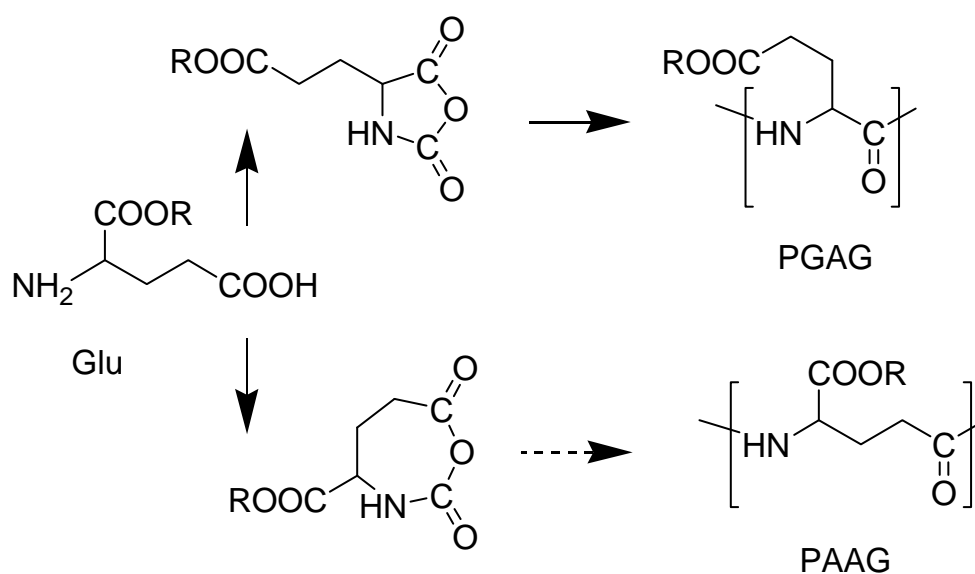
**Figura 2.** Síntesis de PGGA basada en la reacción de ésteres activos.

Lo que se obtiene inicialmente es un  $\alpha$ -éster del ácido poli( $\gamma$ -glutámico) que posteriormente se hidroliza a PGGA. Por lo general se utiliza el éster metílico,<sup>24</sup> aunque también están descritas las rutas a través de los ésteres *ter*-butílico y bencílico.<sup>25</sup> Aunque el procedimiento está principalmente dirigido hacia la preparación de ácido poliglutámico consistente exclusivamente en uniones  $\gamma$ , es posible igualmente obtener copolímeros  $\alpha,\gamma$  mediante un apropiado diseño del dipéptido de partida. Los polímeros que se obtienen por esta vía presentan invariablemente pesos moleculares por debajo de 20 000.<sup>26</sup>

En los últimos trabajos realizados en este campo se realiza la síntesis del PGGA por policondensación del éster metílico del ácido  $\gamma$ -glutámico y subsiguiente transformación a ácido poli( $\gamma$ -glutámico) por hidrólisis alcalina o transesterificación a su  $\alpha$ -bencil éster y posterior hidrogenación.<sup>27</sup>

Otro trabajo posterior se ha basado en la policondensación por pasos del etil-éster del ácido  $\gamma$ -glutámico. Se obtiene un oligómero de 16 unidades del ácido  $\gamma$ -glutámico por transesterificación del glutamato de etilo al bencil-éster del ácido  $\gamma$ -glutámico y posterior hidrogenación.<sup>28</sup>

**3.3.1.2. Policondensación por apertura de ciclos.** La polimerización de los *N*-carboxianhídridos de los  $\alpha$ -aminoácidos ( $\alpha$ -NCA's) constituye el método preferente de obtención de poli( $\alpha$ -aminoácido)s. De hecho el ácido poli( $\gamma$ -glutámico) se obtiene con buenos rendimientos y peso molecular controlado a partir del ácido 3-(2,5-dioxo-1,3-oxazolidin-4-il)propiónico, el cual se prepara satisfactoriamente a partir del ácido glutámico y fosgeno. Sin embargo la síntesis del PGGA por esta vía es insatisfactoria debido fundamentalmente a la inestabilidad del  $\gamma$ -*N*-carboxianhídrido de siete eslabones que se origina en este caso. No sólo la manipulación de este compuesto es extremadamente dificultosa sino que la presencia de productos de descomposición, como es el caso del ácido piroglutámico, limita el peso molecular del polímero a unos pocos millares.<sup>29</sup>



**Figure 3.** Síntesis de PGGA basada en la reacción de polimerización por apertura de anillo.

**3.3.2. Biosíntesis.** Diversas especies del género *Bacillus* presentan la capacidad de fabricar PGGA como producto de secreción que o bien se retiene en la cápsula, o lo que es más frecuente, se excreta al medio circundante.

Thorne *et al.* (1954)<sup>2</sup> realizaron un estudio sistemático para conocer los factores que afectaban a la producción de  $\gamma$ -PGGA con *B. licheniformis* ATCC 9945, y ver en que condiciones se obtenían los mejores rendimientos. Se determinó que el contenido en sales inorgánicas, ácido glutámico, ácido cítrico y glicerol influenciaba notablemente el resultado de la biosíntesis.



Se propuso la utilización de un medio C en el que se conseguía una productividad de  $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , alrededor de 10 veces mayor que el obtenido en las primeras fermentaciones realizadas por Bovarnick en 1942.<sup>30</sup>

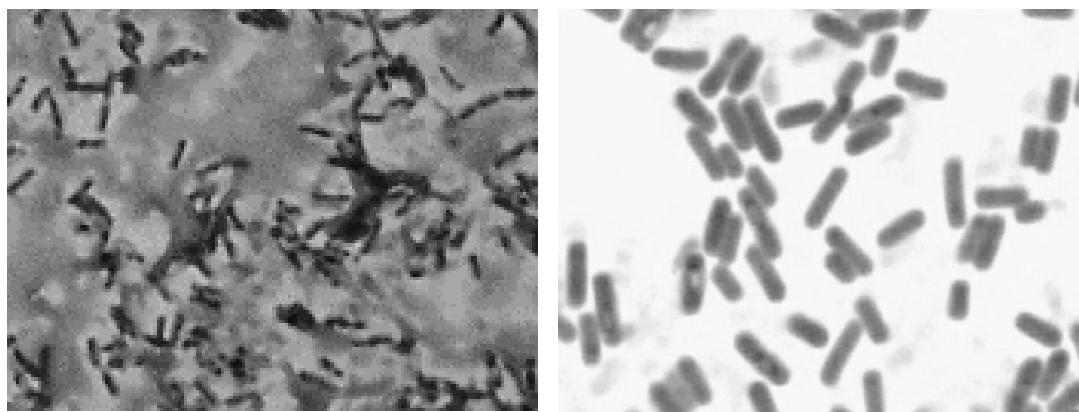
Gomez Leonard *et al.* en el 1958, optimizaron este medio de cultivo para *B. subtilis*, y le llamaron medio E. Los cambios introducidos fueron la presencia de Ca(II) y Mn(II) y la utilización de agua corriente en lugar de agua destilada.<sup>31</sup>

Los efectos de la composición del medio sobre la fermentación son los siguientes:

1. Al margen de otras condiciones operacionales, el máximo de producción de PGGA se alcanza para las concentraciones de ácido glutámico, ácido cítrico y glicerina establecidas en la composición tipo. En ausencia de ácido glutámico la producción de PGGA resulta ser sensiblemente menor.
2. El  $\text{NH}_4\text{Cl}$  es esencial para la producción de PGGA; su función primordial es suministrar el nitrógeno pero también sirve para mantener el pH a valores bajos.
3. El  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  actúa como fuente del fósforo y en su ausencia no hay proliferación celular.
4. El  $\text{MgSO}_4$  no es indispensable pero aumenta el rendimiento en PGGA.
5. El Mn(II) prolonga la viabilidad de las células e influye sobre la composición D/L del PGGA. La adecuada combinación Ca(II)-Mn(II) permite optimizar el rendimiento.

La mayoría de los procesos biosintéticos de PGGA se llevan a cabo en condiciones aeróbicas ya que está comprobado que la presencia de oxígeno influye favorablemente en la productividad. Reemplazar el medio aeróbico por unas condiciones de cultivo en medio nitrificante supone un ahorro económico que ha motivado el estudio de la obtención de PGGA en estas condiciones.

Con la bacteria denitrificante (*B. licheniformis* A35) se alcanzó un rendimiento de  $8.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  utilizando medio M como medio de cultivo.<sup>32</sup> El producto resultante de estas fermentaciones no contenía derivados polisacáridos y la relación D/L en el polímero final se veía claramente afectada por el contenido de Mn(II) en el medio. Una mayor concentración de Mn(II) aumentaba la proporción de ácido D-glutámico desde un 50 hasta un 80%. Hoppensack *et al.* (2003) han explorado la posibilidad de aprovechar el nitrógeno de estiércol para obtener PGGA.<sup>33</sup> Respecto a la producción a gran escala, los trabajos más recientes llegan a alcanzar una concentración de PGGA de  $35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  con una productividad de  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Estos valores se consiguen por cultivo realimentado de *B. licheniformis* en medio E.<sup>34</sup>



**Figura 4.** Principales especies productoras de PGGA : Izq. *B. licheniformis* Der. *B. subtilis*

En los años sesenta Omata y sus colaboradores estudiaron con detalle la producción de PGGA en *B. subtilis* 5E cultivado en un medio salino que contenía glucosa y ácido glutámico, descubriendo que se producía mucho más glutámico del que inicialmente se ponía en el medio. Más tarde encontró que se podía obtener hasta 18 g L<sup>-1</sup> de PGGA a partir de un medio compuesto exclusivamente de urea y glucosa.<sup>35</sup>

Kubota *et al.* utilizan en sus trabajos *B. subtilis* F-2-01, el cual puede producir PGGA con un rendimiento de 5-10 g L<sup>-1</sup> sin precisar que el ácido glutámico haya de estar presente en el medio de cultivo. Este medio es un producto estándar constituido por polipeptona y cantidades variables de glucosa. No obstante, la adición de ácido glutámico hace aumentar notablemente la producción de PGGA.<sup>36</sup>

Estos autores han realizado recientemente un estudio consistente en añadir diversos aminoácidos al medio y determinar su influencia sobre el rendimiento y observan que en presencia de concentraciones de ácido L-glutámico entre 7 y 15 %, se llegan a alcanzar producciones de PGGA entre 45 y 50 g L<sup>-1</sup>.<sup>37</sup>

Jung *et al.* han optimizado la producción de PGGA utilizando *B. subtilis* RKY3, un nuevo bacilo que con un suplemento de ácido L-glutámico de 90 g/L a permitido obtener un rendimiento máximo de 83,2 g/L.

A diferencia de otros protocolos de producción descritos previamente, con el *B. subtilis* RKY3 parece que la producción depende más de la concentración de Mg<sup>2+</sup> que de Mn<sup>2+</sup>.<sup>38</sup>

Xu *et al.* han aislado un nuevo *B.subtilis*, NX-2, cuya principal característica es que no produce PGGA en presencia de ácido cítrico, y si utilizando otras fuentes de carbono como glucosa, sacarosa, maltosa, almidón y glicerol.<sup>39</sup>

Thorne<sup>2</sup> fue el primero en proponer un mecanismo de biosíntesis del PGGA mediado por el ácido pirúvico y basado en la intervención de las enzimas alanina-racemasa y de D y L-glutamyl-transamidasa. En este mecanismo el ácido  $\alpha$ -cetoglutárico juega un papel central. Las observaciones de Troy están en desacuerdo con esta interpretación y sugieren como alternativa un proceso basado en la formación de un hidroxamato de glutamilo.<sup>40</sup>

El mecanismo más consistente con la mayoría de las observaciones hasta ahora descritas gira alrededor del metabolismo de los ácidos tricarboxílicos cítrico e isocítrico (ciclo TCA). Este mecanismo ha sido elaborado por Kunioka en base a sus estudios sobre *B. subtilis* IFO3335. El mecanismo incorpora el ciclo del pirúvico propuesto por Thorne y explica la formación de polisacáridos a partir de la glucosa. Hay que señalar sin embargo que la producción de polisacárido no se observa en la fermentación de *B. licheniformis*.

### **3.4. Derivados del PGGA**

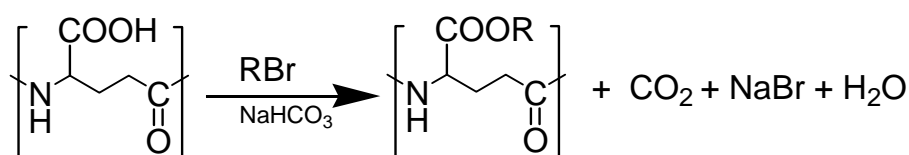
Se ha explorado la posibilidad de preparar películas y fibras de PGGA mediante moldeo o hilado en húmedo.<sup>41</sup> Sin embargo, la pobre solubilidad del PGGA, su inestabilidad en medios húmedos y su incapacidad para ser procesado por los métodos usuales de transformación, han propiciado la búsqueda de derivados en los que estas propiedades pudieran estar mejoradas.

Por otra parte la posible utilización del PGGA como gel encapsulante de fármacos ha generado una intensa investigación acerca de los métodos de modificación que implican entrecruzamiento para la obtención de hidrogeles o funcionalización química susceptible de uniones covalentes.

Los ésteres de poliácidos son derivados de utilidad ya que sus propiedades pueden ajustarse según la naturaleza del grupo alquilo. Los poliacrilatos, polimetacrilatos, poli( $\gamma$ -alquil- $\alpha$ ,L-glutamato)s<sup>42</sup> y poli( $\alpha$ -alquil- $\beta$ ,L-aspartato)s<sup>43</sup> son ejemplos ilustrativos de ello.

**3.4.1. Modificación del polímero de biosíntesis.** La esterificación del PGGA no es una reacción fácil de ejecutar debido a que la reactividad del grupo carboxilo está atenuada por la proximidad de este a la cadena principal y porque las condiciones de reacción no pueden extremarse sin que se produzcan descarboxilaciones o roturas en la cadena polimérica. Además las posibilidades de selección del medio de reacción están severamente limitadas por la escasa solubilidad del PGGA. En consecuencia, la obtención de conversiones del 100% no es siempre factible, en particular cuando se trata de introducir grupos largos o voluminosos.

La gran mayoría de los métodos se basan en la reacción del bromuro de alquilo en presencia de bicarbonato sódico en un disolvente del PGGA, generalmente DMSO o NMP.



**Figura 5.** Obtención de  $\gamma$ - poliglutamatos de alquilo.

La metilación con diazometano, para el caso del éster metílico, supone una alternativa al método de alquilación con haluros. Este método se ha empleado por varios autores con buenos resultados.<sup>13</sup>

Recientemente se ha propuesto una nueva forma de preparación de poli( $\alpha$ -alquil- $\gamma$ -glutamato)s a través de dos pasos: primero esterificación del PGGA para obtener poli( $\alpha$ -etil- $\gamma$ -glutamato) y posteriormente transesterificación de este con el alcohol adecuado en presencia de catalizador de titanio para tener PAAG-n.<sup>44</sup> Este procedimiento es muy adecuado para la obtención de ésteres con grupos alquilo largos ( $n > 8$ ) y su espectro de aplicación es general.

Las reacciones de modificación se obtienen sin alteración de la composición enantiomérica pero con una reducción significativa del peso molecular del polímero. No se observan diferencias en los resultados que se obtienen para el PGGA racémico y para el PGGA enriquecido en enantiómero D.

Pérez-Camero *et al.* en el 2001 han llevado a cabo la preparación de ésteres solubles en agua por transesterificación del poli( $\alpha$ -metil  $\gamma$ -glutamato) obtenido por el método del diazometano, con mono, di y trietilenglicoles que tienen el hidroxilo final bloqueado como metiléter.<sup>45</sup>

**3.4.2. Poli ( $\gamma$ -glutamato)s de síntesis química.** La síntesis química de los PAAG se había realizado desde tiempos remotos como etapa precursora de la síntesis del PGGA, tal y como se mencionó en el Apartado 3.3.1.

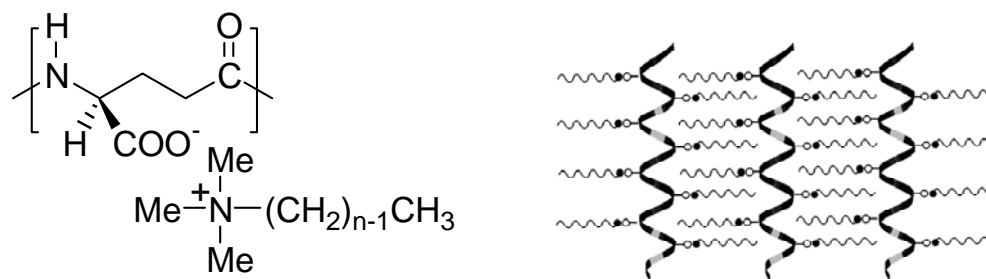
No es hasta 1998 cuando por vez primera se acomete la síntesis de los ésteres metílico y bencílico con el interés de estudiar su estructura cristalina<sup>46</sup> Los trabajos de síntesis mas recientes son los de Taizo *et al.* (1998)<sup>47</sup> y Sanda *et al.* (2001 y 2002)<sup>27,28</sup>, los cuales tienen como objeto la preparación de polímeros y oligómeros del éster metílico. Martínez de Ilarduya *et al.*, (2002) han empleado el mismo método de Sanda para obtener el ester etílico.<sup>48</sup>

**3.4.3. Complejos iónicos del PGGA.** Los complejos iónicos polielectrolito-tensioactivo constituyen un sistema de interés actual por su facilidad de preparación y capacidad para presentar propiedades tales como si fueran compuestos covalentes. Fujita *et al.* (1998) describen la capacidad del PGGA para formar compuestos estables con productos de naturaleza catiónica tales como quitosano o aminas cuaternarias, pero se refiere a ello como complejos resultantes de la formación intermolecular de puentes de hidrógeno.<sup>49</sup>

Pérez-Camero *et al.* han realizado un estudio exploratorio de los complejos que forma el PGGA de *B. licheniformis* con tensioactivos catiónicos de alquiltrimetilamonio. Los complejos tienen composición muy próxima a la estequiométrica, son insolubles en agua y solubles en  $\text{CHCl}_3$ , y presentan propiedades térmicas similares a las de los PAAG-n.

Estos compuestos adoptan una estructura supramolecular de naturaleza bifásica característica de polímeros tipo peine, no estando claro si las cadenas polipeptídicas se encuentran en conformación helicoidal o extendida. Los complejos nATMA·PGGA presentan una morfología cristalina dependiente de la longitud de la cadena lateral con texturas que van desde la de mosaico propia de cristales líquido esmécticos (n =12) hasta esferulíticas (n =22).<sup>50</sup>

García-Alvarez *et al.* (2005) han centrado su estudio en complejos nATMA·PGGA con configuración cercana a la racémica. Al comparar con los complejos prácticamente enantiomeros puros, estudiados con anterioridad, constatan un comportamiento similar, si bien existen ciertas diferencias en cuanto a cristalinidad de la cadena lateral y respuesta dimensional a la temperatura.<sup>51</sup>



*n*ATMA·PGGA (*n* = 12,14,16,18,20,22)

**Figura 6.-** Fórmula química de los complejos iónicos y representación de su estructura molecular.

Los resultados de simulación por dinámica molecular para el 12ATMA·PGGA indican que tendería a adoptar una conformación tipo hélice  $\alpha$ . Tal como se ha descrito para otros complejos tensioactivo-polipéptido, cada grupo amonio interaccionaría con dos grupos carboxilato y simultáneamente con una unidad amida.<sup>52</sup>

### 3.5. Aplicaciones biomédicas.

La mayor parte de las aplicaciones actuales del PGGA se sitúan en el sector de la alimentación. Los desarrollos como material floculante y gelificante están muy avanzados. Aunque se han iniciado numerosas investigaciones sobre la posible utilización del PGGA como material biomédico, estas aplicaciones sólo son potenciales por el momento.

La posibilidad de emplear PGGA en aplicaciones biomédicas ha sido estudiada por diferentes autores. Al igual que la poli(lisina), el ácido poli(glutámico) es soluble en agua, biodegradable, comestible y no tóxico. Por ello el PGGA ha generado un interés creciente tanto a nivel de investigación como industrial. Su uso se ha estudiado en áreas tales como el transporte y liberación de fármacos o los bioadhesivos.<sup>53</sup>

La capacidad del PGGA como dispensador de fármacos ha sido investigada por diversos autores.<sup>54</sup> Se ha probado en particular el agente carcinoestático 5-fluoracilo unido covalentemente al PGGA mediante una función éster o amida, observándose que la actividad del preparado persiste por largos periodo de tiempo y que es motivada por la hidrólisis lenta del grupo éster.<sup>55</sup>

Sung et al. (2005) exponen en su trabajo de revisión las múltiples aplicaciones del PGGA como agente immuno-estimulante y anti-tumor especialmente en el caso del polímero de elevado peso molecular.<sup>56</sup> En inmunoterapia anti-cáncer se han utilizado nanopartículas de PGGA como portadoras de antígenos, comprobándose que se incrementa la respuesta inmune respecto a cuando estos se encuentran en solitario.<sup>57</sup> En ratones la respuesta inmune provocada por nanopartículas de PGGA portadoras de ciertos antígenos de VIH a sido superior a la provocada cuando se han empleado nanopartículas no-biodegradables de poliestireno.<sup>58</sup> Diversos autores corroboran la inducción de una respuesta inmune por parte del PGGA frente a diversas infecciones virales y tumores.<sup>59</sup>

En la actualidad, la administración de la vacuna contra en bacilo ántrax (AVA), la única existente con licencia, comporta desventajas considerables. En este sentido, se ha probado un sistema formado por PGGA capsular portador de RNA y combinado con ciertas proteínas que han inducido respuesta inmune en ratones.<sup>60</sup>

Liang *et al.* han preparado nanopartículas de copolímeros en bloque de PGGA-poli(lactida). Las partículas presentan un tamaño de 140 nm y un potencial zeta de -20 mV. Se ha evaluado su interacción con determinadas células hepáticas cancerosas comprobando su potencial aplicación en el reconocimiento celular en terapia anti-cáncer.<sup>61</sup>

Se ha estudiado el transporte paracelular, en células de carcinoma intestinal, mediante un nuevo sistema de nanopartículas de PGGA-quitano. Los resultados indican un incremento in vitro de la permeabilidad celular.<sup>62</sup>

Estudios realizados en animales in vivo han revelado que el ibuprofeno incorporado a nanofibras de PGGA es significativamente efectivo en la prevención de la adhesión tisular e induce a la cicatrización de heridas, probablemente debido a la hidrofiliidad del PGGA y a sus buenas propiedades barrera.<sup>63</sup>

En relación a la absorción de insulina funcional administrada por vía oral, se ha comprobado que cuando se administra insulina en el interior de nanopartículas de PGGA a ratas diabéticas es posible la permeabilidad celular de dichos nanosomas ya que disminuyen los niveles de glucosa en sangre. Los perfiles de liberación de insulina dependen en gran medida de los valores de pH del entorno.<sup>64</sup>

Por su parte, Karmaker *et al.* (2007) han comprobado que la complejación del  $\text{Cu}^{2+}$  con PGGA origina complejos cuya estructura depende del pH y ejercen in vitro un papel fisiológico similar al de la insulina.<sup>65</sup>

La actividad del PGGa-sulfonato como factor de crecimiento se ha comparado con la heparina y con otros derivados heparinoides, teniendo potencial aplicación en ingeniería de tejidos y en concreto en el campo de los tratamientos vasculares. El análisis por SEM revela la asociación entre fibroblastos y dicho material.<sup>66</sup>

Por otro lado, las mezclas de gelatina y PGGa constituyen un bioadhesivo cuya gelificación se consigue mediante 1-(3-dimetilaminopropil)-3-(etilcarbodiimida) como agente de entrecruzamiento. Dicho material no produce citotoxicidad ni respuesta inflamatoria significativa.<sup>67</sup>

Kakutani *et al.* han explorado las posibilidades del PGGa para la fabricación de suturas reabsorbibles en compuestos que llevan sales metálicas y otros productos de naturaleza no desvelada, los cuales pueden formar en parte puentes de hidrogeno con el PGGa.<sup>68</sup>

Hidrogeles de PGGa/alcohol polivinílico presentan propiedades adecuadas para ser utilizados en dispositivos médicos dada su probada compatibilidad con sangre.<sup>69</sup>

Akagi y su grupo de investigación han preparado y caracterizado nanopartículas a partir de copolímeros de injerto de PGGa con segmentos hidrofóbicos del ester etílico de la fenilalanina, cuya aplicación sería el transporte de fármacos o proteínas. Las partículas presentan una distribución monodispersa de tamaños de entre 150 y 200 nm. La degradación enzimática *in vitro* conlleva un cambio brusco en la morfología de las nanopartículas y una reducción del tamaño hasta su completa desaparición.<sup>70</sup> Este grupo también ha explorado la interacción PGGa-proteínas, ensayando tres métodos de conjugación proteína-nanopartícula, por encapsulación, por inmovilización covalente y por adsorción. Los resultados revelan que la actividad enzimática se ve afectada por el método utilizado, siendo la encapsulación el método óptimo.<sup>71</sup>



### 3.6. Referencias

1. a) V. Bruckner, G.Ivanovics, *Hoppe-Seyl. Z.* **1935**, 247, 281. b) G. Ivánovics, V.Bruckner, *Z. Immunitätsforsch.* **1937**, 90, 304. c) G. Ivánovics, L.Z.Erdös, *Z. Immun.* **1937**, 90, 5.
2. C.B. Thorne, C.G. Gómez, H.E. Noyes, R.D. Housewright, *J. Bacteriol.* **1954**, 68, 307.
3. H. Fujii, *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* **1963**, 37, 615-618.
4. T. Hara, S. Ogata, S. Ueda, *J. Gen. Appl. Microbiol.* **1993**, 39, 75.
5. a) F. Yamaguchi, Y. Ogawa, M. Kikuchi, K. Yuasa, H. Motai, *Biosci. Biotechn. Biochem.* **1966**, 60, 255. b) F. Yamaguchi, Y. Ogawa, E. Yamazaki, Y. Katsumi, *Patent CA* **1994**, 125:166283. c) H. Tanimoto, M. Mori, M. Motoki, K. Torii, M. Kadowaki, T.Noguchi, *Biosci. Biotech. Biochem.* **2001**, 65, 516.
6. T. Hara, Y.Fujio, S. Ueda, *J. Appl. Biochem.* **1982**, 4,112.
7. H. Kubota, T. Matsunobu, K. Uotani, H. Takebe, A. Satoh, M.Taniguchi, *Sci. Report, Meiji Seika Kaisha* 1992, **31**, 41.
8. D. Gonzáles, K. Fan, M. Sevoian, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **1996**, 34, 2019.
9. H. Kubota, H. Fukuda, H. Takebe, T. Endo, *US Patent* 5,118,784 (Meiji Seika Kabushiki Kaisha) 1992.
10. R.A. Gross, S.P. McCarthy, D.T. Shah, *US Patent* 5,378,807 (Univ Mass, Lowell) **1995**.
11. H. Kubota, Y. Nambu, T. Endo, *J. Chem. Soc. Japan., Chem. Ind. Chem.* **1993**, 31, 973.
12. H. Kubota, Y. Nambu, T. Endo, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **1996**, 34, 1347.
13. H. Kubota, Y. Nambu, T. Endo, *J. Polym. Sc. Part A: Polym. Chem.* **1995**, 33, 85.
14. A. Goto, M. Kunioka, *Biosci. Biotech. Biochem.* **1992**, 56, 1031.
15. M. Kunioka, A. Goto, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1994**, 40, 867.
16. D.T. Shah, S.P. McCarthy, R.A. Gross, *Polym. Prep., Am. Chem. Soc.* **1993**, 5, 488.
17. G. Pérez-Camero, F. Congregado, J.J. Bou, S. Muñoz-Guerra, *Biotech. Bioeng.* **1999**, 63, 110.
18. a) H. Kubota, Y. Nambu, T. Endo, *J. Polym. Sc. Part A: Polym. Chem.* **1993**, 31, 2877. b) G.A. Birrer, A-M. Cromwick, R.A. Gross, *Int. J. Biol. Macromol.* **1994**, 16, 265.
19. E.C. King, A.J. Blacker, T.D.H. Bugg, *Biomacromolecules* **2000**, 1, 75.
20. F.B. Oppermann-Sanio, A. Steinbüchel, *Naturwissenschaften* **2002**, 89, 11-22.
21. a) S.G. Waley, *J. Chem. Soc.* **1955**, 43, 517. b) V. Bruckner, J. Kovacs, H. Nagy, M. Katjár, *Naturwissenschaften* **1954**, 41, 528. c) V. Bruckner, J. Wein, H. Nagy, M. Katjár, J. Kovacs, *Naturwissenschaften* **1955**, 42, 210.
22. J. Kovács, G.N. Schmit, B.J. Jonhson, *Can. J. Chem.* **1969**, 47, 3690.
23. a) V. Bruckner, M. Katjár, J. Kovács, H. Nagy, J.Wein, *Tetrahedron*, **1958**, 2, 211. b) M. Hollosi, M. Katjar, V. Bruckner, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1969**, 62, 305.
24. M. Katjar, V. Bruckner, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1969**, 62, 191.
25. P.M. Hardy, J.C. Haylock, H.N. Rydon, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1972**, 32, 605.
26. a)V. Bruckner, M. Szekerke, J. Kovács, *Naturwissenschaften* **1955**, 42, 179. c) V. Bruckner, M. Szekerke, J. Kovács, *Naturwissenschaften* **1956**, 43, 107.
27. F. Sanda, T. Fujiyama, T. Endo, *J. Polym. Sci.: Polym. Chem.* **2001**, 39, 732.
28. F. Sanda, T. Fujiyama, T. Endo, *Macromol. Chem. Phys.* **2002**, 203, 727.
29. a) J. Kovács, H. Nagy, R. Ballina, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 839. b) N. Honda, T. Kawai, F. Higashi, *Makromol. Chem.* **1978**, 179, 1643.
30. M. Bovarnick, *J. Biol. Chem.* **1942**, 145, 415.
31. C. Gomez Leonard, R.D. Housewright, C.B. Thorne, *J. Bacteriol.* **1958**, 76, 499.
32. C. Cheng, Y. Asada, T. Aida, *Agric. Biol. Chem.* **1989**, 53, 2369.
33. A. Hoppensack, F.B. Oppermann-Sanio, A. Steinbüchel, *FEMS Micr. Lett.* **2003**, 218, 39.
34. S.H. Yoon, J.H. Do, S.Y. Lee, H.N. Chang, *Biotech. Lett.* **2000**, 22, 585.

35. a) S. Murao, T. Murakawa, S. Sawa, S. Okumura, S. Omata, *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* **1969**, 43, 595. b) S. Murao, T. Murakawa, S. Sawa, S. Omata, *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* **1971**, 45, 118. c) S. Sawa, T. Murakawa, S. Murao, S. Omata, *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **1971**, 43, 124. d) S. Sawa, T. Murakawa, S. Murao, S. Omata, *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **1973**, 47, 167.
36. H. Kubota, H. Fukuda, H. Takebe, T. Endo, *US Patent* 5,118,784 (Meiji Seika Kabushiki Kaisha) **1992**. b) H. Kubota, T. Matsunobu, K. Uotani, H. Takebe, A. Satoh, M. Taniguchi, *Sci. Report, Meiji Seika Kaisha* **1992**, 31, 41.
37. H. Kubota, T. Matsunobu, K. Uotani, H. Takebe, A. Satoh, T. Tanaka, M. Taniguchi, *Biosci. Biotech. Biochem.* **1993**, 57, 1212.
38. D.Y. Jung, S. Jung, J. Yun, J. Kim, Y. Wee, H. Jang, W. Ryu, *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **2005**, 10, 289.
39. H. Xu, M. Jiang, H. Li, D. Lu, P. Ouyang, *Process Biochemistry (Oxford, United Kingdom)* **2005**, 40, 519.
40. J.M. Gardner, F.A. Troy, *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 6262.
41. a) H. Takeda, A. Shiraishi, S. Myashita, N. Oota, J. Fujita, S. Nomyama, *Jpn. Kokai Tokyo Koho* **1995**. b) H. Takeda, H. Furumoto, *Jpn. Kokai Tokyo Koho* **1997**.
42. H. Block, "Poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate) and other glutamic acid containing polymers" in Gordon and Breach, **1983**.
43. S. Muñoz-Guerra, F. López-Carrasquero, J.M. Fernández-Santín, J.A. Subirana, *Encyclopedia of Polymer Materials*, CRC Press, **1996**.
44. a) J. Melis, M. Morillo, A. Martínez de Ilarduya, S. Muñoz-Guerra, *Polymer* **2001**, 42, 9319. b) M. Morillo, A. Martínez de Ilarduya, S. Muñoz-Guerra, *Macromolecules* **2001**, 34, 7868.
45. G. Pérez-Camero, B. Vázquez, S. Muñoz-Guerra, *J. Appl. Polym. Sci.* **2001**, 82, 2027.
46. J. Puiggali, S. Muñoz-Guerra, A. Rodríguez-Galán, C. Alegre, J.A. Subirana, *Makromol. Chem., Macromol. Symp.* **1988**, 20, 167.
47. F. Taizo, S. Takuro, M. Hironobu, F. Sanda, T. Endo, *Polym. Prep. Japan* **1998**, 47, E95.
48. A. Martínez de Ilarduya, N. Ittobane, M. Bermúdez, A. Alla, M. El Idrissi, S. Muñoz-Guerra, *Biomacromolecules* **2002**, 3, 1078.
49. H. Fujita, A. Nakamura, M. Takeuchi, H. Taketa, *Jpn. Kokai Tokyo Koho*, **1998**.
50. G. Pérez-Camero, A. Martínez de Ilarduya, M. García-Alvarez, S. Muñoz-Guerra, *Polym. Prep.* **1999**, 40, 1142.
51. M. García-Alvarez, J. Alvarez, A. Alla, A. Martínez de Ilarduya, C. Herranz, S. Muñoz-Guerra, *Macromolecular Bioscience* **2005**, 5, 30.
52. D. Zanuy, C. Alemán, *Biomacromolecules* **2007**, 8, 663.
53. I.L. Shih, Y.T. Van, M.H. Shen, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2004**, 4, 179.
54. N. Kakigi, T. Hamano, M. Akashi, N. Morita, T. Endo, *Jpn. Kokai Tokyo Koho*, **1994**.
55. A. Kishida, K. Murakami, H. Goto, M. Akashi, H. Kubota, T. Endo, *J. Bioact. Compat. Polym.* **1998**, 13, 270.
56. M. Sung, C. Park, C.J. Kim, H. Poo, K. Soda, M. Ashiuchi, *Chemical Record* **2005**, 5, 352.
57. K. Matsuo, T. Yoshikawa, A. Oda, T. Akagi, M. Akashi, Y. Mukai, Y. Yoshioka, N. Okada, S. Nakagawa, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2007**, 362, 1069.
58. X. Wang, T. Uto, T. Akagi, M. Akashi, M. Baba, *Journal of Virology* **2007**, 8, 10009.
59. a) T. Akagi, X. Wang, T. Uto, M. Baba, M. Akashi, *Biomaterials* **2007**, 28, 3427. b) T. Kim, T. Lee, H. Bae, J. Hahm, Y. Kim, C. Park, T. Kang, C. Kim, M. Sung, H. Poo, *J. Immun.* **2007**, 179, 775. c) T. Uto, X. Wang, K. Sato, M. Haraguchi, T. Akagi, M. Akashi, M. Baba, *J. Immun.* **2007**, 178, 2979. d) H. Poo, H. Pyo, T. Lee, S.W. Yoon, J.S. Lee, C. Kim, M. Sung, S. Lee, *Int. J. Cancer* **2006**, 19, 1702. e) J.S. Lee, H. Poo, D.P. Han, S.P. Hong, K. Kim, M.W. Cho, E. Kim, M. Sung, C. Kim, *J. Virology* **2006**, 80, 4079.
60. S. Brian, C. Zhengrong, *Vaccine* **2006**, 24, 6405.

61. a) H. Liang, T. Yang, C.T. Huang, M.C. Chen, H.W. Sung, *J. Controll. Rel.* **2005**, *105*, 213. b) H. Liang, S.C. Chen, M.C. Chen, P.W. Lee, C.T. Chen, H.W. Sung, *Bioconj. Chem.* **2006**, *17*, 291. c) H. Liang, C.T. Chen, S.C. Chen, A. Kulkarni, Y.L. Chiu, M.C. Chen, H.W. Sung, *Biomaterials* **2006**, *27*, 2051.
62. Y.H. Lin, C.K. Chung, C.T. Chen, H. Liang, S.C. Chen, H.W. Sung, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1104.
63. Y.G. Ko, K.H. Yoon, C. Park, M.H. Sung, O.K. Kwon, *Key Engineering Materials* **2007**, *342-343(Adv. Biomat. VII)*, 225.
64. a) Y.H. Lin, C.T. Chen, H. Liang, A. Kulkarni, P.W. Lee, C.H. Chen, H.W. Sung, *Nanotechnology* **2007**, *18*, 105102. b) Y.H. Lin, F.L. Mi, C.T. Chen, W.C. Chang, S.F. Peng, H.F. Liang, H.W. Sung, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 146. c) S. Karmaker, T.K. Saha, Y. Yoshikawa, H. Yasui, H. Sakurai, *J. Inor. Biochem.* **2006**, *100*, 1535.
65. S. Karmaker, T.K. Saha, H. Sakurai, *Macromolecular Bioscience* **2007**, *7*, 456.
66. a) M. Matsusaki, K. Hiwatari, M. Higashi, T. Kaneko, M. Akashi, *Chem. Lett.* **2004**, *33*, 398. b) M. Matsusaki, M. Akashi, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 3351. c) M. Matsusaki, M. Akashi, *PMSE Preprints* **2005**, *93*, 645. d) M. Matsusaki, T. Serizawa, A. Kishida, M. Akashi, *J. Biomed. Mat. Res., Part A* **2005**, *73A*, 485. e) M. Matsusaki, T. Serizawa, A. Kishida, M. Akashi, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 400.
67. S. Hsu, C.H. Lin, *Biorheology* **2007**, *44*, 17.
68. T. Kakutani, T. Tomioka, Y. Arika, M. Kitano, H. Takeda, *Jpn. Kokai Tokyo Koho*, **1999**.
69. W.C. Lin, D. Yu, M.C. Yang, *Colloids and Surf., B: Biointerfaces* **2006**, *47*, 43.
70. a) T. Akagi, T. Kaneko, T. Kida, M. Akashi, *J. Controll. Rel.* **2005**, *108*, 226. b) T. Akagi, M. Higashi, T. Kaneko, T. Kida, M. Akashi, *Macromol. Biosci.* **2005**, *5*, 598.
71. a) T. Akagi, M. Higashi, T. Kaneko, T. Kida, M. Akashi, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 297. b) T. Akagi, T. Kaneko, T. Kida, M. Akashi, *J. Biomat. Sci., Polym. Ed.* **2006**, *17*, 875.