

[Seleccionar fecha]
Usuario

Reticulación supramolecular de polímeros funcionalizados con nucleobases: efecto en la formación de nanotransportadores de fármacos

Trabajo Fin de Grado

Grado en Química

Grupo Cristales Líquidos

Departamento de Química Orgánica

Universidad de Zaragoza

Curso 2017-2018

Andrea Fernández Martínez

Directores: Luis T. Oriol Langa

Milagros Piñol Lacambra

Resumen: *Reticulación supramolecular de polímeros funcionalizados con nucleobases: efecto en la formación de nanotransportadores de fármacos*

Los polímeros anfífilos son capaces de asociarse en agua formando autoensamblados, habitualmente micelas o vesículas, que pueden utilizarse como nanosistemas para el transporte de fármacos. Estos autoensamblados pueden estabilizarse mediante entrecruzamiento de las macromoléculas por medio de enlaces de hidrógeno una interacción selectiva y direccional, de manera que puede evitarse la liberación de la carga de forma prematura. Si dichos entrecruzantes son sensibles a algún estímulo, puede lograrse una liberación controlada de la carga. Uno de los estímulos más frecuentes es la luz y uno de los grupos con respuesta a la luz más estudiados debido a su fotoisomerización *trans-cis-trans* es el azobenceno.

El objetivo principal de este trabajo es la combinación de un entrecruzamiento no covalente con la incorporación de grupos funcionales fotoestimulables, con el objetivo de conseguir, por una parte, nanopartículas más estables y, a la vez, facilitar su desagregación con luz. Para ello se usarán aproximaciones típicas de la Química Supramolecular en el proceso de reticulación y azobencenos como unidades de fotoestimulación.

En este trabajo se ha sintetizado y caracterizado el comportamiento en disolución de un agente entrecruzante basado en una unidad azobenceno funcionalizada con dos unidades timina. A partir de este, se ha abordado la preparación de los correspondientes materiales poliméricos supramoleculares, utilizando un copolímero bloque con unidades de 2,6-diacilaminopiridina (DAP), PEG-*b*-PDAP, previamente sintetizado por otros miembros del grupo. Se ha evaluado la capacidad de formar nanopartículas en agua de estos copolímeros, la influencia del porcentaje de agente reticulante y el encapsulado y liberación estimulada por luz de una sonda fluorescente.

Abstract: *Supramolecular crosslinking of nucleobases containing polymers: effect on the formation of drugs nanocarriers*

Amphiphilic polymers are able to self-assemble in water forming micelles or vesicles, as the most common self-assemblies, which can be applied as drug nanocarriers. Polymeric micelles and vesicles can be stabilised by crosslinking throughout hydrogen bonds that are selective and directional interactions. In this way, premature loading release can be avoided. If the aforementioned crosslinkers are stimuli sensitive, a controlled release of the charges can be achieved. Light is amongst the most attractive stimuli and azobenzene is one of the most studied light responsive units due to its photoisomerization *trans-cis-trans*.

This dissertation project aims the combination of non-covalent crosslinking with the inclusion of photostimulable moieties in order to obtain more stable nanoparticles as well as facilitate its light disaggregation. For that purpose, typical approaches from Supramolecular Chemistry will be used in the process of crosslinking; Azobenzene will be used as photostimulation units.

A crosslinker agents based on an azobenzene unit functionalized with two thymines has been synthesised. On this basis, the formation of the corresponding supramolecular polymeric materials have been approached by making use of a block copolymer containing units of 2,6-diacylaminopyridine that had been previously synthesised by other group members. The self-assembly behaviour to yield nanoparticles in water, the influence of the crosslinker percentage as well as the encapsulation and light stimulated release ability of the self-assemblies has also been studied using a fluorescent probe.

Abreviaturas utilizadas:

AZO: azobenceno

CAC: concentración de agregación crítica

Cy: ácido cianúrico

DAP: 2,6-diacilaminopiridina

DBU: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno

DIAD: azodicarboxilato de diisopropilo

DLS: dispersión dinámica de luz

DMF: *N,N*-dimetilformamida

DMSO: dimetilsulfóxido

DPTS: p-toluensulfonato de 4-(dimetilamino)piridinio

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

FTIR: espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier

PEG: polietilenglicol o poli(oxietileno)

RMN: resonancia magnética nuclear

TEM: microscopía de transmisión electrónica

THF: tetrahidrofurano

Thy: timina

UV-vis: ultravioleta visible

Índice

1. Introducción	1
1.1. Polímeros y copolímeros bloque	1
1.2. Copolímeros bloque anfífilos. Formación de autoensamblados en agua	2
1.3. Nanopartículas y nanocápsulas poliméricas como transportadores de fármacos	3
1.4. Nanopartículas con respuesta a la luz.....	4
1.5. Estabilización de nanopartículas poliméricas por entrecruzamiento	5
2. Objetivos y planteamiento	7
3. Resultados y discusión	8
3.1. Síntesis de derivados del ácido cianúrico.....	8
3.2. Síntesis y caracterización de azobencenos con unidades de timina.....	8
3.3. Estudios de irradiación y calentamiento en disolución de 6COOAZO-bisThy.....	11
3.4. Preparación y caracterización de redes poliméricas supramoleculares	15
3.5. Preparación y estudio de autoensamblados en agua	16
4. Conclusiones.....	20
5. Parte experimental.....	21
5.1. Síntesis de entrecruzantes	21
5.2. Preparación de redes poliméricas supramoleculares	23
5.3. Formación de nanopartículas poliméricas en agua	24
5.4. Irradiación de las nanopartículas poliméricas.....	24
6. Bibliografía	25

Anexo A: Espectros (FTIR, 1H RMN, 13C RMN)

Anexo B: Técnicas e instrumentos

1. Introducción

1.1. Polímeros y copolímeros bloque

Un polímero es un compuesto generalmente orgánico, de origen natural o sintético, con una masa molecular elevada y formado por una o unas pocas unidades que se repiten en su estructura¹. La simplicidad estructural de estas macromoléculas es consecuencia del método de preparación que consiste en la polimerización de monómeros, precursores de la unidad repetitiva constitutiva de la macromolécula, proceso mostrado en la Figura 1.1.

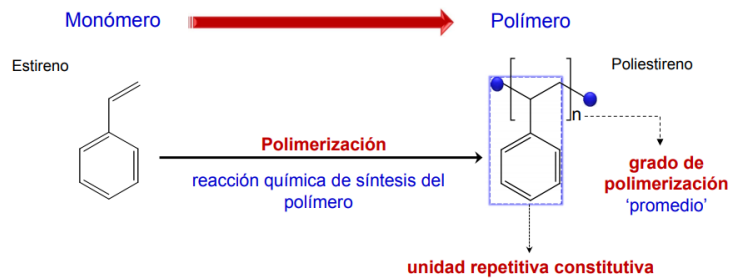


Figura 1.1 Ejemplo de una reacción de polimerización

Los polímeros pueden clasificarse atendiendo a varios factores, sin que sean excluyentes entre sí. Dependiendo de su origen, los polímeros pueden ser:

- Naturales (biopolímeros): forman parte de los seres vivos. Ej. Caucho natural (politerpeno).
- Semisintéticos: obtenidos por modificación de polímeros naturales. Ej. Acetato de celulosa.
- Sintéticos: sintetizados por diferentes metodologías químicas a partir de monómeros. Ej. Polietileno.

En función de su estructura se clasifican de forma básica de la siguiente manera:

- Lineal: macromoléculas extendidas en una dimensión.
- Ramificado: macromoléculas análogas a las anteriores, pero con ramificaciones de diferente longitud (el ejemplo típico es el polietileno de baja densidad).
- Entrecruzado o reticulado: se introducen enlaces covalentes entre cadenas generando estructuras tridimensionales.

La investigación en este campo ha llevado al descubrimiento de nuevas estructuras poliméricas como pueden ser: polímeros estrella, polímeros hiperramificados o dendrímeros.

Adicionalmente se pueden clasificar los polímeros en función de la cantidad de monómeros diferentes que lo constituyan:

- Homopolímero: constituido por una única unidad repetitiva (cadena homogénea).
- Copolímero: constituido por dos o más unidades repetitivas diferentes formando una cadena heterogénea. Un ejemplo se muestra en la Figura 1.2.

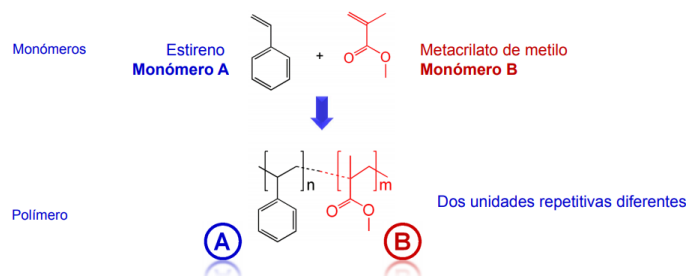


Figura 1.2. Ejemplo de la síntesis de un copolímero

Adicionalmente, la distribución de estas unidades repetitivas a lo largo de la cadena permite clasificarlos, según se ve en Figura 1.3, en:

- Estadístico o al azar
- Alternante
- Bloque
- Gradiente
- De Injerto

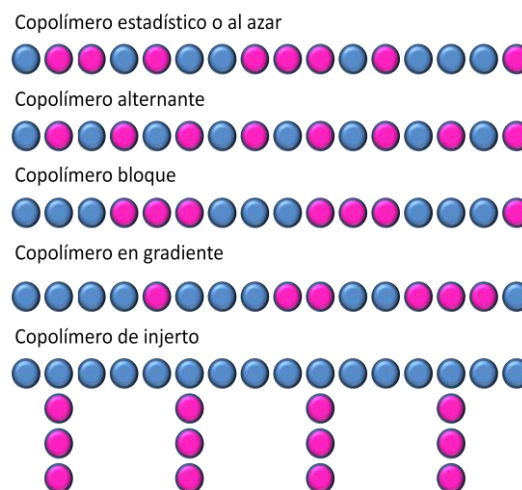


Figura 1.3. Esquema de diferentes tipos de copolímeros

En la actualidad, los copolímeros bloque están recibiendo una gran atención, por sus aplicaciones nanotecnológicas. Estos copolímeros bloque, en su caso más sencillo, pueden definirse como macromoléculas constituidas por dos o más segmentos lineales o bloques con unidades constitutivas diferentes, unidos entre sí mediante un enlace covalente. La síntesis de estos copolímeros puede seguir dos rutas: polimerización secuencial de dos monómeros diferentes o unión de dos homopolímeros previamente obtenidos a través de sus extremos. En ambos casos se necesita que los extremos de la macromolécula que está formándose mantengan su reactividad, por lo que las polimerizaciones radicalarias convencionales no son útiles. Sin embargo, mediante polimerización iónica viva se prepararon los primeros copolímeros bloque comerciales por reacción de un monómero para obtener una macromolécula activa en un extremo (no hay terminación) que se usa para polimerizar un segundo monómero. Sin embargo, la polimerización iónica es bastante restrictiva en cuanto a condiciones de polimerización y los monómeros que pueden emplearse. Por ello en los últimos años se han desarrollado técnicas de polimerización controlada que minimizan la terminación o bien reacciones eficaces de conjugación o unión de macromoléculas que permiten un control estructural adecuado. ²

1.2. Copolímeros bloque anfífilos. Formación de autoensamblados en agua

Entre los copolímeros bloque destacan los anfífilos, que son copolímeros formados por un bloque hidrófobo unido a un bloque hidrófilo. Es decir, en una misma macromolécula se

combina un polímero soluble en agua, con otro que no lo es. Estos copolímeros se asocian o autoensamblan en medios acuosos para formar partículas nanométricas. Debido a la diferente afinidad que presenta cada bloque con el agua, el bloque hidrófilo interacciona con el medio acuoso mientras que el bloque hidrófobo busca reducir al máximo las interacciones con él. Se forma así asociaciones o autoensamblados, tales como micelas y vesículas, que pueden actuar como excelentes vehículos de principios activos, por ejemplo de fármacos.^{3,4}

Una micela polimérica esférica consiste en un núcleo formado por los bloques hidrófobos, rodeado por una corteza formada por los bloques hidrófilos que le confiere estabilidad en el medio acuoso. Estas nanopartículas son capaces de encapsular en el núcleo principios activos insolubles en agua.

Una vesícula consiste en una estructura esférica formada por una membrana con un interior hidrófobo, delimitada en ambas superficies por una capa hidrófila. Estas asociaciones pueden encapsular tanto moléculas hidrófobas dentro de la membrana como hidrófilas en el interior de la vesícula.

De forma análoga a lo que sucede con anfífilos de baja masa molecular, el tipo de agregado viene determinado por el balance hidrófobo-hidrófilo, a su vez marcado por el tamaño de cada bloque. (Figura 1.4).

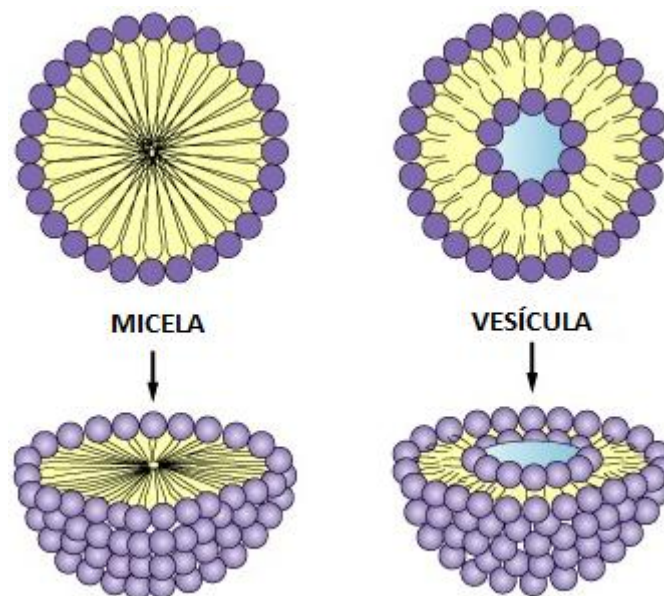


Figura 1.4. Estructura de micelas y vesículas

1.3. Nanopartículas y nanocápsulas poliméricas como transportadores de fármacos

Una de las aplicaciones más relevantes de las nanopartículas o nanocápsulas de copolímeros bloque anfífilicos es la encapsulación y liberación controlada de fármacos con baja solubilidad en medios acuosos.⁵ Esto se debe a las múltiples ventajas que presentan estos autoensamblados poliméricos como son: fácil preparación, estabilidad, distribución estrecha de tamaño, capacidad de protección de los fármacos y preservación de su actividad durante la circulación, mejora de la farmacocinética y alta eficiencia de encapsulación sin modificación

química del medicamento. Para poder ejercer su función, estas estructuras deben ser biocompatibles y preferentemente biodegradables en el medio y además deben tener tamaños pequeños que aseguren una correcta dosificación en las dianas terapéuticas.

Hay diferentes métodos empleados para la preparación de ensamblados poliméricos, por ejemplo a partir de copolímeros bloque. El método se elige principalmente en función del tipo de polímero y aplicación, y del tamaño de la nanopartícula que se desea. Uno de los métodos más empleados es la nanoprecipitación, también denominado método del co-solvente. El método general consiste en añadir agua sobre una disolución del copolímero en un disolvente orgánico miscible con agua. En este disolvente orgánico son solubles ambos bloques, y por lo tanto el copolímero bloque en su conjunto, y las macromoléculas del copolímero se encuentran dispersas y solvatadas. La adición de agua gota a gota provoca un cambio de la solubilidad del bloque hidrófobo en el medio y provoca la asociación de las macromoléculas para generar autoensamblados poliméricos. Las macromoléculas comienzan a asociarse en estas estructuras más complejas cuando la concentración del copolímero alcanza un valor de concentración en una composición determinada de mezcla de ambos disolventes y que se denomina concentración de agregación crítica (CAC).⁶ Además de ser miscible en agua, el disolvente orgánico debe ser fácil de eliminar por evaporación o por diálisis en la última etapa del proceso de fabricación de las nanopartículas o vesículas dispersas en medio acuoso.

Frente a los fármacos convencionales, los sistemas de liberación controlada ofrecen ventajas tales como mayor eficacia, menor toxicidad y efectos secundarios, y tienen como objetivo administrar el fármaco durante un tiempo determinado, manteniendo una concentración óptima en el sitio de acción, sin necesidad de administrar dosis elevadas. En este sentido los copolímeros bloque anfífilos sensibles a algún tipo de estímulo externo son especialmente útiles para el encapsulado y la liberación controlada de fármacos. A priori, es posible deformar o romper una nanopartícula o una vesícula polimérica y liberar su contenido como consecuencia de una variación de las propiedades del polímero por exposición a un cambio en las condiciones de su entorno. Como estímulos se pueden usar cambios de pH, de temperatura, de potencial redox, ultrasonidos, gases, biomoléculas o enzimas y también la luz. Un ejemplo habitual de liberación controlada de fármacos es el regulado por el pH. En el cuerpo humano sano predomina un pH de 4,0-7,0 y su valor depende del tipo de tejido considerado. Así, se pueden diseñar nanopartículas sensibles a cambios de pH que tengan como objetivo, por ejemplo, orgánulos intracelulares ácidos de tumores sólidos, siendo capaces de liberar el principio activo como respuesta a una disminución del pH.

1.4. Nanopartículas con respuesta a la luz

Los copolímeros bloque anfífilos con respuesta a la luz son especialmente interesantes ya que la longitud de onda y la intensidad de la luz son muy fáciles de controlar, así como el tiempo de exposición a la luz y la zona de aplicación. Esto permite una liberación con control espacio-temporal muy preciso a diferencia de otros estímulos basados en agentes químicos. La respuesta a la luz suele estar relacionada con la presencia de grupos funcionales que son capaces de sufrir algún tipo de reacción o isomerización al ser irradiados con luz de una determinada longitud de onda.⁷

Uno de los compuestos más utilizados para dotar a un polímero de respuesta a la luz es el azobenceno, que presenta dos isómeros: *cis* y *trans*. Los dos isómeros pueden interconvertirse mediante la irradiación con luz de longitud de onda adecuada en un proceso denominado fotoisomerización (véase Figura 1.5). En el caso del azobenceno, como se observa en la Figura 1.6, el máximo de absorción del isómero *trans*-azobenceno se sitúa aproximadamente a 365 nm, que corresponde a la transición $\pi\text{-}\pi^*$, por lo que irradiando a esa longitud de onda se consigue isomerizar al *cis*-azobenceno. La reversión al *trans* se puede conseguir vía térmica o con luz de longitud de onda correspondiente al visible (azul), donde se localiza la transición $n\text{-}\pi^*$ del isómero *cis* (es mayor que en el caso del *trans* debido a su no planaridad). El isómero *trans* es más estable termodinámicamente que el *cis* y tiene una geometría preferentemente plana, mientras que el *cis* tiene una geometría angular y es más polar. No obstante, tanto los espectros, y por lo tanto los máximos de absorción, como la geometría molecular y estabilidad relativa de los isómeros puede ser modulada introduciendo los sustituyentes adecuados. Una limitación importante de la luz UV es que puede ser dañina y tiene poca penetración en tejidos biológicos, lo que ha llevado a abusar sistemas basados en azobencenos (u otros sistemas orgánicos) que respondan a luz roja o NIR de mayor penetración y menores efectos secundarios en procesos terapéuticos.

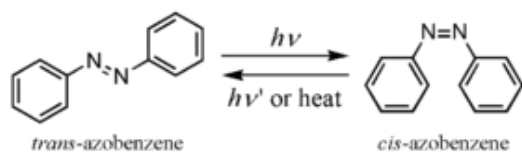


Figura 1.5. Isomerización azobenceno

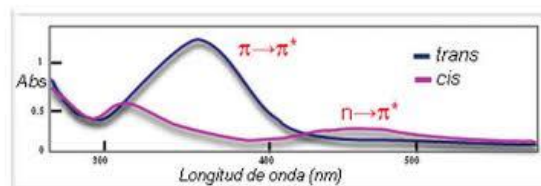


Figura 1.6. Espectros UV de los isómeros del azobenceno

1.5. Estabilización de nanopartículas poliméricas por entrecruzamiento

Las nanopartículas poliméricas y vesículas que se obtienen por autoensamblado de macromoléculas con una estructura anfífila son estables en determinadas condiciones de concentración y, por ello, una excesiva dilución provoca su desensamblado. Esto es un problema en la dosificación de fármacos ya que una vez administradas, la dilución de las nanopartículas en el torrente sanguíneo puede provocar dicho desensamblado y la liberación prematura del fármaco. Para prevenir la desagregación causada por la dilución, se puede modificar la estructura entrecruzando la corona o el núcleo de la micela o la membrana de la vesícula, generando nanopartículas más estables. El entrecruzamiento suele llevarse a cabo mediante enlaces covalentes.⁸

Para llevar a cabo el entrecruzamiento covalente, se requieren preferentemente reacciones simples, rápidas y con altos rendimientos, que no generen subproductos y en los que los reactivos y disolventes empleados sean asequibles, de baja o nula toxicidad y fácilmente eliminables. Habitualmente se recurre a típicas reacciones de entrecruzamiento incluidas en la denominada "Química Click".⁹ Estos entrecruzamientos, como se ha comentado, mejoran

considerablemente la estabilidad de las nanopartículas pero también dificultan la liberación de la carga una vez alcanzado el objetivo, debido a que la red tridimensional macromolecular obtenida obstaculiza y demora la difusión del fármaco al exterior.

Una solución a este “exceso de estabilidad” es entrecruzar mediante enlaces no covalentes, por ejemplo, mediante enlaces de hidrógeno. Esta interacción es selectiva y direccional, pero esencialmente es dinámica y reversible, y depende de factores como el pH y de la temperatura. El estudio de estos sistemas moleculares bien definidos utilizando enlaces no covalentes lo lleva a cabo la Química Supramolecular.¹⁰

En este trabajo se pretende combinar un entrecruzamiento no covalente con la incorporación de grupos funcionales fotoestimulables, para conseguir por una parte nanopartículas más estables a la vez que facilitar su desagregación con luz. Para ello se usarán aproximaciones típicas de la Química Supramolecular en el proceso de reticulación y azobencenos como unidades de fotoestimulación.

2. Objetivos y planteamiento

El objetivo principal de este trabajo ha sido la síntesis de nuevos reticulantes que faciliten la preparación de nanopartículas poliméricas estables a partir de copolímeros bloque anfífilos, cuya función es el encapsulado y liberación de pequeñas moléculas.

El trabajo se ha centrado inicialmente en la preparación de agentes entrecruzantes por enlaces de hidrógeno basados en ácido cianúrico (Cy) y timina (Thy), más concretamente entrecruzantes alifáticos y agentes de reticulación que respondan a la luz basados en unidades de azobenceno (AZO).

En la Figura 2.1 se muestra la estructura general de los agentes entrecruzantes propuestos en este trabajo.

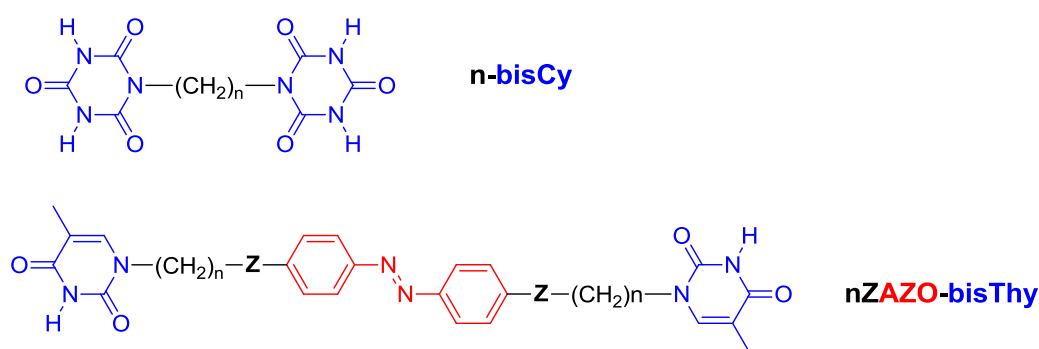


Figura 2.1. Estructura general de los agentes entrecruzantes

Posteriormente se ha abordado la formación de los correspondientes materiales poliméricos supramoleculares utilizando estos agentes con un copolímero bloque que tiene unidades de 2,6-diacilaminopiridina (DAP), PEG-*b*-PDAP, previamente sintetizado por otros miembros del grupo de investigación. La unión tiene lugar por el reconocimiento molecular entre la timina o el ácido cianúrico del agente entrecruzante y la unidad DAP del copolímero, tal como puede verse en la figura 2.2. El ácido cianúrico (Cy) presenta ciertas ventajas en el reconocimiento molecular ya que es capaz de formar hasta seis enlaces de hidrógeno con dos unidades de 2,6-diacilaminopiridina (DAP) frente a los tres que forma la timina (Thy) con una sola unidad de 2,6-diacilaminopiridina (DAP).

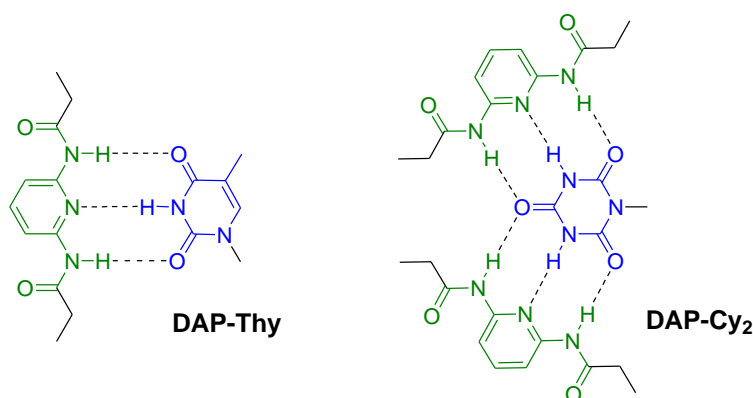


Figura 2.2. Estructura de los complejos supramoleculares formados entre la unidad 2,6-diacilaminopiridina (DAP) y la timina (Thy) o el ácido cianúrico (Cy)

3. Resultados y discusión

3.1. Síntesis de derivados del ácido cianúrico

Inicialmente se procedió a la síntesis de agentes entrecruzantes alifáticos basados en ácido cianúrico. Se abordaron dos compuestos con espaciadores polimetilénicos de cuatro ($n=4$) y doce ($n=12$) metilenos, según el esquema de la Figura 3.1.

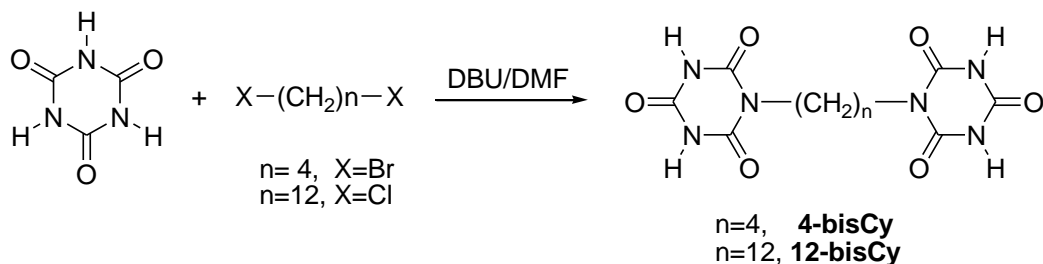


Figura 3.1. Reacción de síntesis de los entrecruzantes basados en ácido cianúrico

La utilización de compuestos análogos para la obtención de polímeros supramoleculares aparece registrada en diversos trabajos^{11,12,13}, sin embargo no se describen los correspondientes procedimientos experimentales seguidos en su preparación. Para su obtención, se hizo reaccionar el correspondiente α,ω -dihaluro de alquilo con exceso de ácido cianúrico (exceso 50% molar) en presencia de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) en DMF.¹⁴ Sin embargo, una vez concluida la reacción no fue posible separar completamente el producto deseado del ácido cianúrico sobrante ni mediante purificación por columna cromatográfica, ni por recristalización, probablemente debido a su similar polaridad.

3.2. Síntesis y caracterización de azobencenos con unidades de timina

Dados los problemas descritos, no se siguió explorando entrecruzantes derivados del ácido cianúrico y el resto del trabajo se realizó con derivados de timina, de los que se disponía de algún producto análogo previamente sintetizado

Se planteó la síntesis de entrecruzantes azobenceno con unidades timina, cuyos procedimientos de síntesis y estructuras se muestran en la Figura 3.2. Para ello se comenzó con la síntesis de la unidad fotosensible 4,4'-dihidroxi-azobenceno mediante acoplamiento azoico usando fenol y 4-aminofenol como reactivos y a través de la correspondiente sal de diazonio de este último (reacción de sustitución electrófila aromática) según un procedimiento descrito en la literatura.¹⁵

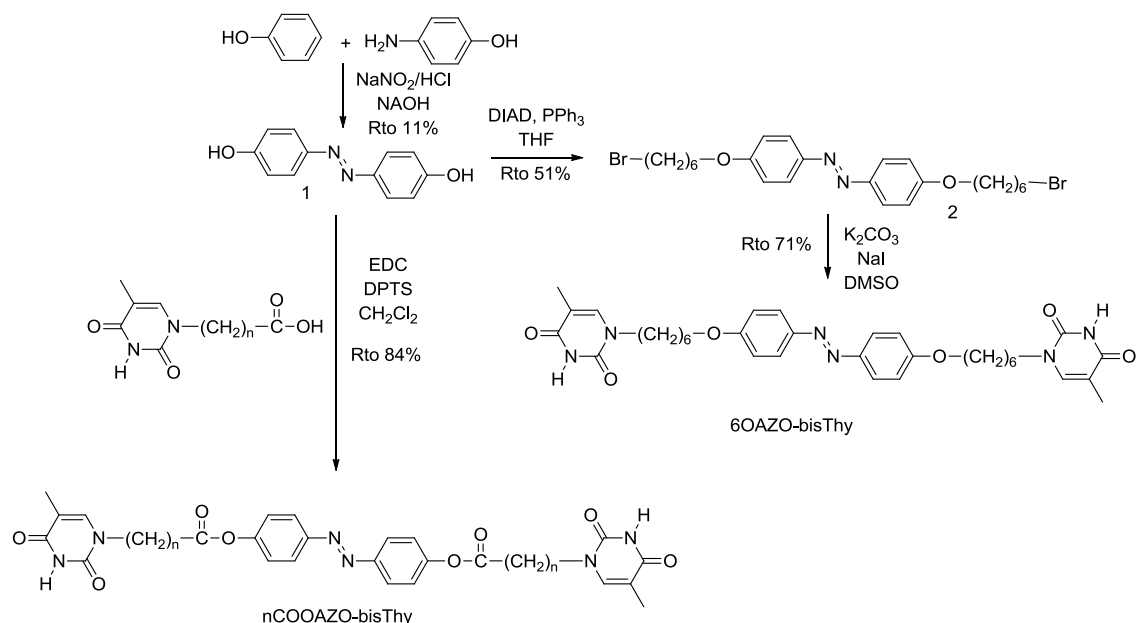


Figura 3.2. Esquema de síntesis de los entrecruzantes derivados de azobenceno

En primer lugar se llevó a cabo una reacción de eterificación en condiciones de Mitsunobu sobre este azobenceno (1) empleando 6-bromohexan-1-ol, DIAD y PPh_3 para obtener el correspondiente compuesto dibromado con espaciadores hexametilénicos (2). A continuación mediante una reacción de sustitución de los átomos de bromo por anillos de timina usando K_2CO_3 y NaI se obtiene el reticulante **6OAZO-bisThy** con grupo electrodador éter en las posiciones 4-4'-azobenceno (Figura 3.2). A pesar de que en los distintos experimentos de caracterización se identifica la presencia de este compuesto, en el espectro de masas se observa también la presencia de un dímero ($[\text{M}+\text{Na}]^+=1135.6$ Figura A.12 Anexo) al que se le asigna la estructura mostrada en la Figura 3.3. La aparición de este compuesto se debe a que la alquilación de la timina no es regioselectiva por lo que además de la alquilación en la posición N_1 , que genera el producto mayoritario, también se da en la posición N_3 ¹⁶. El subproducto obtenido es el resultado de la alquilación en las dos posiciones posibles, N_1 y N_3 , y por lo tanto, la sustitución en los dos átomos de N. El producto **6OAZO-bisThy** es prácticamente insoluble en la mayoría de disolventes habituales por lo que no fue posible la separación cromatográfica del subproducto obtenido, y aunque se realizó una recrystalización en etanol no pudo lograrse la purificación completa.

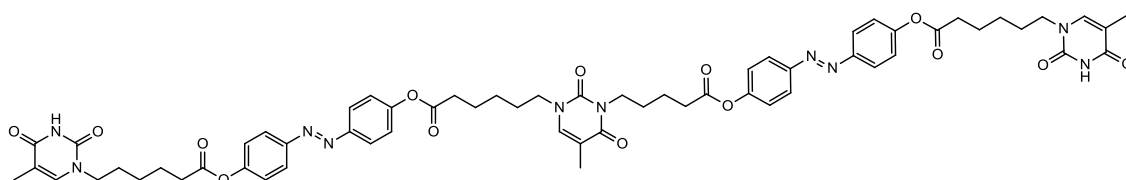


Figura 3.3. Subproducto de la reacción de obtención del azobenceno 6OAZO-bisThy

Para solventar estos problemas se decidió alterar el orden de las etapas de reacción, llevando a cabo una reacción de esterificación sobre el 4,4'-dihidroxi azobenceno (1) con un ácido carboxílico portador del anillo de timina. Como puede observarse en este caso en las posiciones *para*- del azobenceno el grupo de unión no es un éter, -O-, es un alciloxi -O(OC)- por

tanto débilmente dador. La estrategia se probó inicialmente con un derivado del ácido acético que porta una unidad de timina, dado que es comercial y posteriormente con la del ácido hexanoico. De esta manera se obtienen dos derivados que se diferencian en la longitud de la cadena metilénica que separa el anillo de timina del grupo carboxilo.

Con este planteamiento se realizó una esterificación de Steglich del 4,4'-dihidroxiázobenceno (1). Se trata de una esterificación que transcurre mediante un intermedio O-acil-isourea que tras el ataque del alcohol conduce al éster deseado **2COOAZO-bisThy**. En este caso nos encontramos de nuevo con un producto de una solubilidad muy limitada en la mayoría de los disolventes, por lo que su purificación se realizó mediante sucesivos lavados del sólido obtenido con diclorometano y separación del sólido mediante centrifugación.

El espectro RMN ^1H registrado en DMSO- d_6 indica que el sólido final obtenido no está totalmente puro.

Finalmente, y con el objetivo de mejorar la solubilidad del producto final, se realizó la esterificación con un derivado que separaba la unidad de timina del grupo carboxilo por 5 unidades metilénicas (derivado del ácido hexanoico), que fue necesario obtener previamente ya que no es comercial según el procedimiento que se indica en la figura 3.4. En primer lugar se realizó la alquilación del N_1 de la timina con 6-bromohexanoato de metilo (3), a su vez obtenido por esterificación de ácido 6-bromohexanoico. Al igual que se ha descrito con **6OAZO-bisThy**, en la reacción de *N*-alquilación no se obtiene el producto puro por lo que se separa mediante la realización de cromatografía en columna.

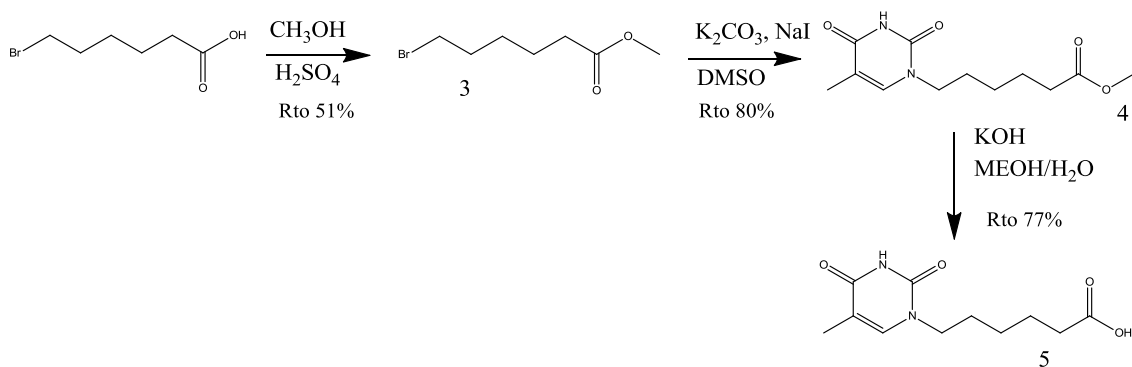


Figura 3.4. Esquema de síntesis del ácido timina-hexanoico

Por último, una esterificación Steglich del 4,4'-dihidroxiázobenceno (1) con el ácido obtenido por saponificación del éster metílico (5) permitió obtener el producto buscado **6COOAZO-bisThy** (véase Figura 3.2) que se recristalizó en etanol y se obtuvo de forma pura como evidencian los espectros de FTIR, RMN ^1H y RMN ^{13}C . Se observa una mejora significativa de la solubilidad respecto a los compuestos anteriores, pero todavía es limitada en disolventes halogenados habituales o acetona por lo que los espectros se registran en DMSO. Estos espectros se muestran en las figuras A.7, A.8 y A.9 de los Anexos.

3.3. Estudios de irradiación y calentamiento en disolución de 6COOAZO-bisThy

El compuesto **6COOAZO-bisThy** ha sido el único entrecruzante que se ha obtenido adecuadamente purificado, y cuya caracterización evidencia la ausencia de otras impurezas.

Por ello, una vez caracterizado, se estudió el comportamiento frente a la luz y la temperatura de **6OOC-AZO-bisThy** en disolución de DMSO mediante RMN ^1H y espectroscopia UV-VIS dado que los correspondientes isómeros *trans* y *cis* presentan características diferentes.

Inicialmente se realizó el estudio mediante espectroscopía UV-vis, registrándose el espectro a una concentración de 6.23×10^{-5} M en DMSO. Se observa (en la figura 3.5.) un máximo de absorción aproximadamente a 365 nm, que corresponde a la transición $\pi-\pi^*$ del isómero *trans*. Irradiando a esa longitud de onda se consigue isomerizar al *cis*-azobenceno, apreciándose una clara disminución de la intensidad de la banda $\pi-\pi^*$ y el aumento de la banda $n-\pi^*$, que es una transición prohibida por las reglas de simetría en el caso del isómero *trans* pero permitida en el caso del *cis* (Figura 3.5). Esto ocurre hasta que se alcanza el estado fotoestacionario, aproximadamente a los 5 min de irradiación, en el que la proporción *trans/cis* ya no cambia aunque sigamos irradiando la disolución. La reversión al *trans* se puede conseguir con luz de longitud de onda correspondiente al visible (420 nm), donde se localiza la transición $n-\pi^*$ del isómero *cis* (Figura 3.6).

El máximo de absorción situado aproximadamente a 275 nm corresponde a la timina y no muestra ninguna variación significativa al irradiar a 365 nm.

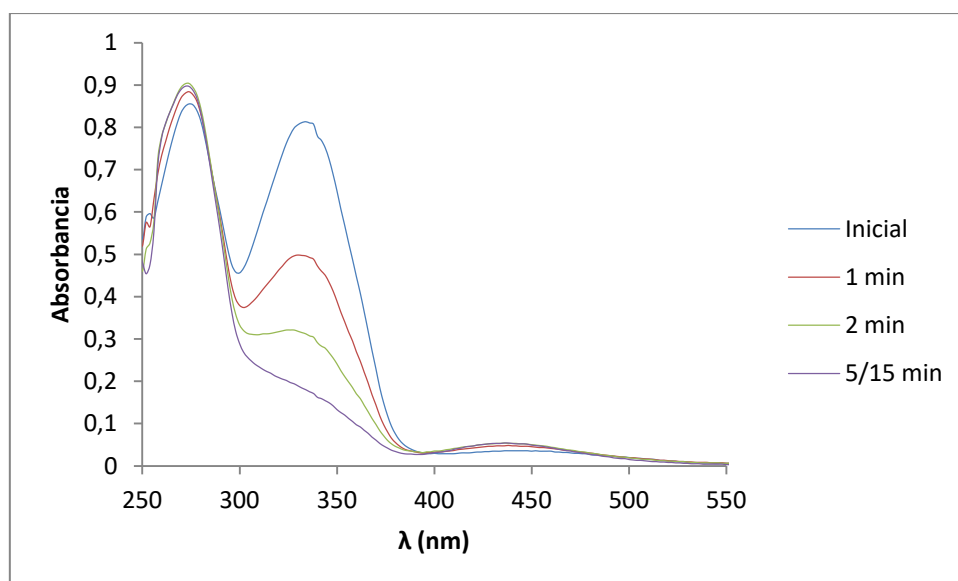


Figura 3.5. Evolución del espectro UV-vis del compuesto 6COOAZO-bisThy al irradiar a 365 nm: Interconversión *trans-cis*

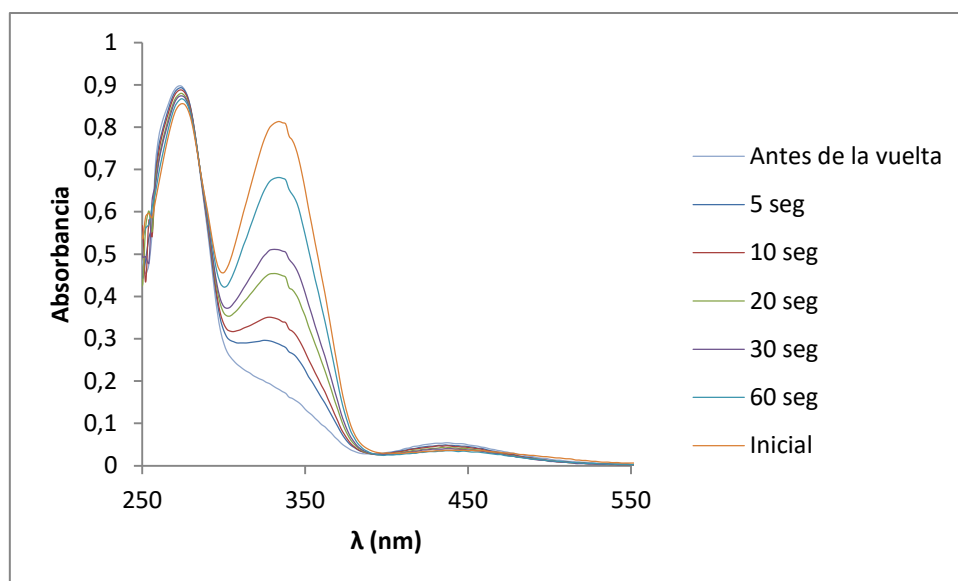


Figura 3.6. Evolución del espectro UV-vis del compuesto 6COOAZO-bisThy al irradiar a 420 nm: Interconversión *cis-trans*

También se realiza en estudio mediante RMN ^1H . El espectro de RMN ^1H inicial (Figura 3.7) sólo se observan las señales correspondientes al isómero *trans* que es el más estable termodinámicamente. Cuando se irradia la muestra con luz UV de 365 nm aparecen nuevas señales correspondientes al isómero *cis*.

Las señales que se ven afectadas son las correspondientes a los protones de los anillos aromáticos a 7-8 ppm ya que el apantallamiento de los mismos varía en función del isómero. Para el caso del isómero *trans* el espectro presenta un sistema *para* que aparece duplicado cuando se produce la conversión al isómero *cis*.

Al ir aumentando el tiempo de irradiación, las señales de los protones aromáticos asociadas al isómero *cis* aumentan proporcionalmente a la disminución de las señales del *trans*, ya que se trata de una interconversión (Figura 3.8). Esto ocurre hasta que se alcanza el estado fotoestacionario. En el isómero *cis* también se observa un desplazamiento de la señal correspondiente al protón de la timina.

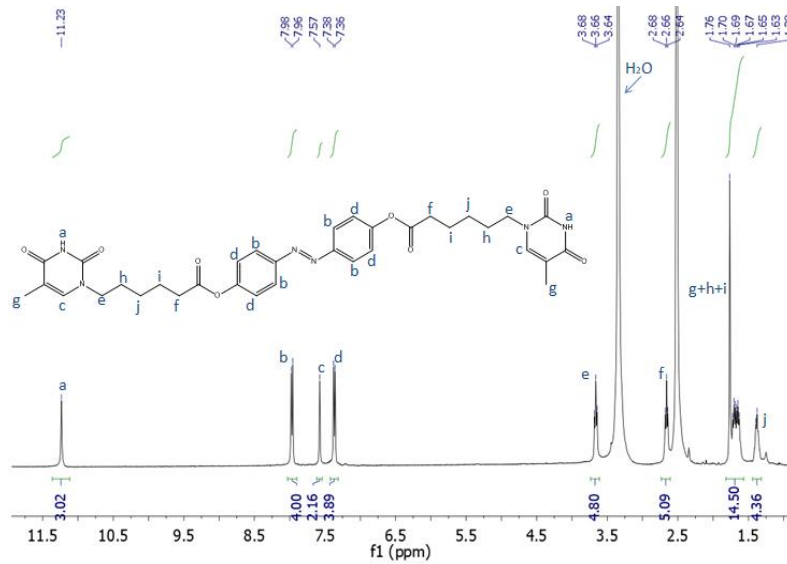


Figura 3.7. Espectro HRMN antes de irradiar del compuesto 6COAZO-bisThy

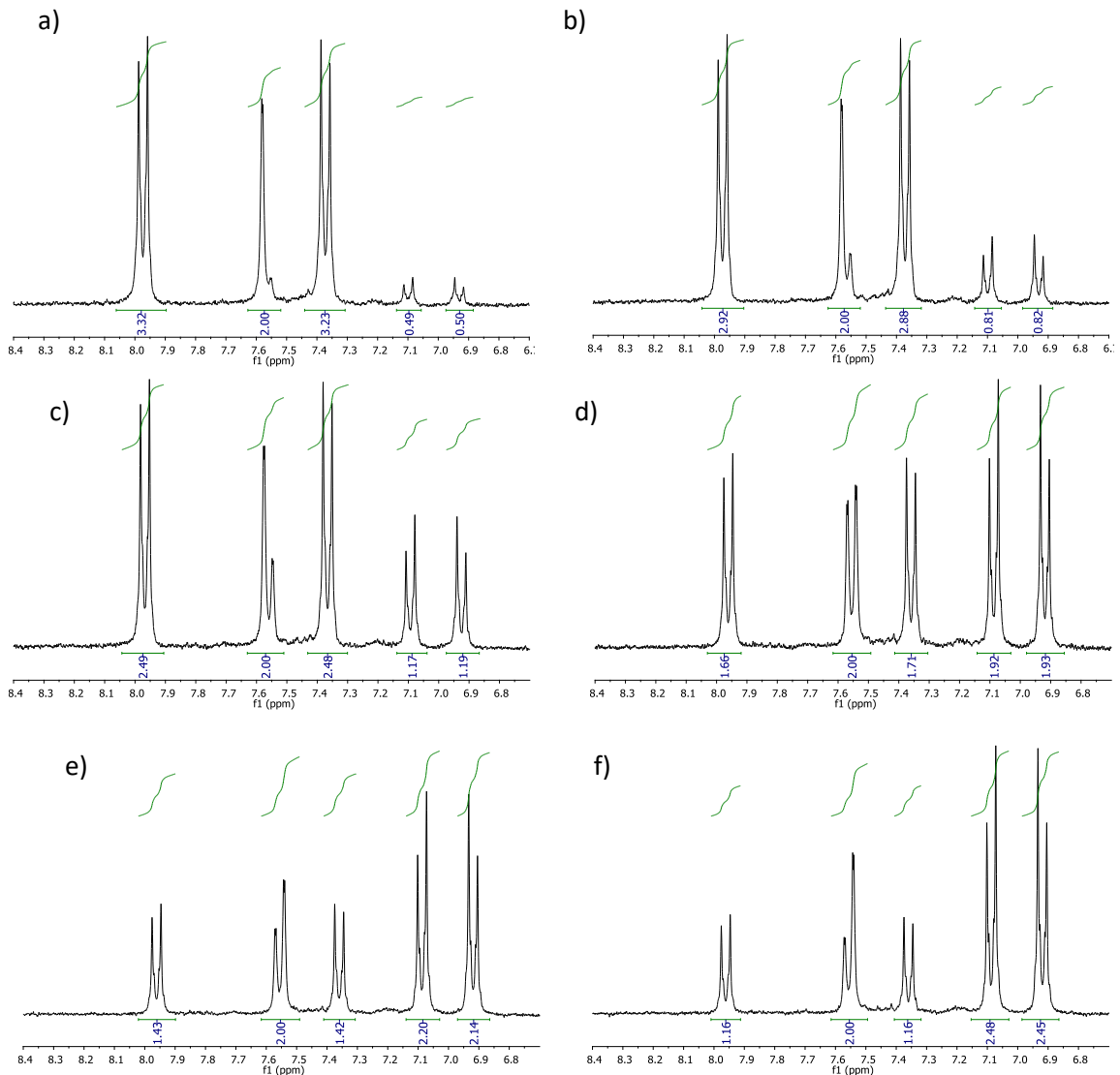


Figura 3.8. Estudio de fotoisomerización por ¹HRMN del compuesto 6COAZO-bisThy: Tras irradiar a 365nm a) 60s; b) 150s; c) 300s; d) 600s; e) 900s; f) 1200s

De la misma forma que se ha estudiado el proceso de fotoisomerización *trans-cis* a 365 nm, también se ha estudiado la isomerización inversa al isómero *trans* irradiando con luz visible a 420 nm (Figura 3.9) donde absorbe preferentemente el isómero *cis*.

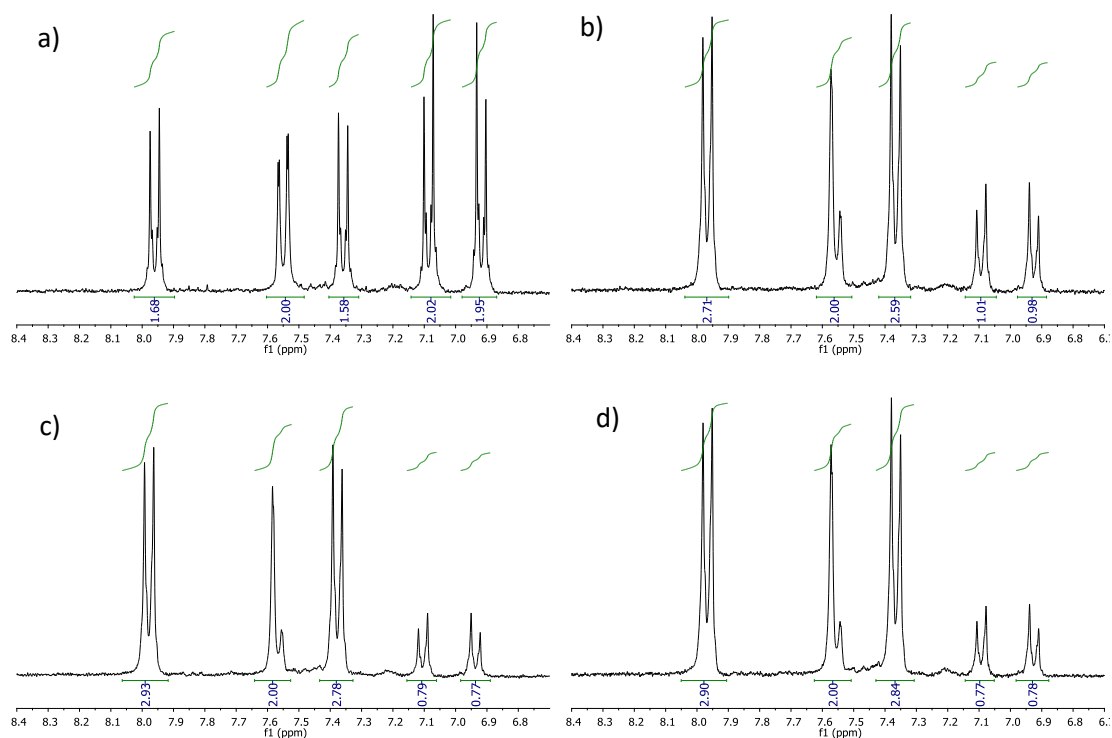


Figura 3.9. Proceso reversible de fotoisomerización del compuesto 6COAZO-bisThy: a) Situación de estado fotoestacionario; b) Irradiando a 420nm 15s; c) Irradiando a 420nm 30s; d) Irradiando a 420nm 60s

El proceso de vuelta al isómero más estable (*trans*) ocurre rápidamente y la variación de las señales es similar que la anterior pero en sentido contrario. No se llega a la situación inicial (antes de la primera irradiación), en la cual no había señales del isómero *cis*, sino que se alcanza un equilibrio en el cual predomina el isómero *trans*. Estas conclusiones son similares tanto en el estudio por espectroscopia UV-vis como RMN.

Además, también se estudió si la isomerización *trans-cis-trans* del azobenceno es reversible vía térmica, dejando las muestras en oscuridad durante 24h y calentando la disolución a 80°C durante 12h, pero se observa que en ambos casos la variación de los espectros es mínima. Por ello se concluye que o la transformación del isómero *cis* al *trans* en estas condiciones es lenta o que el isómero *cis* en estas condiciones es más estable de lo previsto para este tipo de compuestos.

Por otra parte, es conocido que la timina dimeriza cuando es irradiada a 254 nm. En nuestro caso, la irradiación con lámpara fluorescente (máximo emisión a 365 nm) pudiera causar esta dimerización, si bien no se aprecia en los espectros UV-vis. No obstante, para determinar si la timina sufre alguna reacción fotoinducida durante la interconversión *trans-cis* se estudió una timina alifática, sin influencia por tanto de la unidad azobenceno, (Figura 3.10) en DMSO a una concentración aproximada de 10^{-4} a distintos tiempos de irradiación.

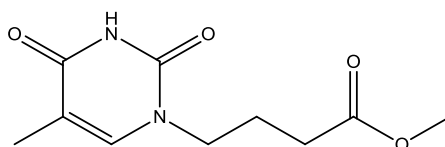


Figura 3.10. Timina alifática usada para el estudio

Según los resultados obtenidos se puede afirmar que no hay dimerización de la timina durante la irradiación con la lámpara a 365 nm.

3.4. Preparación y caracterización de redes poliméricas supramoleculares

El compuesto **6COAZO-bisThy** sintetizado se utilizó para la formación de redes poliméricas supramoleculares derivados de un copolímero sintetizado previamente por otros miembros del grupo, concretamente PEG_{10k}-b-PDAP (véase Figura 3.13), que tenía un bloque de PEG de masa molar 10000 y un grado de polimerización en el bloque de PDAP de 27. Como se ha indicado previamente, la timina es capaz de formar tres enlaces de hidrógeno con la unidad de 2,6-diacilaminopiridina (DAP) del bloque PDAP, como se muestra en la Figura 3.11, y además lo hace por ambos extremos con lo que entrecruza las cadenas de copolímero bloque.

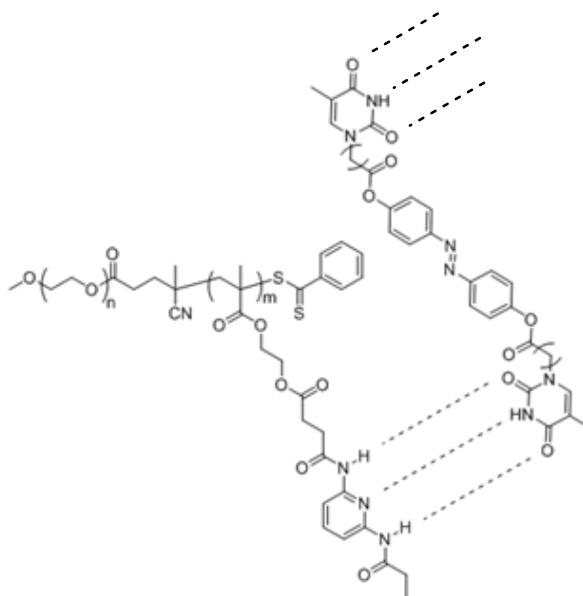


Figura 3.11. Interacciones supramoleculares entre PDAP del copolímero bloque y 6COAZO-bisThy

La preparación de estas redes supramoleculares se hizo pesando una cantidad aproximadamente fija de copolímero y cantidades variables de **6COAZO-bisThy** para que pueda reaccionar (formando enlaces de hidrógeno) el 25%, 50% y 100% de las unidades DAP del copolímero bloque (considerando que todas las unidades de 2,6-diacilaminopiridina se unen a timina). Una vez pesados, ambos componentes se disolvieron en THF y se evaporó lentamente el disolvente bajo agitación en un agitador orbital, para obtener un material en polvo homogéneo ligeramente anaranjado como consecuencia de la incorporación del entrecruzante de azobenceno.

3.5. Preparación y estudio de autoensamblados en agua

La última etapa de este trabajo consistió en comprobar si los polímeros supramoleculares formados a partir de PEG_{10k}-b-PDAP y distintas cantidades de entrecruzante son capaces de formar autoensamblados en agua. Para ello se formaron agregados por el método de nanoprecipitación partiendo de una disolución de 5 mg de polímero en 1 mL de THF (en el cual son solubles ambos bloques, y es miscible con agua). A continuación se añadió progresivamente agua grado Milli-Q en porciones de 20 μL. En el caso de formarse agregados, la turbidez de la muestra debería aumentar como consecuencia de la dispersión de luz de los agregados nanométricos formados.

Una forma indirecta de medir dicha turbidez es registrar la absorbancia (o transmitancia) a una determinada longitud de onda mientras se añade el agua. En esta longitud de onda no deben absorber ninguno de los grupos funcionales del polímero. Si aumenta la turbidez, lo cual es señal de una mayor formación de autoensamblados, la luz incidente se dispersa, con lo que llega menos luz al detector, por lo que se registra un aparente aumento de absorbancia. En el procedimiento llevado a cabo se registró la absorbancia a 650nm frente al porcentaje de agua añadido, como se puede ver en la Figura 3.12. Una vez formados se someten a diálisis para eliminar el disolvente orgánico y se obtienen concentraciones finales de 1mg/mL.

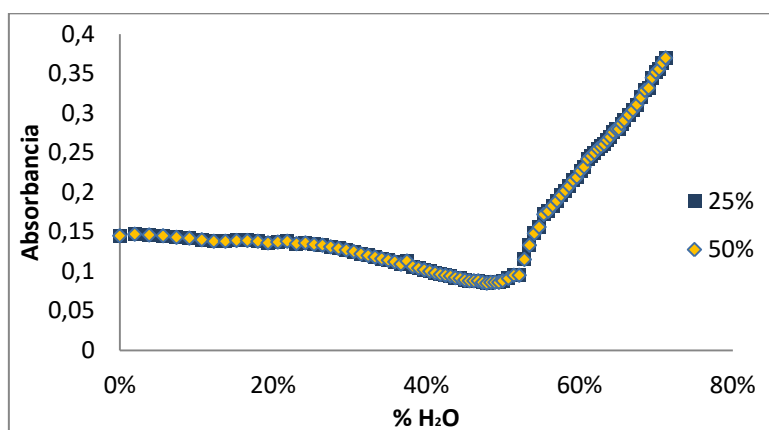


Figura 3.12. Curvas turbidimétricas observadas en la preparación de autoensamblados

De las tres muestras obtenidas, aquella que presentaba una proporción de entrecruzante del 100% respecto de la timina, precipitó tras la diálisis por lo que los estudios posteriores sólo se realizan con las muestras con proporciones de 25 y 50%.

Para conocer con más detalle la formación de los autoensamblados, se determinó la concentración de agregación crítica (CAC). Para ello se preparan disoluciones con concentraciones variables del copolímero supramolecular, entre 10^{-4} mg/mL y 1 mg/mL, y la misma concentración de rojo de nilo y se realizan medidas de fluorescencia. El rojo nilo no presenta fluorescencia en medio polar, pero si se encapsula en un entorno hidrófobo, como ocurre si se forman las nanopartículas, esta fluorescencia aumenta y por lo tanto sirve de sonda para la determinación de formación de los autoensamblados poliméricos. Se obtienen los valores mostrados en la Figura 3.13.

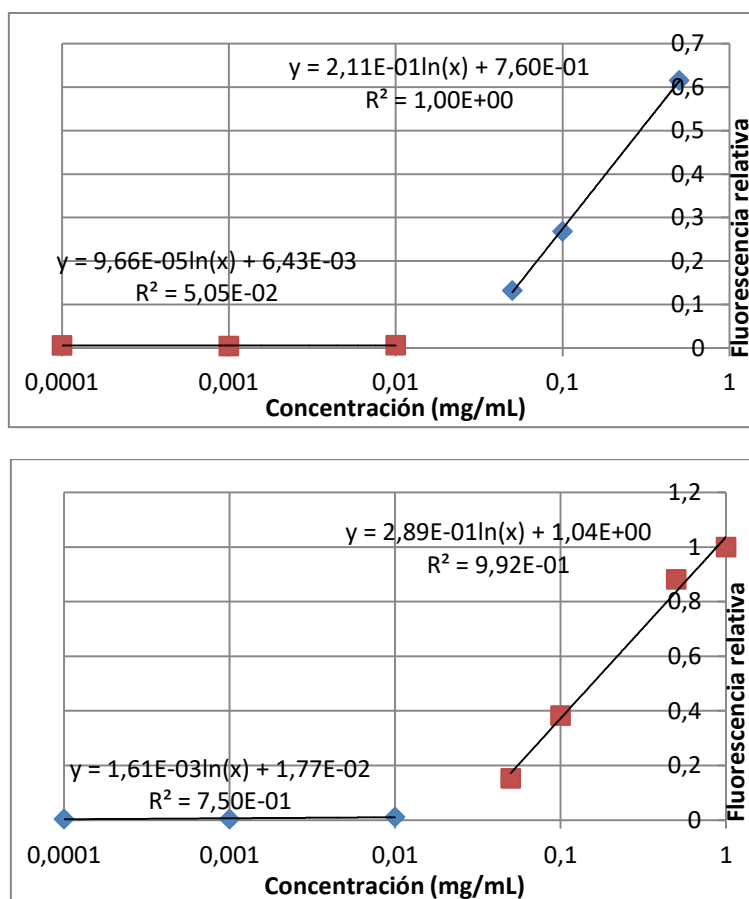


Figura 3.13. Cálculo de CAC para el copolímero supramolecular en proporción a) 1:0,25 b) 1:0,5

La CAC es el punto en el cual se cruzan las dos rectas, que para cada uno de los casos es la que se muestra a continuación, siendo más pequeña cuanto mayor es el porcentaje de entrecruzante supramolecular:

Copolímero supramolecular 1:0,25	Copolímero supramolecular 1:0,5
$7,4 \cdot 10^{-2}$ mg/mL	$2,8 \cdot 10^{-2}$ mg/mL

Los agregados formados se estudiaron mediante TEM (*Transmission Electron Microscopy*). Los autoensamblados de redes poliméricas supramoleculares dan micelas esféricas, como se puede ver en la Figura 3.14. Se observa mayor esfericidad y homogeneidad de tamaño en el caso de las nanopartículas del copolímero supramolecular en proporción 1:0.25, si bien son de tamaño ligeramente menor, lo que puede ser consecuencia del mayor contenido del agente entrecruzante. Realizando medidas sobre las imágenes de TEM se obtienen valores en torno a 24 nm para la proporción 1:0.25 y sobre 26 nm para 1:0.5. También se estudia el efecto de la irradiación a 365 nm, para el cual no se observan variaciones notables, como se puede ver en la Figura 3.15.

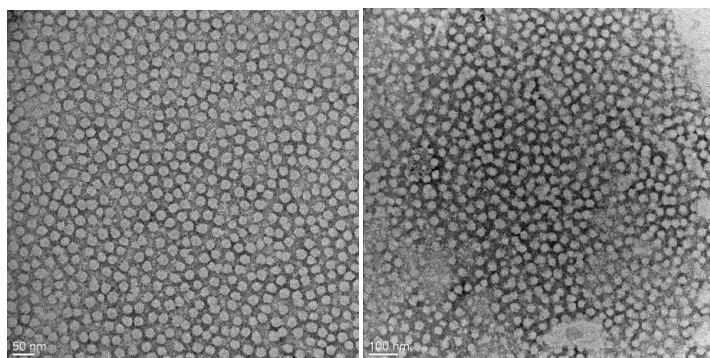


Figura 3.14. Autoensamblados de los copolímeros supramoleculares en proporción: a) 1:0,25 b) 1:0,5

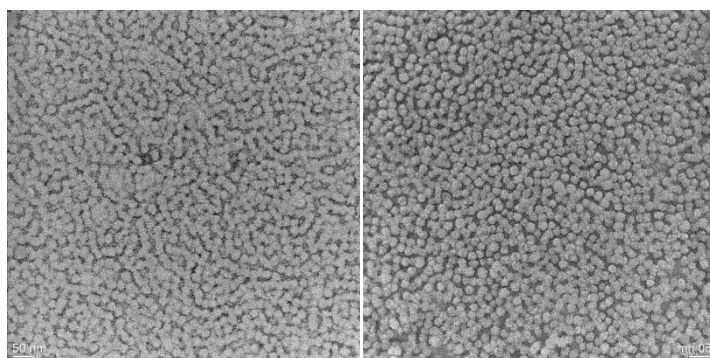


Figura 3.15. Autoensamblados de los copolímeros supramoleculares tras ser irradiados a 365 nm durante 15 min en proporción: a) 1:0,25 b) 1:0,5

Realizando medidas sobre las imágenes de TEM se obtienen valores entorno a 24 nm para el copolímero supramolecular en proporción 1:0.25 y sobre 26 nm para copolímero supramolecular en proporción 1:0.5.

La determinación de tamaños se hizo por medidas de dispersión dinámica de luz (DLS) que permiten conocer el tamaño de las nanopartículas formadas en fase acuosa. En esta técnica se mide la intensidad de la dispersión de luz de las nanopartículas presentes en la muestra, de manera que a mayor diámetro de partícula mayor dispersión de luz y por tanto mayor intensidad. Como este valor no sirve para cuantificar la cantidad de nanopartículas con un tamaño dado debido a la mayor dispersión de luz por parte de las partículas más grandes, se hace un tratamiento matemático por el cual obtenemos el tamaño de las nanopartículas en función del número de nanopartículas con dicho tamaño. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 3.16. Se obtiene una distribución de número en torno a 33 nm para ambos casos, algo superior que las obtenidas a partir de las imágenes de TEM, y de nuevo se observa que son ligeramente menores a mayor cantidad de entrecruzante.

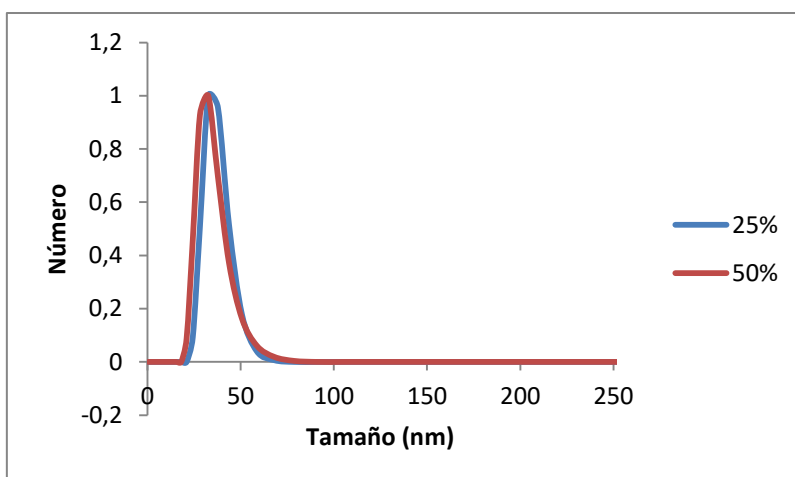


Figura 3.16. Gráficas de DLS para las dispersiones acuosas de nanopartículas

Una vez comprobada la formación de nanopartículas y que su tamaño, así como la CAC es función de la cantidad de agente entrecruzante, se hizo un primer estudio sobre la posibilidad de afectar con luz el agente entrecruzante y que se pueda provocar una liberación de moléculas encapsuladas en las nanopartículas, como consecuencia de la posible desagregación o modificación inducida por luz. Para ello se estudió la liberación de rojo de nilo en nanopartículas cargadas con esta sonda (recuérdese que la fluorescencia debe disminuir si la sonda pasa a un medio más polar). Para ello se prepararon disoluciones con una concentración de 1mg/mL de copolímero supramolecular y 10^{-6} mg/mL de rojo de nilo. Se mide la fluorescencia de dos disoluciones con la misma composición pero una de ellas es irradiada a 365 nm a diferentes tiempos. Se observa la variación mostrada en la Figura 3.16. Como puede comprobarse la irradiación implica la disminución de fluorescencia (algo que no se observa en las muestras de referencia no irradiadas), como consecuencia previsible de la liberación del rojo de nilo. Además esta caída de fluorescencia depende del porcentaje de azo.

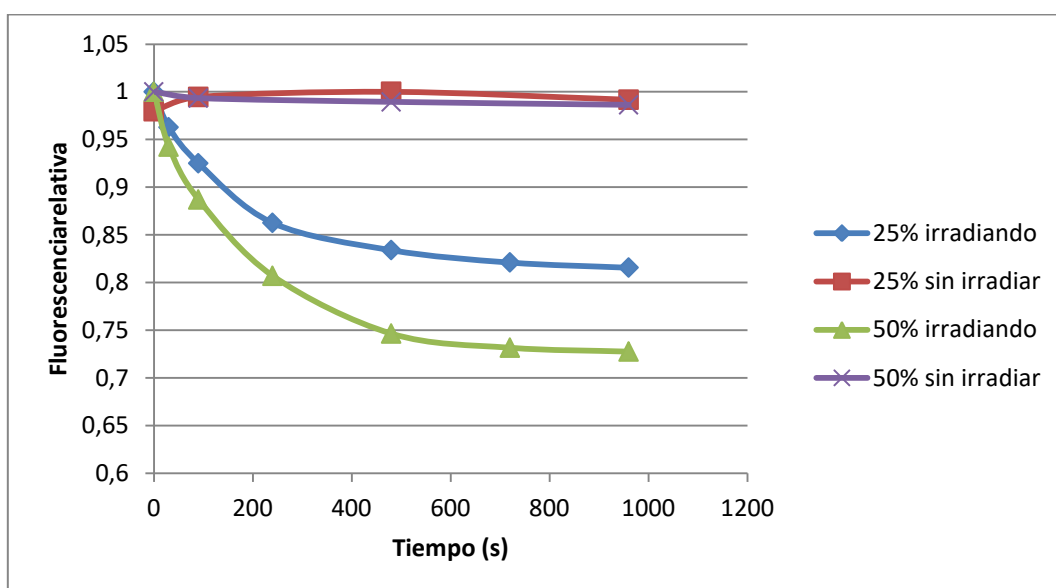


Figura 3.16. Variación de la fluorescencia con la liberación de rojo de nilo

4. Conclusiones

Las principales conclusiones de este trabajo son:

- La síntesis de reticulantes basados en ácido cianúrico presenta problemas tanto de síntesis como de purificación utilizando la estrategia prevista.
- En la síntesis de entrecruzantes con unidades timina y que contienen azobenceno, la ruta de síntesis más favorable es aquella consistente en una reacción de esterificación sobre el 4,4'-dihidroxiazobenceno con un ácido carboxílico portador del anillo de timina.
- En los estudios de irradiación en disolución de 6COOAZO-bisThy, realizados tanto por RMN ^1H como por UV-vis, se observa que el isómero termodinámicamente más estable es el *trans* que al ser irradiado a 365 nm isomeriza al *cis* hasta alcanzar un estado fotoestacionario. Además, la reversión al isómero *trans* se puede conseguir con luz de 420 nm.
- Empleándose el método de disolución en THF y adición progresiva de agua se formaron nanopartículas poliméricas a partir de los copolímeros supramoleculares que contenían el entrecruzante 6COOAZO-bisThy. Estos agregados son estables para proporciones de entrecruzante del 25% y 50% respecto de la timina. Tanto el tamaño (en torno a 30 nm) como la CAC depende del porcentaje de agente entrecruzante, siendo menor en ambos casos cuando el porcentaje de entrecruzante supramolecular aumenta.
- Por isomerización *trans-cis* es posible afectar la estabilidad de estas nanopartículas y provocar la liberación fotoestimulada de moléculas encapsuladas en el núcleo hidrófobo las nanopartículas como se comprobó con una sonda fluorescente hidrófoba como el rojo nilo.

Como conclusión final se puede afirmar que se ha desarrollado una buena estrategia para la síntesis de entrecruzantes azobenceno con unidades timina, compuestos que unidos a copolímeros previamente sintetizados, presentan un buen comportamiento a la hora de agregarse en forma de nanopartículas. Además, debido a la respuesta a la luz de las unidades de azobenceno, se pueden conseguir liberaciones controladas como respuesta a este tipo de estímulos.

5. Parte experimental

5.1. Síntesis de entrecruzantes

Síntesis de 1,1'-(dodecano-1,12-diyl)bis(1,3,5-triazin-2,4,6-triona) (12-bisCy)

Se disuelve ácido cianúrico (5g; 38.74 mmol) y 1,12-diclorodecano (1.27g; 3.87 mmol) en DMF (25 mL) y se adiciona DBU (1.17 mL; 7.75 mmol) diluido en DMF (10 mL). La reacción se mantiene a 70°C durante 24h y pasado este tiempo se evapora el disolvente. El residuo obtenido se disuelve en etanol y se filtra para eliminar posibles impurezas. Se evapora el disolvente a sequedad y el producto se purifica por columna cromatográfica en sílice, eluida con CH₂Cl₂:CH₃OH (9:1) aumentando gradualmente la polaridad a CH₂Cl₂:CH₃OH (1:1). Posteriormente se recristaliza en THF. Véase resultados y discusión.

Síntesis de 1,1'-(butano-1,4-diyl)bis(1,3,5-triazin-2,4,6-triona) (4-bisCy)

Se disuelve ácido cianúrico (5g; 38.74 mmol) y 1,4-dibromodecano (0.46mL; 3.87 mmol) en DMF (25 mL) y se adiciona DBU (1.17 mL; 7.75 mmol) diluido en DMF (10 mL). La reacción se mantiene a 70°C durante 24h y pasado este tiempo se evapora el disolvente. El residuo obtenido se disuelve en CH₂Cl₂:CH₃OH (9.5:0.5) (100mL) y se filtra para eliminar posibles impurezas. Se evapora el disolvente al rotavapor. Véase resultados y discusión.

Síntesis de 4,4'-dihidroxiazobenceno (1)

Una disolución de NaNO₂ (6.3 g; 92 mmol) en agua (130 mL) enfriada en un baño de hielo-agua (temperatura por debajo de 5°C) se adiciona gota a gota sobre una disolución de 4-aminofenol (10 g; 92 mmol) en HCl 2M (180 mL) también enfriada en un baño de hielo en un matraz de 1L. Se disuelve fenol (8.6 g; 96 mmol) y NaOH (11 g; 275 mmol) en agua, se enfría en baño de hielo y se adicionan gota a gota sobre la sal de diazonio. La reacción se mantiene en baño de hielo-agua con agitación durante 2h. Al cabo de este tiempo, se lleva a temperatura ambiente y a pH=3 con HCl 1M. Se extrae con cloroformo (3x50mL), se seca sobre MgSO₄ y se evapora a sequedad. El residuo se purifica por columna cromatográfica en sílice, eluida con CH₂Cl₂, aumentando finalmente la polaridad a CH₂Cl₂: acetato de etilo (9.5:0.5). (Rendimiento 11%).

¹H NMR [400 MHz, DMSO, δ (ppm)]: 10.14 (s, 2H), 7.73 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 6.93 (d, J = 8.8 Hz, 4H).

Síntesis de 4,4'-(6-bromohexiloxi)azobenceno (2)

Se añade 6-bromo-1-hexanol (0.56g; 3.08 mmol), 4,4'-dihidroxiazobenceno (1) (0.33g; 1.56 mmol), PPh₃ (0.81g; 3.08 mol) en un matraz de dos bocas de 100 mL y se disuelve en THF seco (20 mL) bajo atmósfera inerte. Se adiciona DIAD (0.61mL; 3.08 mmol) y se mantiene la reacción durante 18h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se adiciona más cantidad de 6-bromo-1-fenol (0.14g), DIAD (0.15mL) y PPh₃ (0.2g) y se mantiene durante 6h. Se evapora a sequedad y el residuo se purifica por columna cromatográfica en sílice, eluida con hexano: acetato de etilo (8:2) y a continuación por columna cromatográfica en sílice, eluida con CH₂Cl₂. (Rendimiento 51%).

^1H NMR [400 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]: 7.90 (m, $J=10$ Hz, $J=3$ Hz, 4H), 6.98 (m, $J=10$ Hz, $J=3$ Hz, 4H), 4.04 (t, $J=6.4$ Hz, 4H), 3.44 (t, $J=6.8$ Hz, 4H), 1.95-1.80 (m, 8H), 1.57-1.51 (m, 8H).

Síntesis de 4,4'-bis[6-(5-metil-2,4-dioxo-3-hidropirimidin-1-il)hexiloxi]azobenceno (6OAZO-bisThy)

Se añade 4,4'-(6-bromohexiloxi) azobenceno (2) (0.35g; 0.65 mmol), timina (0.4 g; 3.1 mmol), K_2CO_3 (0.2 g; 1.43 mmol) y NaI (0.2 g; 1.3 mmol) en un matraz de dos bocas de 100 mL y se disuelve en 10 mL de DMSO seco bajo atmósfera inerte. La reacción se calienta a 90°C con agitación durante una noche. Pasado este tiempo, la disolución se enfría a temperatura ambiente y se neutraliza con HCl 1M. Se añade H_2O y se extrae con CH_2Cl_2 (2x50 mL). A continuación la disolución se lava con NaCl (sat) (2x30mL). La fase orgánica se seca sobre MgSO_4 y se evapora a sequedad. El residuo se purifica por recristalización en etanol. (Rendimiento 71%).

^1H NMR [400 MHz, DMSO, δ (ppm)]: 11.22 (s, 2H), 7.84 (d, $J=8$ Hz, 4H), 7.56 (s, 2H), 7.11 (d, $J=8$ Hz, 4H), 4.08 (t, $J=7.6$ Hz, 4H), 3.64 (t, $J=8$ Hz, 4H), 1.76 (s, 6H), 1.66-1.34 (m, 16H).

Síntesis de 4,4'-bis(2-(5-metil-2,4-dioxo-3-hidropirimidin-1-il)acetiloxi)azobenceno (2COOAZO-bisThy)

Se añade 4,4'-dihidroxiazobenceno (1) (1g; 4.67 mmol), ácido 2-(5-metil-2,4-dioxo-3-hidropirimidin-1-il acético (3g; 12.9 mmol) y DPTS (1.1 g; 4.3 mmol) en un matraz de 250 mL y se disuelve en CH_2Cl_2 seco (30 mL) y DMF seca (5mL) bajo atmósfera inerte y se enfría a 0°C . Se adiciona EDC (2.2 g; 14.2 mmol) disuelta en CH_2Cl_2 seco. Se retira el baño de hielo y se mantiene la reacción durante 96h. El sólido obtenido se separa por centrifugación y se lava repetidamente con agua. El sólido seco final se vuelve a lavar con CH_2Cl_2 y se seca a vacío. (Rendimiento 80%).

^1H NMR [400 MHz, DMSO, δ (ppm)]: 11.52 (s, 2H), 8.01 (d, $J=8$ Hz, 4H), 7.64 (d, $J=1.2$ Hz, 2H), 7.43 (d, $J=8$ Hz, 4H), 4.84 (s, 4H), 1.81 (d, $J=1.2$ Hz, 6H).

Síntesis de 6-bromohexanoato de metilo (3)

Se toma ácido 6-bromohexanoico (10 g, 51.3 mmol) y se disuelve en 300mL de metanol en un matraz de 500 mL de fondo redondo. Se adicionan gota a gota 8mL de H_2SO_4 como catalizador en presencia de agitación y se mantiene a 65°C durante 12h. Al cabo de este tiempo, se enfría a temperatura ambiente y se evapora el metanol en el rotavapor. Se añaden 70 mL de H_2O y se extrae con 3x100mL de una mezcla de hexano: acetato de etilo (1:1). Los extractos orgánicos combinados, se lavan con 100 mL de NaHCO_3 saturado y se secan sobre MgSO_4 . La disolución se filtra y se evapora en el rotavapor. (Rendimiento 95%).

^1H NMR [400 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]: 3.63 (s, 3H), 3.37 (t, $J=6$ Hz, 2H), 2.29 (t, $J=8$ Hz, 2H), 1.87-1.80 (m, 2H), 1.64-1.58 (m, 2H), 1.47-1.39 (m, 2H).

Síntesis de (6-(5-metil-2,4-dioxo-3-hidropirimidin-1-il)hexanoato de metilo) (4)

Se añade 6-bromohexanoato de metilo (3) (8 g; 38.26 mmol), timina (11.6 g; 92 mmol), K_2CO_3 (7.4 g; 53.5 mmol) y NaI (6.3 g; 41 mmol) en un matraz de dos bocas de 250 mL y se disuelve

en 70 mL de DMSO seco bajo atmósfera inerte. La reacción se calienta a 90°C con agitación durante una noche. Pasado este tiempo, la disolución se enfría a temperatura ambiente y se neutraliza con HCl 1M. Aparece un sólido blanco y se filtra a vacío. A continuación la disolución se extrae con diclorometano (3x75mL) y después se lava con NaCl (sat) (2x40mL). La fase orgánica se seca sobre MgSO₄ y se evapora a sequedad. El residuo se purifica por columna cromatográfica en sílice, eluida con hexano: acetato de etilo (1:1), aumentando gradualmente la polaridad a hexano: acetato de etilo (1:9). Se realiza una segunda purificación con mayor precisión por columna cromatográfica en sílice, eluida con hexano: acetato de etilo (1:1). Se obtienen 3.05 g (12 mmol) de un sólido blanco céreo (Rendimiento 32%).

¹H NMR [400 MHz, CDCl₃, δ (ppm)]: 8.38 (s, 1H), 6.98 (m, *J* = 1.2 Hz, 1H), 3.71-3.66 (m, 5H), 2.33 (t, *J*=8 Hz, 2H), 1.92 (d, *J* = 1.2 Hz, 3H), 1.70-1.67 (m, 4H), 1.36 (tt, 2H).

Síntesis del ácido 6-(5-metil-2,4-dioxo-3-hidropirimidin-1-il) hexanoíco (5)

Una disolución de KOH (1.84 g; 31.66 mmol) en agua (25 mL) se añade sobre una disolución de 6-(5-metil-2,4-dioxo-3-hidropirimidin-1-il) hexanoato de metilo (5) (2.9 g; 11.4 mmol) en metanol (25 mL). La reacción se mantiene a 95°C con agitación durante una noche. Tras ello la reacción se neutraliza con HCl (35 wt%) hasta pH=2. El sólido blanco que se obtiene se filtra, se lava con agua destilada y se seca. (Rendimiento 77%).

¹H NMR [400 MHz, DMSO, δ (ppm)]: 12.02 (s, 1H), 11.20 (s, 1H), 7.55 (m, *J* = 1.2 Hz, 1H), 3.62 (t, *J*=6 Hz, 2H), 2.22 (t, *J*=8 Hz, 2H), 1.76 (d, *J* = 1.2 Hz, 3H), 1.61-1.49 (m, 4H), 1.30-1.24 (m, 2H).

Síntesis de 4,4'-bis([6-(5-metil-2,4-dioxo-3-hidroxipirimidin-1-il)]hexanoiloxi)azobenceno (6COOAZO-bisThy)

Se añade 4,4'-dihidroxiazobenceno (1) (0.58g; 2.73 mmol), ácido 6-(5-metil-2,4-dioxo-3-hidropirimidin-1-il) (5) (1.8 g; 7.5 mmol) y DPTS (0.7g; 2.5 mmol) en un matraz de 250mL y se disuelve en CH₂Cl₂ seco (20 mL) y DMF seco (3mL) bajo atmósfera inerte y se enfría a 0°C. Se adiciona EDC (1.3 g; 8.2 mmol) disuelto en CH₂Cl₂ seco. Se retira el baño de hielo y se mantiene la reacción durante 96h. Se evapora el CH₂Cl₂ al rotavapor, se diluye en H₂O y se filtra lavando con agua. El sólido se seca a vacío y se recristaliza en etanol. (Rendimiento 86%).

¹H NMR [400 MHz, DMSO, δ (ppm)]: 11.23 (s, 2H), 7.97 (d, *J* = 8 Hz, 4H), 7.57 (s, 2H), 7.37 (d, *J* = 8 Hz, 4H), 3.66 (t, *J* = 8 Hz, 4H), 2.66 (t, *J* = 8Hz, 4H), 1.76-1.63 (m, 14H), 1.38 (m, 4H).

¹³C RMN [100MHz, DMSO, δ (ppm)]: 171.61, 164.27, 152.70, 150.88, 149.49, 141.63, 123.87, 122.90, 108.63, 47.07, 33.21, 28.36, 25.35, 23.99, 11.99.

FTIR (KBr) ν (cm⁻¹): 3162 (N-H), 3038 (Csp²-H), 2939 (Csp³-H), 1747 (C=C), 1697 (C=O), 1201 (C-O).

5.2. Preparación de redes poliméricas supramoleculares

Las mezclas se preparan pesando en un vial con una balanza de precisión, la cantidad correspondiente de copolímero bloque (PEG_{10k}-b-PDAP con 27 unidades de DAP) y de entrecruzante. Se disuelven en la mínima cantidad de THF (calidad HPLC) y se filtran (filtros de

teflón de 0,2 micras). Se mantienen en un agitador orbital para que se vaya evaporando poco a poco el disolvente. Una vez evaporado, se secan a vacío a temperatura ambiente.

Copolímero supramolecular	Polímero (PEG _{10k} -b-PDAP) (27 DAP)	TimAZO
PEG _{10k} -b-PDAP + 6COOAZO-bisThy (1:0.25)	14.8 mg	1.66 mg
PEG _{10k} -b-PDAP + 6COOAZO-bisThy (1:0.5)	14.5 mg	3.30 mg
PEG _{10k} -b-PDAP + 6COOAZO-bisThy (1:1)	14.8 mg	6.64 mg

5.3. Formación de nanopartículas poliméricas en agua

Los autoensamblados en agua se han preparado con los tres copolímeros supramoleculares. El procedimiento consiste en disolver 5 mg del copolímero supramolecular en 1 mL de THF de calidad HPLC y a continuación añadir fracciones de 10 μ L de agua Milli-Q mientras se mide la absorbancia de la disolución a $\lambda=650$ nm. La adición se realiza hasta que se produce un salto en los valores de absorbancia. Una vez formados los agregados, la disolución se introduce en una membrana de diálisis con tamaño de poro de 1kDa y se dializa durante 72h, cambiando el agua cada 4, 8 y 24 h para eliminar el disolvente orgánico. Tras la diálisis se pasa la disolución con los autoensamblados a una probeta para medir el volumen y poder así calcular la concentración aproximada.

Para el cálculo de la concentración de agregación crítica (CAC), se realizan disoluciones de 600 μ L con concentraciones entre 10^{-4} mg/mL y 1 mg/mL del copolímero supramolecular y 10^{-6} mg/mL de rojo de nilo. A continuación se realizan medidas de fluorescencia para obtener una serie de puntos que nos permitan conocer cuál es la concentración a la cual se forman los autoensamblados.

Para el estudio por TEM se deposita una gota de la disolución de 1mg/mL obtenida de la diálisis sobre una rejilla de cobre con película de carbono. Se esperan 30 segundos y se elimina agua y parte de muestra no depositada por capilaridad con un papel de filtro. Seguidamente se añade una gota de acetato de uranilo (agente de tinción), se esperan otros 30 segundos y se retira por capilaridad. Las muestras preparadas se dejan secar 24 h a vacío antes de medir.

5.4. Irradiación de las nanopartículas poliméricas

La irradiación de las muestras para producir la isomerización *trans-cis* se realiza con una lámpara fluorescente de Hg de 9W que tiene máximo de emisión a 365 nm.

La irradiación de las muestras para producir la isomerización *cis-trans* se realiza con una lámpara LED a 420 nm. Se utilizan intensidades diferentes en función del estudio: en el caso del estudio por ^1H RMN la intensidad es de $240\mu\text{W}/\text{cm}^2$ y en el estudio UV es $4\mu\text{W}/\text{cm}^2$.

6. Bibliografía

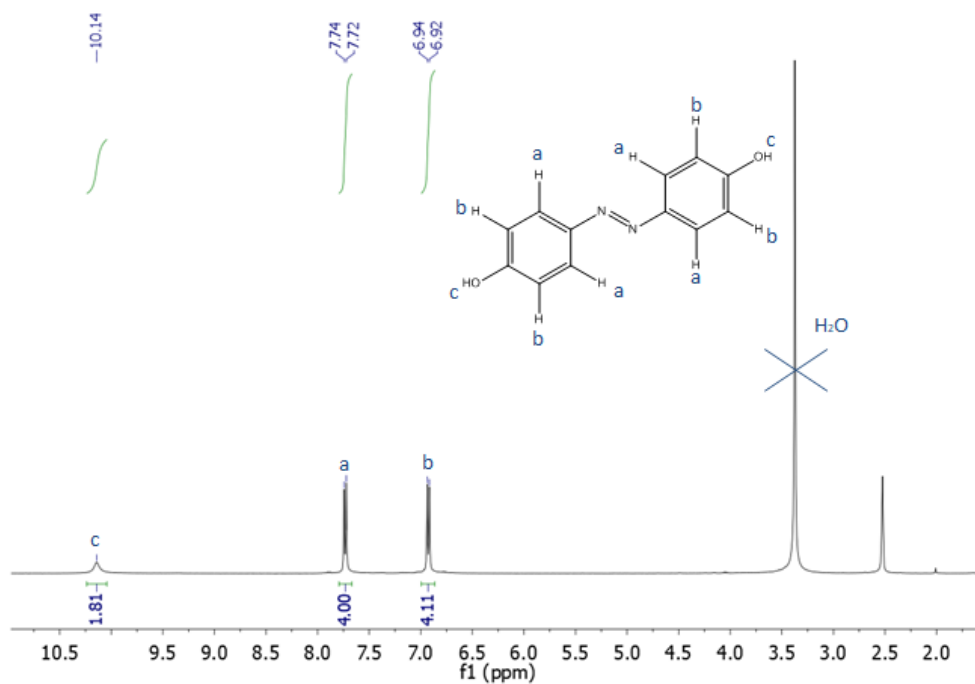
- (1) William, D.; Callister, J. *Introducción a La Ciencia e Ingeniería de Los Materiales. Reverté*, 1995, p 804.
- (2) Grande, C. D.; Zuluaga, F. Polimerización Por Adición, Fragmentación y Transferencia Reversible, RAFT: Una Revisión Del Mecanismo y El Alcance de La Técnica. *Rev. Iberoam. Polímeros* **2010**, *11* (6), 339–359.
- (3) Rosler, A.; Vandermeulen, G. W. M.; Klok, H. Advanced Drug Delivery Devices via Self-Assembly of Amphiphilic Block Copolymers. *Adv. Drug Deliv.* **2001**, *53*, 95–108.
- (4) Reilly, R. K. O.; Hawker, J.; Wooley, K. L.; Reilly, R. K. O. Cross-Linked Block Copolymer Micelles : Functional Nanostructures of Great Potential and Versatility. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 1068–1083.
- (5) Kuang, H.; He, H.; Hou, J.; Xie, Z.; Jing, X. Thymine Modified Amphiphilic Biodegradable Copolymers for Photo-Cross-Linked Micelles as Stable Drug Carriers A. *Macromol. Biosci.* **2013**, *13*, 1593–1600.
- (6) Nostrum, C. F. van. *Soft Matter*. *Soft Matter* **2011**, *7*, 3246–3259.
- (7) Concellón, A.; Blasco, E.; Martínez-Felipe, A.; Martínez, J. C.; Šics, I.; Ezquerra, T. A.; Nogales, A.; Piñol, M.; Oriol, L. Light-Responsive Self-Assembled Materials by Supramolecular Post-Functionalization via Hydrogen Bonding of Amphiphilic Block Copolymers. *Macromolecules* **2016**, *49*, 7825–7836.
- (8) Mavila, S.; Eivgi, O.; Berkovich, I.; Lemco, N. G. Intramolecular Cross-Linking Methodologies for the Synthesis of Polymer Nanoparticles. **2016**.
- (9) C., K. H.; G., F. M.; Barry, S. K. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004–2021.
- (10) Ding, J.; Chen, L.; Xiao, C.; Chen, L.; Chen, L. Micelles for Controlled Drug Delivery. **2014**, 11274–11290.
- (11) Volker, B.; Marc, S.; J., K. M.; G., K. R.; Jean-Marie, L. Supramolecular Polymers Generated from Heterocomplementary Monomers Linked through Multiple Hydrogen-Bonding Arrays—Formation, Characterization, and Properties. *Chem. – A Eur. J.* **2002**, *8* (5), 1227–1244.
- (12) Claudine, F.; Jean-Marie, L.; Anne-Marie, L. Molecular Recognition Directed Self-assembly of Supramolecular Liquid Crystalline Polymers from Complementary Chiral Components. *Adv. Mater.* **2004**, *2* (5), 254–257.
- (13) Yagai, S.; Higashi, M.; Karatsu, T.; Kitamura, A. Binary Supramolecular Gels Based on Bismelamine-Cyanurate/Barbiturate Noncovalent Polymers. *Chem. Mater.* **2004**, *16* (19), 3582–3585.
- (14) Kawasaki, T.; Tokuhiro, M.; Kimizuka, N.; Kunitake, T. Hierarchical Self-Assembly of Chiral Complementary Hydrogen-Bond Networks in Water: Reconstitution of Supramolecular Membranes. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (28), 6792–6800.
- (15) Jiu-an, L.; Weiru, W.; Jixiang, X.; Tomiki, I.; Yanlei, Y. Photoinduced Bending Behavior of Cross-linked Azobenzene Liquid-Crystalline Polymer Films with a Poly(Oxyethylene) Backbone. *Macromol. Rapid Commun.* **2014**, *35* (14), 1266–1272.
- (16) Spijker, H. J.; van Delft, F. L.; van Hest, J. C. M. Atom Transfer Radical Polymerization of Adenine, Thymine, Cytosine, and Guanine Nucleobase Monomers. *Macromolecules* **2007**, *40* (1), 12–18.

Anexos

Anexo A: Espectros (FTIR, ¹H RMN, ¹³C RMN)

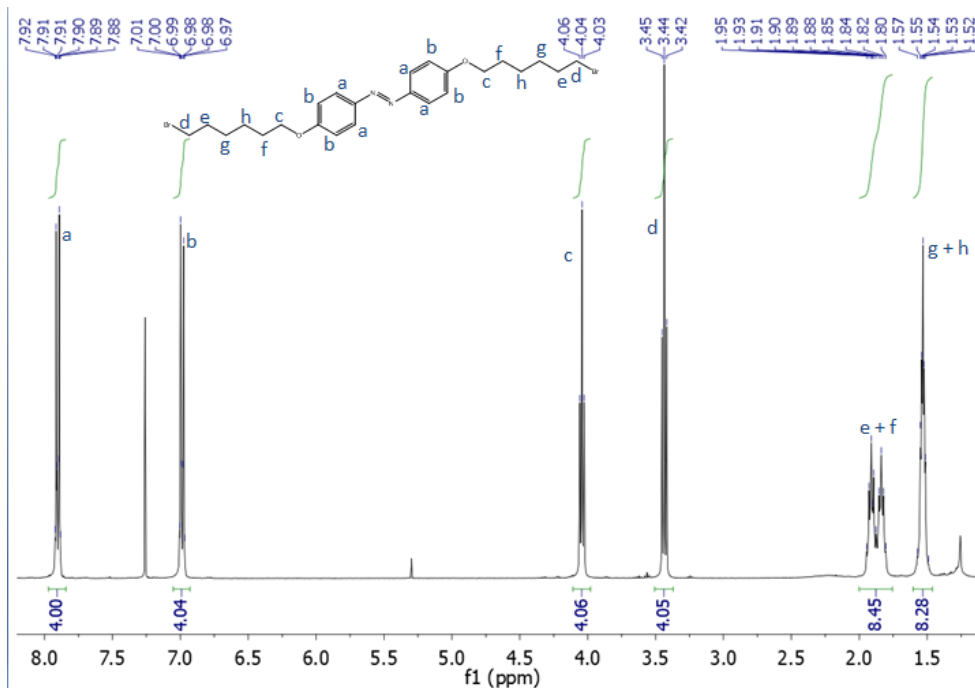
4,4'-Azobisfenol (3)

Figura A.1. ¹H NMR [400 MHz, DMSO, δ (ppm)]



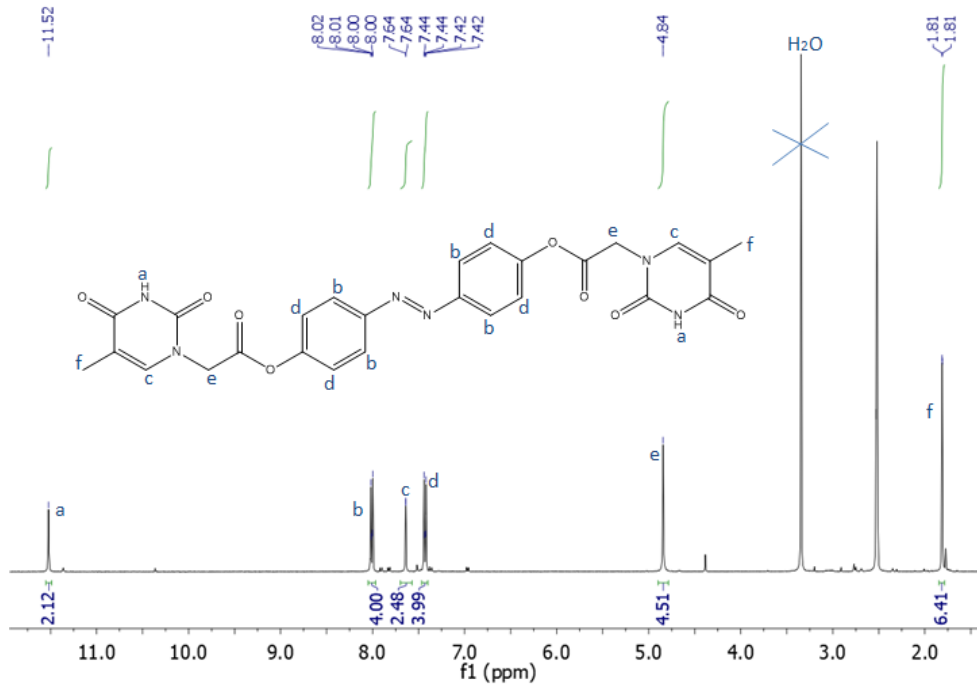
1,2-Bis[4-[(6-bromohexyl)oxy]phenyl]diazene (6)

Figura A.2. ¹H NMR [400 MHz, DMSO, δ (ppm)]



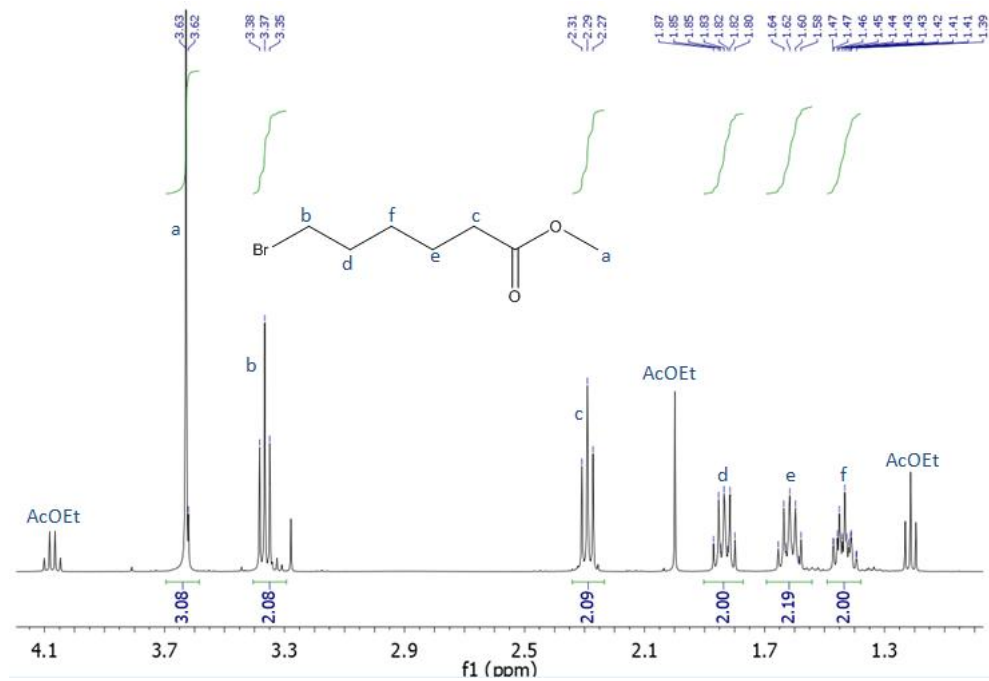
4,4'-Azobis(2-(5-metil-2,4-dioxo-3,4-dihidroxipirimidin-1-il)acetato) (TimAzoTim1) (4)

Figura A.3. ¹H NMR [400 MHz, DMSO, δ (ppm)]



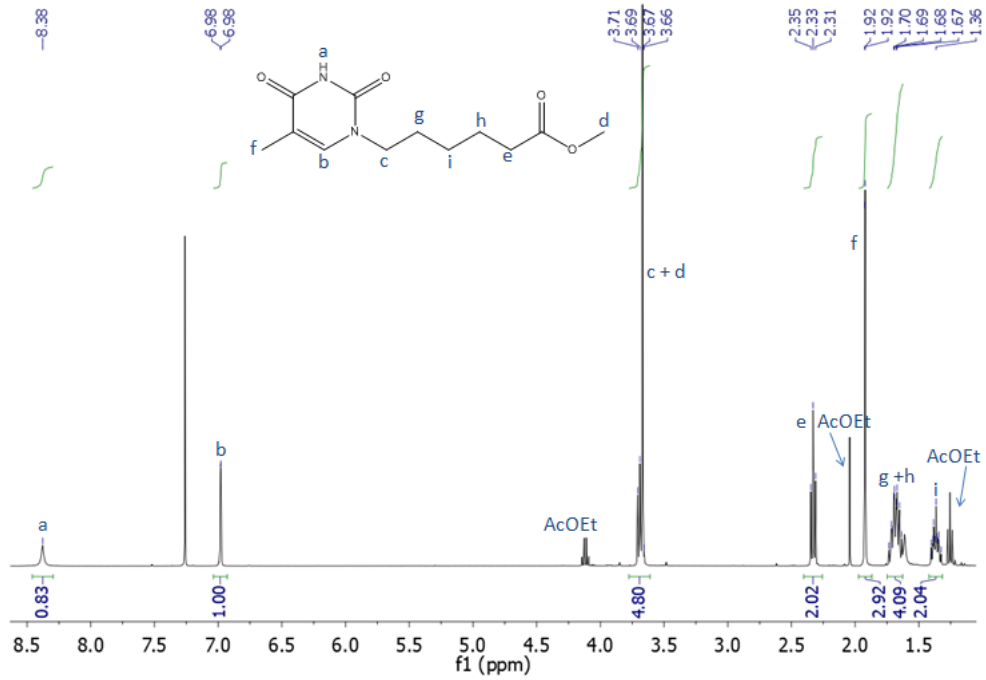
6-bromohexanoato de metilo (8)

Figura A.4. ¹H NMR [400 MHz, CDCl₃, δ (ppm)]



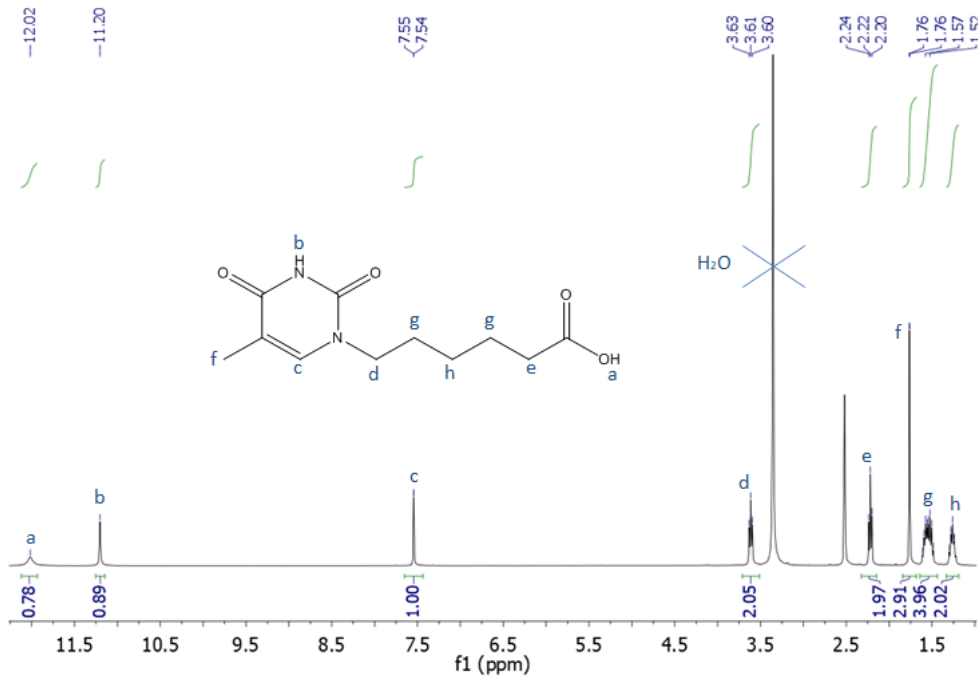
(2-(5-metil-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1-il)acetato) (9)

Figura A.5. ¹H NMR [400 MHz, CDCl₃, δ (ppm)]



6-(5-metil-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1-yl) ácido hexanóico (10)

Figura A.6. ¹H NMR [400 MHz, DMSO, δ (ppm)]



4,4'-Azobis(6-(5-metil-2,4-dioxo-3,4-dihidroxipirimidin-1-il)hexanoato) (TimAzoTim3) (5)

Figura A.7. ¹H NMR [400 MHz, DMSO, δ (ppm)]

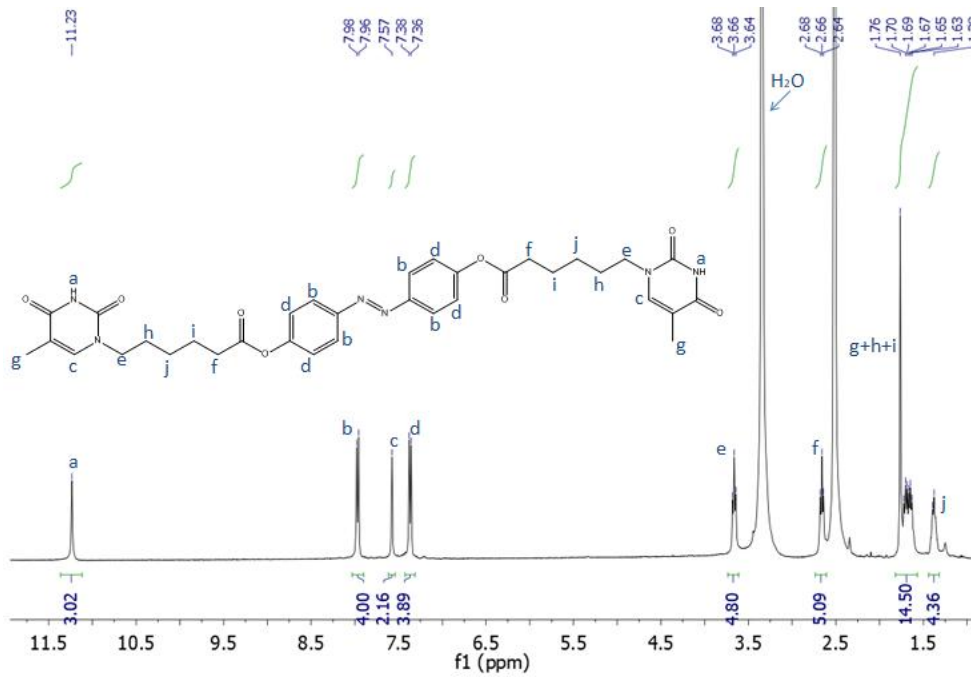


Figura A.8. ¹³C RMN [100MHz, DMSO, δ (ppm)]

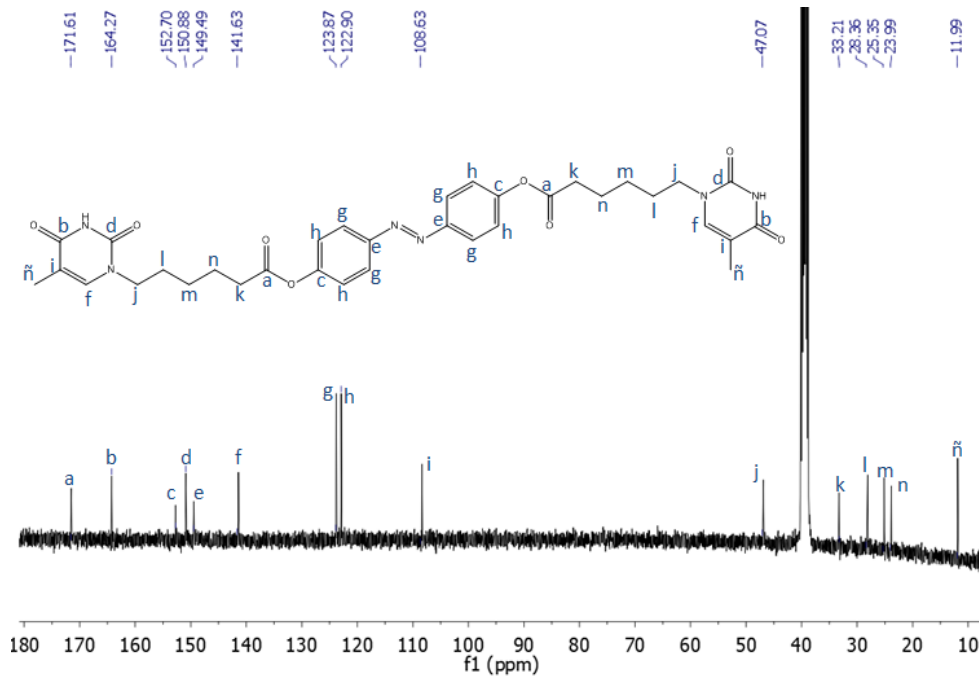


Figura A.9. FTIR (KBr)

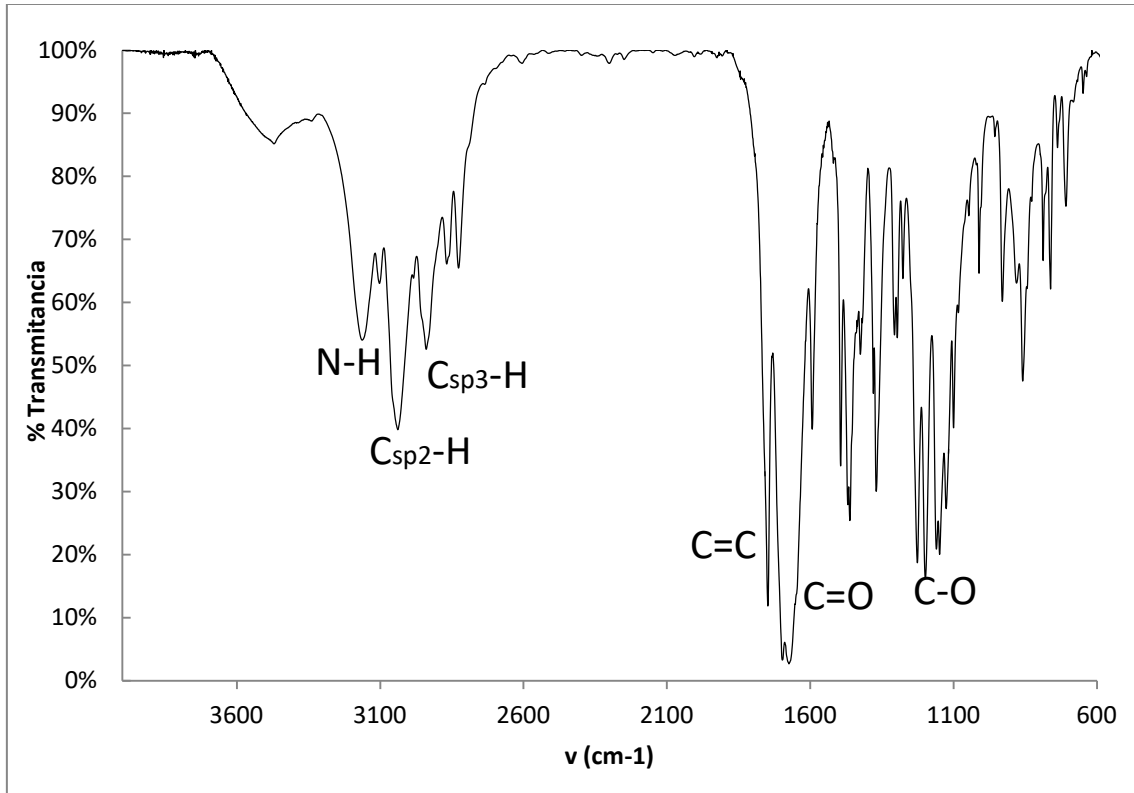
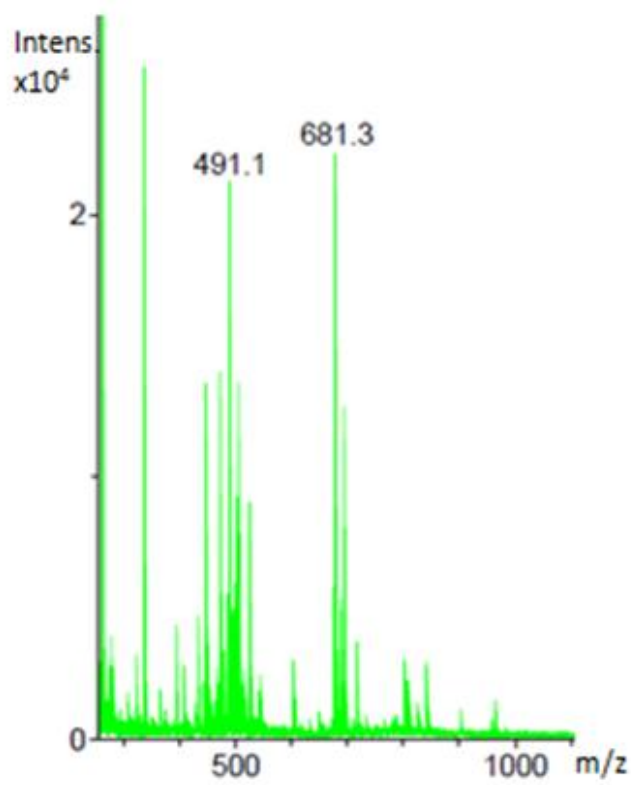


Figura A.10. MALDI-TOF



4,4'-Azobis(oxy)bis(hexano-6,1-diy)bis(5-metilpirimidina-2,4-diona) (TimAzoTim2) (7)

Figura A.11. ¹H NMR [400 MHz, DMSO, δ (ppm)]

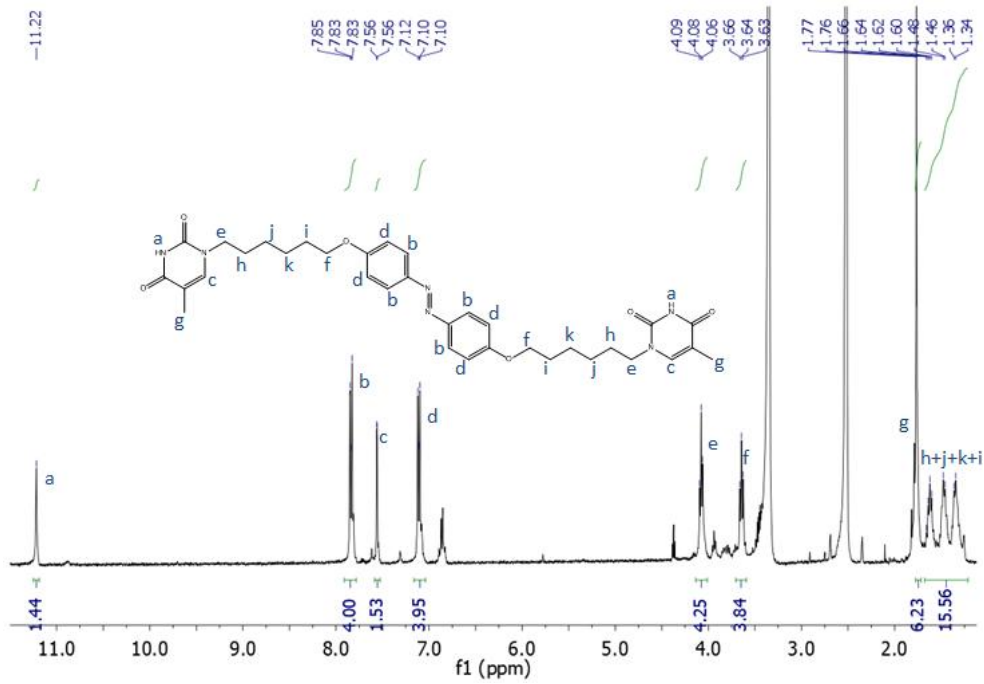
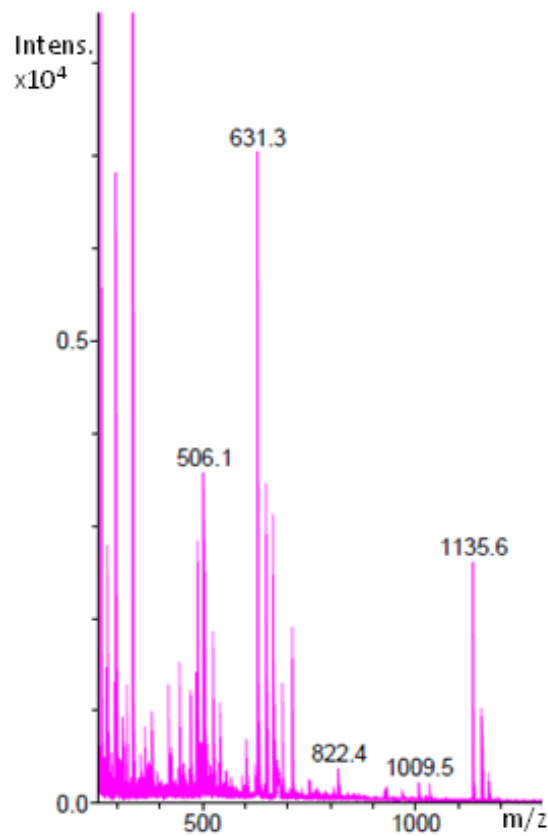
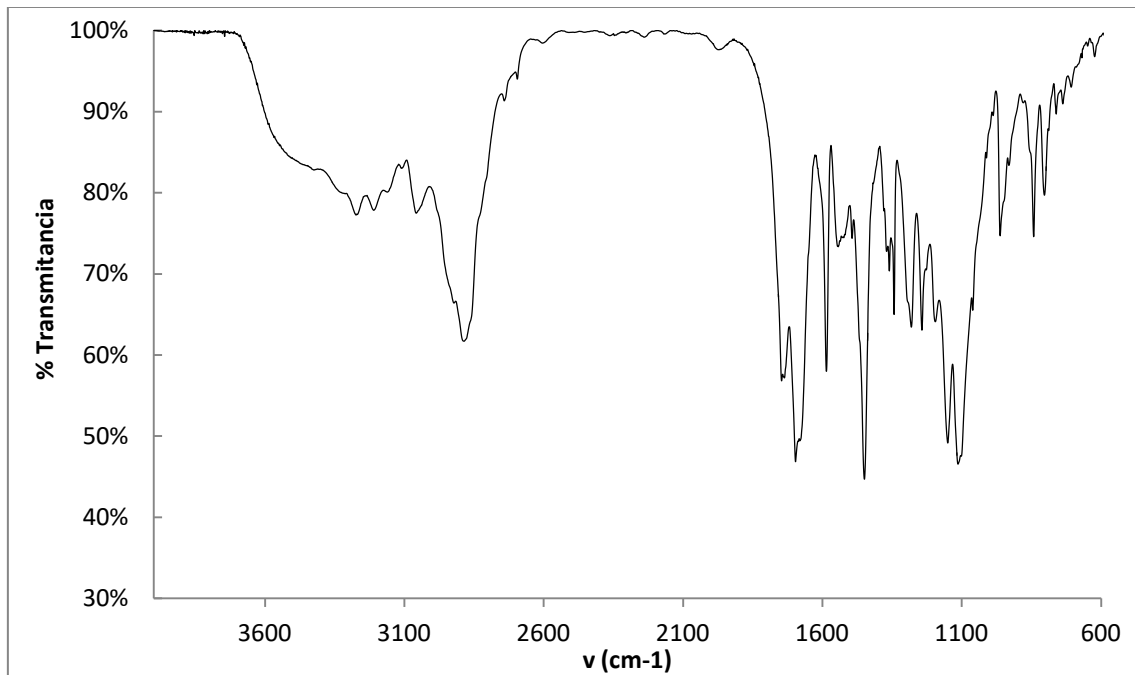


Figura A.12. MALDI-TOF



Copolímero supramolecular PEG_{10k}-b-PDAP + TimAZOTim3 (1:1)

Figura A.13. FTIR (KBr)



Copolímero supramolecular PEG_{10k}-b-PDAP + TimAZOTim3 (1:0.5)

Figura A.14. FTIR (KBr)

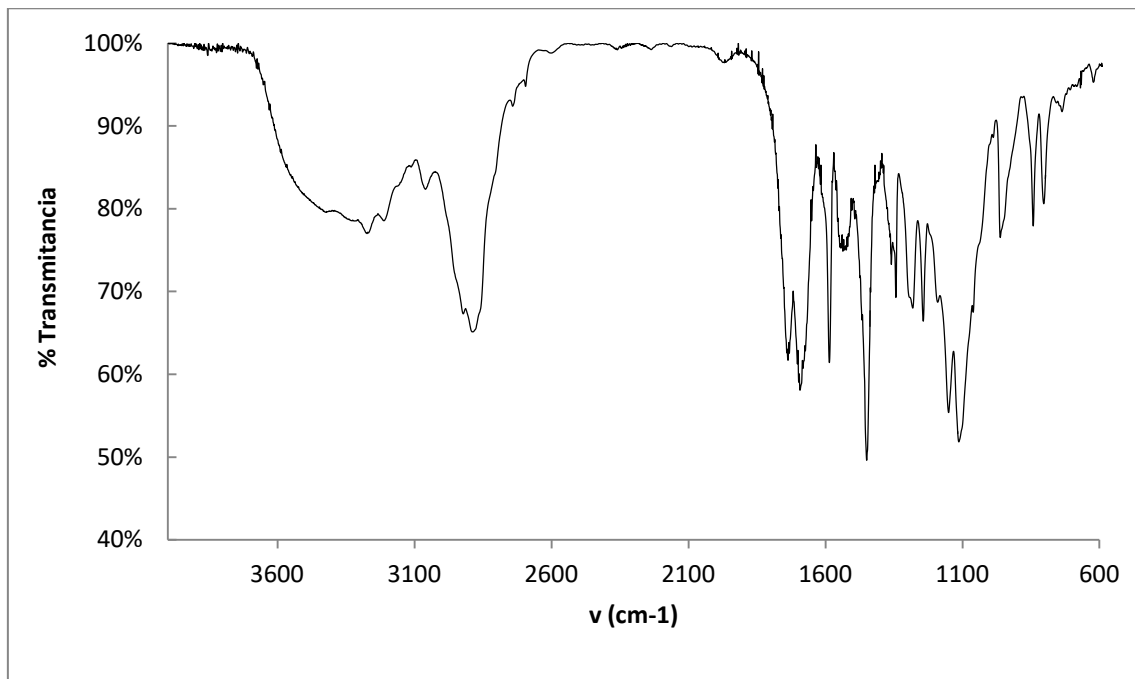
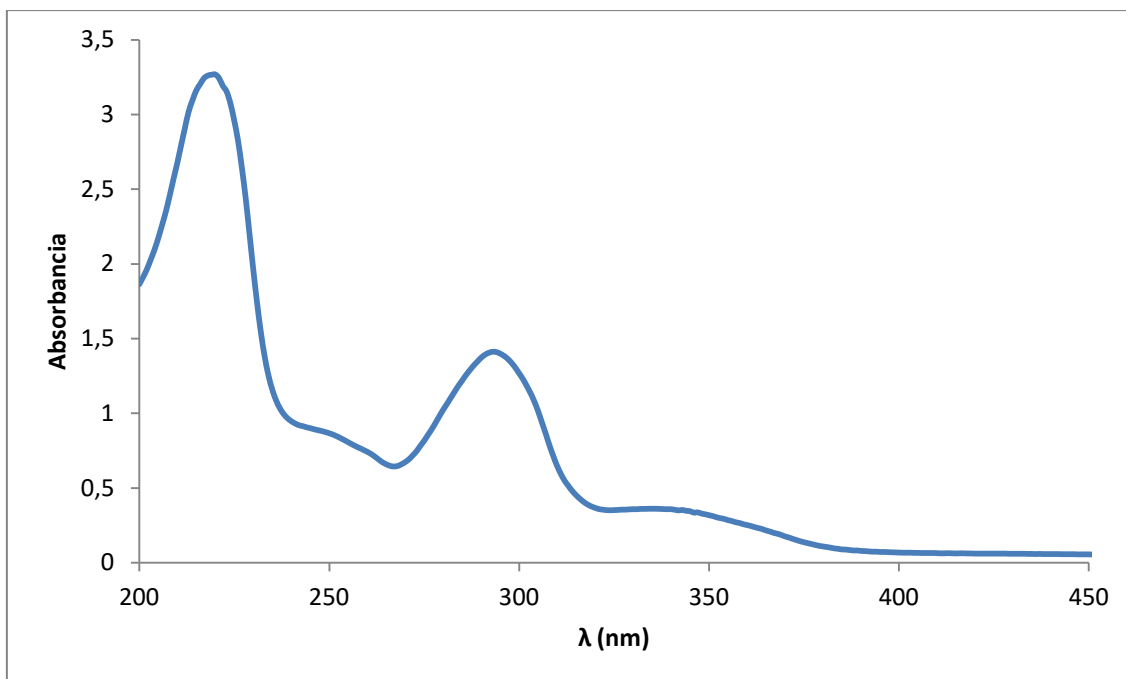


Figura A.15. UV-vis



Copolímero supramolecular PEG_{10k}-b-PDAP + TimAZOTim3 (1:0.25)

Figura A.16. FTIR (KBr)

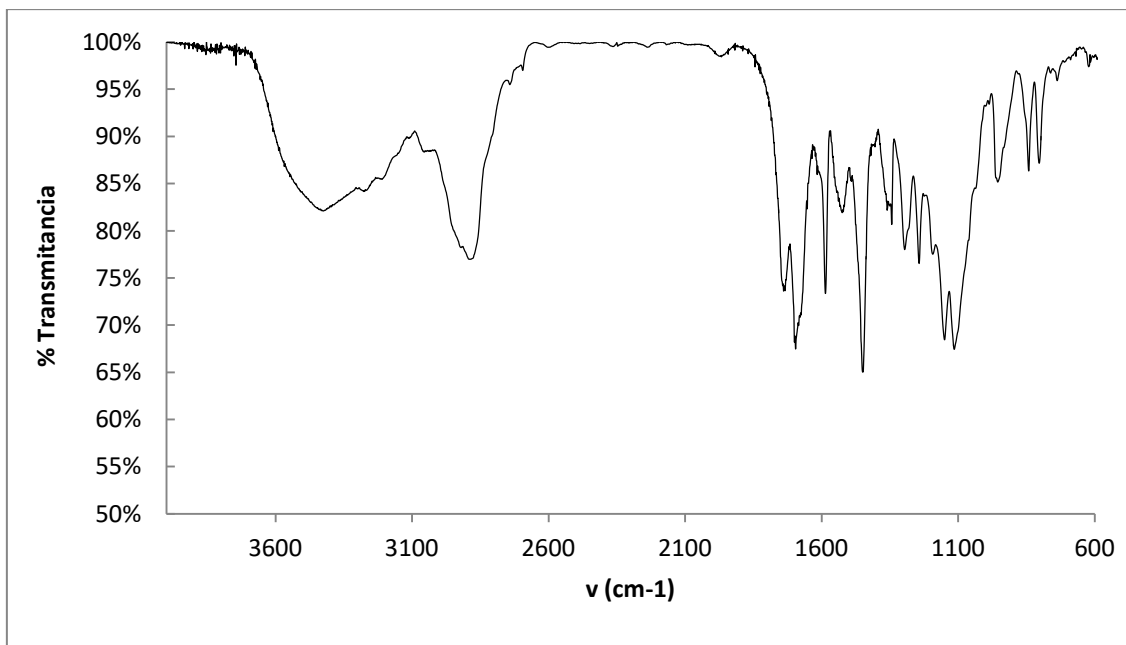
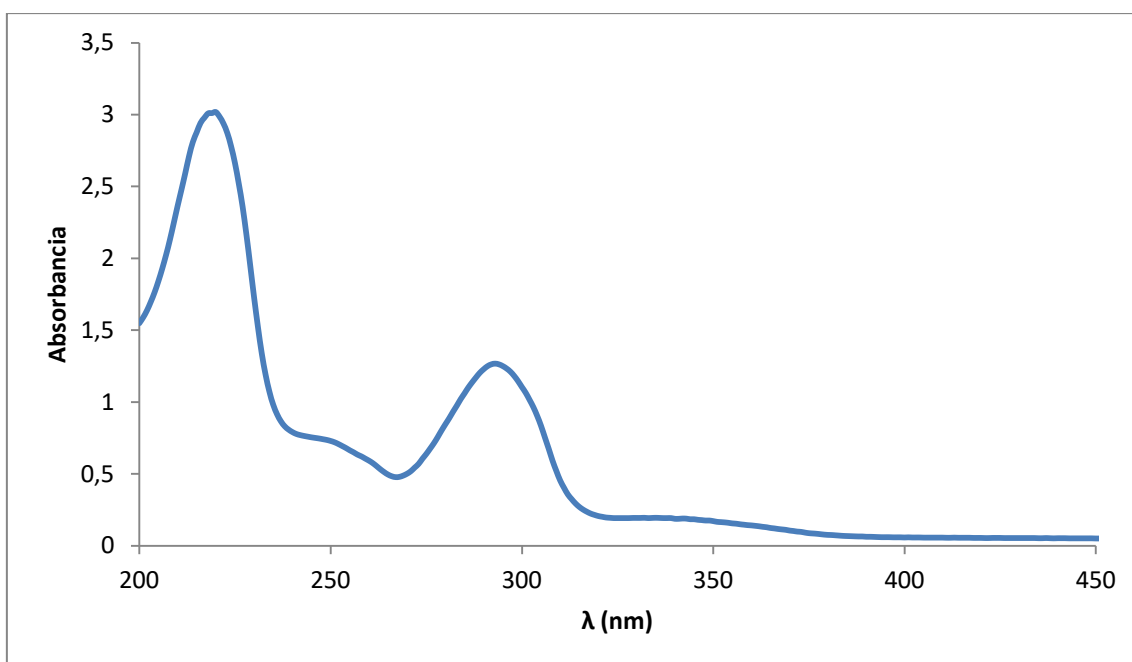


Figura A.17. UV-vis



Anexo B: Técnicas e Instrumentos

- **Espectroscopía Infrarroja: FTIR**

Las muestras se han preparado en pastillas de KBr y se han empleado los equipos Nicolet Matson Avatar 360 y Bruker Vertex 70.

- **Espectrometría de Masas: MS**

Se ha empleado un equipo Bruker Microflex y la técnica MALDI-TOF, utilizando como disolvente DMSO.

- **Resonancia magnética nuclear (RMN)**

Se ha empleado un equipo Bruker AV-400, el cual opera a 400 MHz para ^1H RMN y a 100MHz para ^{13}C . Los espectros han sido realizados en CDCl_3 y en DMSO deuterado.

- **Espectroscopía ultravioleta-visible (para estudio turbidimétrico)**

Se ha empleado un equipo ATI Unicam, UV4-200 y cubetas de cuarzo de paso 1 cm.

- **Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)**

Se ha empleado un microscopio electrónico de transmisión Fei Tecnai T20 operando a 200 Kv.

- **Espectroscopía de fluorescencia molecular**

Para las medidas se empleó un fluorímetro Perkin Elmer LS50B.

- **Dispersión dinámica de luz (DLS)**

Las muestras se prepararon diluyendo las disoluciones con agregados en agua Mili-Q hasta llegar a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en cubetas de poliestireno. Las medidas se llevaron a cabo en el equipo Malvern Instrument Nano ZS usando un láser He-Ne con una longitud de onda de 633 nm, con un ángulo de detector de 173°.

