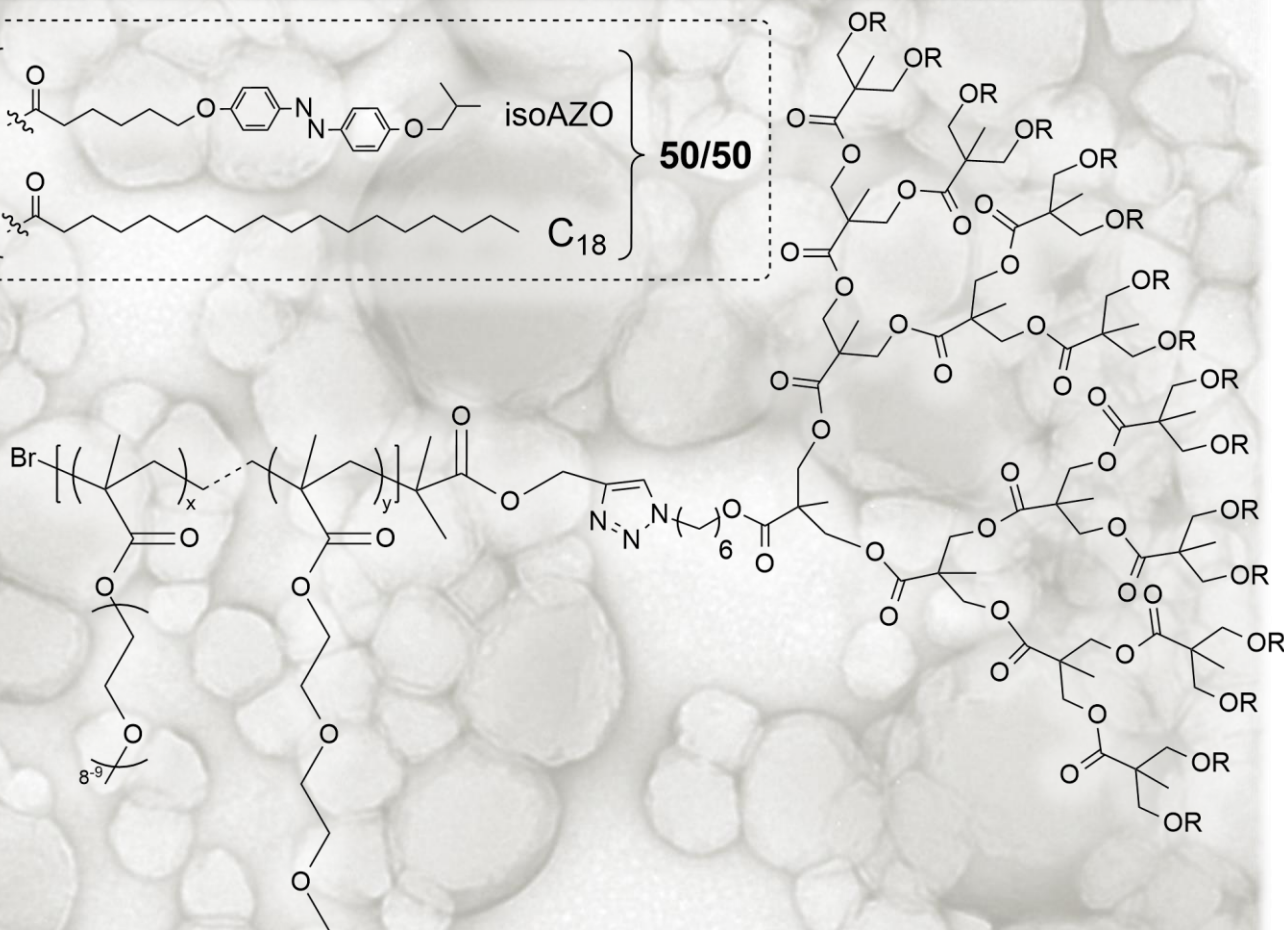
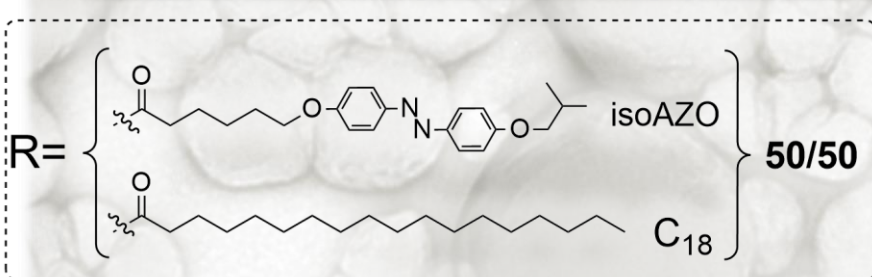


Nuevas arquitecturas poliméricas basadas en la química click



TRABAJO FIN DE MÁSTER

Hugo García Juan

Directores:

Dr. Luis T. Oriol Langa

Dra. Milagros Piñol Lacambra

Dpto. de Química Orgánica

Universidad de Zaragoza



Departamento de
Química Orgánica
Universidad Zaragoza



icma

Instituto de Ciencia
de Materiales de Aragón

Dña. MILAGROS PIÑOL LACAMBRA y D. LUIS T. ORIOL LANGA; ambos profesores titulares del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza y miembros del Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón de la Universidad de Zaragoza-CSIC,

HACEN CONSTAR:

Que el trabajo recogido en la memoria titulada “Nuevas arquitecturas poliméricas basadas en la química click”, ha sido realizado bajo nuestra supervisión por D. HUGO GARCÍA JUAN en laboratorios del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias y del Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón (Universidad de Zaragoza-CSIC) y reúne las condiciones para su presentación como “Trabajo Fin de Máster”.

Zaragoza, a 23 de Junio de 2014

Fdo.: Dr. Luis T. Oriol Langa

Fdo.: Dra. Milagros Piñol Lacambra

RESUMEN

La combinación de las técnicas de polimerización radicalaria controlada (como la ATRP), que permite controlar tanto la masa como los grupos terminales del polímero, con la química *click*¹ constituye una herramienta excepcional para la síntesis de nuevas arquitecturas poliméricas con una estructura perfectamente definida.²

En este trabajo se han preparado por ATRP polimetacrilatos de oligoetilenglicol y dietilenglicol termosensibles con un grupo alquino en un extremo. Estos polímeros son solubles en agua a temperatura ambiente, pero sobrepasada una temperatura crítica (LCST) se vuelven insolubles. El acoplamiento por reacción *click* de estos polímeros con un dendrón con azida en el punto focal dio lugar a un copolímero bloque dendrítico-lineal (LDBC) de estructura compleja y con respuesta dual: a la temperatura y a la luz, gracias a las unidades de azobenceno en la periferia del dendrón (Figura 1).

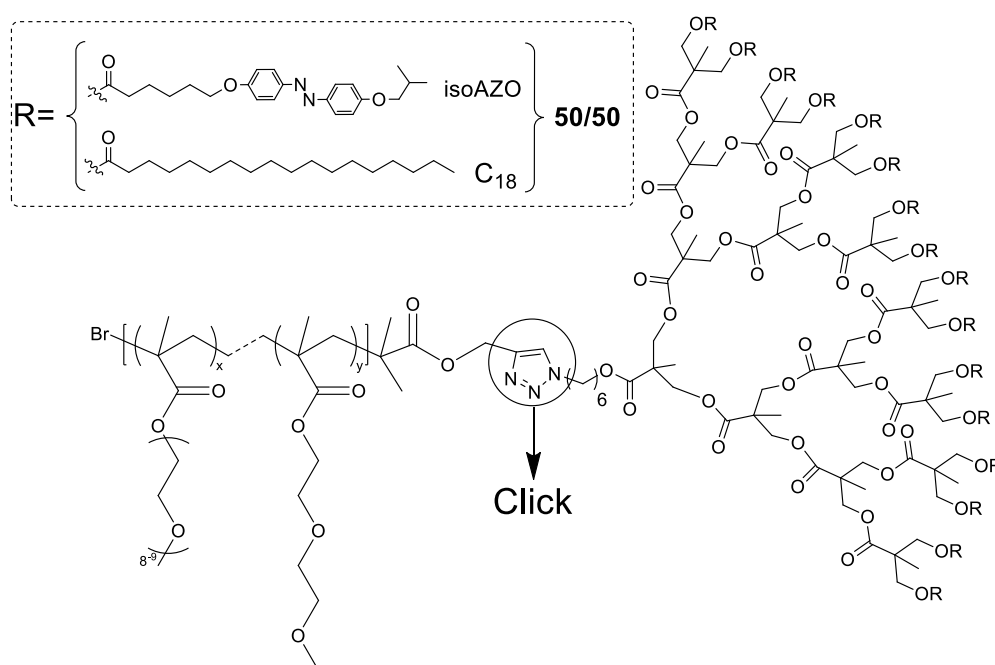


Figura 1: LDBC sintetizado

Se ha estudiado la formación de vesículas en disolución acuosa y se ha comprobado cómo estas vesículas responden a la luz y a la temperatura. Asimismo se ha estudiado el encapsulado y liberación bajo estímulos de sondas fluorescentes, para verificar la aplicación de estas vesículas como nanotransportadores.

¹ H. C. Kolb, M. G. Finn, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 2004-2021

² G.K. Such, A. Johnston, K. Liang, F. Caruso, *Progress in Polymer Science*, **2011**, 37, 985-1003

Otra arquitectura polimérica interesante explorada son los polímeros tipo ramificado.

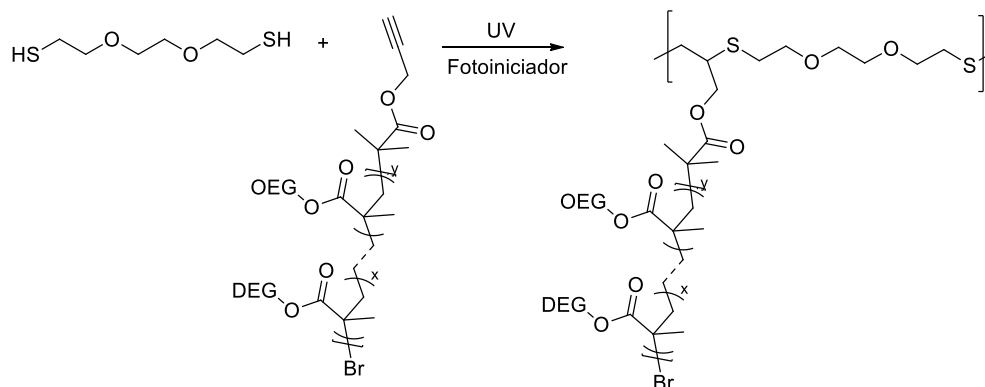


Figura 2: Síntesis de polímeros ramificados

Estos polímeros están formados por una cadena principal de la que cuelgan, a su vez, cadenas poliméricas laterales (Figura 2). Se ha explorado la aplicación de la reacción click de tioles fotoinducida³ como estrategia para conseguir fotopolímeros con esta estructura compleja, utilizando los polimetacrilatos termosensibles con alquino terminal, como macrómero, y ditioles comerciales.

³ C. N. Bowman, C. E. Hoyle, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 1540 – 1573

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto MAT2011-27978-C02-01 y el Gobierno de Aragón (Grupo Cristales Líquidos y Polímeros- E04). Se agradece especialmente la colaboración del Servicio General de Apoyo a la Investigación-SAI, Universidad de Zaragoza, los diferentes servicios utilizados del CEQMA (Universidad de Zaragoza-CSIC), así como del Laboratorio de Microscopías Avanzadas (LMA, Universidad de Zaragoza).

Índice

1. Introducción	1
1.1. Polimerización radicalaria controlada	1
1.2. Química <i>click</i>	1
1.2.1. Cicloadición de azidas y alquinos catalizada por Cu(I)	2
1.2.2. Reacción de tiolenos/inos	3
1.3. Polímeros con termorrespuesta en agua	4
1.4. Copolímeros bloque dendrítico-lineales con respuesta a estímulos	5
2. Antecedentes	8
3. Objetivos	12
4. Resultados y discusión	13
4.1. Síntesis y caracterización de polímeros lineales con termorrespuesta	13
4.2. Síntesis y caracterización de un LDBC sensible a la luz y a la temperatura	15
4.3. Preparación de agregados en agua y estudio de su morfología	16
4.4. Estudio de la morfología de los agregados tras ser irradiados y calentados	19
4.5. Estudio del encapsulado de moléculas y liberación mediante estímulos	20
4.6. Síntesis de polímeros ramificados con termorrespuesta mediante reacciones de tiolinos	23
5. Conclusiones	27
6. Anexos	I
6.1. Parte experimental	I
6.1.1. Síntesis del 2-bromo-2-metilpropanoato de 3-trimetilsililprop-2-in-1-ilo	I
6.1.2. Procedimiento general para las polimerizaciones ATRP	I
6.1.3. Procedimiento general para desprotección de triples enlaces terminales	II
6.1.4. Síntesis del [(OEG-co-DEG) ₃₂₀₀]-b-d(isoAZO/C18)	III
6.1.5. Tinción de muestras para TEM	III
6.1.6. Determinación de la CMC	IV
6.1.7. Estudios de irradiación	IV
6.1.8. Encapsulado de rodamina B en vesículas	IV
6.1.9. Estudios de microscopía confocal	IV
6.1.10. Procedimiento general para fotopolimerizar	IV
6.2. Ejemplo de espectro de ¹ H-RMN de polímero con termorrespuesta	V
6.3. Ejemplo de DSC para el cálculo de la LCST	V
6.4. Espectro de ¹ H-NMR del d(isoAZO/C18)	VI
6.5. Espectro de ¹ H-NMR del [(OEG-co-DEG) ₃₂₀₀]-C≡C	VI
6.6. Espectro de ¹ H-NMR de [(OEG-co-DEG) ₃₂₀₀]-b-d(isoAZO/C18)	VII
6.7. TGA del [(OEG-co-DEG) ₃₂₀₀]-b-d(isoAZO/C18)	VII

6.8. DSC del [(OEG-co-DEG) ₃₂₀₀]-b-d(isoAZO/C18)	VIII
6.9. Espectro de ¹ H-NMR del (OEG-co-DEG) ₁₂₀₀₀ fotopolimerizado en agua	VIII

Índice de figuras

1. Mecanismo de una polimerización ATRP	1
2. Mecanismo propuesto para la CuAAC	2
3. Reacción de tioles y alquenos	3
4. Mecanismo de la reacción de tiolinos	3
5. Disolución de polímero con termorrespuesta en agua por debajo y por encima de la LCST	5
6. Estructuras de copolímeros bloque	6
7. Estrategias para la síntesis de LDBC	6
8. Isomerización del azobenceno	7
9. LDBC formado de PEG y distintas generaciones de azodendrón	8
10. LDBC formado de PMMA y un dendrón funcionalizado con 4-cianoazobenceno	9
11. Distintos agregados formados variando el ratio hidrófobo/hidrófilo	9
12. Estructura de las vesículas formadas	10
13. Fotografías de cryo-TEM a distintos % de azobenceno antes y después de irradiar	11
14. Estructura general de los copolímeros con termorrespuesta sintetizados	13
15. Estructura del LDBC sintetizado	15
16. Espectro de ¹ H-RMN del [(OEG-co-DEG) ₃₂₀₀]-b-d(isoAZO/C18)	16
17. GPC del LDBC y de los bloques por separado	16
18. Curva de turbidimetría	17
19. Imágenes de TEM de los agregados formados	17
20. Curva de DLS (escala logarítmica)	18
21. Intensidad de fluorescencia frente a concentración de agregados	18
22. Espectros de UV-vis de una disolución de agregados irradiando con luz de 365 nm a distintos tiempos	19
23. Fotos de TEM tras estimular los agregados	20
24. Estudios de DLS tras irradiar	20
25. Espectro de fluorescencia del rojo nilo encapsulado antes y después de calentar	21
26. Espectro de fluorescencia del rojo nilo encapsulado, irradiando a distintos tiempos	22
27. Imágenes de microscopio confocal irradiando a distintos tipos	22
28. Variación de la intensidad de fluorescencia del fondo al irradiar y al calentar	23
29. Síntesis de polímeros ramificados mediante reacción de tiolinos	23
30. Espectros de ¹ H-RMN superpuestos antes y después de fotopolimerizar el (OEG-co-DEG) ₃₂₀₀ en THF con Irgacure 2959®	24
31. GPC de las fotopolimerizaciones realizadas en THF con Irgacure2959®	25
32. Ditiolos empleados en las fotopolimerizaciones con Irgacure 651®	25
33. GPC de las fotopolimerizaciones realizadas con Irgacure 651®	25

Índice de tablas

1.	Condiciones de polimerización y polímeros obtenidos	13
2.	Datos de LCST	14

Abreviaturas

ATRP: atomic transfer radical polymerization (polimerización radicalaria por transferencia de átomo)

bipy: 2,2'-bipiridina

bis-MPA: ácido 2,2-bis(hidroximetil)propionico

CMC: concentración micelar crítica

CuAAC: cicloadición de azidas y alquinos catalizada por Cu(I)

DEG: dietilenglicol

D_h : diámetro hidrodinámico

DLS: *dynamic light scattering* (dispersión de luz dinámica)

DSC: calorimetría diferencial de barrido

GPC: *gel permeation chromatography* (cromatografía de permeación en gel)

LCST: *lower critical solution temperature* (temperatura de disolución crítica inferior)

LDBC: *linear-dendritic block copolymer* (copolímero bloque dendrítico-lineal)

M_n : masa molecular promedio en número

MOP: microscopía óptica con luz polarizada

OEG: oligoetilenglicol

OEG-co-DEG: polimetacrilato de oligoetilenglicol y de dietilenglicol

PEG: polietilenglicol

PEMA: polimetacrilato de etilo

PMMA: polimetacrilato de metilo

RAFT: *reversible addition-fragmentation chain transfer* (adición-fragmentación reversible por transferencia de cadena)

TBAF: fluoruro de tetrabutilamonio

TEM: microscopía de transmisión electrónica

TGA: termogravimetría

THF: tetrahidrofurano

TMS: trimetilsililo

UCST: *upper critical solution temperature* (temperatura de disolución crítica superior)

XRD: *X-ray diffraction* (difracción de rayos X)

1. Introducción

1.1. Polimerización radicalaria controlada

Las polimerizaciones radicalarias convencionales son ampliamente utilizadas para producir polímeros a escala industrial. Sin embargo, el control estructural sobre los mismos es deficiente. Esto se debe a que se producen etapas de terminación, en las cuales dos cadenas poliméricas en crecimiento pueden reaccionar entre sí dando lugar a un polímero muerto (es decir, que no puede seguir reaccionando) cuya masa será la suma de las partes. El hecho de que estas cadenas puedan ser de muy diversas masas moleculares provoca que la distribución estadística de masas del polímero obtenido sea ancha. A esta distribución se le denomina dispersidad.

En la década de los 90 empiezan a aparecer las técnicas de polimerización radicalaria controlada. La diferencia de estas técnicas de polimerización frente a las convencionales es que tratan de minimizar las etapas de terminación mediante sofisticados mecanismos de reacción. Esto maximiza el control que podemos ejercer sobre la estructura del polímero ya que, además de poder controlar mucho mejor la distribución de masas obtenida, nos permite sintetizar polímeros con grupos terminales perfectamente definidos, lo que es de gran utilidad de cara a hacer reacciones posteriores sobre ellos.

Entre las diversas reacciones de polimerización radicalaria controlada destacan la ATRP y sus derivadas, cuyo mecanismo se basa en el equilibrio de la Figura 1.¹

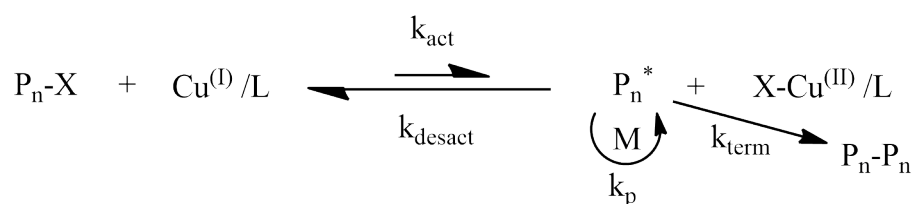


Figura 1: Mecanismo de una polimerización ATRP

En la parte izquierda del equilibrio tenemos un radical en estado latente, que mediante la ruptura homolítica de un enlace carbono-halógeno, con transferencia del halógeno al átomo metálico, genera un radical que va creciendo mediante la unión de unidades monoméricas. Idealmente, k_{desact} ha de ser mucho mayor que k_{term} , minimizando así las reacciones de terminación.

En los últimos años también se ha producido el auge de la polimerización RAFT, con un mecanismo diferente basado en la transferencia de los radicales formados a derivados tipo diotioésteres, o análogos.²

1.2. Química click

El concepto de química *click* es acuñado por Sharpless en el año 2001. Este término engloba un conjunto de reacciones que reúnen las siguientes características: condiciones de reacción sencillas,

¹K. Matyjaszewski, *Macromolecules*, **2012**, 45, 4015-4039

²D. J. Keddie, G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Macromolecules*, **2012**, 45, 5321-5342

purificación mediante métodos no cromatográficos, altos rendimientos y buena regio y estéreselectividad (aunque no necesariamente enantioselectividad). Se caracterizan también por ser procesos cinética y termodinámicamente favorables (~ 20 kcal/mol).³

Entre las reacciones que se incluyen en esta denominada química *click* se encuentra por ejemplo la reacción de Diels-Alder. Sin embargo podemos destacar dos reacciones que han adquirido una gran importancia en ciencia de materiales: la cicloadición de azidas y alquinos catalizada por Cu(I) (CuAAC) y las reacciones de tiolenos y tiolinos.

La combinación de estas reacciones con las técnicas de polimerización radicalaria controlada viva constituyen una herramienta fundamental para el diseño de nuevas arquitecturas poliméricas bien definidas, ya que nos permiten unir de una manera sencilla bloques poliméricos, sintetizados con un excelente control de la masa molecular y unos grupos funcionales bien definidos. Es posible diseñar así polímeros tipo estrella, polímeros ramificados regulares o copolímeros bloque lineal-lineal o dendrítico-lineales, entre otros.^{4 5}

1.2.1. Cicloadición de azidas y alquinos catalizada por Cu(I)

La CuAAC entre una azida orgánica y un alquino terminal en presencia de Cu(I) da lugar a un 1,2,3-triazol sustituido en posiciones 1,4. Esto contrasta con la reacción no-catalizada, en la cual obtenemos mezclas 1,4 y 1,5. La razón de esta mejora es que la reacción catalizada por Cu(I) es del orden de 10^7 veces más rápida y, al transcurrir por un mecanismo perfectamente definido, se obtiene sólo uno de los regioisómeros.

El mecanismo propuesto para la reacción se representa en la Figura 2.

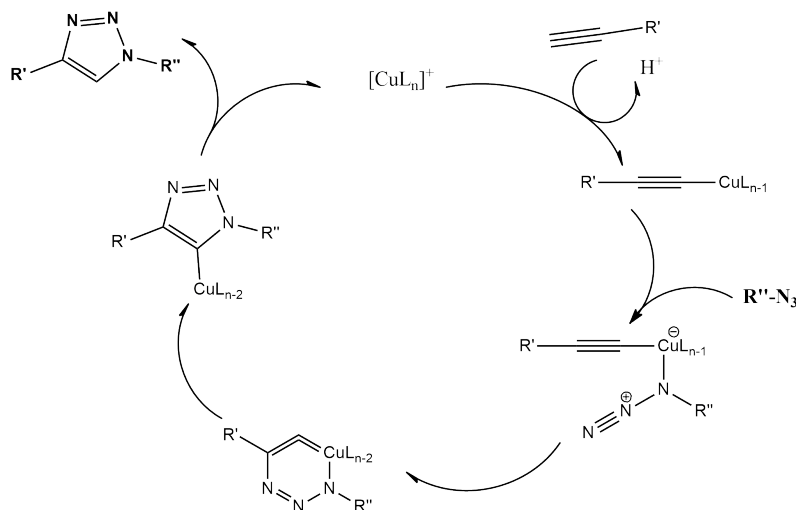


Figura 2: Mecanismo propuesto para la CuAAC

Esta reacción se puede llevar a cabo en cualquier disolvente, prótico o aprótico, y es tolerante a prácticamente cualquier grupo funcional presente en el medio de reacción, incluso a azidas inorgánicas. El Cu(I) puede introducirse directamente en este estado de oxidación, lo que obliga a trabajar

³H. C. Kolb, M. G. Finn, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 2004-2021

⁴N. Akeroyd, B. Klumperman, *Eur. Polym. J.*, **2011**, 47, 1207-1231

⁵O. Türlüç, M. A. R. Meier, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **2012**, 50, 1689-1695

en ausencia de oxígeno; o bien puede introducirse como Cu(II) junto con un reductor suave como ascorbato de sodio, que lo reducirá a Cu(I) *in situ*, evitando así tener que trabajar en atmósfera inerte.

Esta reacción ha sido ampliamente utilizada en Química Macromolecular (y Ciencia de Materiales en general) tanto para la preparación de polímeros como para procesos de fotopolimerización o funcionalización de macromoléculas.⁶

1.2.2. Reacción de tioenos/inos

Las reacciones entre tioles y alquenos (Figura 3) no son un descubrimiento reciente. Ya a mitad del Siglo XIV, Goodyear descubrió el vulcanizado de los neumáticos que consiste en la reacción de azufre con poli(*cis*-isopreno). Sin embargo, en los últimos años, la investigación sobre esta reacción ha repuntado debido a su utilidad para conseguir nuevas arquitecturas poliméricas o para entrecruzar cadenas, dando lugar a redes con una estructura muy homogénea y unas propiedades excelentes.⁷

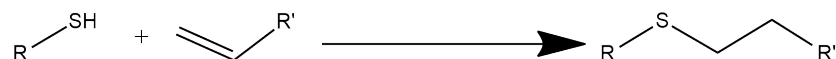


Figura 3: Reacción de tioles y alquenos

Por contra, la reacción de tioenos tiene una limitación ya que cada alqueno reacciona únicamente con un tiol. Esto significa que la máxima densidad de entrecruzamiento posible viene limitada por la monofuncionalidad del alqueno.

Una alternativa es la reacción de tioles y alquinos (también llamada de tiolinos), en la cual cada alquino puede reaccionar con dos tioles, según el mecanismo en dos etapas descrito en la Figura 4.

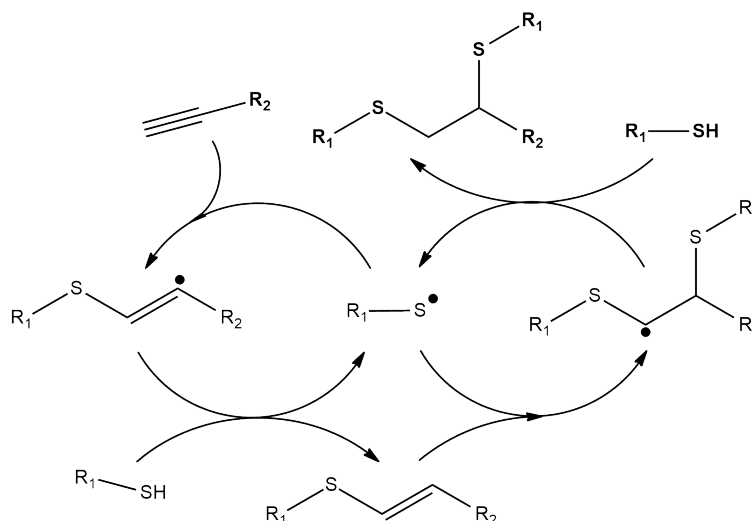


Figura 4: Mecanismo de la reacción de tiolinos

Esta reacción introduce una mayor concentración de azufre en la red formada. Entre otras ventajas nos permite controlar el índice de refracción de nuestro material dentro de un rango, ya que el aumento

⁶G.K. Such, A. Johnston, K. Liang, F. Caruso, *Prog. Polym. Sci.*, **2011**, 37, 985-1003

⁷A.B. Lowe, C. E. Hoyle, C. N. Bowman, *J. Mater. Chem.*, **2010**, 20, 4745-4750

del contenido en azufre revierte en un mayor índice de refracción lo que tiene especial utilidad en aplicaciones ópticas.⁸

Esta reacción es especialmente útil para funcionalizar polímeros en posiciones concretas de la cadena. Como se ha comentado, la técnica de polimerización ATRP permite obtener polímeros con grupos terminales perfectamente definidos. Así pues, si uno de estos grupos terminales es un alquino, se pueden hacer reacciones sobre él aprovechando la reacción con tioles. Como alternativa a la CuAAC, también es aplicable a las polimerizaciones tipo RAFT, que mediante una reacción de aminólisis dan lugar a un tiol en un extremo de la cadena, sobre el que, de nuevo, se pueden hacer reacciones con alquinos.⁹

Una particularidad interesante de estas reacciones es la posibilidad de ser llevada a cabo con luz usando un fotoiniciador adecuado, lo que las diferencia de la CuAAC. Las fotopolimerizaciones se han usado desde hace tiempo en numerosas aplicaciones cotidianas como la litografía o los implantes dentales. Sin embargo, las fotopolimerizaciones clásicas tienen dos problemas fundamentales: son inhibidas por oxígeno y dan lugar a redes muy heterogéneas. La síntesis de redes poliméricas mediante fotopolimerización de tioles y alquenos, o alquinos, combina las virtudes de las fotopolimerizaciones (control espacial y temporal) con las propiedades de la química *click*, lo que se traduce en una menor sensibilidad al oxígeno y en la formación de redes mucho más homogéneas.¹⁰ Esta estrategia ha resultado ser especialmente interesante en la preparación de hidrogeles físicos para ingeniería de tejidos. En estos casos el fotoiniciador Irgacure 2959® es uno de los más utilizados debido a su moderada solubilidad en agua (~1 % en peso), a su sensibilidad a la luz de 365 nm (compatible con células) y a que no es citotóxico.¹¹

1.3. Polímeros con termorrespuesta en agua

La solubilidad de ciertos polímeros puede verse afectada por la temperatura del medio. En general, los compuestos de bajo peso molecular van aumentando su solubilidad de forma gradual conforme aumenta la temperatura; sin embargo, los polímeros con termorrespuesta presentan una rápida transición de soluble a insoluble, o viceversa. Cuando el paso que se produce es de soluble a insoluble, la temperatura a la que se produce se denomina LCST, del inglés *lower critical solution temperature*, (Figura 5). Inversamente, si el paso es de insoluble a soluble, la temperatura se denomina UCST, del inglés *upper critical solution temperature*.

El comportamiento LCST es el más estudiado. Este comportamiento depende tanto del polímero como del disolvente, siendo especialmente interesante en agua. El fenómeno se debe a que por debajo de la LCST el polímero es soluble por los enlaces de hidrógeno que forma con el agua. Una vez superada dicha temperatura se rompen estos enlaces, el polímero se vuelve insoluble y pasa a un estado globular debido a la hidrofobicidad de la cadena principal. El proceso es completamente reversible, redisolviéndose al enfriar por debajo de la temperatura crítica. Cualitativamente, la LCST se controla

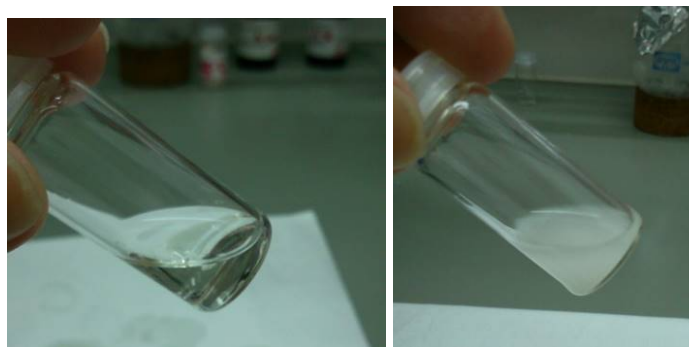
⁸J-G. Liu, M. Ueda, *J. Mater. Chem.*, **2009**, 19, 8907-8919

⁹B. Yu, J. W. Chan, C. E. Hoyle, A. B. Lowe, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **2009**, 47, 3554-3557

¹⁰C. N. Bowman, C. E. Hoyle, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 1540 – 1573

¹¹C. G. Williams, A. N. Malik, T. K. Kim, P. N. Manson, J. H. Elisseeff, *Biomaterials*, **2005**, 26, 1211-1218

por la proporción hidrófila/hidrófoba del polímero. Así pues cuanto más porcentaje hidrófobo tenga el polímero más baja será la temperatura a la que se vuelva insoluble. Existen un buen número de homopolímeros y copolímeros que presentan este comportamiento.¹²



(a) Por debajo de la LCST (b) Por encima de la LCST

Figura 5: Disolución de polímero con termorrespuesta en agua por debajo y por encima de la LCST

En particular los polimetacrilatos de oligoetilenglicol y dietilenglicol (OEG-co-DEG) han mostrado tener la biocompatibilidad del PEG y, a su vez, comportamiento LCST en agua debido a la solubilidad de las cadenas de OEG y a la insolubilidad de la cadena principal. Estos polímeros pueden sintetizarse de forma relativamente sencilla controlando tanto la masa molar como los grupos terminales, usando polimerizaciones radicalarias controladas como la ATRP.¹³

Si un polímero con termorrespuesta se une a un bloque hidrófobo se pueden obtener copolímeros bloque anfífilos que pueden formar agregados en agua, como vesículas o micelas. Estos agregados mantienen la termorrespuesta inicial de manera que la temperatura es un estímulo para inducir cambios morfológicos en los mismos. Estos cambios se pueden utilizar en aplicaciones como la liberación controlada de un determinado compuesto que hubiera sido encapsulado en su interior.¹⁴

1.4. Copolímeros bloque dendrítico-lineales con respuesta a estímulos

Los copolímeros bloque son macromoléculas formadas por al menos dos cadenas poliméricas de distinta composición. Si los bloques que conforman el copolímero bloque son de distinta polaridad puede producirse una separación de fases en fundido a escala nanoscópica. Si el copolímero bloque es de naturaleza anfífila puede producirse la formación de agregados supramoleculares como vesículas o micelas en disolución.

La combinación de bloques poliméricos y dendríticos abre nuevas posibilidades en el diseño de materiales poliméricos funcionales (Figura 6). En estos materiales la periferia del dendrón puede ser funcionalizada para conseguir unas determinadas propiedades como son la hidrofilia y la hidrofobia (claves para poder controlar el autoensamblaje en disolución) o bien la capacidad de responder a ciertos estímulos.

¹²R. Liu, M. Fraylich, B. R. Saunders, *Colloid polym. Sci.*, **2009**, 287, 627-643

¹³G. Vancoillie, D. Frank, R. Hoogenboom, *Prog. Polym. Sci.*, **2014**, 39, 1074-1095

¹⁴S. J. T. Rezaei, M. R. Nabid, H. Niknejad, A. A. Entezami, *Polymer*, **2012**, 53, 3485-3497

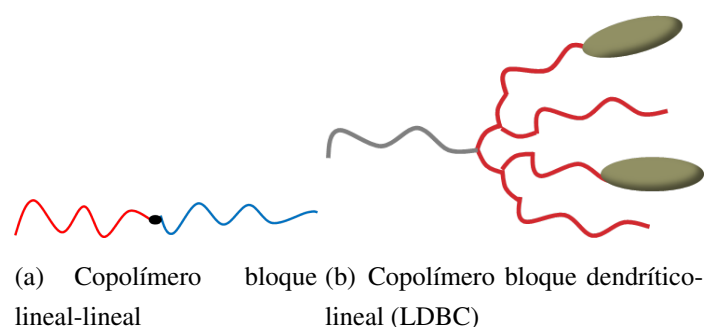


Figura 6: Estructuras de copolímeros bloque

Existen varias estrategias para la preparación de estos copolímeros bloque dendrítico-lineales (Figura 7). Puede sintetizarse un dendrímero que sirva como macroiniciador para hacer crecer desde él el polímero, o bien al revés, crecer un polímero que sirva como punto focal para el crecimiento del dendrímero. Sin embargo, la estrategia más sencilla es construir ambos por separado y unirlos después mediante una reacción de acoplamiento.

Una vez más, la química *click* es una herramienta sintética excepcional para la unión de los bloques dendríticos y lineales. Para ello, ambos bloques han de ser sintetizados de tal manera que contengan grupos funcionales complementarios que reaccionen entre sí. En el caso del bloque lineal esto puede conseguirse mediante técnicas de polimerización radicalaria viva, como la ATRP. En cuanto al bloque dendrítico se puede usar cualquiera de los métodos habituales utilizados para su preparación.¹⁵ La ventaja de este método es que se puede ejercer mejor control sobre la síntesis ya que ambos bloques pueden ser purificados y caracterizados con total precisión antes de acoplarse.

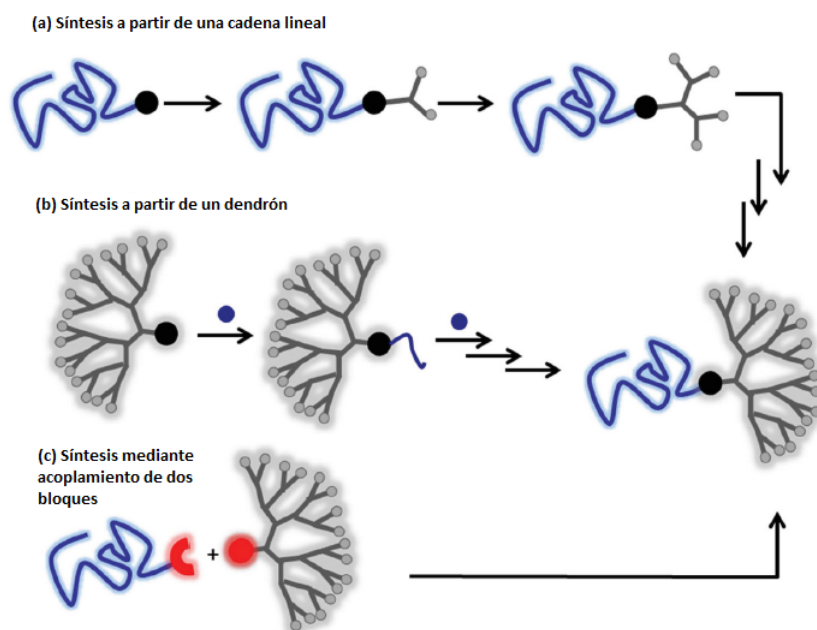


Figura 7: Estrategias para la síntesis de LDBC

Una alternativa que hace todavía más interesante a estos materiales es la posibilidad de hacerlos

¹⁵F. Wurm, H. Frey, *Prog. Polym. Sci.*, **2011**, 36, 1-52

capaces de responder a estímulos provocando, por ejemplo, cambios estructurales en las moléculas. Esta propiedad puede introducirse en cualquiera de los dos bloques, o en ambos. Incluso puede hacerse cada bloque sensible a un estímulo diferente, como podrían ser la luz y la temperatura. Esto, unido a su capacidad para formar agregados en agua, los hace ideales para actuar como nanotransportadores para transporte de fármacos y liberación controlada de los mismos mediante estímulos.

El fármaco puede encapsularse físicamente en el interior del agregado o en la membrana, dependiendo de la naturaleza del fármaco y del tipo de agregado que se tenga. Las ventajas de usar agregados poliméricos como nanotransportadores van desde la solubilización de fármacos poco solubles en agua a la reducción de la toxicidad.¹⁶

Un estímulo particularmente interesante es la luz. Este estímulo puede ser inducido de forma muy precisa y controlada en tiempo y espacio. La fotorrespuesta generalmente está asociada a la presencia de grupos funcionales que son capaces de isomerizar al ser irradiados con luz de una determinada longitud de onda. El cromóforo más usado y más estudiado en este tipo de materiales es el azobenceno.

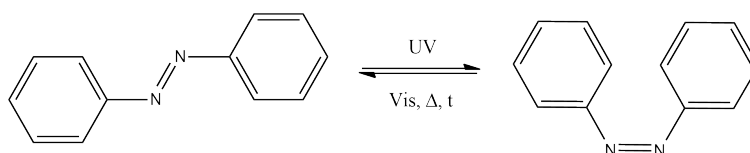


Figura 8: Isomerización del azobenceno

El azobenceno es una molécula orgánica sencilla formada por dos anillos aromáticos unidos por enlace diazoico. Su espectro UV-vis se caracteriza por dos bandas: una de mayor intensidad correspondiente a una transición $\pi - \pi^*$, en torno a 365 nm, y otra correspondiente a una transición $n - \pi^*$ sobre 430 nm. Sin embargo estas longitudes de onda varían según la naturaleza de los sustituyentes.¹⁷ La irradiación en la región UV produce una isomerización reversible del isómero *trans* al isómero *cis*, el cual pierde la planaridad del *trans* y es más polar y, por tanto, más hidrófilo. Este proceso puede revertirse irradiando con luz en la región del visible, calentando, o bien dejándolo en oscuridad (Figura 8).

El confinamiento de este compuesto en copolímeros bloque lo hace interesante debido a sus aplicaciones en almacenamiento holográfico o en la preparación de nanobjetos con fotorrespuesta.

¹⁶E. Blasco, M. Piñol, L. Oriol, *Macromol. Rapid Commun.*, **2014**, 35, 1090-1115

¹⁷R. Klajn, *Pure Appl. Chem.*, **2010**, 82, 12, 2247-2279

2. Antecedentes

El origen de este trabajo está en la investigación llevada a cabo en el grupo de Cristales Líquidos y Polímeros (CLIP) con materiales con fotorrespuesta basados en copolímeros bloque dendrítico-lineales (LDBC), en los cuales las moléculas de azobenceno se encuentran en la periferia de un dendrímero tipo poliéster del ácido 2,2-bis(hidroximetil)propionico o bis-MPA. Esta arquitectura molecular combina perfectamente la alta funcionalidad de los dendrímeros con la segregación de los copolímeros bloque.

Concretamente, los LDBC cristal líquido basados en azobenceno se han evaluado como materiales para el almacenamiento holográfico de datos. La razón es que la irradiación con luz linealmente polarizada produce la fotoisomerización de las moléculas de azobenceno acompañada de la orientación de las mismas con su eje molecular largo perpendicular a la dirección de polarización de la luz. El acoplamiento del azodendrón a un bloque polimérico transparente a la luz UV permite el uso de films de mayor grosor, en los cuales la nanosegregación de fases conserva el efecto cooperativo en la orientación de las moléculas de azobenceno en los distintos dominios. El primer trabajo realizado en el grupo en este campo consistió en la síntesis de LDBC formados por una cadena lineal de PEG ($M_n=2000$ Da) acoplada a dendrones de bis-MPA, desde la 1ª generación a la 4ª, funcionalizados con 4-cianoazobenceno (Figura 9). Estos compuestos mostraron mesofases esméctica tipo A (excepto para la primera generación) y morfologías lamelares en fundido. Irradiando con luz linealmente polarizada de 488 nm se consiguió inducir anisotropía óptica aunque el material presente el inconveniente de su cristalinidad.¹⁸

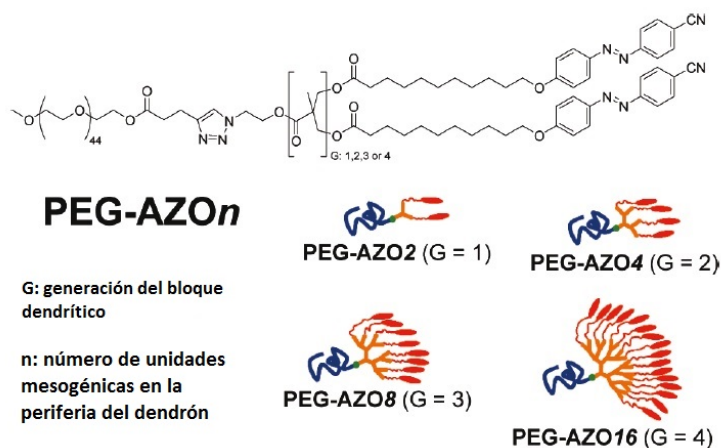


Figura 9: LDBC formado de PEG y distintas generaciones de azodendrón

Con el fin de mejorar las propiedades de los films obtenidos se prepararon LDBC sustituyendo el PEG por PS, PMMA y PEMA, y estudiando tanto la influencia de la longitud del espaciador que une las moléculas de azobenceno al dendrón como la longitud del bloque lineal. Se observó comportamiento cristal líquido así como morfología lamelar sólo para la 3ª y 4ª generación en los LDBC con un contenido en dendrón del 25 % en peso aproximadamente (Figura 10). Se estudió también

¹⁸J. del Barrio, L. Oriol, R. Alcalá, C. Sánchez, *Macromolecules*, **2009**, 42, 5752-5760

su capacidad para generar anisotropía fotoinducida, obteniéndose mejores valores con un espaciador decametilénico que con el pentametilénico.¹⁹

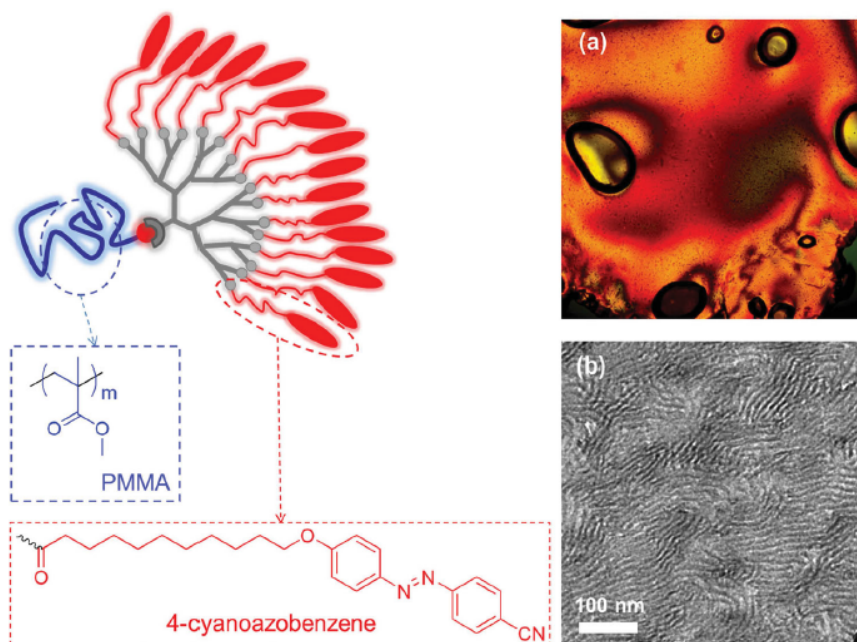


Figura 10: LDBC formado de PMMA y un dendrón funcionalizado con 4-cianoazobenceno

Especialmente interesante resultó el estudio del comportamiento en agua de los LDBC derivados de PEG, así como su capacidad para formar distintos tipos de agregados dependiendo de la relación hidrófobo/hidrófilo. Así, variando la generación del dendrímero y la longitud del bloque lineal se ha podido controlar la morfología de los agregados formados en agua, obteniéndose desde nanofibras (proporción 33/67) a vesículas (proporción 80/20) (Figura 11).²⁰

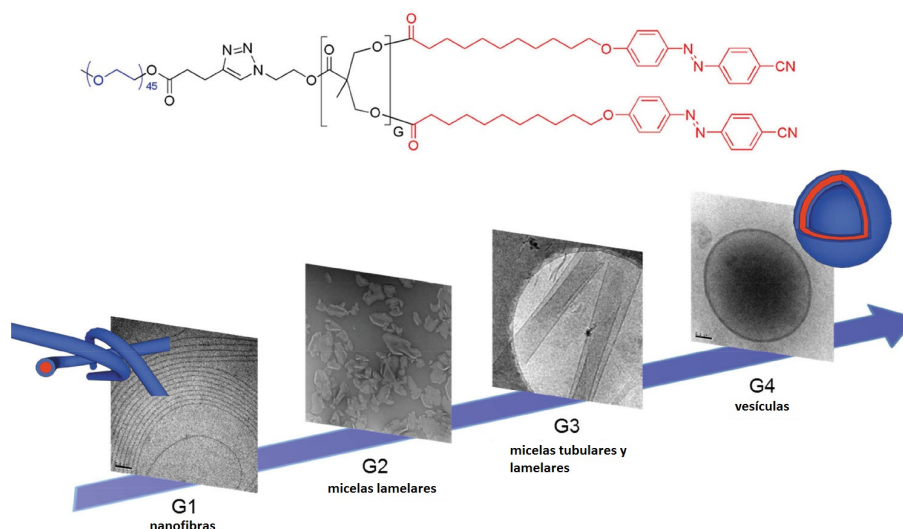


Figura 11: Distintos agregados formados variando el ratio hidrófobo/hidrófilo

¹⁹E. Blasco, J. del Barrio, M. Piñol, L. Oriol, C. Berges, C. Sánchez, R. Alcalá, *Polymer*, **2012**, 53, 4604-4613

²⁰J. del Barrio, L. Oriol, C. Sánchez, J. L. Serrano, A. Di Cicco, P. Keller, M.-H. Li, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 11, 3762-3769

Particular atención se ha puesto en el estudio de los derivados de 4^a generación unidos a PEG de $M_n=2000$ Da, capaces de formar vesículas en agua y actuar como nanotransportadores con respuesta a la luz. Estas vesículas están formadas por una bicapa del azodendrón aislada del medio acuoso interno y externo por las cadenas de PEG (Figura 12).

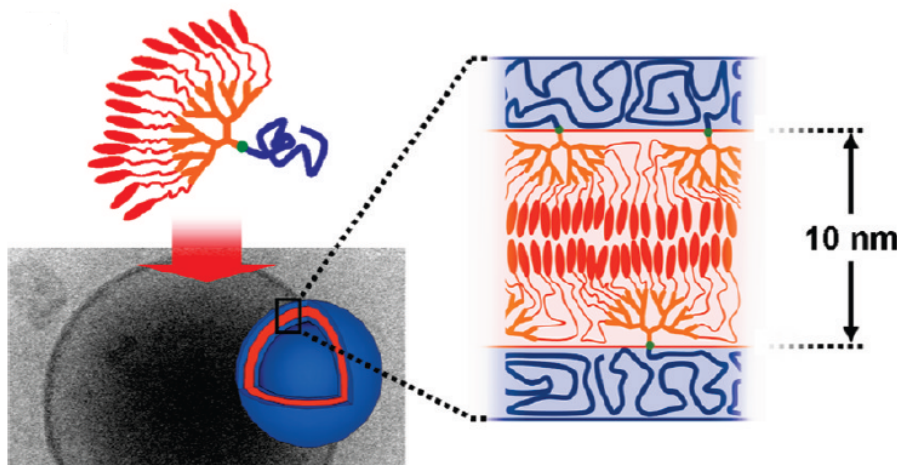


Figura 12: Estructura de las vesículas formadas

Los estudios demostraron la existencia de un espacio interior que les permite encapsular compuestos hidrófilos además de poder incorporar compuestos hidrófobos en el interior de la membrana. La liberación de los compuestos encapsulados se activa mediante irradiación con luz en la región UV. La isomerización *trans* \rightarrow *cis* del azobenceno produce un cambio en la forma y polaridad de las moléculas, lo que provoca cambios estructurales en las vesículas deformándolas. Esta deformación aumenta la permeabilidad de la membrana y produce la liberación de los compuestos encapsulados.

Posteriormente se realizó una modificación consistente en reemplazar el 4-cianoazobenceno por 4-isobutiloxiazobenceno. Este cambio no alteró las propiedades de autoensamblaje en disolución; sin embargo redujo considerablemente la intensidad de luz y el tiempo de exposición necesario para producir la liberación fotoinducida. Esta mejora se atribuye a la menor tendencia a la agregación del 4-isobutiloxiazobenceno y a que la isomerización *trans* \rightarrow *cis* provoca un cambio de polaridad mayor que en el cianoazobenceno.²¹

En un trabajo posterior se redujo el número de unidades de azobenceno en la periferia del dendrón combinando la unidad 4-isobutiloxiazobenceno con cadenas alifáticas. Una vez más se mantuvieron las propiedades de autoensamblaje a la vez que se redujeron los tiempos de respuesta debido a la menor agregación de las unidades de azobenceno dada la menor concentración de las mismas. Las vesículas con un 75 % de contenido de azobenceno en la periferia del dendrón mostraron un comportamiento similar a las que contienen un 100 %. Las que tenían un 25 % no sufrieron alteraciones al ser irradiadas. Sin embargo cuando el contenido de azobenceno es del 50 % las vesículas se destruyen completamente al ser irradiadas tal y como se observó en Cryo-TEM (Figura 13).²²

²¹E. Blasco, J. del Barrio, C. Sánchez-Somolinos, M. Piñol, L. Oriol, *Polym. Chem.*, **2013**, 4, 2246-2254

²²E. Blasco, J.L. Serrano, M. Piñol, L. Oriol, *Macromolecules*, **2013**, 46, 5951-5960

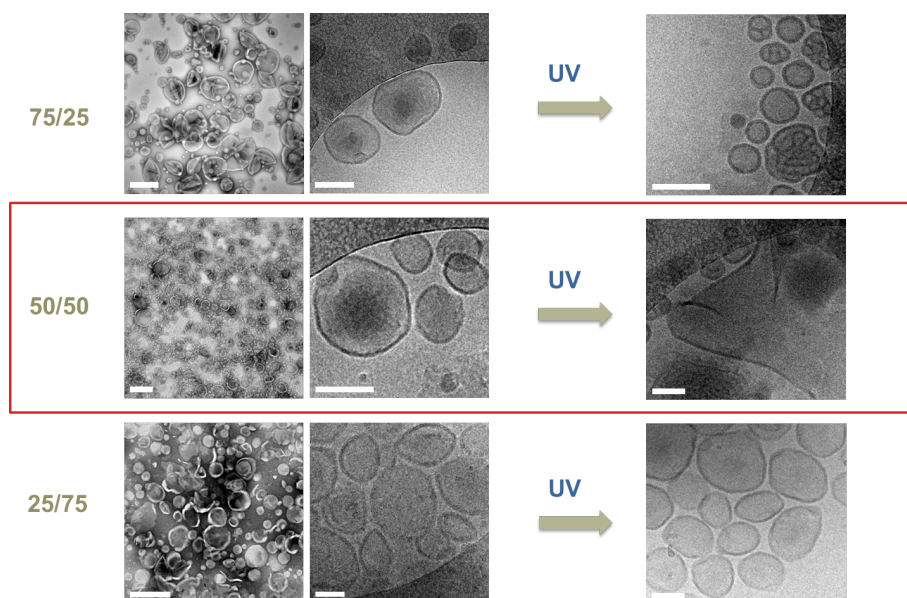


Figura 13: Fotografías de cryo-TEM a distintos % de azobenceno antes y después de irradiar

3. Objetivos

- Preparación de LDBC y formación de agregados en disolución acuosa (vesículas) sensibles tanto a la luz como a la temperatura.
 - Síntesis y caracterización de polímeros lineales con termorrespuesta en agua basados en polimetacrilatos de oligoetilenglicol y dietilenglicol.
 - Obtención y caracterización espectroscópica de un LDBC formado por una cadena lineal sensible a la temperatura y un azodendrón sensible a la luz.
 - Formación de agregados supramoleculares en agua y estudio de su morfología mediante TEM y DLS.
 - Estudio sobre su respuesta a estímulos lumínicos y térmicos empleando técnicas espectroscópicas, como UV-vis y fluorescencia, y técnicas como TEM y DLS.
 - Encapsulamiento de moléculas hidrófilas e hidrófobas y estudio de su liberación mediante estímulos térmicos y lumínicos.
- Búsqueda de nuevas arquitecturas poliméricas ramificadas con termorrespuesta basadas en reacciones de tiolinos iniciadas con luz.
 - Estudio de la reacción en agua.
 - Estudio de la reacción en un disolvente alternativo, como THF.
 - Estudio de la reacción usando dos fotoiniciadores distintos: Irgacure 2959® e Irgacure 651®.
 - Estudio de la reacción con distintos ditioles.

4. Resultados y discusión

4.1. Síntesis y caracterización de polímeros lineales con termorrespuesta

Se ha llevado a cabo la síntesis de copolímeros formados por metacrilatos de oligoetilenglicol (OEG) de 8-9 unidades repetitivas y de dietilenglicol (DEG). Estos copolímeros (**OEG-co-DEG**) presentan una LCST en agua, que no depende de la concentración del polímero y que se puede controlar variando la fracción molar de los monómeros. Se ha descrito que en una proporción $[DEG]/[OEG]=85/15$ el polímero tiene una LCST de 44°C, cercana a la temperatura fisiológica, que puede hacer a estos polímeros interesantes en el campo de la biomedicina.²³ La estructura general de los polímeros sintetizados se representa en la Figura 14.

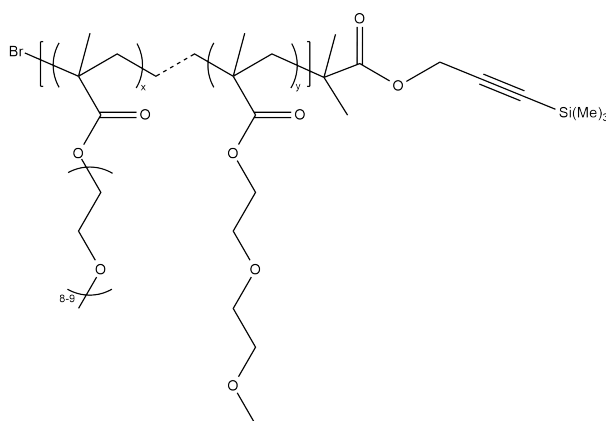


Figura 14: Estructura general de los copolímeros con termorrespuesta sintetizados

Estos polímeros han sido preparados mediante polimerización ATRP (ver Anexo 6.1.2), usando un iniciador con un grupo alquino protegido. Tal y como está descrito en la bibliografía, el sistema catalítico empleado ha sido Cu(I)/bipy y el disolvente etanol.

Se han realizado varias pruebas en distintas condiciones de polimerización (Tabla 1).

Tabla 1: Condiciones de polimerización y polímeros obtenidos

	M_n teórica ¹	M_n calculada ²	Tiempo (min)	$[DEGMA]/[OEGMA]$ teórica	$[DEGMA]/[OEGMA]$ calculada ²
(OEG-co-DEG)_12000	11600	12000	60	85/15	85/15
(OEG-co-DEG)_10600	11600	10600	30	85/15	85/15
(OEG-co-DEG)_4600	5000	4600	15	85/15	85/15
(OEG-co-DEG)_3600	2500	3600	20	80/20	80/20
(OEG-co-DEG)_3200	2500	3200	10	80/20	76/24

¹ Calculada multiplicando la masa molar de los monómeros por la proporción de moles que guardan respecto al iniciador, sumando la masa molar de éste y asumiendo una conversión completa. Por ejemplo si $[I]_0 : [OEG]_0 : [DEG]_0 = 1 : 2 : 8$, tendremos que $M_{n,teórico} = 276 + 475 * 2 + 188 * 8 \simeq 5000$

² Calculada por RMN

El cálculo tanto de M_n como de la relación molar entre monómeros se determinó mediante

²³J.-F. Lutz, A. Hoth, *Macromolecules*, **2006**, 39, 893-896

¹H-RMN resolviendo un sistema de ecuaciones donde x e y son las unidades de OEG y DEG, respectivamente (ver Anexo 6.2). Para ello se toma como referencia la señal a 0.12 ppm, correspondiente a los 9H del TMS terminal, y se determina la integración relativa de la señal a 3.35 ppm correspondiente a los grupos metoxi- terminales de cada una de las unidades repetitivas, 3H cada uno (Ecuación 1). Por otro lado se determina la integración relativa de las señales entre 3.45 y 3.70 ppm correspondientes a los grupos metileno unidos a oxígeno de los PEG, sin incluir los unidos al éster que salen a mayor desplazamiento, 32H en el caso del OEG y 6H en el caso del DEG (Ecuación 2).²⁴

$$3x + 3y = I_{3,35} \quad (1)$$

$$32x + 6y = I_{3,45-3,70} \quad (2)$$

La relación molar calculada se corresponde bien con la alimentada a la reacción, excepto en el **(OEG-co-DEG)_3200**. Esto puede deberse a que al ser un polímero con un número pequeño de unidades repetitivas, cualquier pequeña variación en el grado de polimerización de uno de los monómeros puede provocar un cambio significativo en la proporción que mantienen. Los valores de M_n obtenidos también se ajustan bien al M_n teórico, obteniéndose conversiones elevadas en pocos minutos. En los polímeros **(OEG-co-DEG)_3600** y **(OEG-co-DEG)_3200** se obtienen M_n ligeramente superiores a las buscadas. La justificación puede estar en el proceso de purificación, ya que al dializar en agua con una membrana que en teoría deja pasar $M_n < 1000$, esto puede no ser rigurosamente cierto y las cadenas poliméricas de menor M_n se pueden eliminar, desplazando la distribución estadística a M_n mayores.

La LCST de los polímeros preparados se determina mediante DSC, como la temperatura correspondiente al valor máximo de la primera derivada de la curva de calentamiento (ver Anexo 6.3). El experimento se realiza calentando una disolución acuosa del polímero al 10 % en peso desde 0°C hasta 80°C a 10°C/min. Los valores calculados se ajustan adecuadamente con los datos de la bibliografía (Tabla 2), así como con los determinados visualmente calentando la disolución de polímero en un baño. La diferencia más significativa corresponde al polímero **(OEG-co-DEG)_3200**, lo que puede deberse a que al ser éste de longitud tan corta la hidrofobicidad del grupo terminal tenga mayor efecto rebajando la LCST hasta los 42°C.

Tabla 2: Datos de LCST

	Proporción DEGMA/OEGMA	LCST bibliografía (°C)	LCST experimental (°C)
(OEG-co-DEG)_12000	85/15	44	41.5
(OEG-co-DEG)_10600	85/15	44	41.5
(OEG-co-DEG)_4600	85/15	44	41.7
(OEG-co-DEG)_3600	80/20	49	46
(OEG-co-DEG)_3200	76/24	49	42

²⁴En el caso del OEG, al ser una mezcla de 8 y 9 unidades repetitivas se le asignan 32H, como el promedio de (8 ud. x 4H/ud.) - 2H unidos a éster = 34H y (9ud. x 4H/ud.) - 2H unidos a éster = 30H

4.2. Síntesis y caracterización de un LDBC sensible a la luz y a la temperatura

Como ya se ha comentado, en el grupo CLIP se ha trabajado con anterioridad en LDBC formados por un azodendrón y una cadena lineal de PEG. Estos compuestos son capaces de mostrar distintas morfologías en disolución acuosa según la relación hidrófobo/hidrófilo de los bloques, formando vesículas cuando ésta se sitúa en torno a 80/20. Estas vesículas son capaces de encapsular tanto compuestos hidrófobos como hidrófilos y liberarlos mediante irradiación con luz, siendo esta liberación más rápida cuando el bloque dendrítico es un azodendrón de 4ª generación funcionalizado con un ácido graso de cadena larga y con isobutiloxiazobenceno en proporción 50/50.²⁵

Ya que este azodendrón, **d(isoAZO/C18)(50/50)**, tiene una masa de aproximada de 7000 g/mol, para alcanzar la proporción hidrófobo/hidrófilo=80/20 mencionada es necesario anclar una cadena lineal de $M_n=2000$ Da aproximadamente. Por ser el que más se aproxima a este valor se ha elegido el polímero **(OEG-co-DEG)_3200** para preparar el LDBC (Figura 15) mediante una cicloadición de azidas y alquinos catalizada por Cu(I) (ver Anexo 6.1.4).

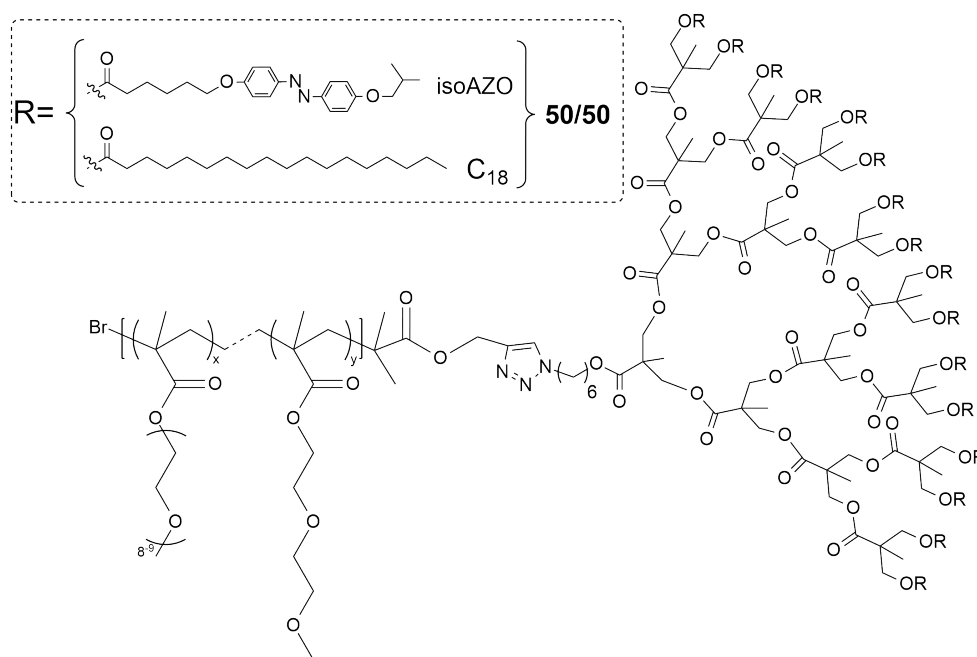


Figura 15: Estructura del LDBC sintetizado

En primer lugar se desprotege el triple enlace terminal usando TBAF (ver Anexo 6.1.3). Se comprueba que la desprotección es completa viendo que la señal en RMN a 0.12 ppm, correspondiente al TMS, desaparece por completo (ver Anexo 6.5). Una vez se realiza el acoplamiento, la eficiencia de la reacción se puede comprobar mediante RMN (Figura 16) ya que desaparece la señal a 3.25 ppm correspondiente al $-CH_2-N_3$ del **d(isoAZO/C18)(50/50)** y la señal a 4.61 ppm correspondiente al $-CH_2-C\equiv CH$ del bloque lineal **[(OEG-co-DEG)_3200]-C\equiv C** (ver Anexos 6.4, 6.5 y 6.6).

²⁵Este azodendrón fue sintetizado previamente por la Dra. Eva Blasco

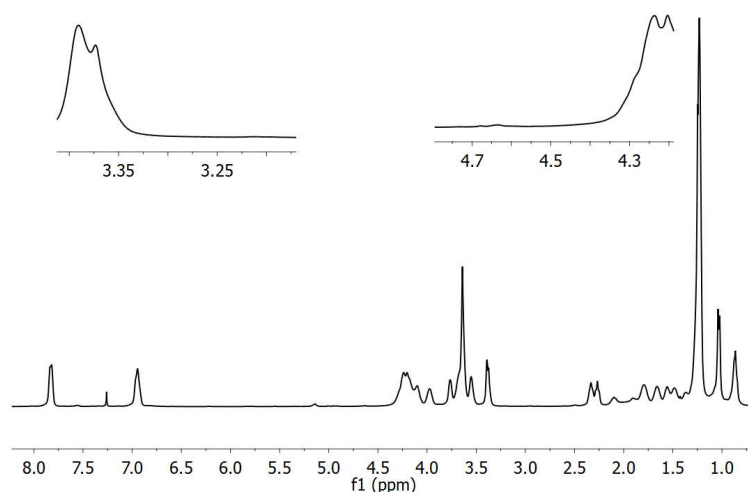


Figura 16: Espectro de ^1H -RMN del [(OEG-co-DEG)₃₂₀₀]-b-d(isoAZO/C18)

Por GPC se comprueba que no quedan bloques sin reaccionar y que, efectivamente, la reacción ha funcionado puesto que se ve un desplazamiento de la curva de distribución de masas moleculares a tiempos de elución menores, manteniendo una dispersidad cercana a uno (Figura 17).

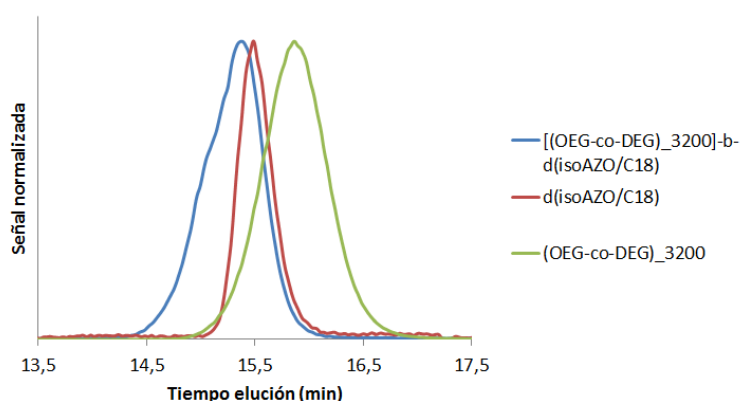


Figura 17: GPC del LDBC y de los bloques por separado

El copolímero bloque obtenido, [(OEG-co-DEG)₃₂₀₀]-b-d(isoAZO/C18), presenta buena estabilidad térmica, con un valor de DTGA = 288°C (ver Anexo 6.7).²⁶ Es un polímero cristalino con una $T_{\text{fusión}} = 32^\circ\text{C}$ (ver Anexo 6.8). El compuesto no presenta comportamiento cristal líquido, tal y como se comprobó en el estudio de MOP.

4.3. Preparación de agregados en agua y estudio de su morfología

Se han preparado agregados en agua disolviendo 5 mg del LDBC sintetizado en 1 mL de THF y añadiendo volúmenes de 10 μL de agua mili-Q, a la vez que se mide la turbidez durante la adición. Una vez alcanzado un determinado porcentaje de agua se llega a un punto crítico en que se empiezan

²⁶El valor de DTGA es la temperatura correspondiente al valor máximo del primer pico de la derivada de la curva de TGA

a formar agregados como consecuencia del comportamiento anfífilo del LDBC y se produce un salto brusco en la turbidez (Figura 18). Se sigue añadiendo agua hasta que la turbidez se mantiene estable. Los agregados formados se dializan en agua durante 4 días para eliminar el THF, obteniéndose una concentración de agregados de concentración 2,5 mg/mL aproximadamente.

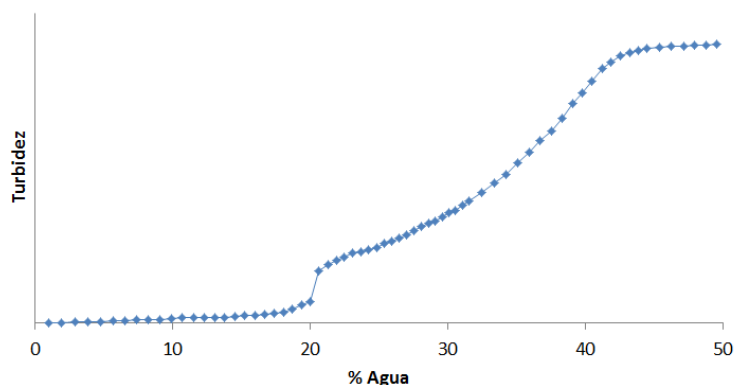


Figura 18: Curva de turbidimetría

En la curva de turbidimetría se aprecian dos saltos, lo que puede significar que se forman dos tipos de agregado; o bien, agregados de dos tamaños distintos.

La morfología de los agregados formados se estudió por TEM (Figura 19). Para ello las muestras se depositaron sobre rejillas de Cu y se tiñeron con acetato de uranilo y se secaron (ver Anexo 6.1.5). Las imágenes de microscopía confirman la formación de agregados nanoscópicos, concretamente la formación de vesículas con tamaños que van desde los 70 hasta los 400 nm.

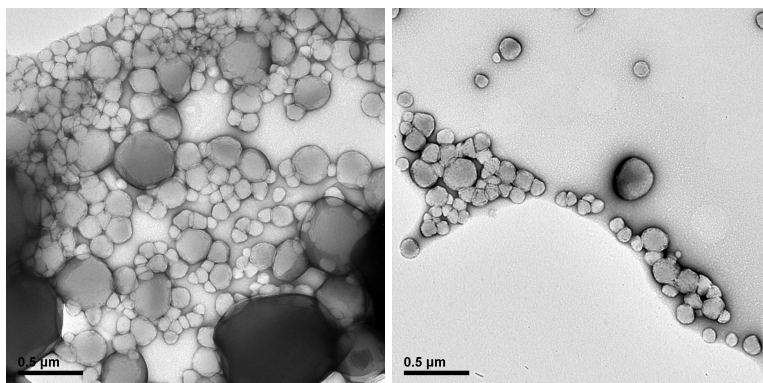


Figura 19: Imágenes de TEM de los agregados formados

Se realizó también un estudio de DLS con el fin de determinar el diámetro hidrodinámico (D_h) de los agregados en agua (Figura 20). El experimento se hizo por triplicado para asegurar la reproducibilidad de las medidas. Tal y como se podía pensar viendo la curva de turbidimetría, existen dos distribuciones de tamaños, una en torno a 80-90 nm y otra en torno a 350-400 nm, lo que concuerda con las imágenes de TEM. Es necesario señalar que las dos distribuciones no son integrables, ya que la gráfica que se representa está medida en intensidad emitida, y a ésta contribuyen en mayor medida los agregados de mayor tamaño.

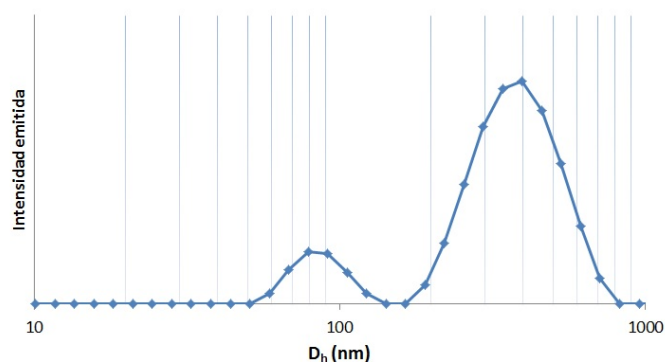


Figura 20: Curva de DLS (escala logarítmica)

La concentración micelar crítica en agua (CMC) se determinó midiendo la fluorescencia de rojo nilo en un entorno hidrófobo (ver Anexo 6.1.6). Se excita a 560 nm y el rojo nilo cuando se encuentra en un entorno hidrófobo, como es el interior de la membrana al formarse los agregados, emite a 606 nm. Estas longitudes de onda están alejadas de las longitudes de onda que provocan la isomerización del azobenceno. La fluorescencia del rojo nilo en agua depende entonces de la existencia de agregados en disolución, y su intensidad de la concentración de los mismos. En caso de estar por debajo de la CMC no se formarán agregados y el rojo nilo no será fluorescente puesto que no se puede situar en un entorno hidrófobo. Así pues, se representa en una gráfica la intensidad de luz emitida a 606 nm, frente al logaritmo de la concentración. El valor de la CMC se obtiene calculando el valor del *onset* en la Figura 21.

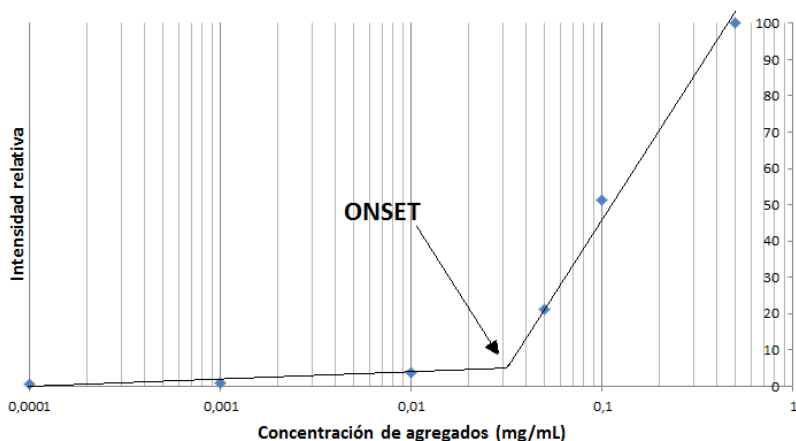


Figura 21: Intensidad de fluorescencia frente a concentración de agregados

Para el compuesto [(OEG-co-DEG)₃₂₀₀]-b-d(isoAZO/C18), el valor de la CMC obtenido es 35 $\mu\text{g/mL}$. Este valor es comparable a los obtenidos en otros agregados de naturaleza similar.^{27,28}

²⁷J. L. Mynar, A. P. Goodwin, J. A. Cohen, Y. Ma, G. R. Fleming, J. M. J. Fréchet, *Chem. Commun.*, **2007**, 2081–2082

²⁸Y. Chang, Y. C. Kwon, S. C. Lee, C. Kim, *Macromolecules*, **2000**, 33, 4496–4500

4.4. Estudio de la morfología de los agregados tras ser irradiados y calentados

Como se ha comentado, el LDBC sintetizado es capaz de responder a la temperatura calentando una disolución acuosa del polímero por encima de la LCST, y a la luz (mediante la fotoisomerización de las moléculas de azobenceno de la periferia del dendrón). Es de esperar que los agregados formados en agua a partir de este LDBC también sean capaces de responder a estos estímulos provocando cambios en su morfología.

En primer lugar se registraron espectros de UV-vis de una disolución de vesículas de concentración 0,5 mg/mL irradiando con luz de 365 nm (ver Anexo 6.1.7) a distintos tiempos para ver la evolución de las curvas (Figura 22). A tiempo cero se aprecia la banda a 360 nm, correspondiente con la banda $\pi - \pi^*$ a la misma longitud de onda en el espectro en disolución de CHCl_3 , y dos hombros en 344 y 380 nm, asociados a la presencia de agregados tipo H y tipo J, respectivamente.

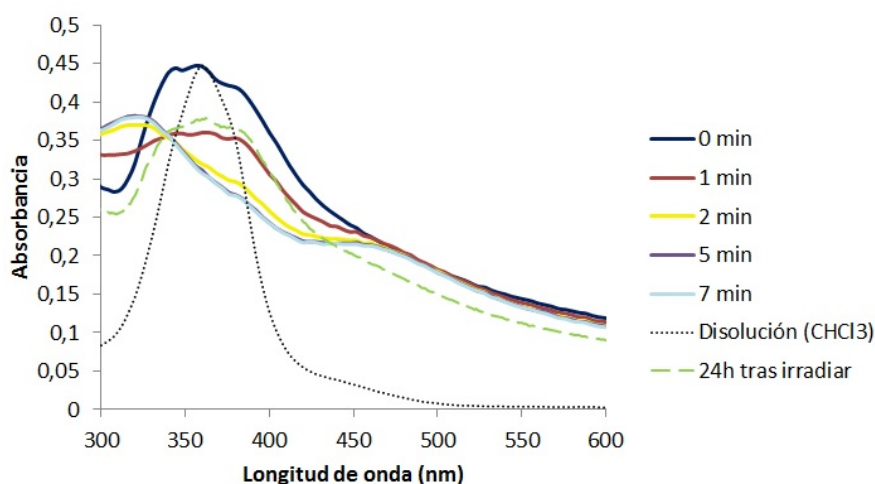


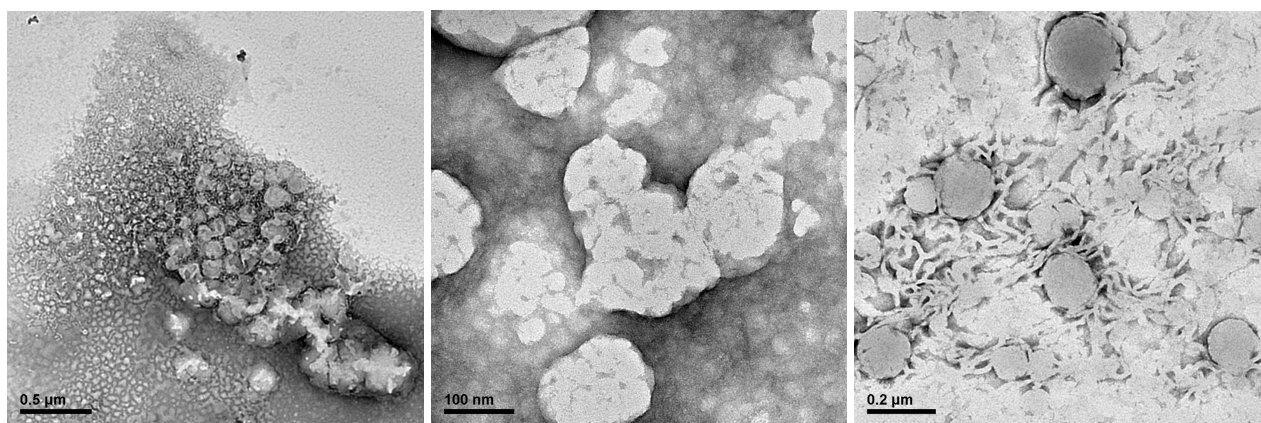
Figura 22: Espectros de UV-vis de una disolución de agregados irradiando con luz de 365 nm a distintos tiempos

Como consecuencia de la isomerización *trans* \rightarrow *cis* del azobenceno, el máximo de la banda $\pi - \pi^*$ se desplaza a longitudes de onda más cortas a la vez que disminuye su intensidad mientras que la banda $n - \pi^*$ aumenta en intensidad. A los 5 minutos se alcanza el estado estacionario. Tras mantener la disolución irradiada en oscuridad 24 horas se aprecia como se va recuperando el espectro inicial registrado para el isómero *trans*.

Los cambios en la morfología tras irradiar y calentar fueron estudiados por TEM. Se investigaron tres muestras con estas características:

- Muestra irradiada durante 10 minutos.
- Muestra calentada por encima de la LCST²⁹, a 60°C, durante 1 hora y preparada en caliente.
- Muestra calentada por encima de la LCST, a 60°C, durante 1 hora y enfriada lentamente hasta temperatura ambiente.

²⁹Tomamos como valor de la LCST para el LDBC el valor que se obtuvo para el bloque lineal aislado, que fue de 42°C



(a) Muestra irradiada

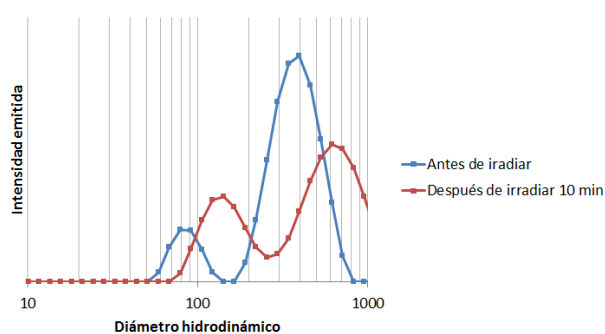
(b) Muestra preparada en caliente

(c) Muestra preparada en frío tras haber calentado

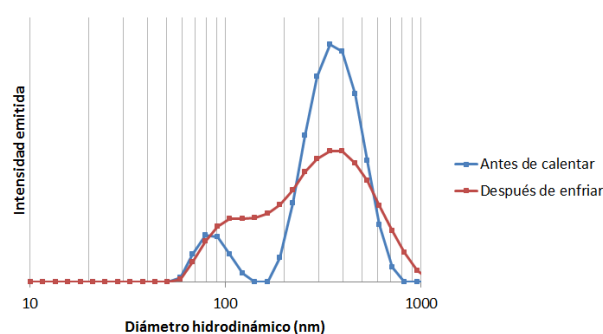
Figura 23: Fotos de TEM tras estimular los agregados

En las imágenes obtenidas (Figura 23) se puede apreciar como, efectivamente, hay cambios apreciables en la morfología en ambos casos.

También se han realizado estudios de DLS para estudiar estos cambios morfológicos (Figura 24). En primer lugar se hizo un estudio comparando una disolución de agregados antes y después de haber irradiado durante 10 minutos, observándose cambios apreciables en la distribución de tamaños. En segundo lugar se estudió el comportamiento de los agregados en disolución con la temperatura. Para ello se realizaron medidas a 60°C. En este caso, la medida obtenida en el equipo no era estable. Esto puede deberse a que al elevar la temperatura por encima de la LCST los dos bloques del LDBC son hidrófobos, lo que se traduce en que las vesículas dejan de ser estables en disolución y empiezan a formar agregados, dando lugar a una medida inestable. Se realizó un último estudio tras haber dejado enfriar y estabilizar la disolución de agregados, observándose un cambio en la distribución de tamaños respecto a la distribución inicial.



(a) DLS tras irradiar



(b) DLS tras calentar y enfriar

Figura 24: Estudios de DLS tras irradiar

4.5. Estudio del encapsulado de moléculas y liberación mediante estímulos

Las vesículas formadas, tal y como se ha comentado, tienen la capacidad de albergar moléculas tanto hidrófilas como hidrófobas, en la cavidad generada en el interior o en la membrana, respectiva-

mente. Así pues se ha llevado a cabo un estudio de encapsulado y liberación mediante estímulos de un compuesto hidrófobo, como es el rojo nilo, y otro hidrófilo, como es la rodamina B.

Ya se comprobó que los agregados formados eran capaces de encapsular rojo nilo en el interior de su membrana (debido a la hidrofobicidad del entorno), y que esta propiedad nos permite determinar la CMC del compuesto (Sección 4.3). Así pues se trató de averiguar si eran capaces de liberar este compuesto mediante estímulos lumínicos y/o térmicos. Para ello, en primer lugar, se midió el espectro de fluorescencia antes y después de calentar una disolución de agregados con rojo nilo encapsulado por encima de la LCST durante 30 minutos (Figura 25).

Se puede apreciar que el espectro no cambia lo que indica que el rojo nilo se mantiene en el entorno del polímero. Sin embargo el estudio de TEM indica que las vesículas se destruyen. Lo que previsiblemente sucede es que al calentar la disolución de agregados por encima de la LCST el LDBC se vuelve más hidrofóbico, con lo que las vesículas colapsan formando agregados macroscópicos y el rojo nilo se mantiene en este entorno, con lo que el espectro no cambia.

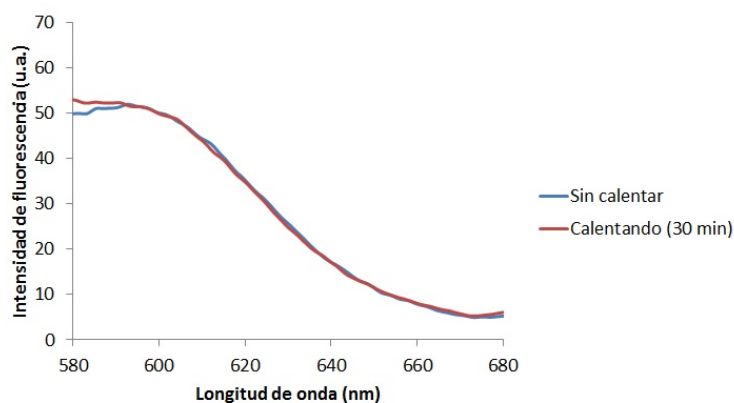


Figura 25: Espectro de fluorescencia del rojo nilo encapsulado antes y después de calentar

La liberación del rojo nilo mediante luz se determinó midiendo el espectro de fluorescencia del rojo nilo encapsulado tras irradiar con luz de 365 nm a distintos tiempos (Figura 26). Se observa que al irradiar se produce una disminución en la intensidad de fluorescencia del rojo nilo, lo que a priori indica que el compuesto es liberado como consecuencia de la fotoisomerización del azobenceno. Sin embargo también es posible que la disminución en la intensidad de fluorescencia se deba a que la isomerización *trans* \rightarrow *cis* provoca un aumento de polaridad en la membrana haciéndola menos hidrófoba.

Cuando se repitió la medida 24 h después de dejar de irradiar, se comprobó que la fluorescencia se recuperaba parcialmente. Esto probablemente indica que la liberación del rojo nilo sea parcial y ésta sea la razón de que pasadas 24 h se recupere parcialmente la intensidad de fluorescencia.

Como compuesto hidrófilo se eligió la rodamina B. Para realizar este estudio se formaron las vesículas en presencia de rodamina B (ver Anexo 6.1.8). Se dializó en agua la disolución de agregados formada con el fin de eliminar tanto el THF como la rodamina B no encapsulada.

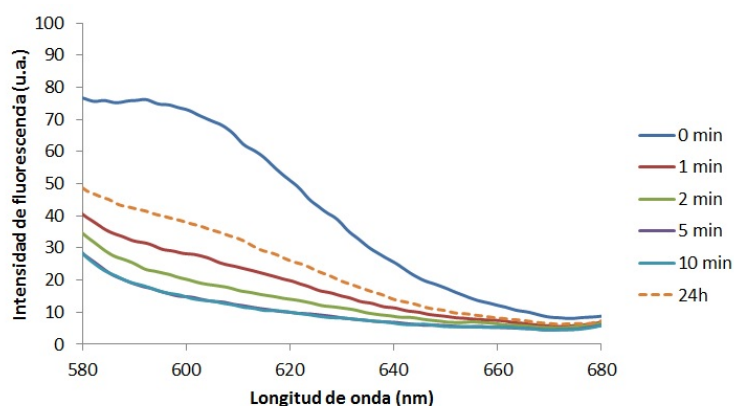


Figura 26: Espectro de fluorescencia del rojo nilo encapsulado, irradiando a distintos tiempos

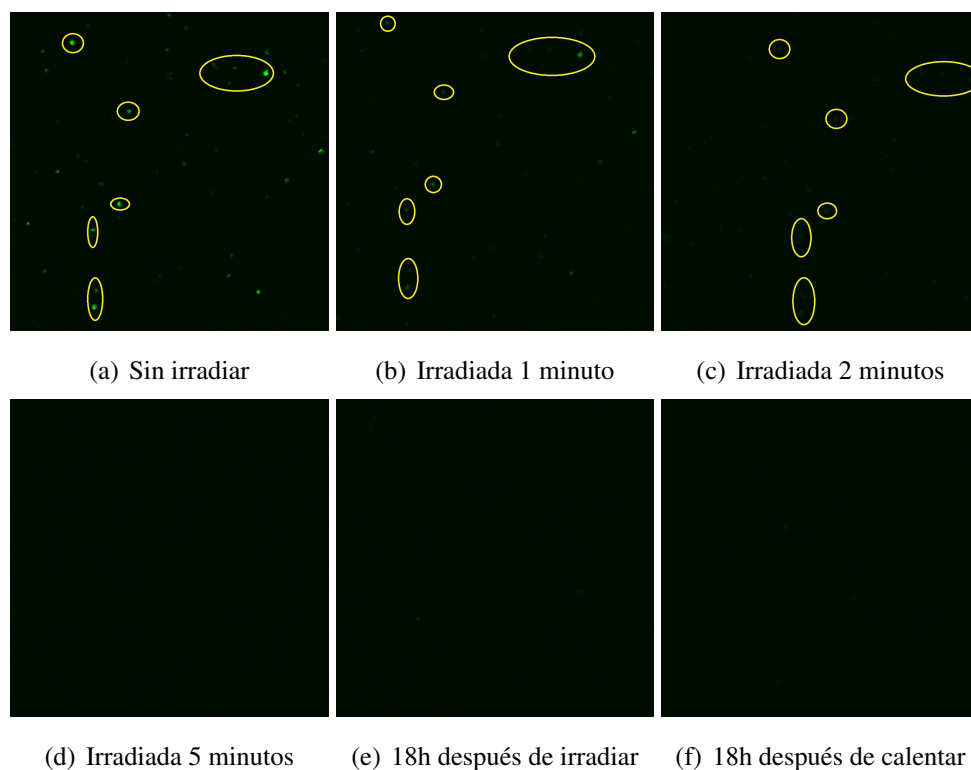


Figura 27: Imágenes de microscopio confocal irradiando a distintos tipos

La evolución en la liberación de la rodamina B fue seguida mediante microscopía confocal (Figura 27). En primer lugar se estudió una muestra sin estimular, comprobándose la existencia de rodamina encapsulada ya que se aprecian puntos iluminados. A continuación se irradió esa misma muestra a distintos tiempos, observándose como la intensidad de los puntos (señalados con círculos amarillos) disminuye, hasta casi desaparecer a los 5 minutos de irradiación, como consecuencia de la liberación de la rodamina. En último lugar se estudiaron dos muestras 18 horas después de haber sido irradiadas durante 15 minutos y calentadas a 60°C durante 1 hora, respectivamente. Se comprobó como la intensidad de los agregados era mucho menor que en la muestra sin estimular, lo que significa que ambos estímulos son capaces de provocar cambios en los agregados que permiten la liberación de la rodamina B al medio. Se realizaron también imágenes en unas condiciones que nos permitieran ver si la rodamina era liberada al medio (Figura 28). Efectivamente se vio como aparece una intensidad de

fondo correspondiente a la rodamina B liberada, tanto al irradiar como al calentar.

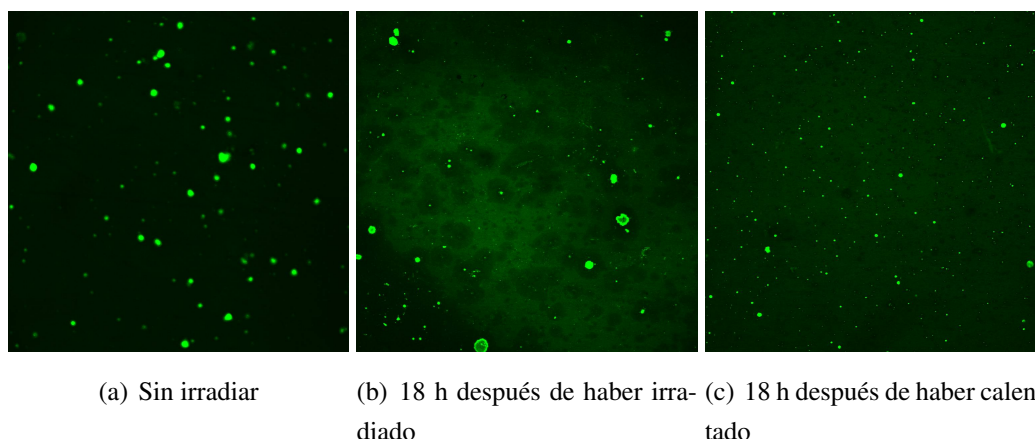


Figura 28: Variación de la intensidad de fluorescencia del fondo al irradiar y al calentar

4.6. Síntesis de polímeros ramificados con termorrespuesta mediante reacciones de tiolinos

La presencia de un grupo etinilo o alquino terminal en los polimetacrilatos sintetizados permite realizar otro tipo de química diferente a la CuAAC utilizada para la síntesis del LDBC. Así, se ha realizado un estudio preliminar sobre la síntesis de polímeros ramificados a partir de los polímeros con termorrespuesta sintetizados, mediante reacciones de tiolinos usando distintos ditioles e iniciadores, con el fin de estudiar la reacción y la posibilidad de obtener nuevas arquitecturas poliméricas. En este tipo de reacciones alquino-ditiol, dada la estequiometría se obtienen, a priori, cadenas poliméricas lineales. Puesto que el alquino está en el extremo de un polímero, en nuestro caso se obtendrá un polímero ramificado con una unidad repetitiva de la que cuelga el polimetacrilato. Este tipo de estructuras obtenidas por fotopolimerización de tiolinos no han sido prácticamente exploradas hasta la fecha.

Dada la ya citada solubilidad de los polimetacrilatos de oligotilenglicol y dietilenglicol en agua se intentó la fotopolimerización en este medio usando Irgacure 2959® como fotoiniciador, debido a su ligera solubilidad en agua (ver Anexo 6.1.10). El polímero utilizado en esta prueba fue el (OEG-co-DEG)_3200 y el ditiol elegido el HS-DEG-SH (Figura 29).

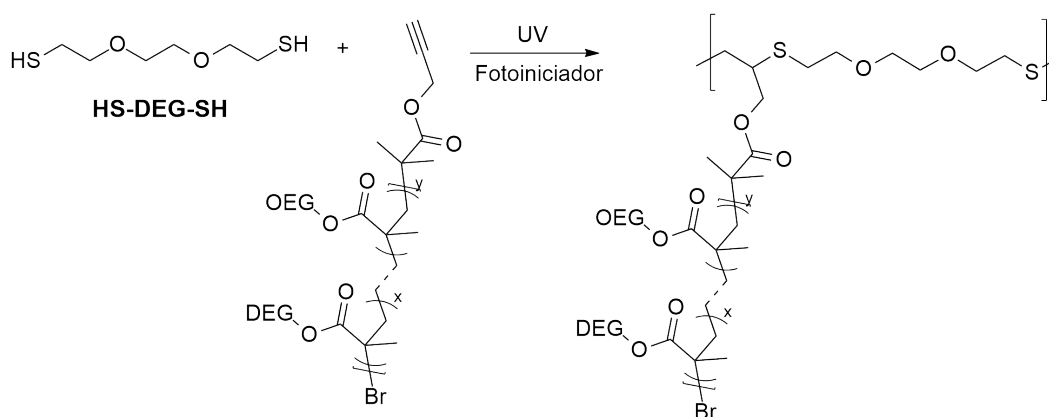


Figura 29: Síntesis de polímeros ramificados mediante reacción de tiolinos

El estudio de RMN reveló que la reacción no se produjo ya que la señal a 4.58 ppm correspondiente al metileno unido al alquino no desapareció (ver Anexo 6.9). Una posible explicación es la poca solubilidad del fotoiniciador Irgacure 2959® en agua, que si bien es moderada (1 mg/mL), no parece suficiente como para que la reacción avance.

Con el objetivo de solventar este problema se llevó a cabo la misma fotopolimerización en THF aumentando el porcentaje en peso del fotoiniciador al 4 %, frente al 0,1 % que se puede alcanzar en agua. Se realizó por duplicado, usando los polímeros (OEG-co-DEG)_3200 y (OEG-co-DEG)_12000. En esta ocasión sí que desapareció la señal de 4.58 ppm en ambos espectros, a la vez que apareció una nueva señal en la zona de 2.7 ppm, correspondiente al $-\text{CH}_2\text{-S-}$ formado (Figura 30).

Se estudiaron los polímeros obtenidos por GPC (Figura 31). Pese a que por RMN se vio que la fotopolimerización tenía lugar, por GPC se ve que si bien la distribución de masas se ensancha en la zona de tiempos de elución más bajos (es decir, masas más altas) se conservan los picos de los polímeros iniciales. La conclusión es que la reacción se produce, puesto que por RMN hay cambios en las señales, pero probablemente el grado de polimerización alcanzado es muy bajo. Una explicación es que una vez ha reaccionado un grupo tiol con el alquino sea el otro tiol de la misma molécula puente el que ataque la otra posición del alquino, en lugar de que ataque otro tiol de otra molécula. Esto explicaría que la reacción se produzca según el espectro de RMN pero no haya un desplazamiento de masas en el GPC.

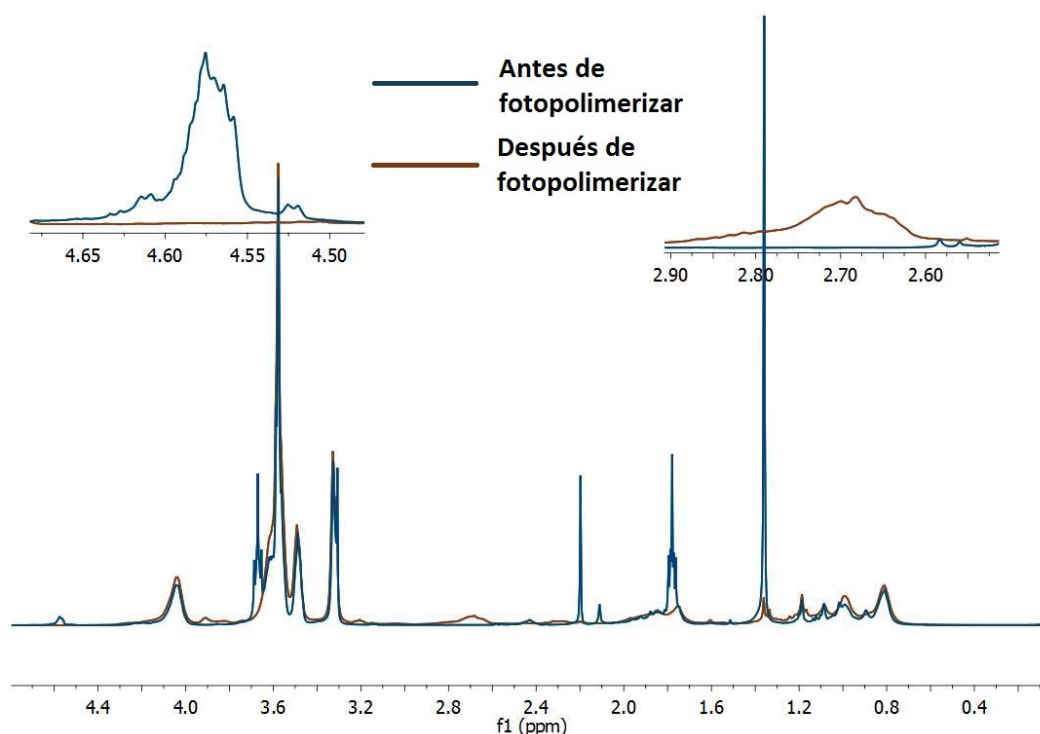


Figura 30: Espectros de ^1H -RMN superpuestos antes y después de fotopolimerizar el (OEG-co-DEG)_3200 en THF con Irgacure 2959®

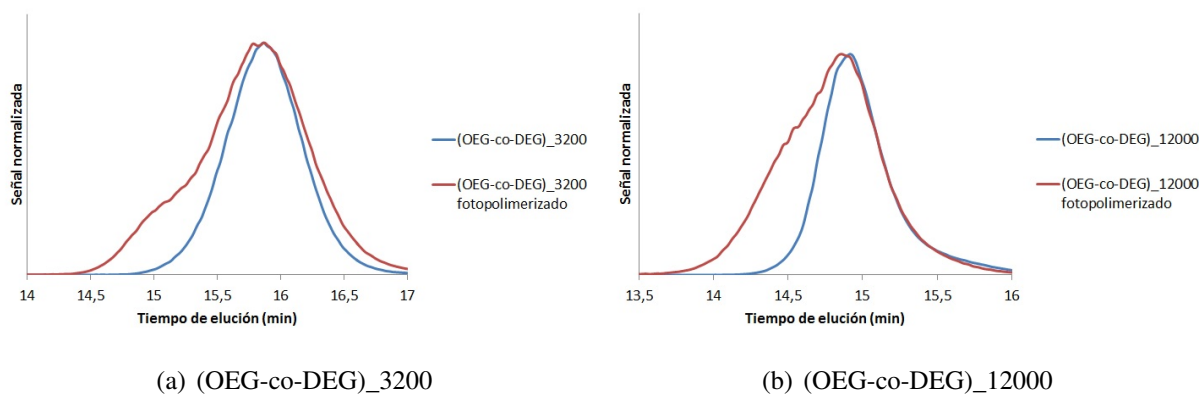


Figura 31: GPC de las fotopolimerizaciones realizadas en THF con Irgacure2959®

Se trató de mejorar la fotopolimerización usando como fotoiniciador el Irgacure 651®. Éste presenta una mayor absorción a la longitud de onda que emite la lámpara UV, 365 nm. Con este fotoiniciador se realizaron dos pruebas usando un polímero de masa 17000 (**(OEG-co-DEG)_17000**) y dos ditioles distintos, representados en la Figura 32, para estudiar su posible influencia.

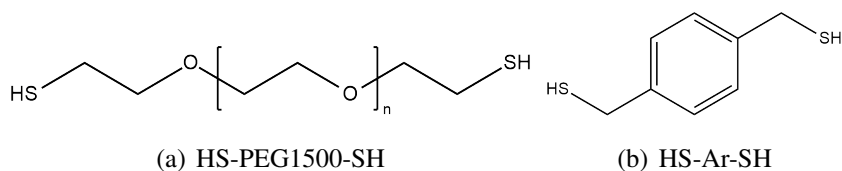


Figura 32: Ditioles empleados en las fotopolimerizaciones con Irgacure 651®

De nuevo, los espectros de RMN indican que la reacción ha tenido lugar. Los estudios de GPC indican que con el ditio **HS-PEG1500-SH** el pico de distribución de pesos moleculares no se desplaza en el cromatograma pero en la fotopolimerización con el ditio aromático (**HS-Ar-SH**) sí que hubo un cambio claro en la distribución de masas (Figura 33).

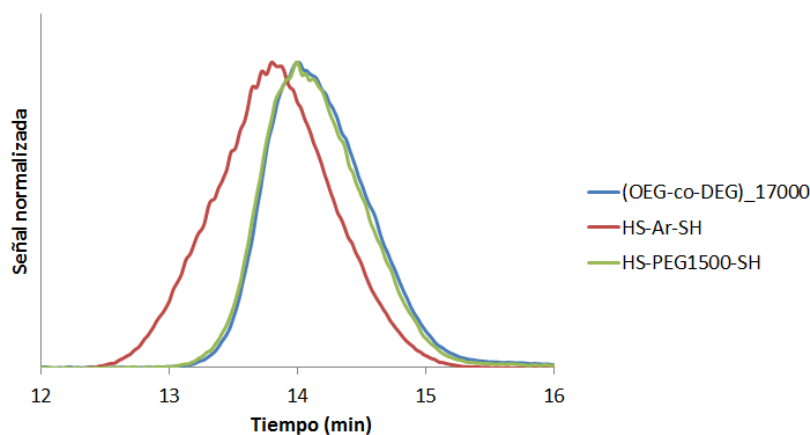


Figura 33: GPC de las fotopolimerizaciones realizadas con Irgacure 651®

Es posible que en efecto cuando se trabaja con tioles flexibles haya tendencia a ciclar y por tanto no se extiende la cadena. Al llevar a cabo la reacción con un ditio más rígido como el **HS-Ar-SH** se

evita esta reacción intramolecular, lo que hace que la distribución de tamaños, ahora sí, se desplace a tiempos de elución más bajos (masas mayores). No obstante, otra posible explicación es que se formen oligómeros y que en el caso de estos ditiolés flexibles su volumen hidrodinámico no varíe respecto al polímero de partida lo que justificaría que no haya un cambio en las curvas de GPC a pesar de observar polimerización.

Como se ha comentado estos resultados son preliminares pero muestra la potencialidad de usar la fotopolimerización de tiolinos para obtener nuevos polímeros con una estructura ramificada compleja.

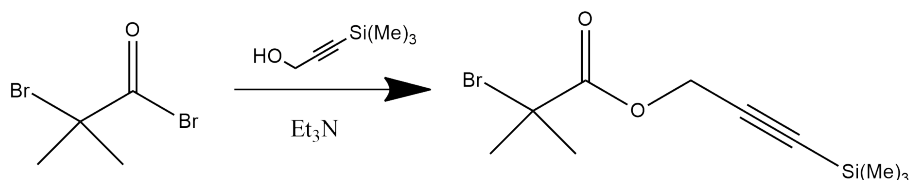
5. Conclusiones

- La combinación de la técnica de polimerización radicalaria controlada ATRP y de la química *click* ha demostrado ser de especial utilidad para la síntesis de nuevas arquitecturas poliméricas de estructura perfectamente controlada.
- Se ha preparado un LDBC cuyo bloques son capaces de responder a dos estímulos, la luz y la temperatura.
- El LDBC sintetizado es capaz de formar vesículas en agua tal y como se observó en TEM y DLS.
- Estos agregados presentan respuesta a la luz y la temperatura. Estos estímulos desencadenan cambios estructurales en los agregados, tal y como se observó en TEM y DLS.
- Los agregados preparados son capaces de encapsular compuestos hidrófobos e hidrófilos, como son el rojo nilo y la rodamina B, respectivamente. Son, a su vez, capaces de liberarlos aprovechando los cambios morfológicos producidos por la luz y la temperatura, excepto en el caso del rojo nilo, que no pudo ser liberado mediante temperatura.
- La reacción de tiolinos muestra ser una reacción prometedora para la síntesis de polímeros ramificados con termorrespuesta.

6. Anexos

6.1. Parte experimental

6.1.1. Síntesis del 2-bromo-2-metilpropanoato de 3-trimetilsililprop-2-in-1-ilo



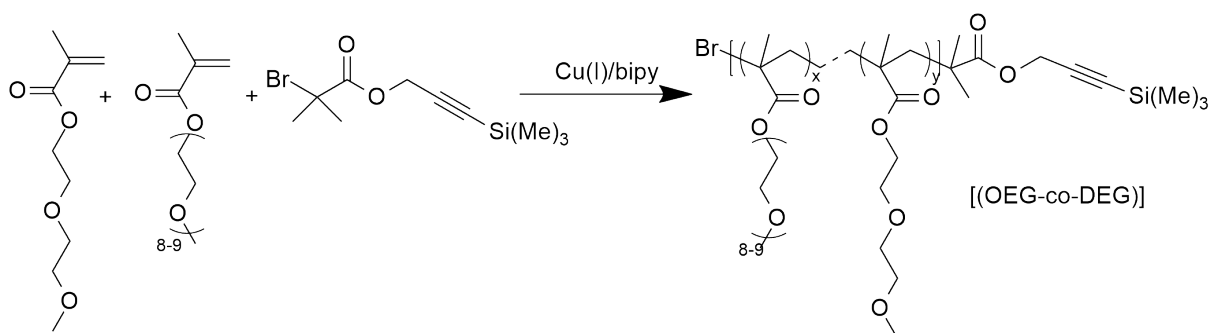
Se disuelve 3-trimetilsilil-2-propin-1-ol (0.38 g, 3 mmol) y trietilamina (0.63 mL, 4.5 mmol) en THF seco (20 mL). Se enfría en un baño de agua y hielo. Se añade gota a gota bromuro de 2-bromoisobutirilo (0.55 mL, 4.5 mmol) previamente disuelto en THF seco (10 mL). Se retira el baño de hielo y se mantiene agitando durante 4 h a temperatura ambiente. Se añade H₂O (3 mL) para eliminar exceso de 2-bromoisobutirilo de bromo. Se evapora el disolvente y el residuo se disuelve en DCM (30 mL). Se lava con disolución saturada de NH₄Cl (1x50 mL) y con H₂O destilada (1x50 mL). Se seca la fase orgánica con MgSO₄ anhidro, se filtra, se evapora y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna a presión en gel de sílice usando hexano/acetato de etilo (20/1) como eluyente. Rto: 88 %

IR (NaCl, cm⁻¹) 2961 (Csp³-H), 2187 (C≡C), 1742 (C=O), 1270 (C-O)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.76 (s, 2H), 1.95 (s, 6H), 0.18 (s, 9H)

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 170.86, 98.16, 92.77, 55.12, 54.24, 30.67, -0.36

6.1.2. Procedimiento general para las polimerizaciones ATRP



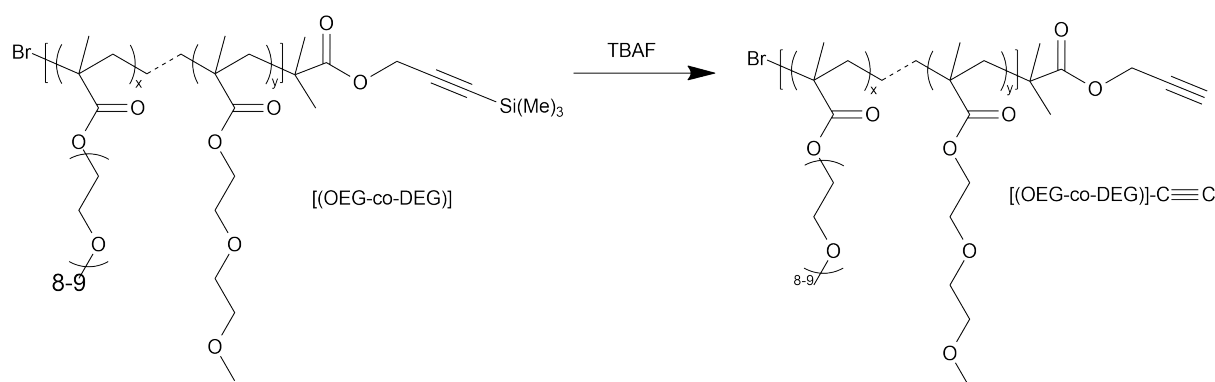
Se disuelve el iniciador (2-bromo-2-metilpropanoato de 3-trimetilsililprop-2-in-1-ilo), OEGMA, DEGMA, bipy y CuBr en etanol seco y desoxigenado (9 mL) en un matraz Schlenk. Se realizan tres ciclos de vacío-argon y luego se introduce el matraz en un baño de silicona a 60°C y se deja en agitación durante el tiempo indicado. El crudo de reacción se filtra a través de una columna de alúmina neutra para eliminar el CuBr lavando con abundante THF. Se evapora el disolvente y el residuo se dializa en agua durante 5 días. Pasado este tiempo se liofiliza para eliminar el agua.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 4.63-4.52 (m, 2H), 4.06, 3.60, 3.52, 3.35, 1.86, 1.77, 1.10, 1.00, 0.84, 0.12 (s, 9H)

IR (NaCl , cm^{-1}) 2877 ($\text{Csp}^3\text{-H}$), 1732 (C=O), 1246 (C-O)

	Iniciador	CuBr	bipy	OEGMA	DEGMA	Tiempo (min)
(OEG-co-DEG)_12000	171 mg (0.62 mmol)	90 mg (0.62 mmol)	196 mg (1.24 mmol)	2.3 g (4.7 mmol)	5 g (26.6 mmol)	60
(OEG-co-DEG)_10600	171 mg (0.62 mmol)	90 mg (0.62 mmol)	196 mg (1.24 mmol)	2.3 g (4.7 mmol)	5 g (26.6 mmol)	30
(OEG-co-DEG)_4600	410 mg (1.48 mmol)	212 mg (1.48 mmol)	462 mg (2.96 mmol)	2.3 g (4.8 mmol)	5 g (26.6 mmol)	15
(OEG-co-DEG)_3600	920 mg (3.3 mmol)	478 mg (3.3 mmol)	1 g (6.6 mmol)	3.2 g (6.6 mmol)	5 g (26.6 mmol)	20
(OEG-co-DEG)_3200	920 mg (3.3 mmol)	478 mg (3.3 mmol)	1 g (6.6 mmol)	3.2 g (6.6 mmol)	5 g (26.6 mmol)	10

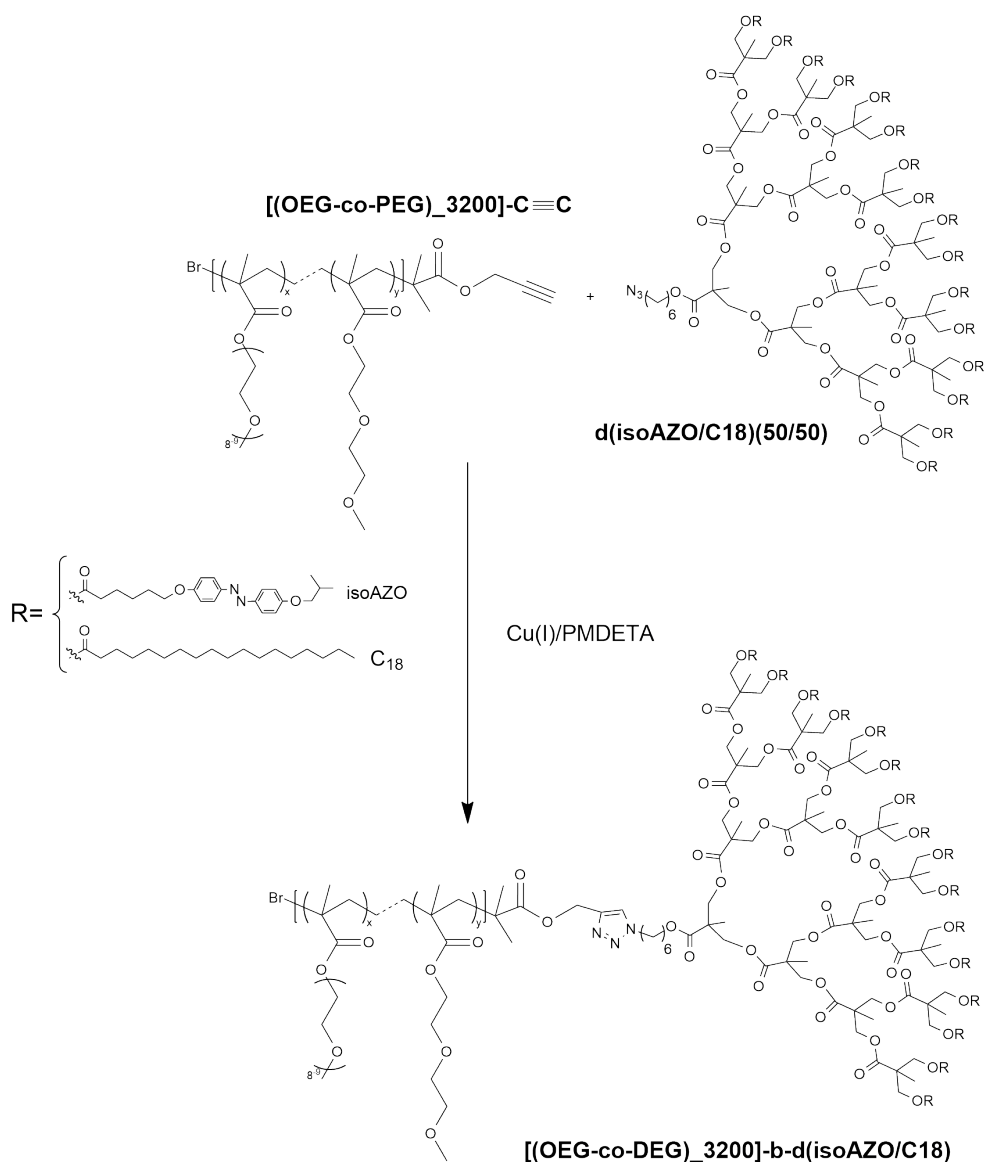
6.1.3. Procedimiento general para desprotección de triples enlaces terminales



Se introducen en un matraz Schlenk el (OEG-co-DEG) de M_n dado (n moles) y ácido acético glacial (n moles) disueltos en THF seco (2 mL por cada 200 mg de (OEG-co-DEG)). Se enfría en baño de hielo. A continuación se añade TBAF (5n moles) disuelto en THF seco (1 mL por cada 200 mg de polímero), gota a gota, en atmósfera inerte. Pasada 1 h se retira el baño y se deja en agitación 48 h. El crudo de reacción se filtra a través de una columna de alúmina neutra lavando con abundante DCM para eliminar el exceso de TBAF. Se evapora el disolvente.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 4.65-4.56 (m, 2H), 4.06, 3.60, 3.52, 3.35, 1.86, 1.77, 1.10, 1.00, 0.84

6.1.4. Síntesis del [(OEG-co-DEG)_3200]-b-d(isoAZO/C18)



Se introducen en un matraz Schlenck CuBr (6.05 mg, 0.042 mmol), PMDETA (7.3 mg, 0.042 mmol), [(OEG-co-DEG)₃₂₀₀]-C≡C (137 mg, 0.042 mmol) y d(isoAZO/C18) (150 mg, 0.021 mmol) en DMF seca (2 mL). Se realizan tres ciclos de vacío-argon y se introduce el matraz en un baño de silicona a 40°C durante 72 h. El crudo de reacción se filtra a través de una columna de alúmina neutra para eliminar el CuBr lavando con abundante THF. Se precipita el producto en etanol frío.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.83, 6.95, 5.14, 4.24, 4.20, 4.10, 3.97, 3.76, 3.64, 3.55, 3.39, 2.33, 2.27, 2.10, 1.79, 1.66, 1.56, 1.48, 1.25, 1.04, 0.86

IR (NaCl, cm⁻¹) 2921 (Csp³-H), 1734 (C=O), 1599 (Aromático), 1471 (Aromático), 1245 (C-O)

6.1.5. Tinción de muestras para TEM

Se depositan sobre una rejilla de TEM 10 μL de disolución de agregados de concentración 1 mg/mL. Se dejan 30 s y se elimina el agua por capilaridad con un trozo de papel de filtro. A continuación,

se depositan 10 μL de disolución de acetato de uranilo y al cabo de 30 s se elimina el agua por capilaridad. La muestra se seca a vacío durante 12 h.

6.1.6. Determinación de la CMC

Se preparan viales a los que se añaden 120 μL de una disolución de rojo nilo en DCM (5×10^{-6} M) y se deja evaporar el disolvente. A continuación se añade en cada tubo 600 μL de una disolución de agregados en el intervalo 1×10^{-4} a 0,5 mg/mL, en la que la concentración final de rojo nilo es 1×10^{-6} M. Los viales se agitan durante 24 h hasta que se alcance el equilibrio y se mide la fluorescencia de la muestras excitando a 560 nm.

6.1.7. Estudios de irradiación

La irradiación de las disoluciones de agregados se realiza con una lámpara Phillips PL-S 9W que emite entre 350 y 400 nm. La muestra se sitúa a una distancia de 10 cm de la lámpara. Una vez irradiadas se guardan en la oscuridad.

6.1.8. Encapsulado de rodamina B en vesículas

Se disuelven 2.5 mg de LDBC en 0,5 mL de THF y se añade de forma gradual una disolución acuosa de rodamina B, cuya concentración se ajusta para que al finalizar la adición ésta sea 5 veces superior a la de LDBC. Se sigue el proceso por turbidimetría. Una vez se alcanza una turbidez estable, se dializa la disolución de agregados formados durante 4 días para eliminar el THF y la rodamina B en exceso.

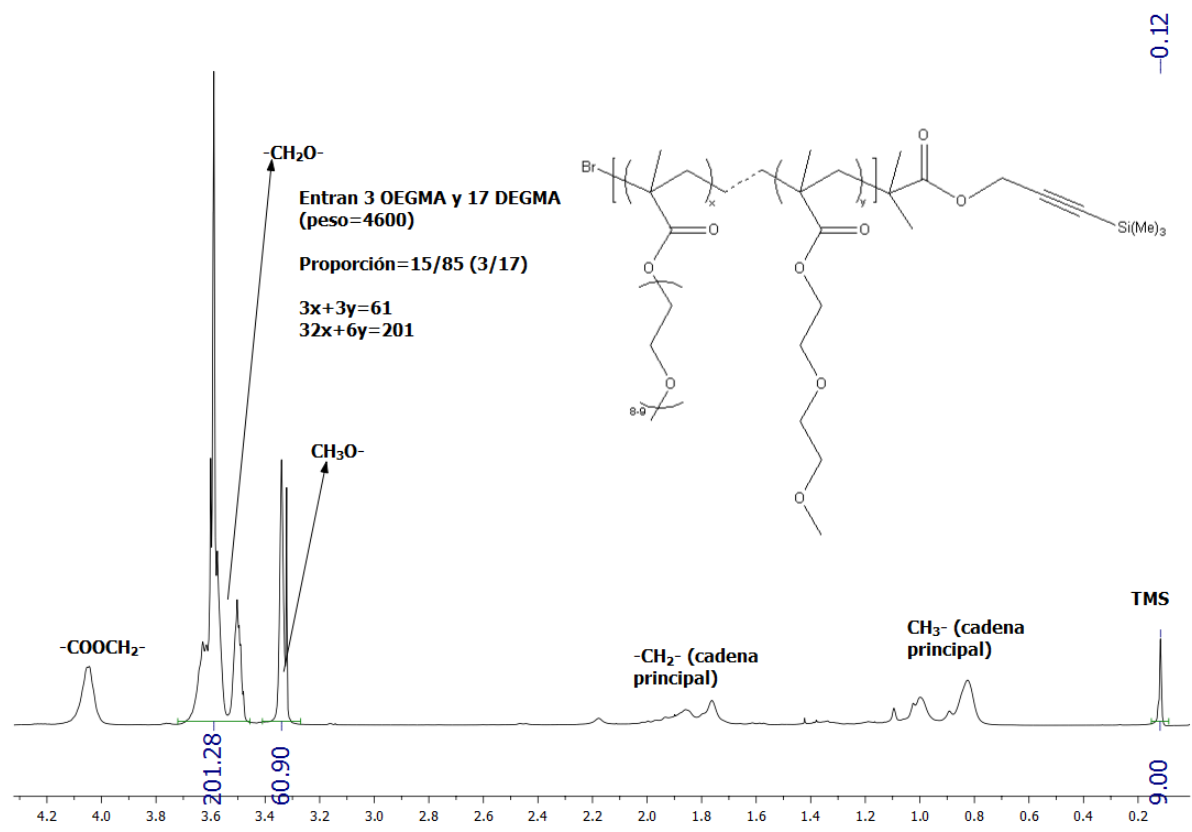
6.1.9. Estudios de microscopía confocal

Se añaden 5 μL de la disolución de agregados en un portaobjetos, se tapan con un cubre y la muestra se sella, sin dejar evaporar el agua. Se estudian las muestras realizando los correspondientes tratamientos cuidando que los parámetros del microscopio sean los mismos en todas las observaciones, con el fin de que las fotos obtenidas sean comparables.

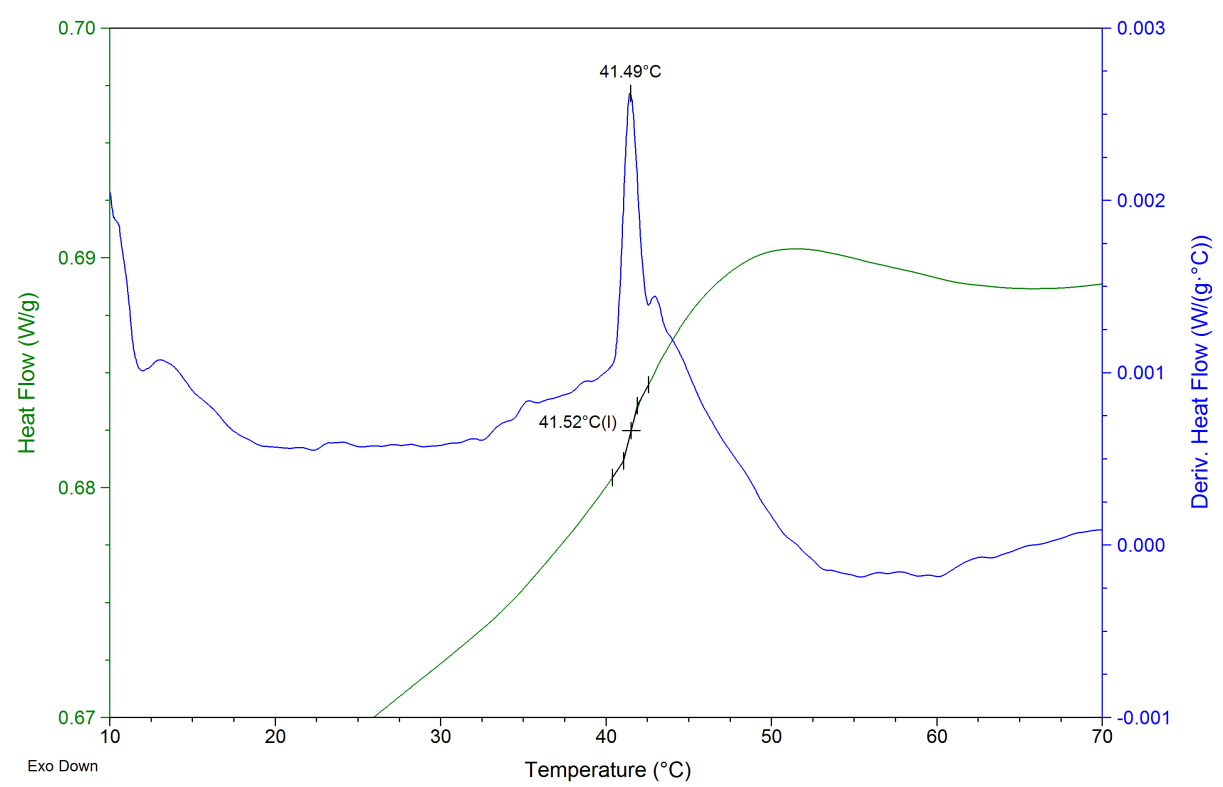
6.1.10. Procedimiento general para fotopolimerizar

Se introducen en un matraz Schlenk el [(OEG-co-DEG)]-C \equiv C de la masa correspondiente (n moles), el ditiol (n moles) y el fotoiniciador (4 % en peso) en THF (1 mL por cada 100 mg de [(OEG-co-DEG)]-C \equiv C). Se realizan tres ciclos de vacío-argon y se irradia bajo agitación durante 1 h con una lámpara Phillips PL-S 9W. Se evapora el disolvente.

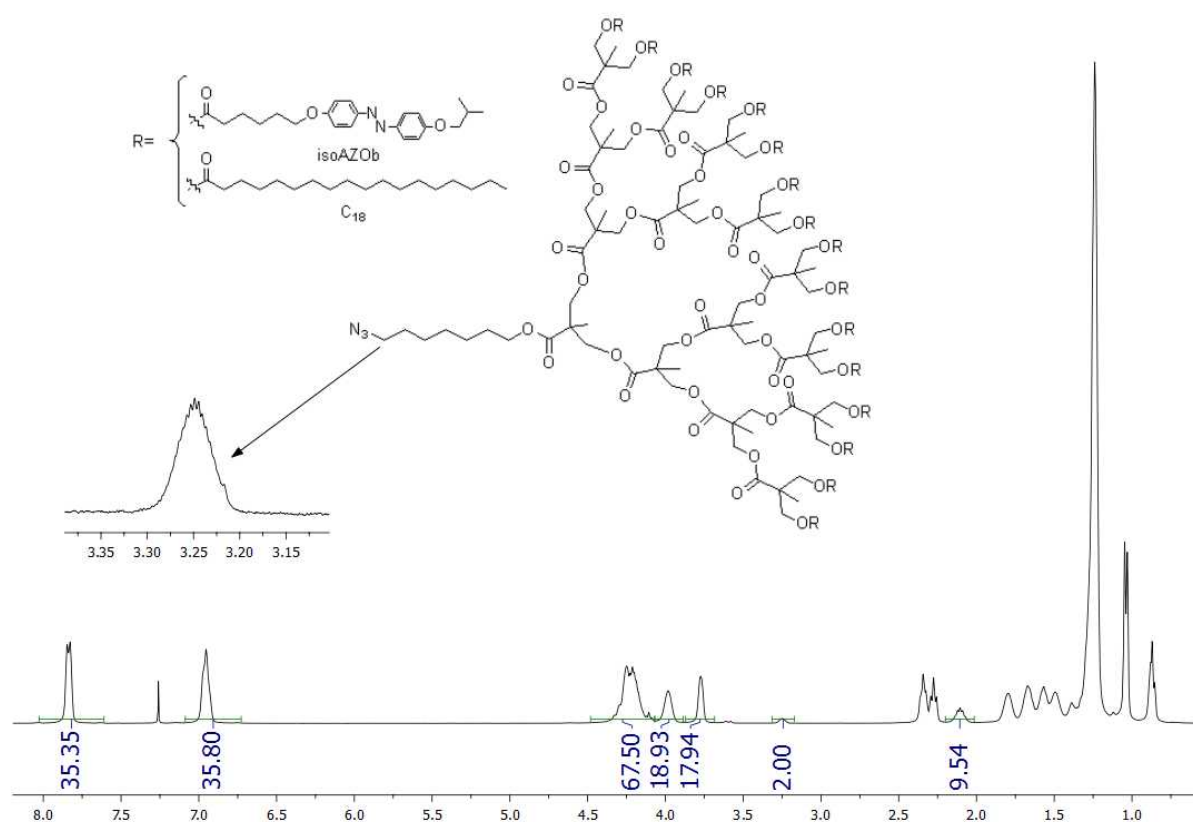
6.2. Ejemplo de espectro de ^1H -RMN de polímero con termorrespuesta



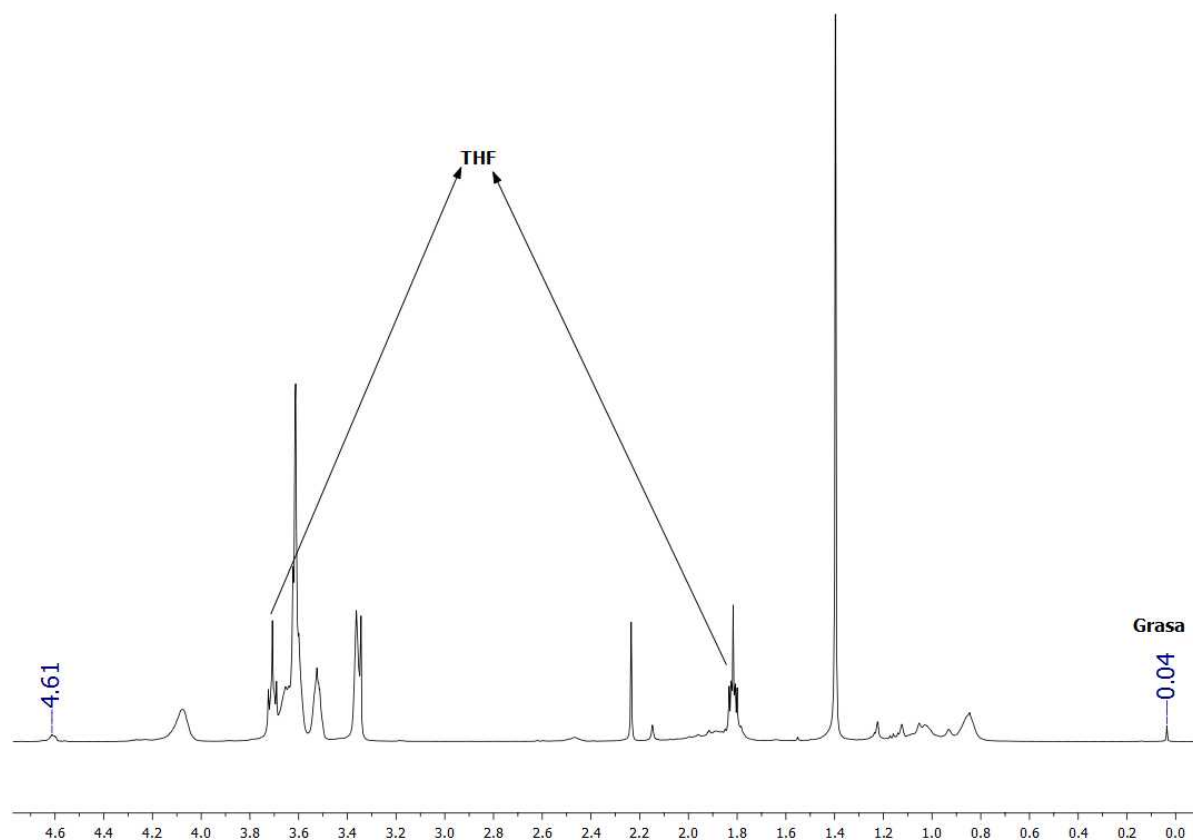
6.3. Ejemplo de DSC para el cálculo de la LCST



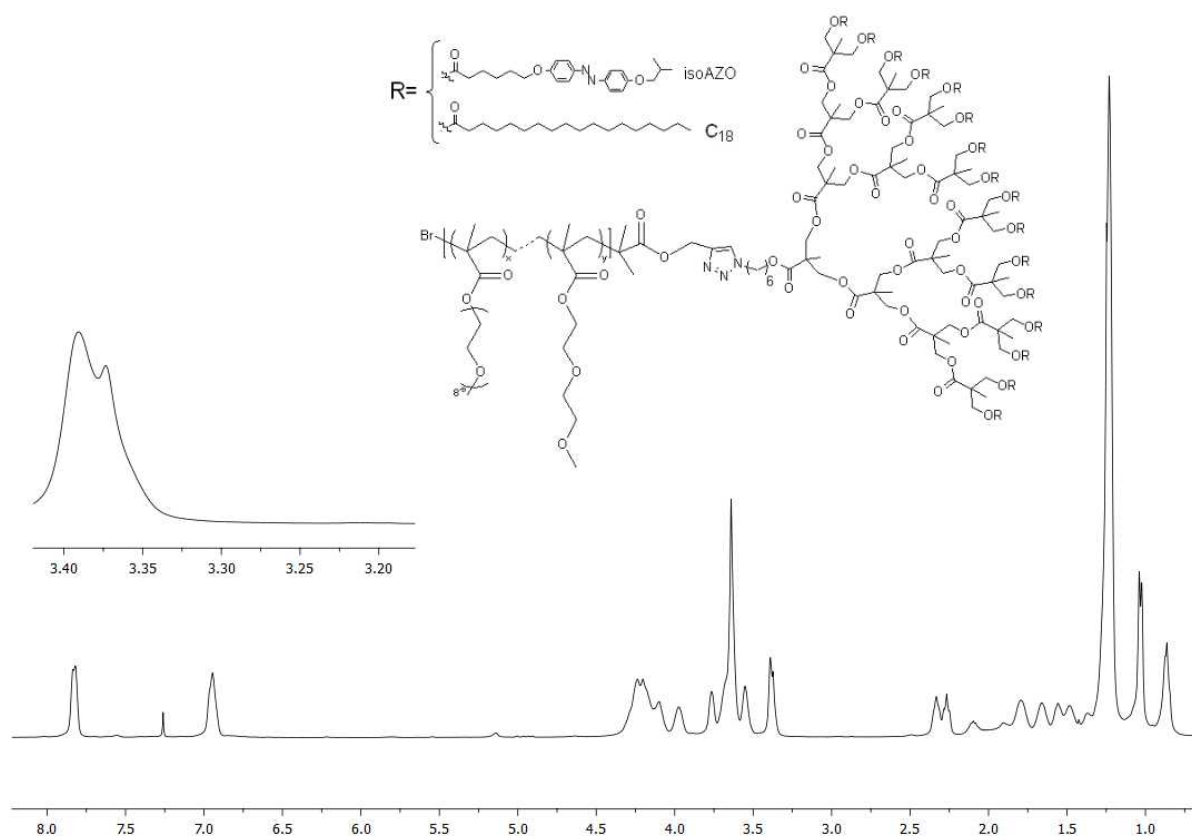
6.4. Espectro de ^1H -NMR del d(isoAZO/C18)



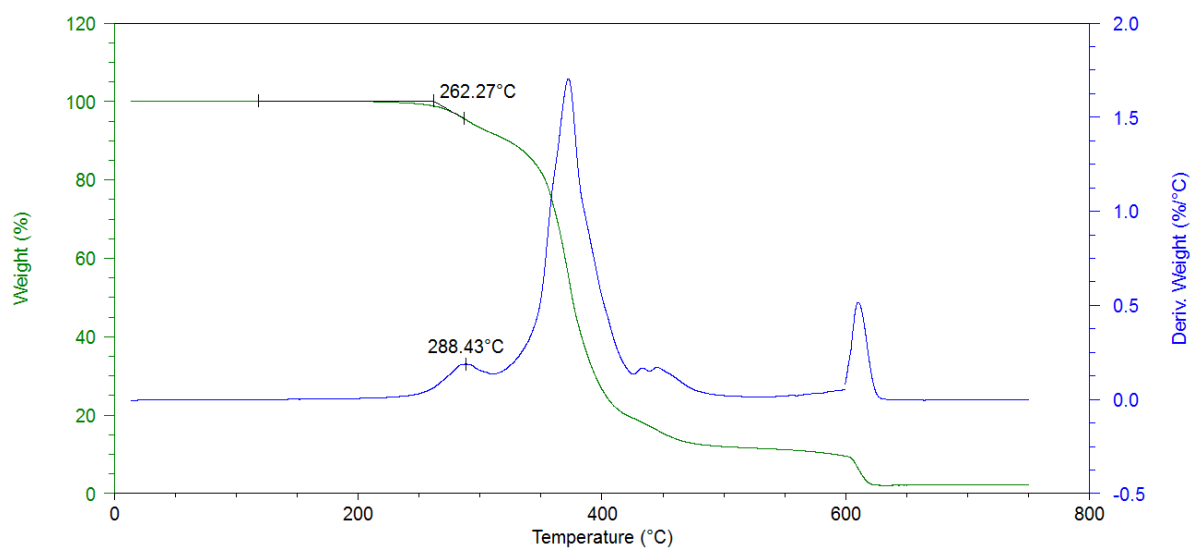
6.5. Espectro de ^1H -NMR del [(OEG-co-DEG)₃₂₀₀]-C \equiv C



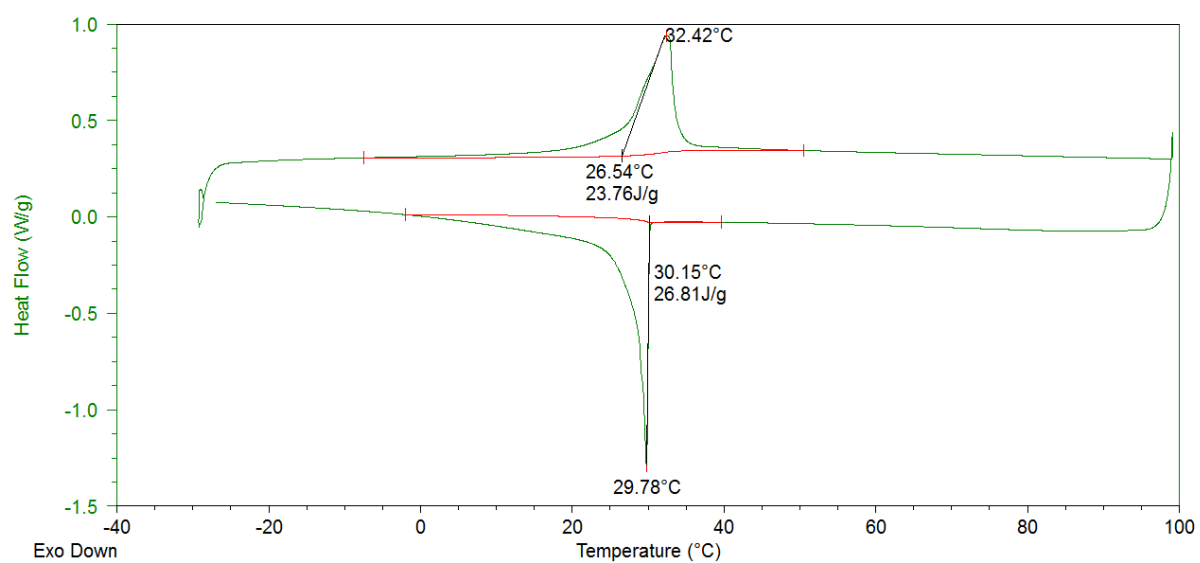
6.6. Espectro de ^1H -NMR de [(OEG-co-DEG)₃₂₀₀]-b-d(isoAZO/C18)



6.7. TGA del [(OEG-co-DEG)₃₂₀₀]-b-d(isoAZO/C18)



6.8. DSC del [(OEG-co-DEG)_3200]-b-d(isoAZO/C18)



6.9. Espectro de ^1H -NMR del (OEG-co-DEG)_12000 fotopolimerizado en agua

