



Departamento de
Química Orgánica
Universidad Zaragoza



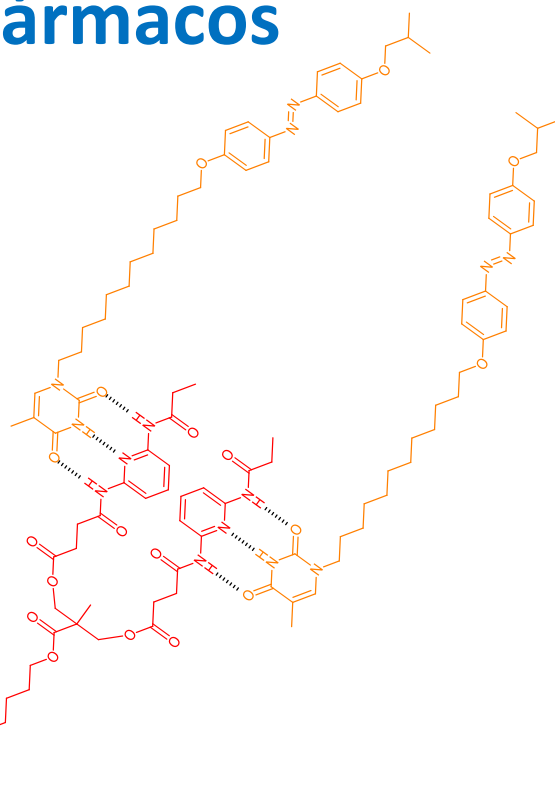
Nuevas arquitecturas de copolímeros bloque supramoleculares para la liberación controlada de fármacos

Trabajo Fin de Grado (TFG)
GRADO EN QUÍMICA

Grupo Cristales Líquidos y Polímeros
Dpto. Química Orgánica
Universidad de Zaragoza
Curso 2015/2016

Alejandro Martínez Bueno

Directores: Dr. Luis T. Oriol Langa
Dra. Milagros Piñol Lacambra



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Universidad
Zaragoza

RESUMEN: “NUEVAS ARQUITECTURAS DE COPOLÍMEROS BLOQUE SUPRAMOLECULARES PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS”.

Los copolímeros bloque (BCs) anfífilos son capaces de auto-organizarse formando estructuras nanoscópicas en fase condensada o en agua. En este caso si forman micelas o vesículas, podemos utilizar dichos materiales para la encapsulación de moléculas de interés. Si los BCs responden a estímulos externos es posible lograr que las moléculas encapsuladas en el interior de las nanopartículas (micelas esféricas) o nanocápsulas (vesículas) poliméricas sean liberadas de manera controlada.

La introducción de dichas unidades que respondan a estímulo suele hacerse mediante química covalente, si bien es posible esta funcionalización por reconocimiento molecular mediante interacciones no covalentes. De manera que el objetivo principal de este trabajo ha sido la *síntesis y caracterización de un polímero de tipo dendrítico-lineal de primera generación derivado del ácido 2,2-bis(hidroximetil)propionico con unidades de 2,6-diacildiaminipiridina en la periferia del dendrón que sean capaces de unirse mediante enlaces de hidrógeno a unidades fotosensibles que incluyan anillos de timina*. Este trabajo se planteó como base para trabajos posteriores con dendrones de generaciones superiores.

Se han desarrollado diferentes rutas sintéticas para la introducción de unidades de 2,6-diacilaminopiridina en un bloque hidrófilo derivado del ácido 2,2-bis(hidroximetil)propionico. Posteriormente se optimizó la reacción de acoplamiento de este bloque hidrófobo a un bloque hidrófilo de naturaleza polimérica mediante una reacción de cicloadición 1,3-dipolar azida-alquino catalizada por Cu(I), reacción tipo “click” que permite obtener eficientemente la macromolécula perseguida, como modelo de primera generación de copolímeros bloque dendrítico-lineal que pueden funcionalizarse por reconocimiento molecular vía enlaces de hidrógeno. También se ha comprobado la capacidad de acoplamiento de las unidades de 2,6-diacilaminopiridina, mediante tres enlaces de hidrógeno, a unidades derivadas de timina, obteniendo los copolímeros bloque supramoleculares deseados. Por último se estudió la capacidad de formar agregados en agua de estos copolímeros, si bien los copolímeros supramoleculares no formaron dispersiones estables.

ABSTRACT: “NEW ARCHITECTURES FOR SUPRAMOLECULAR BLOCK COPOLYMERS CONTROLLED DRUG DELIVERY”.

Amphiphilic block copolymers (BCs) are able to self-assemble into nanometric structures either in bulk or water. In the last case, they give rise to micelles or vesicles that can be used for the encapsulation of molecules of interest. If BCs respond to external stimuli, it is possible to trigger the release of molecules encapsulated inside the polymeric nanoparticles (spherical micelles) or nanocapsules (vesicles) in a controlled manner.

The way to introduce stimuli-responsive units into polymers has traditionally achieved by employing covalent chemistry also functionalization can be also achieved by molecular recognition using non-covalent interactions. In this way, the main objective of this project was the synthesis and characterization of a first-generation dendritic-linear polymer derived from 2,2-bis(hydroxymethyl)propionic acid with 2,6-diacylaminipyridine units attached on the dendron periphery. These units are able to bind to photosensitive units that include thymine rings by hydrogen bonding. This project was also presented as reference for later studies in which it is intended to synthesize higher generation dendrons.

Different synthetic routes have been developed for the introduction of 2,6-diacylaminipyridine units in a hydrophilic block derived from 2,2-bis(hydroxymethyl)propionic acid. Afterwards the coupling reaction between both hydrophilic and hydrophobic blocks was optimized by 1,3-dipolar cycloaddition between alkynes and azides, which was catalyzed by Cu (I). This reaction, also known as "click" reaction, allowed obtaining efficiently the aimed macromolecule. In this way, a model of dendritic-linear block copolymers that can be functionalized by molecular recognition through hydrogen bonding. It was also proved coupling ability between 2,6-diacylaminipyridine units and thymine units by triple hydrogen bonding to obtain supramolecular block copolymers. Finally the ability to form aggregates in water of these copolymers was studied also stable dispersions were not obtained.

ABREVIATURAS

Bis-MPA	Ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico
DAP	2,6-Diacilaminopiridina
DCC	<i>N,N'</i>-Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DMF	<i>N,N</i>-Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DPTS	p-Toluensulfonato de dimetilaminopiridinio
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DTGA	Derivada (primera) del análisis termogravimétrico
FTIR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
GPC	Cromatografía de permeación en gel
MALDI-TOF	Ionización láser asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo
MOP	Microscopía óptica con luz polarizada
PEG	Poli(etilenglicol)
PMDTA	<i>N,N,N',N'',N''</i>-pentametildietilentriamina
PMMA	Poli(metacrilato de metilo)
R_f	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
R_{to}	Rendimiento
T_c	Temperatura de cristalización
T_g	Temperatura de transición vítrea

TGA	Análisis termogravimétrico
THF	Tetrahidrofurano
Tm	Temperatura de fusión
UV-vis	Ultravioleta-visible

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Polímeros. Copolímeros bloque.....	1
1.2 Copolímeros bloque dendrítico-lineales.....	2
1.3 Polímeros supramoleculares	5
1.4 Antecedentes del trabajo fin de grado	6
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO	7
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
3.1 Preparación y caracterización de la azida con unidades de 2,6-diacilaminopiridina.....	8
3.2 Preparación y caracterización del polímero con unidades 2,6-diacilaminopiridina	12
3.3 Preparación y caracterización de los copolímeros bloque supramoleculares	15
3.4 Caracterización térmica.....	17
3.5 Preparación de autoensamblados en agua	18
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	19
4.1 Síntesis y caracterización la azida con unidades 2,6-diacilaminopiridina	19
4.2 Síntesis y caracterización del polímero con unidades 2,6-diacilaminopiridina.....	23
4.3 Síntesis y caracterización de los copolímeros bloque supramoleculares	23
4.4 Formación de autoensamblados en agua	24
5. CONCLUSIONES	25
 ANEXOS	
A. Espectros (FTIR, ¹ H-RMN).....	A-1
B. Estudio de enlaces de hidrógeno a temperatura variable.....	A-15
C. Termogravimetría (TGA, DTGA)	A-17
D. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	A-19
E. Espectrometría de masas.....	A-21
F. Técnicas e instrumentos	A-23

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Polímeros. Copolímeros bloque

Los polímeros son macromoléculas cuya estructura química está formada por unidades menores que se repiten a lo largo de una cadena (Figura 1.1). Los polímeros se obtienen mediante la reacción de moléculas más sencillas, denominadas monómeros. Esta reacción se denomina polimerización.

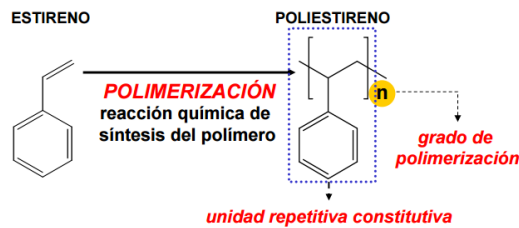


Fig 1.1. Ejemplo de un monómero y del polímero resultante de su polimerización

Los polímeros pueden clasificarse como homopolímeros o copolímeros en función del número de unidades diferentes que se repiten en su estructura. Generalmente se consideran como homopolímeros aquellos polímeros cuya cadena está constituida por una única unidad repetitiva, y como copolímeros aquellos cuya cadena está constituida por dos o más tipos de unidades repetitivas (véase Figura 1.2).

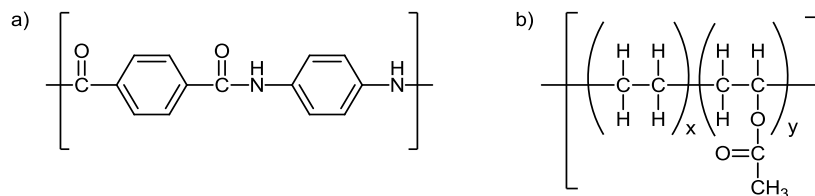


Fig 1.2. Estructura de a) un homopolímero (Kevlar®) y b) un copolímero (EVA)

Existen diferentes tipos de copolímeros, que se diferencian en función de cómo están distribuidas las unidades repetitivas en la cadena como por ejemplo: copolímeros estadísticos, alternantes, bloque y de injerto representados en la Figura 1.3.

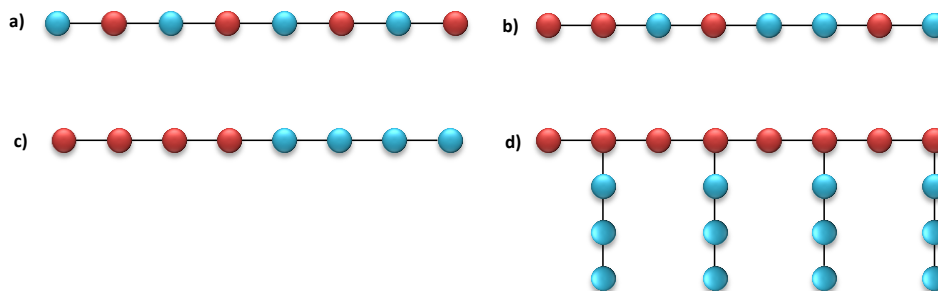


Fig 1.3. Esquema de diferentes tipos de copolímeros: a) alternante, b) estadístico, c) bloque, d) de injerto

Los copolímeros bloque tienen diversas aplicaciones impulsadas recientemente por el auge de la nanociencia y consisten en la unión covalente de dos o más homopolímeros diferentes en la misma cadena. En los copolímeros bloque se suele observar una separación de fases, ya sea en fase condensada o en el seno de un disolvente selectivo, como consecuencia de la diferente naturaleza y afinidad química de los bloques constituyentes. Debido a la conexión química que presentan, los segmentos poliméricos tienden a auto-organizarse en dominios nanoscópicos. En el caso de un copolímero bloque anfífilo disperso en agua, los segmentos hidrófobos tienden a interactuar entre sí para minimizar el contacto con las moléculas de agua, proceso desfavorecido desde el punto de vista entálpico, mientras que los segmentos hidrófilos quedan solvatados por moléculas de agua, formándose distintos tipos de agregados. La morfología y tamaño del agregado formado, depende entre otros factores, de la relación hidrófobo/hidrófilo en el copolímero. Algunos de estos posibles agregados se muestran en la Figura 1.4.

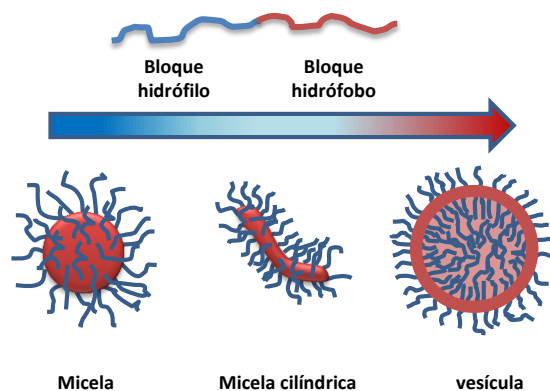


Fig 1.4. Morfologías encontradas para copolímeros bloque anfífilos en medio acuoso (de izquierda a derecha aumenta el carácter hidrófobo del polímero)

Las micelas esféricas presentan una envoltura hidrófila que proporciona solubilidad en agua a un núcleo hidrófobo dando lugar a un sistema que puede encapsular en su interior moléculas hidrofóbicas. Las vesículas están formadas por una membrana hidrófoba cuyo interior y exterior están delimitados por una capa hidrófila, proporcionando en este caso un sistema que puede encapsular moléculas tanto hidrófilas, en el interior de la vesícula, como hidrófobas, en el interior de la membrana.

1.2. Copolímeros bloque dendrítico-lineales

El término “dendrímero” fue propuesto a principios de 1980 por Tomalia¹ derivado del término griego *dendra* que significa árbol. Los polímeros dendríticos son macromoléculas con un elevado grado de ramificación, cuyo tamaño y forma pueden controlarse de manera precisa en el proceso de síntesis. Las características geométricas de estos polímeros dependen principalmente de la direccionalidad del núcleo inicial de crecimiento y del número y longitud de las ramificaciones. Dependiendo de la distribución de la masa molecular, los polímeros dendríticos pueden ser

¹ D.A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, *Polym. J.* **1985**, 17, 117-132

clasificados como monodispersos, en caso de que dicha distribución sea homogénea, o como polidispersos si la distribución es heterogénea (Figura 1.5).²

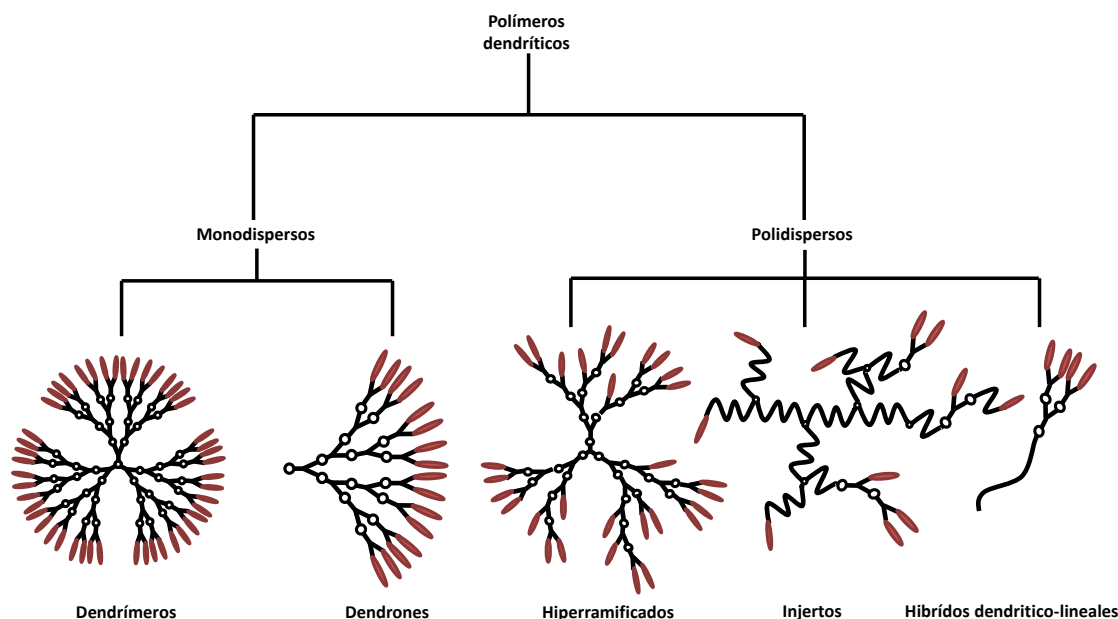


Fig 1.5. Estructuras de los polímeros dendríticos monodispersos y polidispersos

La combinación en un copolímero bloque de un polímero lineal y otro dendrítico abre nuevas posibilidades en el diseño de materiales poliméricos. En estos polímeros la periferia del dendrón se utiliza para incorporar diferentes unidades químicas y conseguir propiedades como la capacidad de responder a diferentes estímulos externos, entre los que destacan la luz, el pH o la temperatura.

Existen varias estrategias para la preparación de los copolímeros bloque dendrítico-lineales (Figura 1.6). Puede sintetizarse un dendrón que sirva como punto de crecimiento del polímero lineal, o bien al revés, hacer crecer un polímero lineal que sirva como punto focal para el crecimiento posterior del dendrón. Sin embargo, la estrategia más sencilla es construir ambas partes por separado y unir las después mediante una reacción de acoplamiento.³ Para ello, ambos bloques han de ser sintetizados de tal manera que contengan grupos funcionales complementarios que reaccionen entre sí. 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.

Para la unión de ambos bloques es conveniente usar reacciones con condiciones sencillas, en las que no sea necesario purificar posteriormente por métodos cromatográficos, que transcurran con altos rendimientos y con una buena regio- y estereoselectividad (aunque no necesariamente enantioselectividad).⁴ El conjunto de reacciones que reúnen todas estas características se denominan reacciones de tipo *click*. Dentro de estas reacciones, la cicloadición entre alquinos y azidas ha sido la que más importancia ha adquirido los últimos años en la ciencia de materiales, siendo también una herramienta sintética muy adecuada para el acoplamiento de bloques de un copolímero.

² F. Vögtle, G. Richardt, N. Werner, *Dendrimer Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2009**

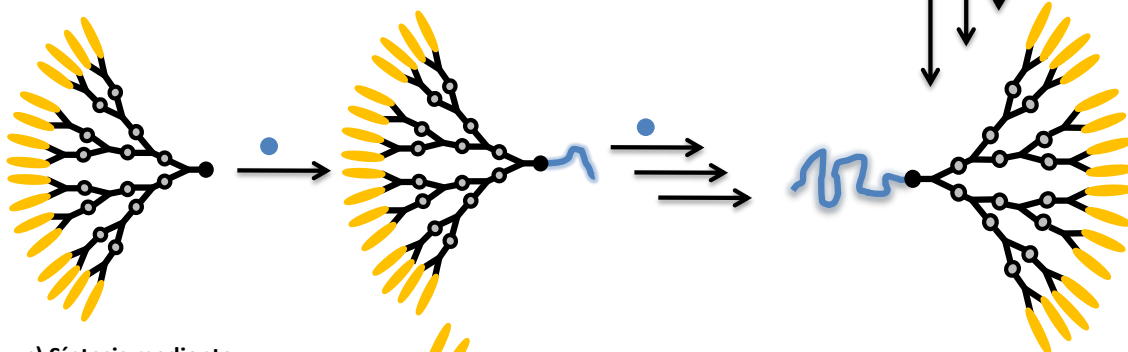
³ E. Blasco, M. Piñol, L. Oriol, *Macromol. Rapid Commun.* **2014**, 35, 1090-1115

⁴ H. C. Kolb, M. G. Finn, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004-2021

a) Síntesis a partir de una cadena lineal



b) Síntesis a partir de un dendrón



c) Síntesis mediante acoplamiento de dos bloques

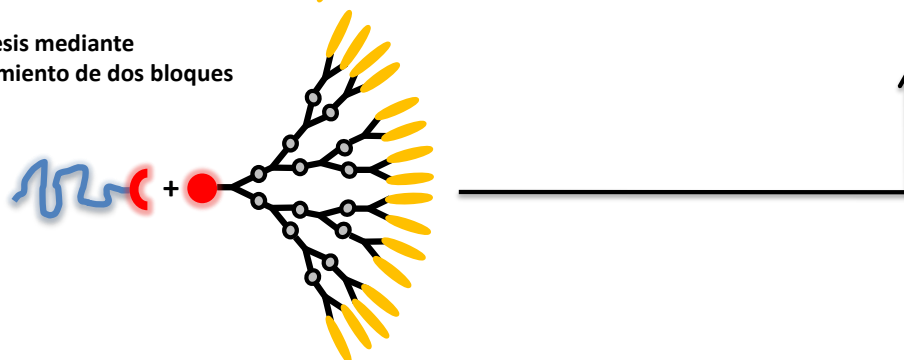


Fig 1.6. Estrategias para la síntesis de copolímeros bloque dendrítico lineales
(Adaptado referencia 3)

Como se ha mencionado anteriormente, los copolímeros bloque dendrítico-lineales pueden ser funcionalizados en la periferia del dendrón, haciéndolos capaces de dar respuesta a estímulos mediante cambios estructurales en las moléculas. Esto, unido a la capacidad de formar agregados en agua de los copolímeros bloque anfífilos, hace que puedan ser usados como nanotransportadores de fármacos de liberación controlada mediante estímulos.

Un estímulo especialmente interesante es la luz, ya que puede ser inducido de forma muy precisa y controlada espacial y temporalmente. Esta respuesta a la luz está asociada generalmente a la presencia de grupos funcionales que son modificados al ser irradiados con luz de una determinada longitud de onda. Uno de los compuestos más usado y estudiado con estas propiedades son los derivados de azobenceno.

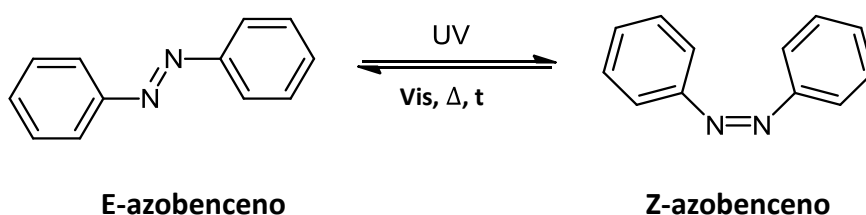


Fig 1.7. Isomerización del azobenceno

La irradiación en la región UV produce una isomerización reversible del isómero *E-azobenceno* al isómero *Z-azobenceno*, cambiando la geometría de la molécula y aumentando su polaridad y, por tanto, su hidrofilia. Este proceso puede revertirse irradiando con luz en la región del visible, calentando, o simplemente dejándolo en oscuridad (Figura 1.7).

1.3. Polímeros supramoleculares

La Química Supramolecular tiene como objetivo la preparación de sistemas moleculares bien definidos (tanto en estructura como en propiedades) utilizando enlaces no covalentes. Aunque la mayoría de los polímeros que se conocen son covalentes, se pueden aplicar los principios de la Química Supramolecular a la síntesis de macromoléculas, generando de esta manera polímeros supramoleculares. Existe una gran variedad de interacciones no covalentes que se pueden emplear para el reconocimiento molecular que da lugar a la entidad supramolecular: el enlace de hidrógeno, la coordinación con metales, la interacción electrostática, etc.

Los polímeros supramoleculares (dejando a un lado los polímeros entrecruzados) suelen dividirse en dos grandes grupos, los de cadena principal y los de cadena lateral (Figura 1.8). Los polímeros supramoleculares de cadena principal son sistemas poliméricos que se mantienen unidos mediante interacciones no covalentes dentro de la misma cadena principal del polímero. Por otro lado, los polímeros supramoleculares de cadena lateral se basan en una cadena polimérica covalente que en su cadena lateral contiene unidades sobre las que se pueden unir por enlaces no covalentes (reconocimiento molecular) diferentes moléculas dando lugar a un nuevo polímero.

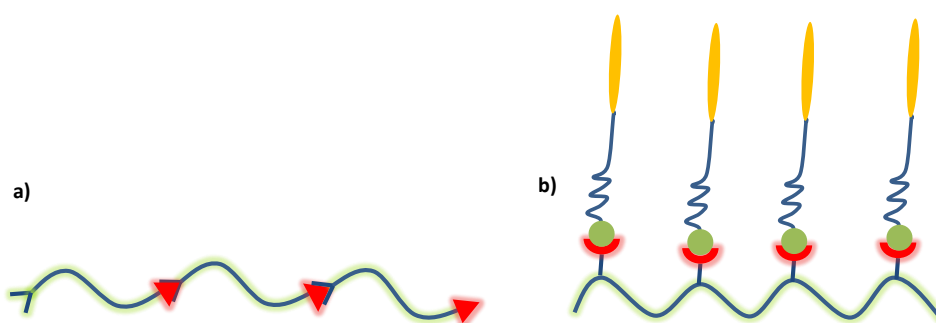


Fig 1.8. Representación esquemática de polímero supramolecular de cadena principal (a) y de cadena lateral (b)

El autoensamblaje permite modificar fácilmente la estructura del polímero, proporcionando una gran variedad de polímeros funcionalizados en periodos muy cortos de tiempo. Además, la naturaleza dinámica de los enlaces supramoleculares permite el control de la formación de los complejos intermoleculares a través de factores externos tales como la polaridad del disolvente y la temperatura. Este tipo de síntesis por tanto, presenta claras ventajas frente a la síntesis covalente tradicional, la cual suele resultar laboriosa cuando se trabaja con macromoléculas.

Este concepto no solamente es aplicable a polímeros lineales, sino que también es extrapolable a copolímeros dendrítico-lineales, los cuales también los podemos funcionalizar mediante autoensamblado dando lugar a nuevas arquitecturas poliméricas sensibles a estímulos externos.

1.4. Antecedentes del trabajo fin de grado

Este trabajo fin de grado surge del trabajo de tesis de J. del Barrio y E. Blasco y del trabajo fin de máster de A. Concellón, llevados a cabo en el departamento de Química Orgánica, en concreto en el grupo de investigación de Cristales Líquidos y Polímeros de la Universidad de Zaragoza.

Tanto J. del Barrio como E. Blasco sintetizaron copolímeros bloque anfífilos dendrítico-lineales con poli(etilenglicol) (PEG) y un dendrón de ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico (bis-MPA) con unidades de azobenceno enlazadas covalentemente en la periferia (Figura 1.9).

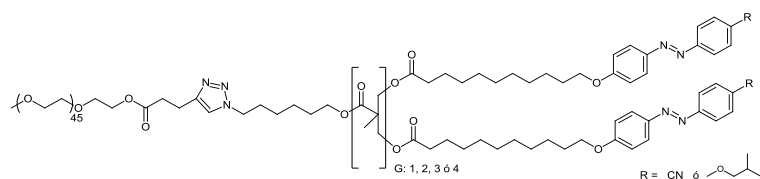


Fig 1.9. Copolímero bloque dendrítico-lineal formado por una unidad de PEG y distintas generaciones de azodendrón

Todos los copolímeros preparados agregaban en agua y en concreto con la cuarta generación del azodendrón (16 unidades azobenceno terminales) se forman en agua agregados de tipo vesícula (Figura 1.10). Los estudios realizados han demostrado la encapsulación de sondas fluorescentes y su posterior liberación con luz. Además, las vesículas preparadas con el copolímero que contiene unidades de 4-isobutiloxiazobenceno responden más rápidamente al estímulo lumínico que cuando se usan unidades 4-cianoazobenceno.

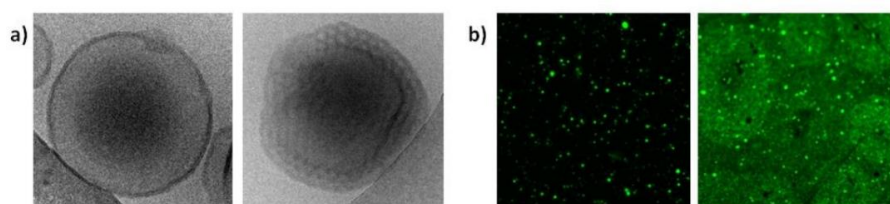


Fig 1.10. a) Cryo-TEM de vesículas antes (izquierda) y después (derecha) de irradiación con UV. **b)** Microscopía de fluorescencia de vesículas cargadas con Rodamina B en su interior antes (izquierda) y después (derecha) de irradiación UV en la que se observa la liberación de la sonda hidrófila fluorescente.⁵

Por otro lado, A. Concellón llevo a cabo la síntesis de copolímeros bloque lineal-lineal con PEG y un polimetacrilato de 2,6-diacilaminopiridina (DAP) en el que se introdujeron las unidades azobenceno mediante tres enlaces de hidrógeno usando como base complementaria timina (Figura 1.11). En este caso también se consiguió la formación en agua de micelas y vesículas, y se demostró la encapsulación de sondas fluorescentes con su posterior liberación tras ser irradiadas con luz.

⁵ E. Blasco, J. del Barrio, C. Sánchez-Somolinos, M. Piñol, L. Oriol, *Polym. Chem.* **2013**, 4, 2246-2254

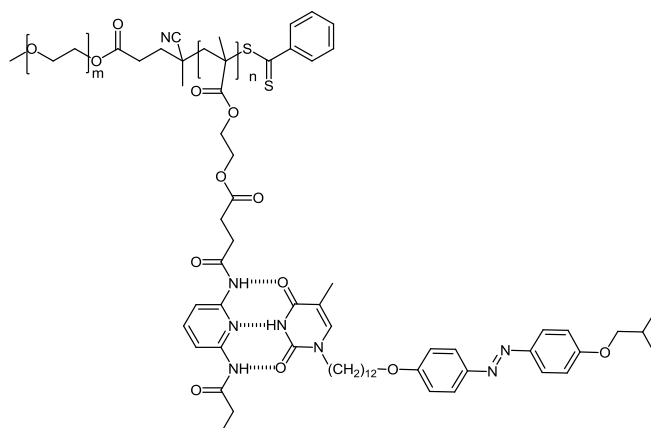


Fig 1.11. Copolímero bloque lineal-lineal unido a grupos azobenceno por puentes de hidrógeno

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

El objetivo de este trabajo es explorar la preparación de nuevos copolímeros bloque anfífilos de tipo dendrítico-lineal modificados en la periferia del dendrón para poder incorporar mediante enlaces de hidrógeno diferentes moléculas y en particular moléculas sensibles a la luz.

El trabajo se centra en la preparación de un polímero formado por un segmento de poli(etilenglicol) (PEG) unido a un derivado del ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico (bis-MPA) con unidades de 2,6-diacilaminopiridina y la posterior formación de los correspondientes polímeros supramoleculares con derivados de timina (Figura 2.1). El planteamiento sintético del copolímero se basa en el acoplamiento de los bloques de PEG con un triple enlace terminal y un bloque derivado de bis-MPA con una azida, incorporada a través del grupo ácido (véase Figura 2.2). El acoplamiento se hará mediante una cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos catalizada por Cu(I).

La preparación, caracterización y estudio de estos compuestos servirá de referencia para abordar en otros trabajos del departamento de Química Orgánica para la preparación de los correspondientes copolímeros dendrítico-lineales con generaciones del dendrón superiores a la aquí preparada.

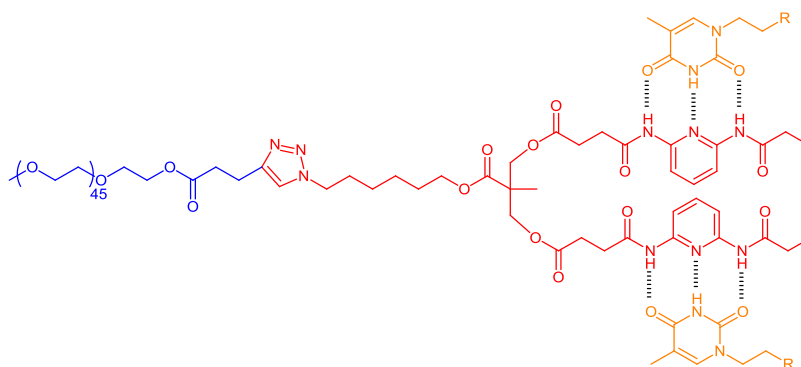


Fig 2.1. Estructura del polímero *supramolecular* objetivo de este trabajo

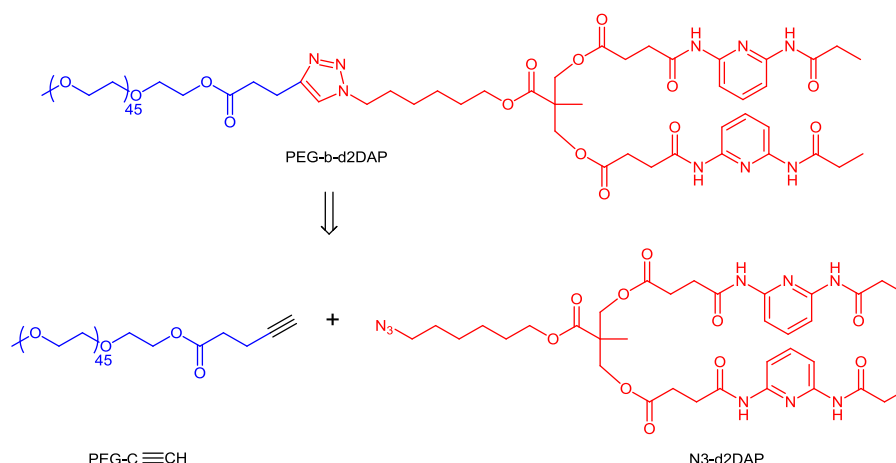


Fig 2.2. Estrategia seguida para la preparación del polímero objetivo de este trabajo

De acuerdo a esto, el planteamiento y las tareas específicas programadas para este TFG han sido las siguientes:

- Síntesis del dendrón de primera generación con dos unidades de 2,6-diacilaminopiridina.
- Síntesis del polímero por acoplamiento del dendrón y el bloque lineal de poli(etilenglicol).
- Preparación de copolímeros supramoleculares con derivados de timina.
- Preparación de autoensamblados en agua.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Preparación y caracterización de la azida con unidades de 2,6-diacilaminopiridina

La síntesis del dendrón de primera generación tiene como punto de partida la molécula de ácido bis-MPA, utilizando el grupo carboxilo para incorporar el grupo funcional azida y los dos grupos hidroxilo para incorporar las unidades 2,6-diacilaminopiridina.

En primer lugar se prepara un derivado del ácido bis-MPA que contiene un grupo azida (2) por esterificación de dicho ácido que tiene los grupos hidroxilo protegidos en forma de acetal (1) según se muestra en la Figura 3.1. Esta primera etapa fue llevada a cabo por dos rutas sintéticas diferentes, en la primera se esterifica directamente con 6-azidohexan-1-ol, según un procedimiento previamente descrito⁶, y en la segunda se esterifica, mediante el mismo procedimiento, con 6-bromohexan-1-ol dando un intermedio bromado (3). Posteriormente se sustituye el bromo, mediante una reacción de sustitución nucleófila biomolecular, por el grupo funcional azida. Usando esta segunda alternativa los rendimientos obtenidos son similares, pero se evita la preparación previa del compuesto 6-azidohexan-1-ol reduciendo el riesgo asociado a la manipulación de azidas con una relación nitrógeno/carbono alta, peligrosas por posibles explosiones (si bien en la 6-azidohexan-1-ol este riesgo no es elevado). En cualquiera de los dos casos, la última reacción implica la desprotección de los grupos hidroxilo usando una resina de intercambio iónico ácida y obteniéndose el compuesto buscado (4).

⁶ J. del Barrio, *Tesis Doctoral*, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, Marzo 2010.

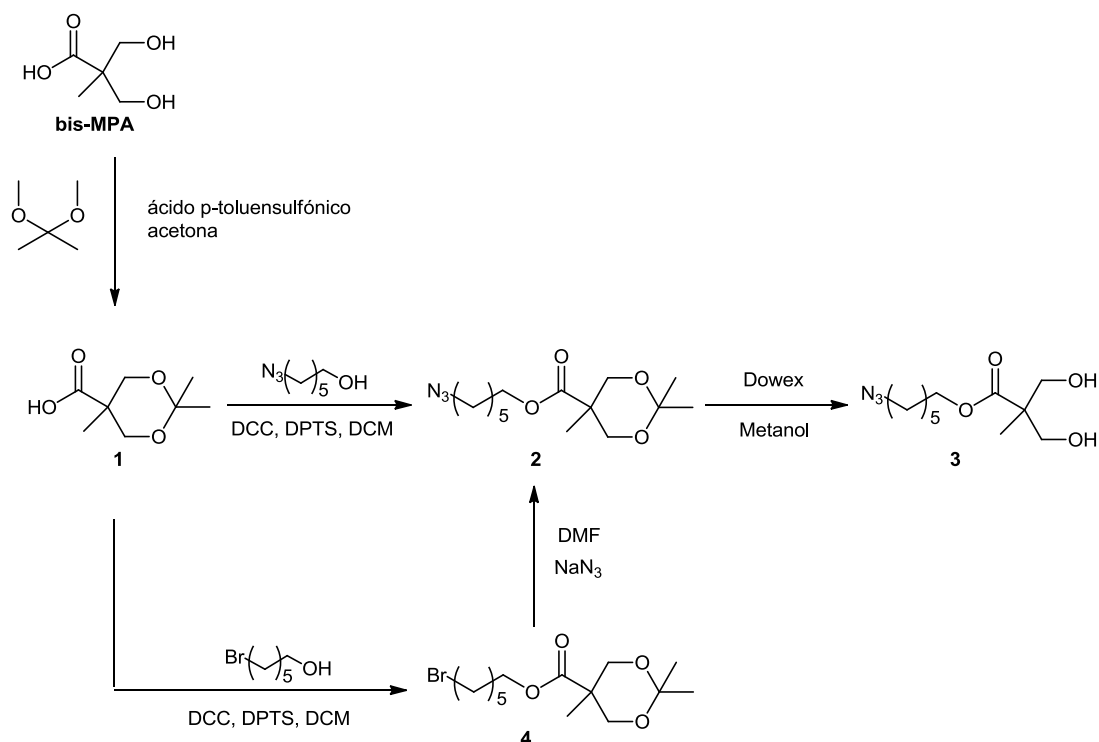


Fig 3.1. Síntesis de la azida derivada de bis-MPA

Por otro lado es necesario modificar la 2,6-diaminopiridina con un ácido carboxílico que permita incorporarla en el derivado de bis-MPA (mediante una reacción de esterificación de los hidroxilos libres); para ello se plantea usar como conector ácido succínico (Figura 3.2). En primer lugar se hace reaccionar la 2,6-diaminopiridina con cloruro de acetilo para obtener el intermedio (5), que con anhídrido succínico y DMAP como catalizador permite obtener el compuesto buscado (6). Ambos compuestos fueron sintetizados por procedimientos descritos anteriormente.^{7,8}

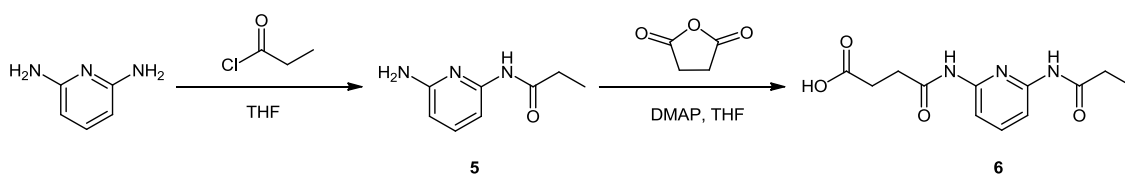


Fig 3.2. Síntesis de la 2,6-diaminopiridina modificada

Finalmente, se intentó la esterificación del ácido derivado de la 2,6-diaminopiridina (6) con la azida derivada del bis-MPA (3) según se muestra en la Figura 3.3. Esta reacción fue llevada a cabo en tres condiciones de reacción diferentes. En primer lugar se utilizó EDC y DMAP como catalizador, aislando el producto monosustituido (N3-d1DAP) en (Figura 3.4) con rendimientos inferiores al 5%.

⁷ A. Concellón, *Trabajo Fin de Máster*, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, Junio **2013**

⁸ V. Nandwana, B. Fitzpatrick, Q. Liu, K. Solntsev, X. Yu, G. Tonga, S. Eymur, M. Tonga, G. Cooke, V. Rotello, *Polym. Chem.* **2012**, 3, 3072-3076

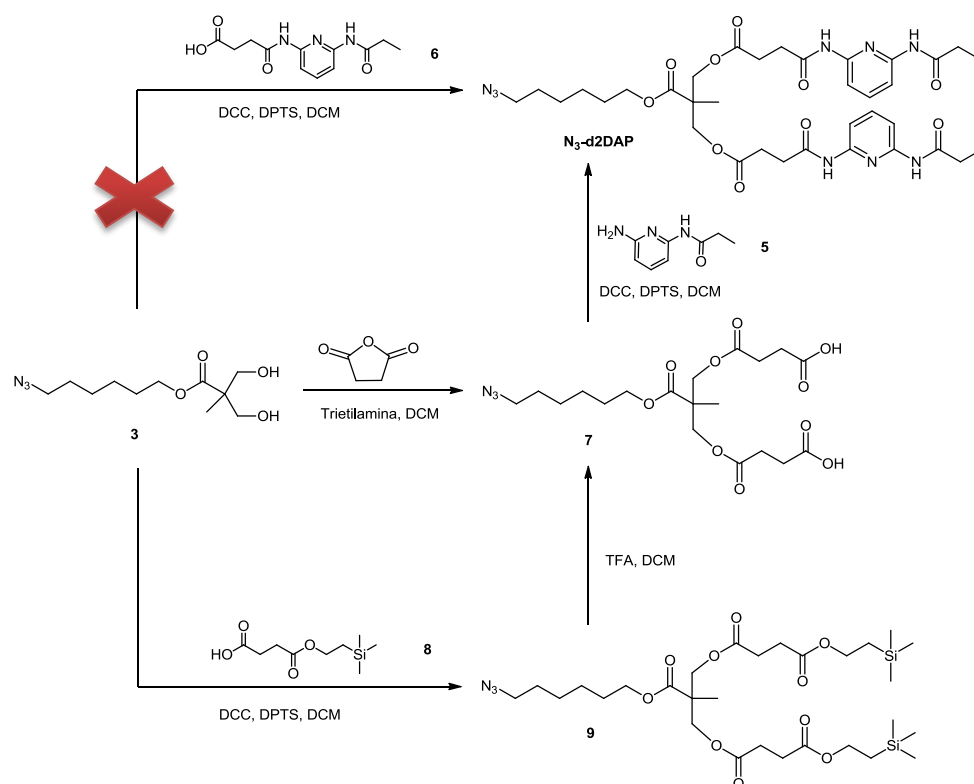


Fig 3.3. Síntesis del dendrón de primera generación N_3 -dDAP

La reacción de esterificación también se intentó con DCC y DPTS como catalizador, tanto a temperatura ambiente como a 40°C, sin llegar a conseguir el compuesto buscado N_3 -d2DAP. En estos casos, el compuesto que se formaba mayoritariamente, con rendimientos del 33%, era la succinimida correspondiente a la reacción intramolecular entre el grupo ácido y amida del derivado de la 2,6-diaminopiridina (Figura 3.4) que se identificó por espectroscopia de ^1H -RMN (Figura 3.5a, se incluye como referencia ^1H -RMN del otro reactivo utilizado, 3) y espectrometría de masas (vesase Figura 3 del *Apartado E en Anexos*). En el espectro de masas aparece el pico del ion molecular ($m/z = 248$) correspondiente a la masa del ácido derivado de la diaminopiridina (6) menos 18 unidades de masa, correspondiente a la pérdida de agua en la formación del anillo succinimida.

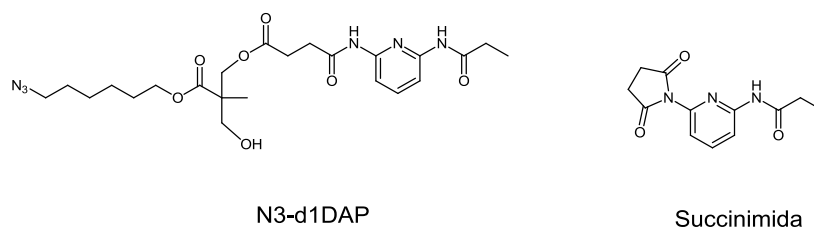


Fig 3.4. Productos no deseados obtenidos en la reacción de esterificación del ácido derivado de la 2,6-diaminopiridina (6) y la azida derivada del bis-MPA (3)

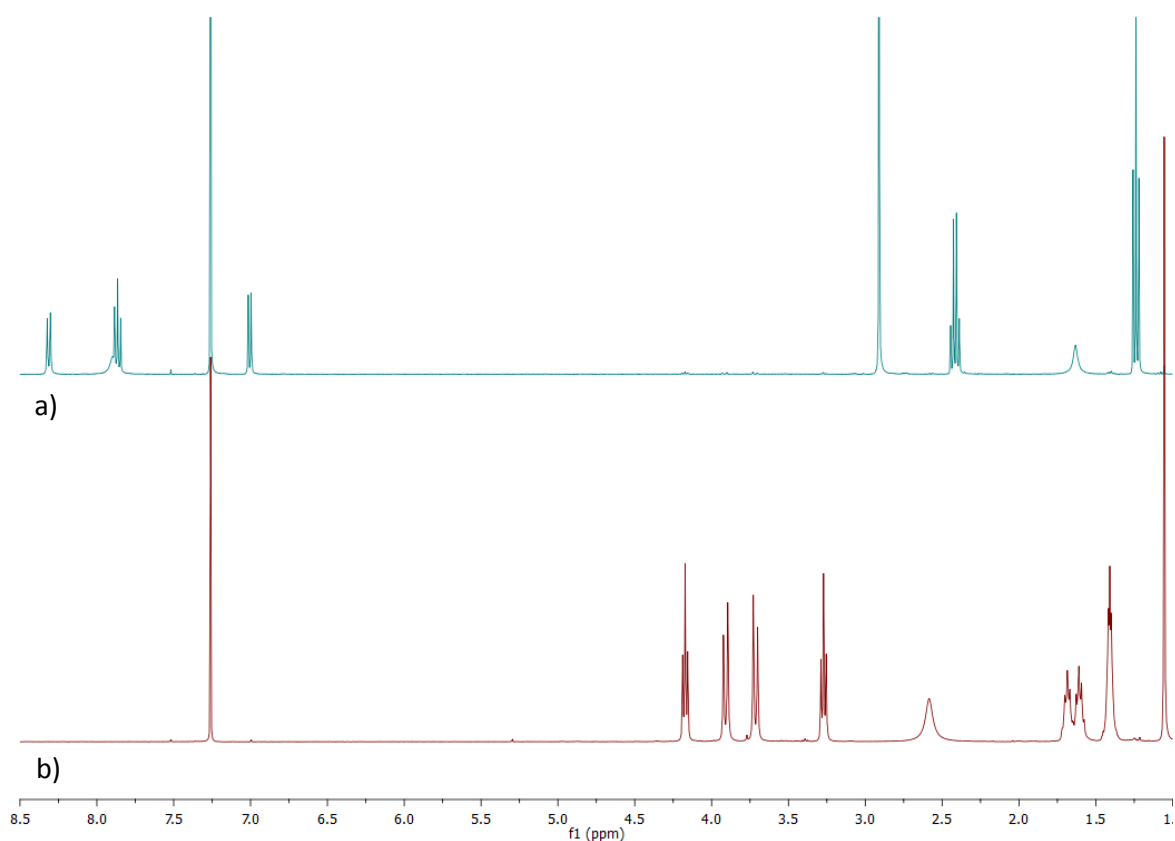


Fig 3.5. ^1H -RMN de a) succinimida, b) 2,2-bis(hidroximetil) propanoato de 6-azidohexilo

La estrategia descrita, basada en una síntesis convergente, sería la más adecuada para dendrones de generaciones superiores con un número de grupos funcionales terminales creciendo de forma exponencial ($n=2^G$) ya que se basa en una única reacción sobre los grupos periféricos. Sin embargo, dadas las dificultades encontradas, se planteó una alternativa lineal que implica una serie de reacciones sucesivas sobre la azida (3).

En primer lugar se hace reaccionar la azida del bis-MPA (3) con anhídrido succínico para obtener el diácido derivado (7), según el procedimiento similar descrito,⁹ que posteriormente reacciona con 2-propanoilamino-6-aminopiridina (5), obteniéndose de esta forma el compuesto deseado N_3 -d2DAP. La reacción entre el bis-MPA y el anhídrido succínico es directa, sin embargo pensando en la extrapolación de esta reacción a dendrones de generaciones superiores, un número elevado de grupos ácido carboxílico en la periferia puede complicar la purificación de los intermedios. Por este motivo se exploró una segunda alternativa en la que el anhídrido succínico se hace reaccionar con 2-(trimetilsilil)etanol, mediante un procedimiento ya descrito,¹⁰ obteniéndose el ácido succínico protegido (8). Este compuesto se esterifica posteriormente con el compuesto derivado del bis-MPA (3), obteniendo el diácido correspondiente protegido (9). En este caso, es necesaria la desprotección

⁹ (4) S. Olivier, L. Derue, B. Geffroy, T. Maindron, E. Ishow, *J. Mater. Chem.*, **2015**, 3, 8403-8412

¹⁰ G. T. Anderson, M. D. Alexander, S.D. Taylor, D. B. Smithrud, S. J. Benkovic, S. M. Weinreb, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 125-132

del compuesto (9) con ácido trifluoroacético.¹¹ A pesar de ser una alternativa sintética con más etapas, la purificación del intermedio protegido es mucho más sencilla y la reacción de desprotección transcurre de forma cuantitativa, no siendo necesaria una purificación posterior. Esta secuencia sintética sería más adecuada para generaciones superiores ya que evita la purificación de los compuestos con grupos carboxilo en la periferia.

3.2. Preparación y caracterización del polímero con unidades 2,6-diacilaminopiridina.

El copolímero final se obtiene por una cicloadición 1,3-dipolar azida-alquino catalizada por Cu(I) a partir de la azida N₃-d2DAP (bloque dendrítico de generación 1) y polietilenglicol (bloque lineal) con un grupo alquino terminal (PEG-C≡CH) (Figura 3.6). El polietilenglicol usado tiene una masa molar 1941 g/mol, correspondiente a un grado de polimerización 45 y se obtiene usando PEG comercial, con un grupo hidroxilo en uno de los extremos, que se hace reaccionar con ácido 4-pentinoico. Este polímero estaba disponible en el grupo de investigación, por lo que no fue necesaria su preparación.

La reacción de acoplamiento se llevó a cabo, según un procedimiento previamente descrito,¹² en DMF a 60°C durante 3 días, utilizando CuBr y PMDTA como agente quelante, ambos en un 10% en moles respecto a la azida. La reacción se hizo con un exceso de alquino frente a la azida, aproximadamente 20% molar, para favorecer al máximo el acoplamiento. De acuerdo a la experiencia previa con copolímeros análogos de generación 1, la precipitación en metanol permite eliminar fácilmente el exceso de polietilenglicol, pero el copolímero PEG-b-d2DAP es soluble en metanol también de manera que hubo que precipitarlo en éter dietílico.

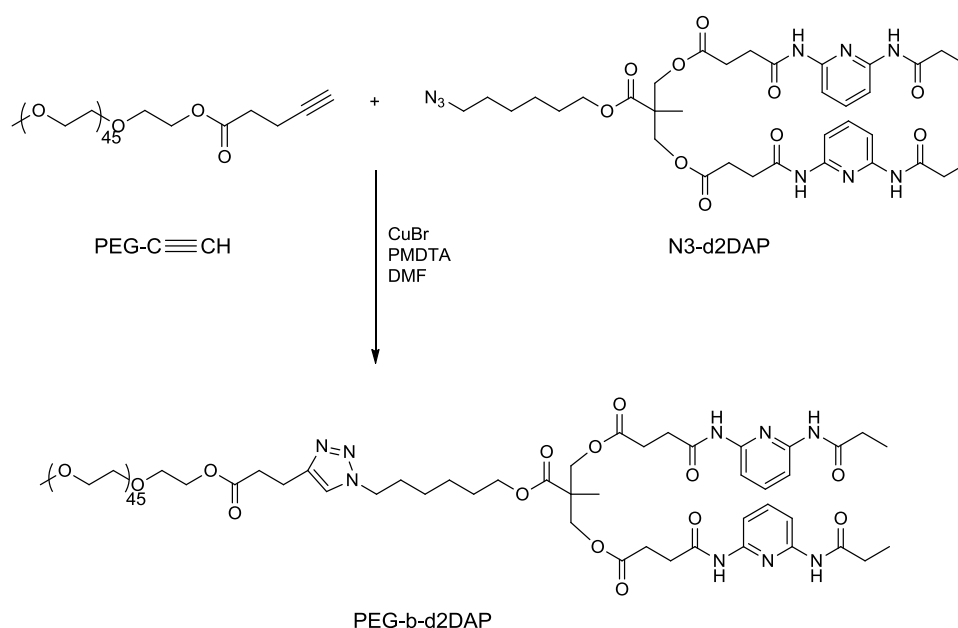


Fig 3.6. Reacción de acoplamiento y obtención del polímero final PEG-b-d2DAP

¹¹ J. Luczkowiak, S. Sattin, I. Sutkeviciute, J.J. Reina, M. Sanchez-Navarro, M. Thepaut, L. Martinez-Prats, A. Daggetti, F. Fieschi, R. Delgado, A. Bernardi, J. Rojo, *Bioconjugate Chem.* **2011**, 22, 1354-1365

¹² C. Huang, P. Wu, W. Su, C. Zhu, S. Kuo, *Polym. Chem.* 2016, 7, 795-806

La desaparición de la azida, como consecuencia del acoplamiento, se comprobó por RMN de ^1H (Figura 3.7a) donde se observa la desaparición de protones en la posición α del grupo azida, a 3.3 ppm. Sin embargo, en el producto final se detectó la presencia de $\text{PEG-C}\equiv\text{CH}$ (Figura 3.7b) sin reaccionar. Tras varios intentos de purificación por reprecipitación, en el espectro de RMN de ^1H seguía observándose una señal a 1.92 ppm correspondiente al protón alquínilico (Figura 3.7c). Para resolver este problema se sintetizó resina Merrifield funcionalizada con azida, de manera que una vez terminada la reacción, se añadió esta resina al crudo de reacción para eliminar el exceso de alquino presente.

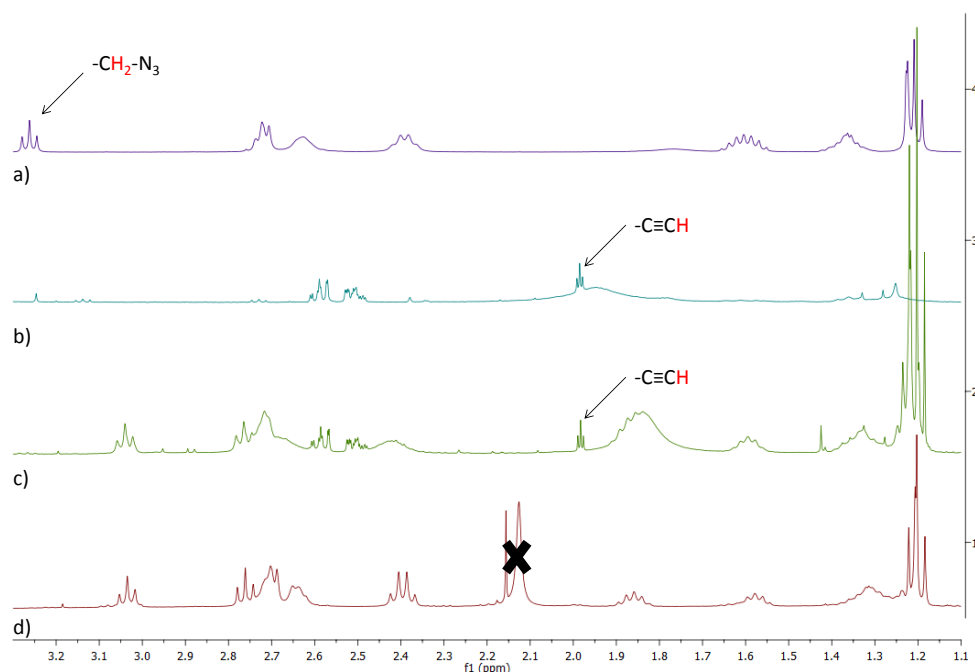


Fig 3.7. Espectros de ^1H -RMN: a) N_3 -d2DAP, b) $\text{PEG-C}\equiv\text{CH}$ c) PEG-b-d2DAP con presencia de $\text{PEG-C}\equiv\text{CH}$ que no ha reaccionado y d) PEG-b-d2DAP sin presencia de $\text{PEG-C}\equiv\text{CH}$

Una vez se vio por ^1H -RMN que la señal correspondiente al protón alquínilico había desaparecido, se corroboró también por FIRT la formación de producto, observándose que las señales correspondientes a la azida a 2094 cm^{-1} (tensión N_3) y al alquino terminal a 3270 cm^{-1} (tensión $\equiv\text{C-H}$) y 2117 cm^{-1} (tensión $\text{C}\equiv\text{C}$), habían desaparecido (Figura 3.8) corroborando la formación del copolímero.

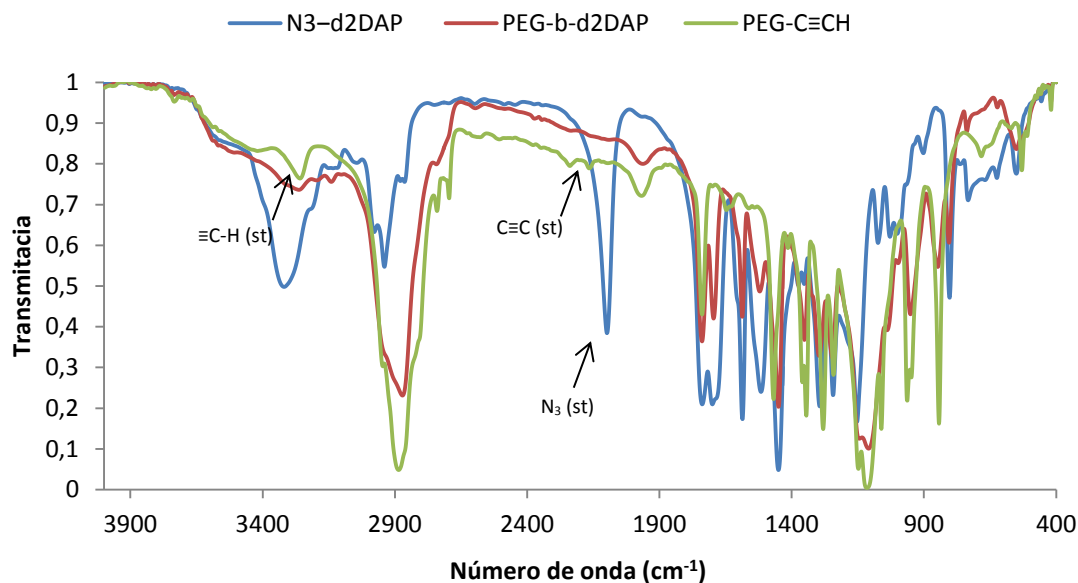


Fig 3.8. Espectros de FTIR registrados en pastilla de KBr

Se hizo un análisis por cromatografía de permeación en gel (GPC), donde se comprobó que el producto final está desplazado a tiempos de elución menor con respecto a los bloques por separado, ya que en esta técnica el tiempo de elución es inversamente proporcional al tamaño de la molécula. El pico del copolímero es simétrico, y no se observan ni hombros u otros picos debido a bloques sin reaccionar.

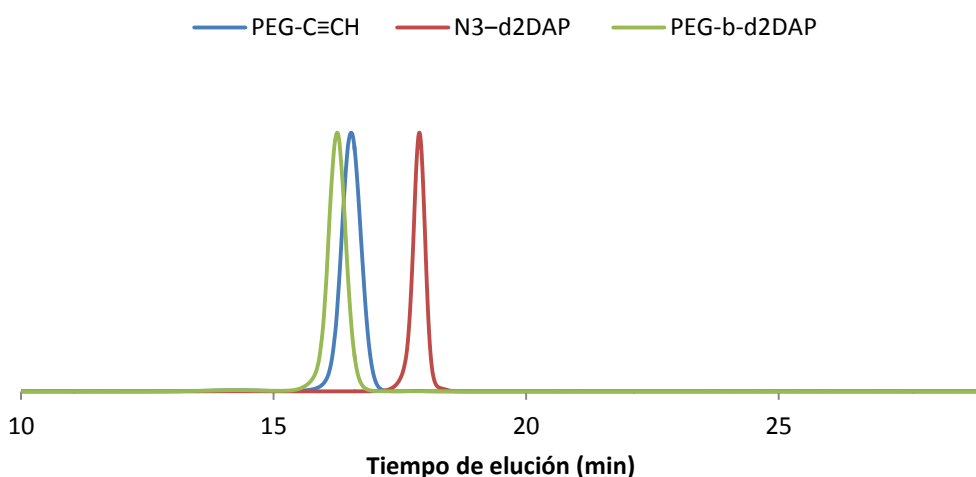


Fig 3.9. Curvas de GPC de los reactivos de partida y del copolímero obtenido

No obstante, como las curvas correspondientes al PEG-C≡CH y al PEG-b-d2DAP se solapan, ya que no difieren excesivamente en masa molar, pudiera ocurrir que la curva del PEG-b-d2DAP contenga una pequeña contribución de PEG-C≡CH. A pesar de no observarse ningún hombro, para verificarlo se

realizó un análisis por espectrometría de masas por la técnica MALDI-TOF a ambos compuestos, tal y como se muestra en la Figura 3.10.

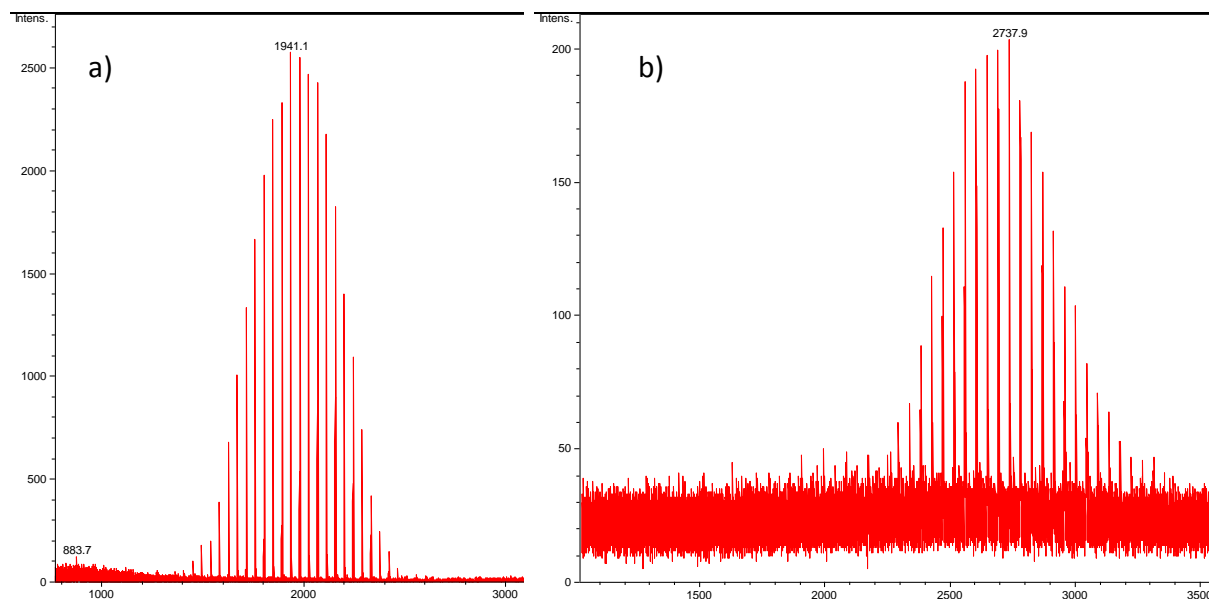


Fig 3.10. Espectros de masas de a) PEG-C≡CH y b) PEG-b-d2DAP.

Como puede verse en la Figura 3.10, el espectro b no tiene restos de PEG-C≡CH, de manera que se comprueba que el producto obtenido era el deseado sin presencia del bloque de poli(etilenglicol) en exceso.

3.3. Preparación y caracterización de los copolímeros bloque supramoleculares

Una vez obtenido el polímero con las unidades de 2,6-diacilaminopiridina, se procedió a la preparación de dos copolímeros bloque supramoleculares utilizando derivados de timina sintetizados previamente en el grupo de investigación. En el primer polímero se incorporó un azobenceno, tAZO, con respuesta a la luz y en el segundo una cadena alifática, tC20. La estructura de los polímeros se pueden ver en la Figura 3.11.

El método de preparación se basa en la disolución estequiométrica de los componentes a partir de los cuales se va a formar el compuesto deseado y la posterior evaporación progresiva del disolvente. Para la preparación de ambas mezclas se utilizó como disolvente THF, ya que es un disolvente común a ambos compuestos.

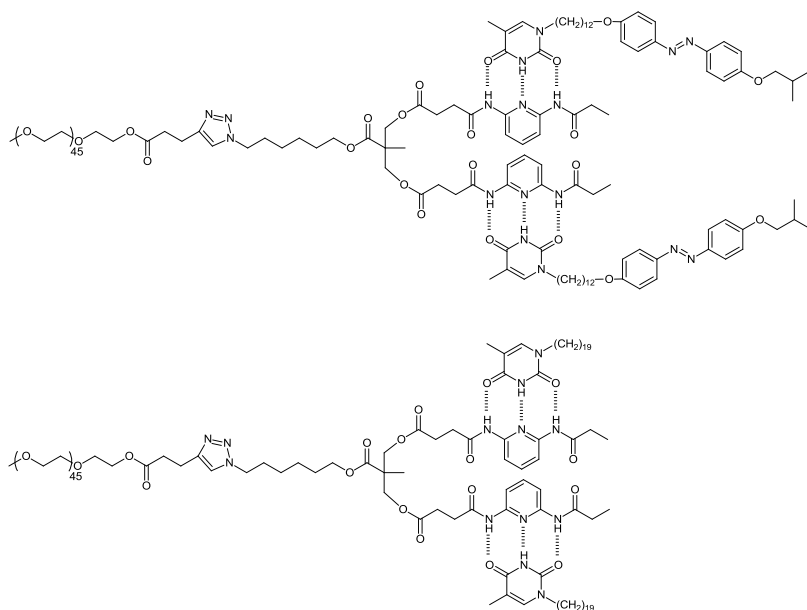


Fig 3.11. Polímeros supramoleculares preparados en este trabajo PEG-b-d2DAP•tAZO y PEG-b- d2DAP•tC20

La formación del polímero supramolecular se estudió mediante FTIR y RMN de ^1H . Como puede verse en la Figura 3.12, en el espectro de FTIR la banda correspondiente a la vibración N-H^{st} en el polímero aparece a 3300 cm^{-1} . En los polímeros supramoleculares esta banda se debilita apareciendo a números de onda más bajos, en torno a 3160 cm^{-1} debido a la formación del enlace de hidrógeno.

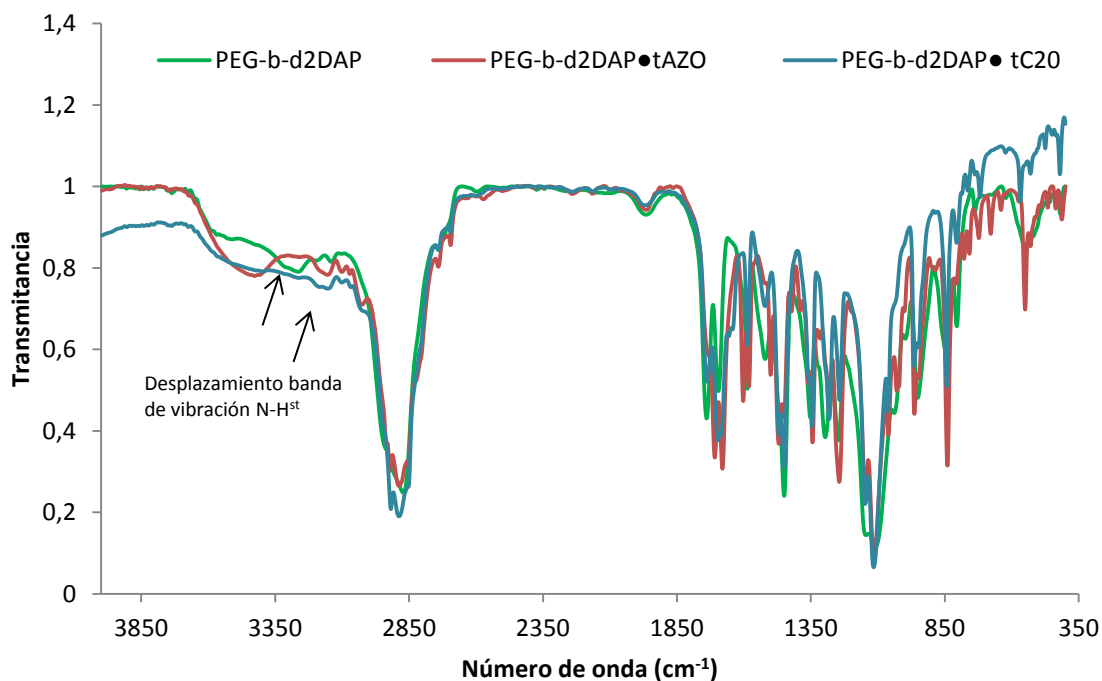


Fig 3.12. Espectros de FTIR registrados en pastilla de KBr

También se llevó a cabo un estudio de ^1H -RMN a temperatura variable (Figura 3.13) observando la evolución de los protones implicados en la formación de los enlaces de hidrógeno entre las unidades de timina y diacilaminopiridina. En concreto, los protones de la unidad diacilaminopiridina en PEG-b-

d2DAP (codificados ambos como H_a) se observan a 8.1 y a 8.3 ppm, mientras que para la unidad timina (H_b) a 8.34 ppm tanto en tAZO y tC20. Al formarse los complejos supramoleculares, a temperatura ambiente, estas señales se desplazan hacia ppm mayores debido a que los protones implicados en las interacciones se ven más desapantallados, apareciendo en este caso a 9.8 y 9.7 ppm los protones de la diacilaminopiridina (H_a) y a 9.4 ppm el protón de la unidad timina (H_b) (Figura 3.13 espectro c). Al aumentar la temperatura las señales se desplazan hacia menores valores de desplazamiento químico, indicando que el apantallamiento de los protones disminuye a consecuencia de que las interacciones por enlace de hidrógeno se debilitan. Este proceso se debe a que las interacciones por enlace de hidrógeno son interacciones dinámicas, por lo que el hecho de aumentar la temperatura se traduce en una mayor agitación térmica de las moléculas y por tanto en una menor asociación.

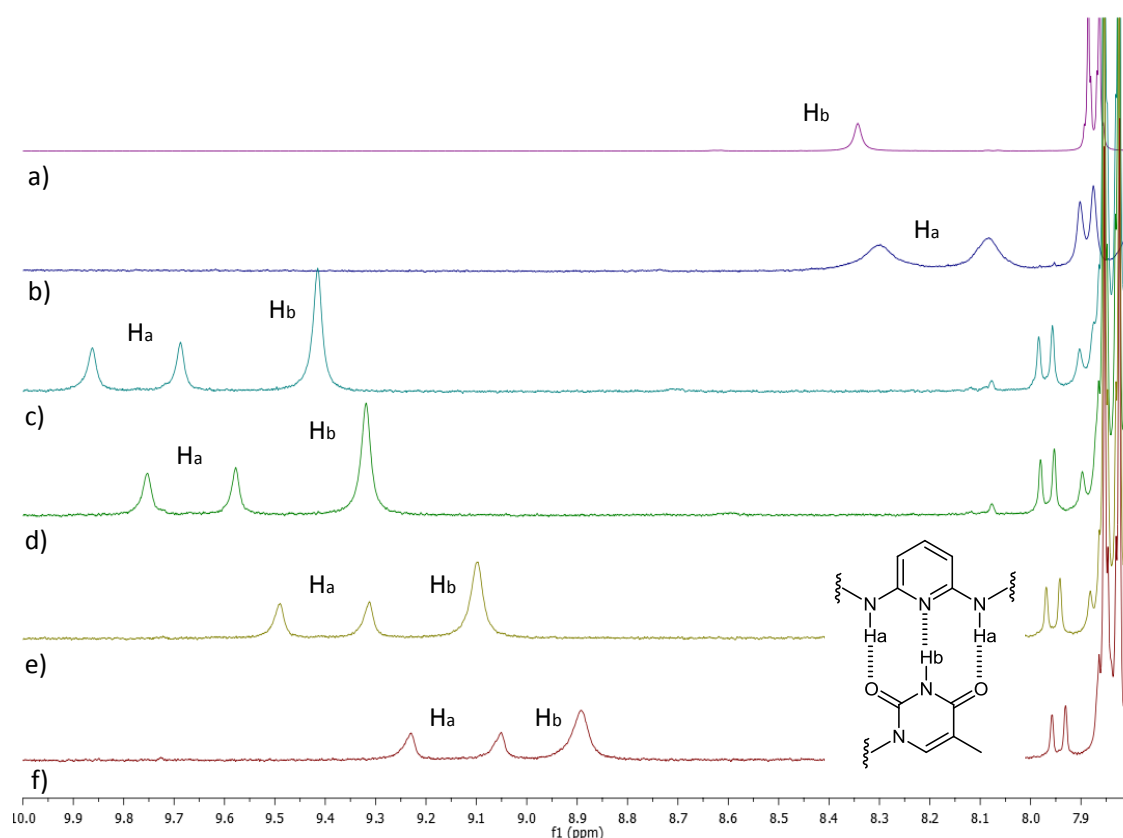


Fig 3.13. Estudio de ^1H -RMN a temperatura variable en el que se muestran los protones de implicados en la formación de los enlaces de hidrógeno en (a) tAZO (b) PEG-b-d2DAP y PEG-b-d2DAP•tAZO a (c) 25 °C, (d) 35 °C, (e), 45 °C, y (f) 55 °C.

3.4. Caracterización térmica

Las transiciones y la estabilidad térmica de los materiales preparados se estudiaron mediante DSC y termogravimetría (TGA). En la tabla 3.1 se recogen los datos más importantes de las curvas de termogravimetría y DSC (Ver Figuras del Apartado C y D, respectivamente, en Anexos). Se observa que la azida es estable hasta 200°C y los polímeros son estables hasta aproximadamente 250°C, no detectándose pérdidas de masa asociadas a restos de disolvente.

Tabla 3.1. Estabilidad y transiciones térmicas de los materiales preparados

	TGA ¹			DSC ²	
	2%	5%	Tonset	Tg	Tm ₁ /Tm ₂
N₃-d2DAP	211°C	230°C	253°C	19°C	-
PEG-b-d2DAP	246°C	273°C	262°C	-	44°C
PEG-b-d2DAP•tAZO	256°C	283°C	314°C	-	48/158°C
PEG-b-d2DAP•tC20	260°C	286°C	286°C	-	45/~100°C

¹ Resultados del análisis termogravimétrico (TGA) en atmósfera de nitrógeno calentando a 10°C/min: pérdida de masa de 2% y 5% de peso y temperatura onset de pérdida de masa.

² Resultados de calorimetría diferencial de barrido (DSC) calentando a 10°C/min registrados en el segundo calentamiento: Tg, temperatura de transición vítrea; Tm, temperatura de fusión.

En lo que se refiere a transiciones térmicas, la azida N₃-d2DAP, (en el segundo barrido) se comporta como un material amorfo, cuya transición vítrea (Tg) se produce a 19°C. Por otro lado, el polímero PEG-b-d2DAP presenta un transición a 44°C que se corresponde con la fusión del bloque mayoritario de poli(etilenglicol). Sin embargo, cuando se enlaza supramolecularmente mediante tres enlaces hidrógeno a las moléculas tAZO y tC20, se produce una clara modificación en el comportamiento térmico (véase Figuras 3 y 4 del *Apartado D en Anexos*). Si nos referimos al segundo calentamiento, por una parte se observa la fusión del bloque de PEG a aproximadamente la misma temperatura (45-48°C), mientras que a más alta temperatura se observa otro pico correspondiente a la fusión de la parte enlazada al bloque de d2DAP. En el caso de PEG-b-d2DAP-tC20, esta transición es compleja dado que se observa una primera fusión seguida de cristalización y una segunda fusión (véase Figura 4 del *Apartado D en Anexos*)

3.5. Preparación de autoensamblados en agua

Los agregados poliméricos se prepararon mediante el método de cosolventes o nanoprecipitación. Dicho método consiste en disolver el polímero en un buen disolvente orgánico tanto para el bloque hidrófobo como para el hidrófilo y miscible con agua, en este caso THF, e ir añadiendo lentamente agua hasta que se detecta la formación de agregados. Este proceso se siguió en un espectrofotómetro UV-vis midiendo la variación de la absorbancia a 650 nm conforme se iba añadiendo agua miliQ. Esta medida es una forma indirecta de comprobar si se produce agregación, ya que a al ir añadiendo agua la turbidez de la disolución va aumentando (en caso de que se produzca), provocando de esta manera una mayor dispersión de la luz y aparentemente un aumento de la absorbancia. En la Figura 3.14 se muestra la evolución de la absorbancia al ir añadiendo agua para el polímero y los polímeros supramoleculares.

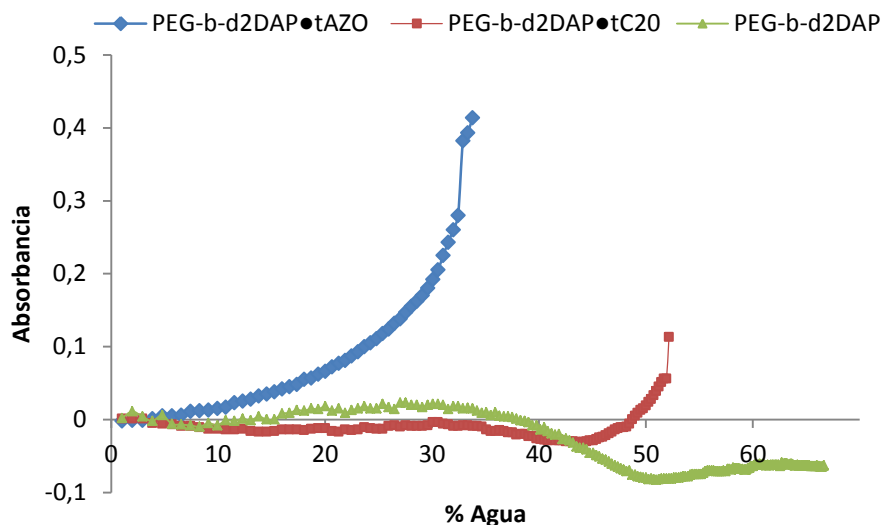


Fig 3.14. Curvas turbidimétricas observadas en la preparación de autoensablados

Para el caso del polímero PEG-b-d2DAP, vemos que la absorbancia es más o menos estable (o aumenta ligeramente) hasta que el contenido en agua es de un 30% y que después disminuye hasta que el contenido en agua es de un 50% aproximadamente, valor a partir del cual se mantiene aproximadamente estable. Este hecho puede deberse a que al ir aumentando la cantidad de agua, la solvatación del polímero sea mayor, de manera que al disolverse parte del polímero la absorbancia va disminuyendo.

Para el caso de los copolímeros supramoleculares, la absorbancia sí aumenta como consecuencia de la micelación pero no se llegó a observar una formación estable agregados ya que ambos compuestos precipitan en lugar de formar dispersiones estables de agregados supramoleculares. El PEG-b-d2DAP•tAZO precipitó con un contenido de agua del 30%, mientras que el PEG-b-d2DAP•tC20 lo hizo con 50% aproximadamente.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Síntesis y caracterización la azida con unidades 2,6-diacilaminopiridina (N_3 -d2DAP)

Síntesis del ácido 2,2,5-trimetil-1,3-dioxano-5-carboxílico (1)

En un matraz de 100 mL se introducen bis-MPA (30.00 g, 223.66 mmol), 2,2-dimetoxipropano (41.2 mL, 335.48 mmol) y ácido *p*-toluensulfónico (2.12 g, 11.18 mmol), y se disuelven en acetona (55 mL). Se deja reaccionar a temperatura ambiente bajo agitación durante aproximadamente 3h. Después, el catalizador se neutraliza por adición de una disolución de $NH_3:EtOH$ (50:50) y el disolvente se evapora. El residuo obtenido se disuelve en DCM (400 mL), se lava con agua, se seca con sulfato de magnesio, se filtra y el disolvente se evapora obteniéndose un sólido blanco. Rto: 49%.

- Caracterización: 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 4.19 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H), 3.67 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H), 1.44 (s, 3H), 1.41 (s, 3H), 1.21 (s, 3H).

IR (KBr), ν (cm^{-1}): 3360 (O-H), 1723 (C=O), 1259, 1073 (C-O)

Síntesis de 2,2,5-trimetil-1,3-dioxano-5-carboxilato de 6-azidohexilo (2). Método 1

En un matraz de dos bocas de 100 mL se introducen ácido 2,2,5-trimetil-1,3-dioxano-5-carboxílico (1) (7.92 g, 45.45 mmol), 6-azidohexan-1-ol (5.93 g, 41.43 mmol) y p-toluensulfonato de dimetilamino piridinio (DPTS) (5.37 g, 18.24 mmol), y se disuelven en DCM seco (25 mL) bajo atmósfera de Ar y agitación. Se introduce el matraz en un baño de agua/hielo y se deja enfriar aproximadamente 10 min. Una vez fría la mezcla de reacción, se adiciona gota a gota y durante 1 h una disolución de DCC (11.28 g, 54.67 mmol) en DCM seco (25 mL) usando un embudo de adición. Pasado este tiempo, quitamos el baño de hielo y se deja reaccionar durante 72 h a temperatura ambiente. El crudo de reacción se filtra y se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando como eluyente hexano/acetato de etilo (8:2), obteniéndose un aceite amarillento. Rto: 32%.

Síntesis de 2,2,5-trimetil-1,3-dioxano-5-carboxilato de 6-azidohexilo (2). Método 2

Síntesis de 2,2,5-trimetil-1,3-dioxano-5-carboxilato de 6-bromohexilo (4). En un matraz de 100 mL de dos bocas se introducen ácido 2,2,5-trimetil-1,3-dioxano-5-carboxílico (1) (5.88 g, 33.75 mmol), 6-bromohexan-1-ol (5.06 g, 28.15 mmol) y DPTS (1.64 g, 5.57 mmol), y se disuelven en DCM seco (35 mL) bajo flujo de Ar y agitación. Se introduce el matraz en un baño de agua/hielo y se deja enfriar aproximadamente 10 min. Una vez fría la mezcla de reacción, se adiciona gota a gota y durante 1 h una disolución de DCC (11.28 g, 54.67 mmol) en DMC seco (15 mL) usando un embudo de adición. Pasado este tiempo, quitamos el baño de hielo y se deja reaccionar durante 72 h a temperatura ambiente. El crudo de reacción se filtra y se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando como eluyente hexano/acetato de etilo (8:2), obteniéndose un aceite amarillento. Rto: 44%.

- Caracterización: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 4.18 (d, $J = 11.8$ Hz, 2H), 4.14 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.63 (d, $J = 11.8$ Hz, 2H), 3.40 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.90 – 1.81 (m, 2H), 1.71 – 1.62 (m, 2H), 1.52 – 1.44 (m, 2H), 1.42 (d, $J = 0.4$ Hz, 3H), 1.38 (d, $J = 0.5$ Hz, 3H), 1.18 (s, 3H).
IR (KBr), ν (cm^{-1}): 1730 (C=O), 1259, 1082 (C-O)

Síntesis de 2,2,5-trimetil-1,3-dioxano-5-carboxilato de 6-azidohexilo (2). En un matraz de 50 mL se disuelve 2,2,5-trimetil-1,3-dioxano-5-carboxilato de 6-bromohexilo (3) (2.0 g, 5.77 mmol) en DMF (15 mL) y a continuación se añade azida de sodio (1.12 g, 17.31 mmol). La mezcla de reacción se deja bajo agitación a 120 °C durante 24 h. Pasado este tiempo se deja enfriar la reacción, se diluye con dietil éter, se lava con agua, la fase orgánica se seca con sulfato de magnesio y se evapora el disolvente, obteniendo un aceite amarillento. Rto: 96 %.

- Caracterización: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.16 (d, $J = 11.9$ Hz, 2H), 4.13 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.62 (d, $J = 11.8$ Hz, 2H), 3.25 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 1.70 – 1.62 (m, 4H), 1.62 – 1.54 (m, 1H), 1.41 (s, 3H), 1.42 – 1.35 (m, 4H), 1.36 (d, $J = 0.4$ Hz, 3H), 1.17 (s, 3H).
IR (KBr), ν (cm^{-1}): 2097 (N_3), 1732 (C=O), 1259, 1083 (C-O)

Síntesis de 2,2-bis(hidroximetil) propanoato de 6-azidohexilo (3)

En un matraz de 50 mL se disuelve 2,2,5-trimetil-1,3-dioxano-5-carboxilato de 6-azidohexilo (2) (0.5 g, 1.67 mmol) en metanol (15 mL) y se añade resina DOWEX-50-X2 (0.25 g). La mezcla se deja reaccionar bajo agitación a temperatura ambiente durante 3 h. Transcurrido este tiempo, la resina se elimina filtrando y el disolvente se elimina a vacío obteniéndose un aceite amarillento. Rto: 93%.

- Caracterización: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.20 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.94 (d, $J = 11.2$ Hz, 2H), 3.74 (d, $J = 11.2$ Hz, 2H), 3.30 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.61 (s, 2H), 1.77 – 1.66 (m, 2H), 1.68 – 1.59 (m, 2H), 1.48 – 1.39 (m, 4H), 1.08 (s, 3H).

IR (KBr), ν (cm^{-1}): 3429 (O-H), 2098 (N_3), 1721 (C=O)

Síntesis de 2-propanoilamino-6-aminopiridina (5)

En un matraz de dos bocas de 250 mL se disuelve 2,6-diaminopiridina (8.5 g, 77.98 mmol), previamente recristalizada en etanol, en THF seco (50 mL) bajo flujo de Ar. Se introduce el matraz en un baño de agua/hielo y se deja enfriar aproximadamente 10 min. Una vez fría la mezcla de reacción, se añade cloruro de propanoilo (3.6 g, 38.91 mmol) en THF seco (10 mL) gota a gota durante 1 h usando un embudo de adición. Pasado este tiempo, quitamos el baño de hielo y se deja reaccionar durante 4 h a temperatura ambiente. El crudo de reacción se filtra, se evapora el disolvente y se purifica por recristalización en etanol/tolueno (1:6). Rto: 67%.

- Caracterización: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.84 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.42 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.22 (dd, $J = 7.9, 0.7$ Hz, 1H), 4.34 (s, 2H), 2.35 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.19 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H).
IR (KBr), ν (cm^{-1}): 3478, 3370, 3226 (NH_2), 1629 (C=O), 1541, 1466, 793 (Ar).

Síntesis del ácido 4-oxo-((6-propanoilaminopiridin-2-il)amino)butanoico (6)

En un matraz de dos bocas de 100 mL se disuelven 2-propanoilamino-6-aminopiridina (5) (4.33 g, 26.27 mmol), anhídrido succínico (5.38 g, 53.76 mmol) y DMAP (0.32 g, 2.62 mmol) en THF seco bajo flujo de Ar y agitación. La mezcla de reacción se calienta hasta reflujo (80 °C) y se deja reaccionar durante 90 min. Pasado este tiempo se deja enfriar primero a temperatura ambiente y luego en la nevera durante unas 15 h. El sólido formado se filtra, se lava con DCM frío y se purifica por recristalización en etanol/tolueno (1:4). Rto: 60%.

- Caracterización: ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ (ppm) 10.06 (s, 1H), 9.97 (s, 1H), 7.62-7.56 (m, 3H), 2.64 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 2.5 (m, 4H), 2.4 (q, $J = 7.5$, 2H), 1.06 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H).
IR (KBr), ν (cm^{-1}): 3297 (N-H), 1696 (C=O).

Síntesis de (7). Método 1

En un matraz de 25 mL de dos bocas se disuelve anhídrido succínico (1.74 g, 17.4 mmol) en DCM seco (10 mL) bajo flujo de Ar y agitación. A continuación se disuelve 2,2-bis(hidroximetil) propanoato de 6-azidohexilo (4) (0.45 g, 1.74 mmol) en trietilamina (2.42 mL, 17.4 mmol) y se añade gota a gota sobre la disolución anterior. Se deja reaccionar la mezcla durante 24 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el crudo de reacción se diluye con DCM, se lava con HCl (2M, 3×50 mL), con agua (1×50 mL) y salmuera (1×50 mL), la fase orgánica se seca con sulfato de magnesio, se evapora el disolvente y se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando como eluyente hexano/acetato de etilo (1:1), obteniéndose un aceite amarillento. Rto: 50 %.

Síntesis de (7). Método 2

Síntesis del ácido 4-oxo-4-(2-trimetilsilil)etoxibutanoico (8). En un matraz de 50 mL de dos bocas se disuelve anhídrido succínico (0.8 g, 8 mmol) en DCM seco (16 mL) bajo flujo de Ar y agitación. A continuación se añade 2-trimetilsililetanol (1 g, 8.5 mmol) y trietilamina (1.12 mL, 8 mmol) a la disolución y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 24 h. Pasado este tiempo se evapora el disolvente, el residuo obtenido se disuelve de nuevo en DCM (50 mL), se lava con HCl (1M, 50 mL

x 3), con agua (50 mL x 1) y salmuera (50 mL x 1), la fase orgánica se seca con sulfato de magnesio y se evapora el disolvente, obteniéndose un aceite incoloro. Rto: 94%.

- Caracterización: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 4.21-4.16 (m, 2H), 2.69-2.65(m, 2H), 2.61-2.57 (m, 2H), 1.01-0.95 (m, 2H), 0.03 (s, 9H).

IR (KBr), ν (cm^{-1}): 3500 (O-H), 1735 (C=O).

Síntesis de (9). En un matraz de 25 mL de dos bocas se disuelven ácido 4-oxo-4-(2-trimetilsilil)etoxibutanoico (7) (1.4 g, 6.3 mmol), 2,2-bis(hidroximetil)propanoato de 6-azidohexilo (4) (0.65 g, 2.5 mmol) y DPTS (0.74 g, 2.5 mmol) en DCM seco (8 mL) bajo flujo de Ar y agitación. A continuación añadimos DCC (1.3 g, 6.3 mmol), calentamos a 40 °C y se deja reaccionar durante 15 h. Pasado este tiempo se deja enfriar el crudo de reacción, se filtra y se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando como eluyente hexano/acetato de etilo (9:1), obteniéndose un aceite transparente. Rto: 62%.

- Caracterización: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 4.27-4.21 (m, 4H), 4.19-4.14 (m, 4H), 4.11 (t, J = 8 Hz, 2H), 3.27 (t, J = 8 Hz, 2H), 2.63-2.55 (m, 8H), 2.69 – 2.57 (m, 8H), 1.68 – 1.56 (m, 4H), 1.44 – 1.33 (m, 4H), 1.23 (s, 3H), 0.03 (s, 18 H).

IR (KBr), ν (cm^{-1}): 2098 (N_3), 1737 (C=O).

Síntesis de (7). En un matraz de 100 mL se disuelve la azida (8) (0.7 g, 1 mmol) en DCM seco (25 mL) bajo corriente de Ar y agitación. A continuación se añade poco a poco ácido trifluoroacético (25 mL) y se deja reaccionar durante 2 h. Transcurrido este tiempo se evapora el disolvente, el residuo obtenido se disuelve de nuevo en DCM (50 mL), se lava con agua (50 mL x 3), la fase orgánica se seca con sulfato de magnesio y se evapora el disolvente. Rendimiento cuantitativo.

- Caracterización: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 8.51 (s, 2H), 4.29 (d, J = 11.0 Hz, 2H), 4.20 (d, J = 11.1 Hz, 2H), 4.12 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 3.27 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.69 – 2.57 (m, 8H), 1.68 – 1.56 (m, 4H), 1.44 – 1.32 (m, 4H), 1.23 (s, 3H).

IR (KBr), ν (cm^{-1}): 3566 (OH), 2099 (N_3), 1740 (C=O)

Síntesis de azida N_3 -d2DAP. Procedimiento 1

En un matraz de 250 mL de dos bocas se introducen 2,2-bis(hidroximetil)propanoato de 6-azidohexilo (0.43 g, 1.67 mmol), ácido 4-oxo-((6-propanoilaminopiridin-2-il)amino)butanoico (1 g, 4 mmol), DPTS (0.40 g, 1.33 mmol) y se disuelven en DCM seco (65 mL) bajo flujo de Ar y agitación. Se introduce el matraz en un baño de agua/hielo y se deja enfriar aproximadamente 10 min. Una vez fría la mezcla de reacción, disolvemos DCC (1.01 g, 5 mmol) en DMC seco (15 mL) en un embudo de adición y se añade la disolución gota a gota durante 1 h en la disolución anterior. Pasado este tiempo, quitamos el baño de hielo y se deja reaccionar durante 72 h a temperatura ambiente. El crudo de reacción se filtra y se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando como eluyente hexano/acetato de etilo (8:2), obteniéndose un sólido blanco. El sólido aislado no es el producto deseado.

Síntesis de azida N_3 -d2DAP. Procedimiento 2

En un matraz de dos bocas de 50 mL se disuelven 2-propanoilamino-6-aminopiridina (5) (0.41 g, 2.5 mmol), azida (7) (0.50 g, 1.00 mmol) y DPTS (0.25g, 0.84 mmol) en DCM seco (5 mL) bajo flujo de Ar y agitación. Se introduce el matraz en un baño de agua/hielo y se deja enfriar aproximadamente 10

min. Una vez fría la mezcla de reacción, adicionamos DCC (0.6 g, 2.9 mmol). Pasada 1 h, quitamos el baño de hielo y se deja reaccionar durante 72 h a temperatura ambiente. El crudo de reacción se filtra y se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando como eluyente hexano/acetato de etilo (1:4), obteniéndose un sólido blanco. Rto: 70%.

- Caracterización: Caracterización: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 8.21 (s, 2H), 8.04 (s, 2H), 7.95-7.72 (m, 2H), 7.66 (t, $J = 8$ Hz, 1H), 4.33 (d, $J = 11.1$ Hz, 2H), 4.22 (d, $J = 11.1$ Hz, 2H), 4.09 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.26 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.78-2.58 (m, 8H), 2.39 (q, $J = 8$ Hz, 2H), 1.66 – 1.54 (m, 2H), 1.43 – 1.30 (m, 4H), 1.25 – 1.18 (m, 9H).
IR (KBr), ν (cm^{-1}): 3319 (NH), 2098 (N_3), 1738 (C=O), 1586, 1515, 1449 (Ar).

4.2. Síntesis y caracterización del polímero con unidades 2,6-diacilaminopiridina (PEG-*b*-d2DAP)

Modificación de la resina Merrifield con grupos azida

En un matraz de reacción de 25 mL se añaden la resina Merrifield de poliestireno clorometilado con 1.0-1.5 mmol/g (Aldrich) (1 g, 0.8-1.3 mmol) y azida de sodio (1 g, 15.4 mmol) en DMSO (10 mL). Se deja reaccionar a 60 °C durante 3 días. Pasado este tiempo, se añade metanol y el sólido se aísla por filtración. La resina blanca obtenida se lava 3 veces con metanol y 3 veces con DCM.

Síntesis de PEG-*b*-d2DAP. En un Schlenk se disuelven la azida N_3 -d2DAP (0.1 g, 0.13 mmol), PEG ($M_n=2000$ g/mol) (0.32 g, 0.16 mmol), CuBr (2.0 mg, 0.013 mmol) y PMDTA (2.3 mg, 0.013 mmol) en DMF (1 mL) destilada bajo flujo de Ar y agitación. A continuación se le realizan tres ciclos Ar-vacío, congelando la mezcla de reacción con nitrógeno líquido antes de hacer vacío y dejando descongelar bajo atmósfera de Ar. Una vez hechos los ciclos, la mezcla de reacción se lleva a 60 °C durante 3 días. Cuando finaliza la reacción, se añade resina Merrifield funcionalizada con azida y se deja 24 h más. El crudo de reacción se filtra en alúmina neutra usando como eluyente THF. Por último, se evapora el THF y se precipita el residuo obtenido en dietil éter, obteniéndose un sólido blanco. Rto: 28 %.

- Caracterización: Caracterización: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 8.33 (s, 2H), 8.11 (s, 2H), 7.94-7.74 (m, 2H), 7.65 (t, $J = 8$ Hz, 1H), 7.37 (s, 1H), 4.34-4.17 (m, 8H), 4.06 (t, $J = 8$ Hz, 2H), 3.9-3.38 (m, 187H), 3.36 (s, 3H), 3.04 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.8-2.60 (m, 10H), 2.39 (q, $J = 7.5$ Hz, 4H), 1.92 – 1.8 (m, 2H), 1.64 – 1.51 (m, 2H), 1.35 – 1.16 (m, 13H).
IR (KBr), ν (cm^{-1}): 3319 (NH), 2098 (N_3), 1738 (C=O), 1586, 1515, 1449 (Ar).

4.3. Síntesis y caracterización de los copolímeros bloque supramoleculares (PEG-*b*-d2DAP•tAZO y PEG-*b*-d2DAP•C20)

Para preparar los complejos supramoleculares se pesa en una balanza de precisión cantidades estequiométricas de PEG-*b*-d2DAP y tAZO o tC20. La mezcla se disuelve en la mínima cantidad posible de THF (grado HPLC) y se filtra usando un filtro de 0.2 μm de teflón. A continuación se evapora el disolvente a temperatura ambiente con una suave agitación mecánica. El sólido obtenido se seca a vacío a temperatura ambiente.

El polímero **PEG-*b*-d2DAP•tAZO** se sintetizó a partir de PEG-*b*-d2DAP (47.8 mg, 0.0175 mmol) y tAZO (20.0 mg, 0.0355 mmol).

El polímero **PEG-*b*-d2DAP•C20** se sintetizó a partir de PEG-*b*-d2DAP (20.0 mg, 0.0074 mmol) y tC20 (5.7 mg, 0.014 mmol).

4.4. Formación de autoensamblados en agua

Se intentó la formación de autoensamblados en agua de **PEG-*b*-d2DAP**, **PEG-*b*-d2DAP•tAZO** y **PEG-*b*-d2DAP•C20** mediante el método de cosolventes. Este método consiste en disolver de polímero, 5 mg, en THF (grado HPLC), 1mL. La disolución resultante se filtra usando un filtro de teflón de 0.2 μm . Después se van añadiendo con ayuda de una micropipeta se van añadiendo porciones de 10 μL de H_2O miliQ siguiendo la variación de la absorbancia a $\lambda=650\text{ nm}$ mediante espectroscopía UV-vis. Al ir añadiendo agua la disolución se va haciendo cada vez más turbia ya que se van formando agregados y estos dispersan la luz, de manera que al alcanzar la concentración micelar crítica se observa un aumento de absorbancia y si se sigue añadiendo más agua hasta estabilización.

5. CONCLUSIONES

Como resumen del trabajo se puede indicar que:

- Se ha sintetizado el dendrón de primera generación con unidades de 2,6-diacilaminopiridina en la periferia. La síntesis no ha sido posible por la ruta sintética convergente propuesta inicialmente y ha sido necesaria la búsqueda de una nueva alternativa sintética basada en una estrategia de síntesis lineal en la que la periferia del dendrón se modifica en reacciones sucesivas. La adecuada protección de grupos carboxilo permite que esta ruta pueda extrapolarse a generaciones superiores.
- Ha sido posible la síntesis del polímero por acoplamiento del dendrón con PEG mediante una reacción de acoplamiento azida-alquino catalizada por Cu(I).
- El copolímero obtenido ha sido caracterizado por ^1H -RMN y FTIR y se han estudiado sus propiedades térmicas mediante TGA y DSC.
- Se han obtenido los copolímeros supramoleculares, que han sido estudiados por ^1H -RMN e IR, demostrándose la formación de enlaces de hidrógeno entre las unidades de 2,6-diacilaminopiridina y la timina. En estos copolímeros también se estudiaron las propiedades térmicas por TGA y DSC.
- Se ha estudiado la agregación en agua de los copolímeros pero se ha comprobado que no se forman agregados estables.

Como conclusión final podemos afirmar que la cicloadición 1,3-dipolar entre alquinos y azidas es un buen método para la formación de copolímeros bloque dendrítico-lineales con unidades DAP en la periferia. Esta aproximación sintética se basa en la disponibilidad de un dendron con un grupo funcional azida para el que se ha logrado desarrollar una estrategia que podrá se extrapolada a la obtención de dendrones de generaciones superiores. Finalmente, el reconocimiento molecular mediante enlaces de hidrógeno es una buena estrategia sintética para la funcionalización de copolímeros dendrítico-lineales y la introducción de unidades con respuesta a estímulos en materiales poliméricos.