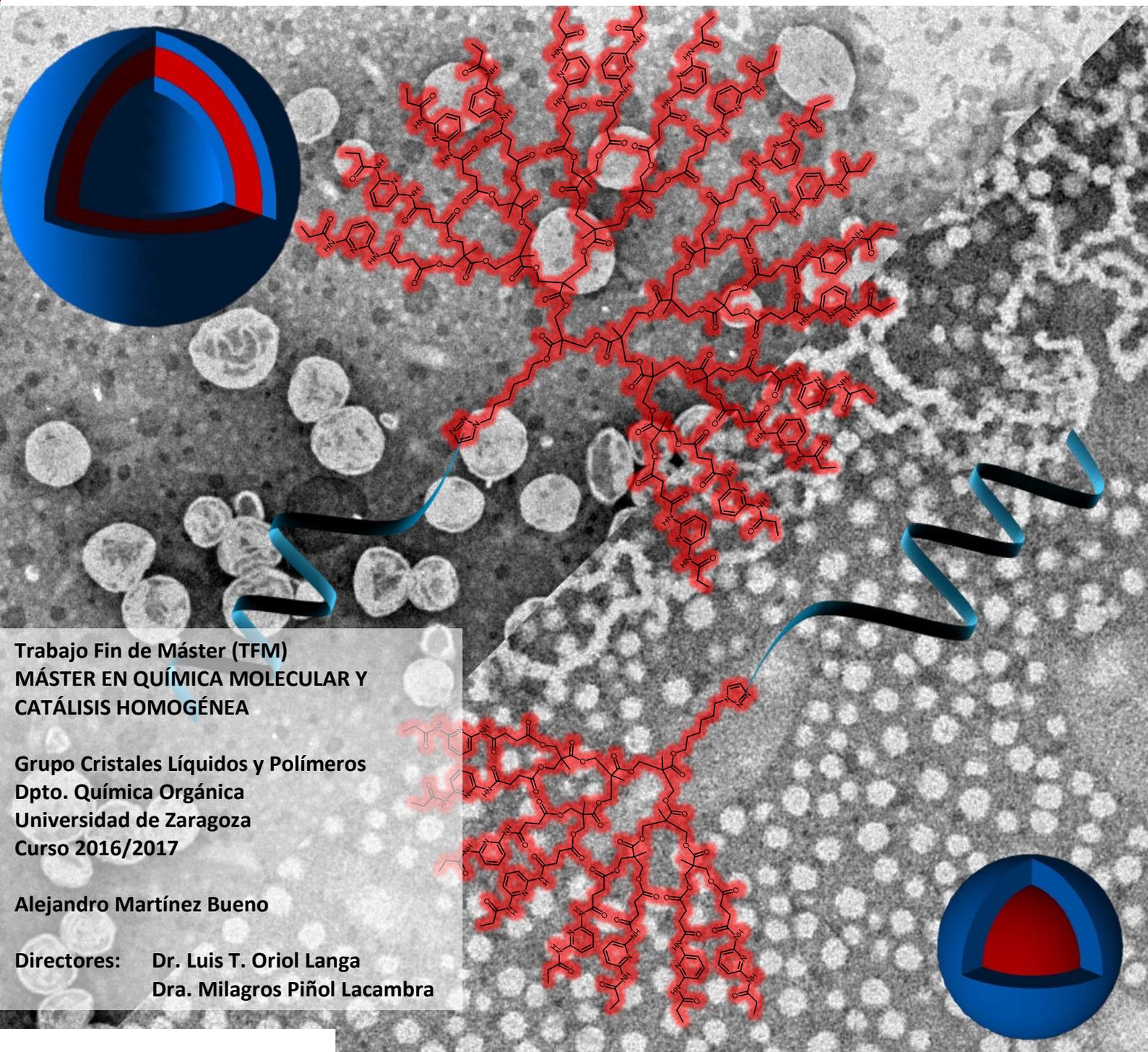


# COPOLÍMEROS BLOQUE ANFÍFILOS PARA LA PREPARACIÓN DE NANOTRANSPORTADORES EN AGUA



Trabajo Fin de Máster (TFM)  
MÁSTER EN QUÍMICA MOLECULAR Y  
CATÁLISIS HOMOGÉNEA

Grupo Cristales Líquidos y Polímeros  
Dpto. Química Orgánica  
Universidad de Zaragoza  
Curso 2016/2017

Alejandro Martínez Bueno

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



Departamento de  
Química Orgánica  
Universidad Zaragoza



Facultad de Ciencias  
Universidad Zaragoza



## **RESUMEN: “COPOLÍMEROS BLOQUE ANFÍFILOS PARA LA PREPARACIÓN DE NANOTRANSPORTADORES EN AGUA”.**

Los copolímeros bloque (BCs) anfífilos son capaces de auto-organizarse formando estructuras nanoscópicas en fase condensada o en agua. Unas de las estructuras más interesantes son las micelas o vesículas poliméricas, ya que permiten la encapsulación y el transporte de moléculas de interés. Además, 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.

El objetivo principal de este trabajo ha sido la *síntesis y caracterización de copolímeros bloque de tipo dendrítico-lineal derivados del ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico con unidades de 2,6-diacildiaminopiridina en la periferia del dendrón que sean capaces de unirse mediante enlaces de hidrógeno a unidades fotosensibles que incluyan anillos de timina.*

Se ha desarrollado una ruta sintética para la introducción de unidades 2,6-diacilaminopiridina en la periferia de distintas generaciones de dendrones derivados del ácido 2,2-bis(hidroximetil)propionico que conformen un bloque hidrófobo. Posteriormente se acoplaron estos dendrones, 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 los copolímeros bloque anfífilos buscados. Los copolímeros bloque sintetizados fueron funcionalizados en las unidades 2,6-diacilaminopiridina de la periferia de los dendrones mediante tres enlaces de hidrógeno, utilizando como base complementaria timina con unidades azobenceno con respuesta a la luz. Por último, se estudió la capacidad de formar agregados en agua de estos copolímeros, formando los agregados del tipo micela y vesícula buscados. No obstante, los copolímeros supramoleculares no formaron dispersiones estables.

## **ABSTRACT: “AMPHIPHILIC BLOCK COPOLYMERS FOR THE PREPARATION OF NANOCARRIERS IN WATER”**

Amphiphilic block copolymers (BCs) are able to self-assemble into nanometric structures either in bulk or water. Some of the most interesting structures are polymeric micelles or vesicles, which can be used for the encapsulation and transport 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 objective of this project was the *synthesis and characterization of linear-dendritic block copolymers 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.*

A synthetic route for the introduction of 2,6-diacylaminipyridine on the periphery of different generations of hydrophobic dendrons derived from 2,2-bis(hydroxymethyl)propionic acid has been developed. Afterwards, these dendrons were couple, to a hydrophilic polymeric block through a 1,3-dipolar cycloaddition reaction catalyzed by Cu(I), “click” reaction that allows obtaining efficiently the aimed amphiphilic block copolymers. The synthesized block copolymers were functionalised with light-responsive azobenzene moieties containing thymine units, which were anchored to the 2,6-diacylaminipyridine units of the dendron periphery through three hydrogen bonds. Finally, the ability to form aggregates in water of these copolymers was studied. BCs before azobenzene functionalization gave rise to micelles and vesicles. However, the supramolecular BCs did not form stable aggregates in water. derivatives.



## **ABREVIATURAS**

<b>Bis-MPA</b>	<b>Ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico</b>
<b>DAP</b>	<b>2,6-Diacilaminopiridina</b>
<b>DCC</b>	<b><i>N,N'</i>-Diciclohexilcarbodiimida</b>
<b>DCM</b>	<b>Diclorometano</b>
<b>DLS</b>	<b>Dispersión dinámica de luz</b>
<b>DMF</b>	<b><i>N,N</i>-Dimetilformamida</b>
<b>DPTS</b>	<b>p-Toluensulfonato de dimetilaminopiridinio</b>
<b>DSC</b>	<b>Calorimetría diferencial de barrido</b>
<b>DTGA</b>	<b>Derivada (primera) del análisis termogravimétrico</b>
<b>FTIR</b>	<b>Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier</b>
<b>GPC</b>	<b>Cromatografía de permeación en gel</b>
<b>MALDI-TOF</b>	<b>Ionización láser asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo</b>
<b>PEG</b>	<b>Poli(etilenglicol)</b>
<b>PMDTA</b>	<b><i>N,N,N',N'',N''</i>-pentametildietilentriamina</b>
<b>RMN</b>	<b>Resonancia magnética nuclear</b>
<b>Rto</b>	<b>Rendimiento</b>
<b>Tg</b>	<b>Temperatura de transición vítrea</b>
<b>TGA</b>	<b>Análisis termogravimétrico</b>
<b>THF</b>	<b>Tetrahidrofurano</b>
<b>Tm</b>	<b>Temperatura de fusión</b>
<b>UV-vis</b>	<b>Ultravioleta-visible</b>

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Copolímeros bloque dedrítico-lineales .....	1
1.2 Copolímeros bloque anfífilos .....	3
1.3 Polímeros supramoleculares .....	5
1.4 Antecedentes del trabajo fin de máster .....	7
<b>2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO .....</b>	<b>9</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>11</b>
3.1 Preparación y caracterización de las azidas con unidades de 2,6-diacilaminopiridina ....	11
3.2 Preparación y caracterización de los copolímeros bloque con unidades 2,6-diacilaminopiridina .....	17
3.3 Preparación y caracterización de los copolímeros bloque supramoleculares.....	19
3.4 Caracterización térmica.....	23
3.5 Preparación de autoensamblados en agua .....	25
<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>30</b>

## ANEXOS

<b>A. Parte experimental .....</b>	<b>A-1</b>
<b>B. Espectros (FTIR, <sup>1</sup>H-RMN) .....</b>	<b>A-9</b>
<b>C. Termogravimetría (TGA, DTGA).....</b>	<b>A-27</b>
<b>D. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) .....</b>	<b>A-32</b>
<b>E. Imágenes de TEM.....</b>	<b>A-39</b>
<b>F. Espectrometría de masas .....</b>	<b>A-42</b>
<b>G. Técnicas e instrumentos .....</b>	<b>A-46</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Copolímeros bloque dendrítico-lineales

El término “dendrímero” fue propuesto a principios de 1980 por Tomalia<sup>1</sup> 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. Cada capa repetitiva de la unidad de ramificación se denomina generación (Gx) (Figura 1.1) y determina el número de grupos funcionales en la periferia del dendrón, el cual va creciendo exponencialmente según vamos aumentando la generación.

Los copolímeros bloque dendrítico-lineales (LDBC) son híbridos cuya estructura química está formada por un bloque polimérico lineal y otro dendrítico (Figura 1.1).

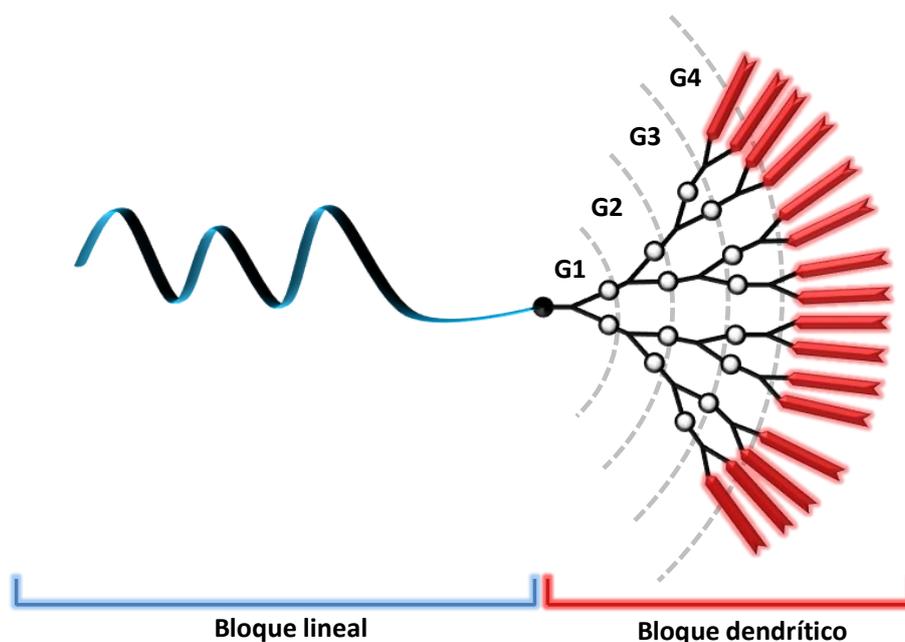


Fig 1.1. Copolímero bloque dendrítico-lineal de cuarta generación

Este tipo de arquitecturas poliméricas fueron introducidas por Gitsov y Fréchet<sup>2</sup> y pueden llevar a cambios sustanciales en algunas propiedades como la solubilidad, la

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

<sup>2</sup> I. Gitsov, K. L. Wooley and J. M. J. Fréchet, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 1992, **31**, 1200-1202.

viscosidad intrínseca o la microsegregación de fase entre otros, en comparación con los copolímeros bloque (BCs) lineal-lineal convencionales.

Existen tres estrategias para la preparación de los copolímeros bloque dendrítico-lineales como se muestra en la Figura 1.2<sup>3</sup>. La primera ruta (Figura 1.2a), conocida como “chain first”, consiste en la síntesis de un polímero lineal que contenga en su extremo terminal un grupo reactivo que sirva como punto de crecimiento divergente del dendrón. Uno de los primeros ejemplos conocidos fue reportado por Meijer y colaboradores, combinando la polimerización aniónica y la síntesis divergente de dendrones de poli(propilenimina) (PPI)<sup>4</sup>.

La segunda ruta (Figura 1.2b), conocida como “dendrón first”, implica la síntesis inicial del dendrón con un grupo reactivo en el punto focal que sirva como iniciador en la polimerización del bloque lineal. Este concepto fue desarrollado por Matyjaszewski, Hawker y Fréchet, utilizando dendrones de poliéter como macroiniciadores en la polimerización controlada por radicales libres de monómeros vinílicos<sup>5</sup>.

Finalmente, en la estrategia de acoplamiento de dos bloques (Figura 1.2c), es necesaria la síntesis previa del polímero lineal y del dendrón conteniendo grupos funcionales complementarios que reaccionen entre sí: uno en el extremo terminal del polímero lineal y el otro en el punto focal del dendrón. 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. Por otro lado, para la unión de ambos bloques es conveniente usar reacciones con condiciones sencillas, que transcurran con altos rendimientos y en las que no sea necesario purificar posteriormente por métodos cromatográficos. El conjunto de reacciones que reúnen todas estas características, y algunas otras, son las definidas por Sharpless como reacciones de tipo “click”<sup>6</sup>. Dentro de estas reacciones, la cicloadición entre alquinos y azidas catalizada por Cu(I) 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.

---

<sup>3</sup> E. Blasco, M. Piñol and L. Oriol, *Macromol. Rapid Commun.*, 2014, **35**, 1160-1160.

<sup>4</sup> J. van Hest, D. Delnoye, M. Baars, M. van Genderen and E. Meijer, *Science*, 1995, **268**, 1592-1595.

<sup>5</sup> M. Leduc, C. Hawker, J. Dao and J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 11111-11118.

<sup>6</sup> H. Kolb, M. Finn and K. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2001, **40**, 2004-2021.

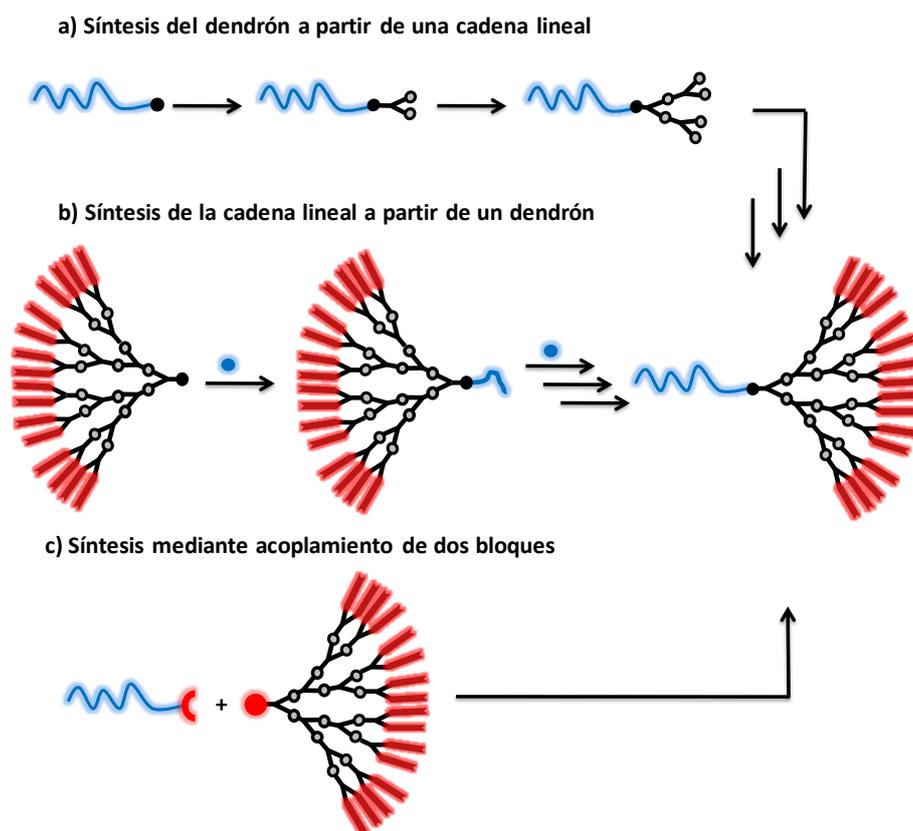


Fig 1.2. Estrategias para la síntesis de copolímeros bloque dendrítico lineales

## 1.2. Copolímeros bloque anfífilos

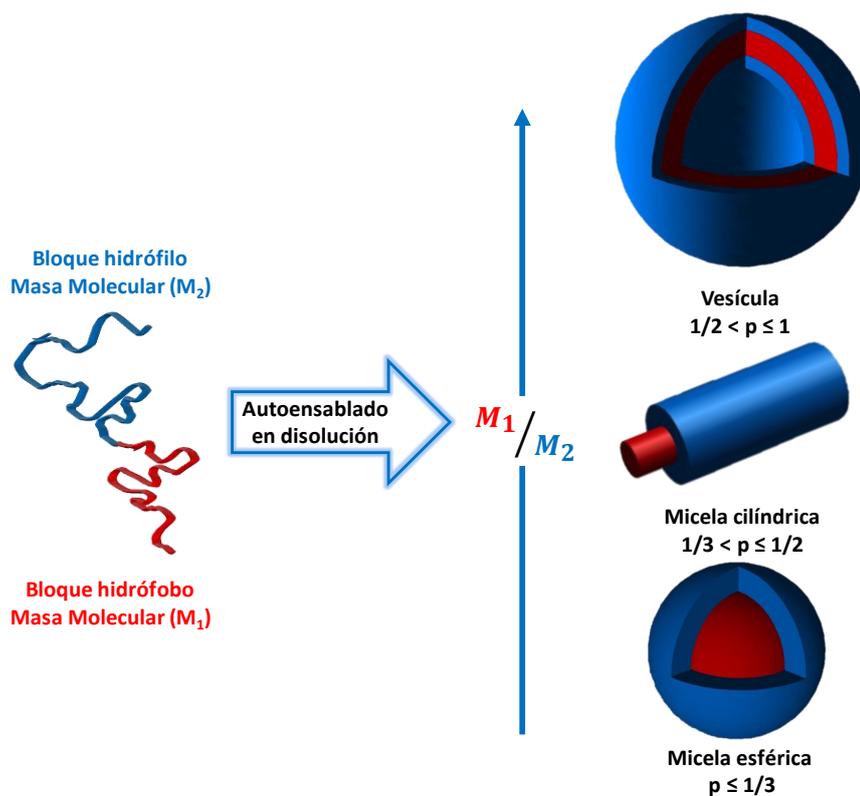
Una de las propiedades más interesantes de los copolímeros bloque anfífilos es su habilidad para formar agregados nanoestructurados en medio acuoso. Esto los ha convertido en materiales especialmente interesantes en campos como el de la biomedicina, para la liberación controlada de fármacos<sup>7</sup>, o en catálisis como nanorreactores<sup>8</sup>.

Las estructuras formadas por los BCs anfífilos más comunes son micelas esféricas, micelas cilíndricas o vesículas (Figura 1.3). Tanto las micelas esféricas como las cilíndricas 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 hidrófobas. Las vesículas, sin embargo, están formadas por una membrana hidrófoba cuyo interior y exterior están delimitados por una capa hidrófila,

<sup>7</sup> S. Martín-Saldaña, R. Ramírez-Camacho, R. Palao-Suay, M. R. Aguilar and J. San Román, *Acta Biomater.*, 2016, 53, 199-210.

<sup>8</sup> M. V. Dinu, M. Spulber, K. Renggli, D. Wu, C. A. Monnier, A. Petri-Fink and N. Bruns, *Macromol. Rapid Commun.*, 2015, 36, 507-514.

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. La morfología de agregación depende del volumen relativo de los diferentes bloques y del parámetro de empaquetamiento ( $p$ ) donde  $p = v/al$ , siendo  $v$  el volumen hidrófobo,  $a$  el área interfacial en la interfase hidrófobo-hidrófilo / agua y  $l$  la longitud de cadena perpendicular a la superficie por molécula<sup>9</sup>. Este concepto ha sido utilizado para explicar y predecir la formación de micelas esféricas ( $p \approx 1/3$ ), micelas cilíndricas ( $p \approx 1/2$ ) y vesículas ( $p \approx 1$ ) en función de los volúmenes de los bloques del copolímero.



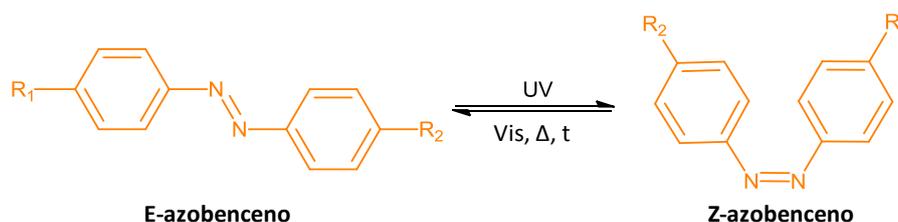
**Fig 1.3.** Morfologías de agregación más comunes encontradas en copolímeros bloque anfífilos en función del parámetro de empaquetamiento (Adaptado referencia 9)

En los LDBCs la periferia del dendrón puede ser funcionalizada con un número preciso de grupos funcionales con respuesta a diferentes estímulos externos como la luz, el pH o la temperatura. 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. Dada su estructura precisa (el

<sup>9</sup> S. Holder and N. Sommerdijk, Polym. Chem., 2011, **2**, 1018-1028.

número de unidades funcionales unidos a la periferia es fijo) pueden obtenerse materiales autoensamblados con estructuras muy reproducibles.

Entre los estímulos empleados, la luz presenta como ventajas que su aplicación es rápida, localizada, aplicada de forma temporalmente precisa y de forma externa por lo que la respuesta que se produzca no está asociada a ningún cambio en el entorno químico donde están las micelas o las vesículas, como en el caso de la respuesta al pH. 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. 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 1.4).



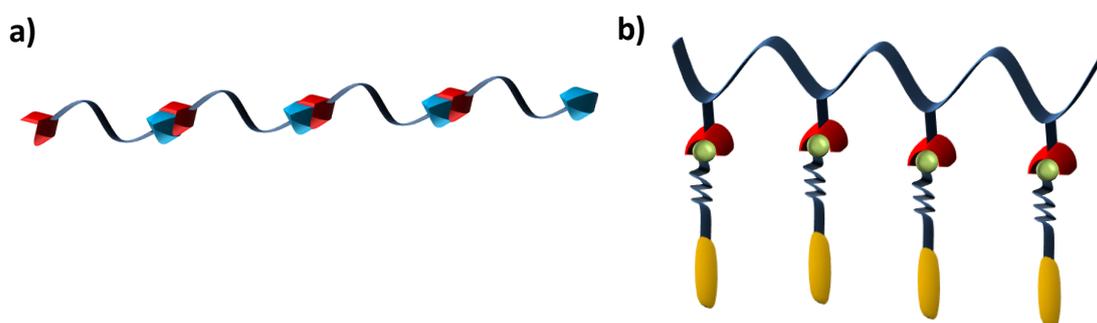
**Fig 1.4.** *Isomerización reversible del azobenceno*

### 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. Los polímeros supramoleculares están formados por unidades monoméricas que se mantienen unidas mediante interacciones no covalentes, dando como resultado materiales con propiedades poliméricas en disolución o en *bulk*<sup>10</sup>. 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. Aunque la mayoría de los

<sup>10</sup> L. Brunsveld, B. Folmer, E. Meijer and R. Sijbesma, *Chem. Rev.*, 2001, **101**, 4071-4098.

polímeros que se conocen son covalentes, en los últimos años la síntesis de polímeros supramoleculares se ha incrementado debido a sus propiedades dinámicas como la reversibilidad, habilidad adaptativa, respuesta a estímulos o autocurado (“self-healing”). 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 1.5). 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.



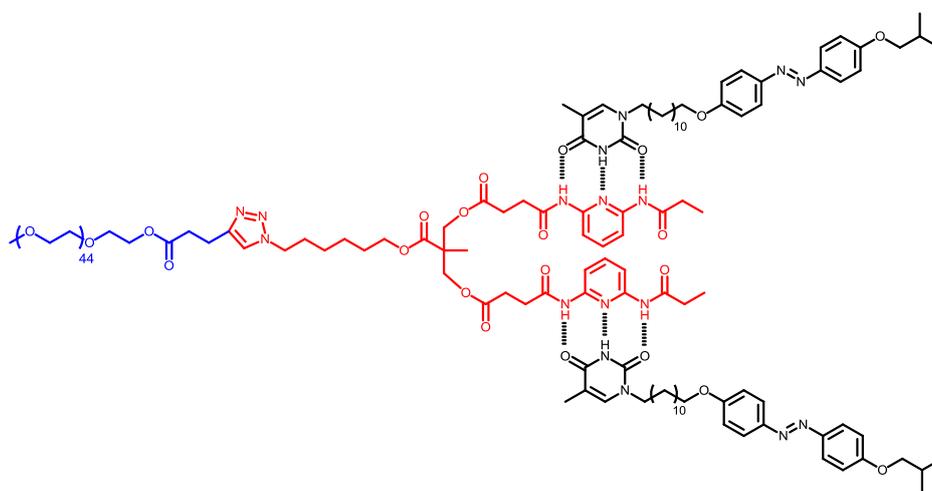
**Fig 1.5.** Representación esquemática de un polímero supramolecular de cadena principal (a) y de cadena lateral (b)

El ensamblaje por reconocimiento molecular permite modificar fácilmente la estructura del polímero, proporcionando una gran variedad de macromoléculas funcionalizadas con una síntesis sencilla y rápida. Además, la naturaleza dinámica de los enlaces supramoleculares permite el control y la reversibilidad 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 ciertas 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, por ejemplo mediante la funcionalización de la periferia por reconocimiento molecular para dar lugar a nuevas arquitecturas poliméricas sensibles a estímulos externos.

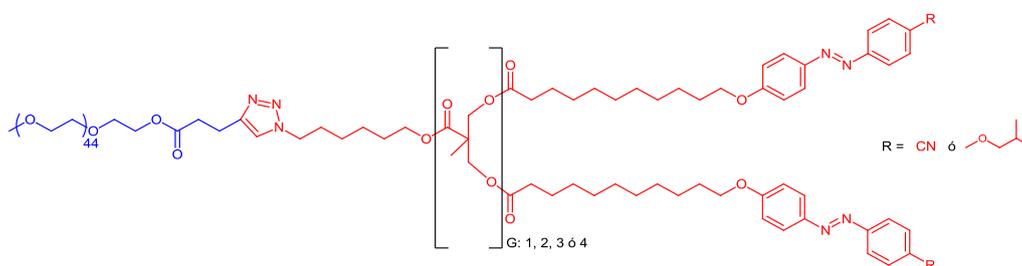
#### 1.4. Antecedentes del trabajo fin de máster

Este trabajo fin de máster es la continuación de mi trabajo fin de grado, llevado 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. En él se sintetizó un copolímero bloque anfífilo dendrítico-lineal con poli(etilenglicol) (PEG) y un dendrón de ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico (bis-MPA) de primera generación con dos unidades de 2,6-diacilaminopiridina en la periferia, en las que se introdujeron unidades azobenceno mediante tres enlaces de hidrógeno usando como base complementaria timina (Figura 1.6).



*Fig 1.6. Copolímero bloque dendrítico-lineal de primera generación unido a grupos azobenceno por puentes de hidrógeno*

Esta línea de trabajo está conectada con la experiencia del grupo de investigación en copolímeros bloque dendrítico-lineal, que hasta la realización de mi trabajo fin de grado se había circunscrito a materiales covalentes<sup>11, 12</sup> como los mostrados en la Figura 1.7.

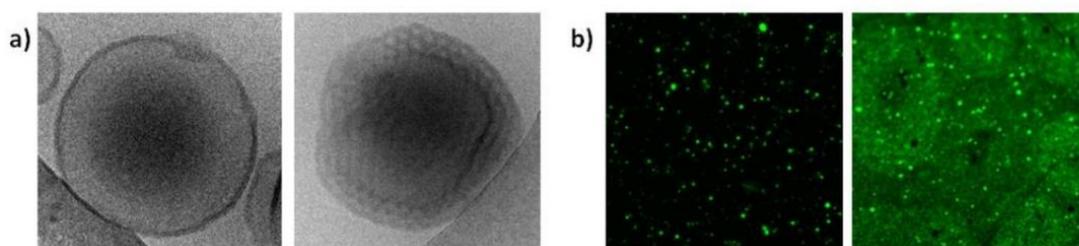


*Fig 1.7. Copolímero bloque dendrítico-lineal formado por una unidad de PEG y distintas generaciones de azodendrón*

<sup>11</sup> E. Blasco, *Tesis Doctoral*, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, **2013**.

<sup>12</sup> J. del Barrio, *Tesis Doctoral*, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, **2010**

Todos los copolímeros covalentes preparados agregaban en agua y en concreto con la cuarta generación del azodendrón (16 unidades azobenceno terminales) forman agregados de tipo vesícula. Los estudios realizados también demostraron la encapsulación de sondas fluorescentes y su posterior liberación con luz. En la Figura 1.8 se observa cómo se modifica la morfología de la vesícula cuando es irradiada y cómo esta irradiación provoca la liberación de una sonda fluorescente encapsulada en su interior (el proceso de liberación se sigue por microscopía confocal de fluorescencia). 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 1.8. 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.<sup>13</sup>

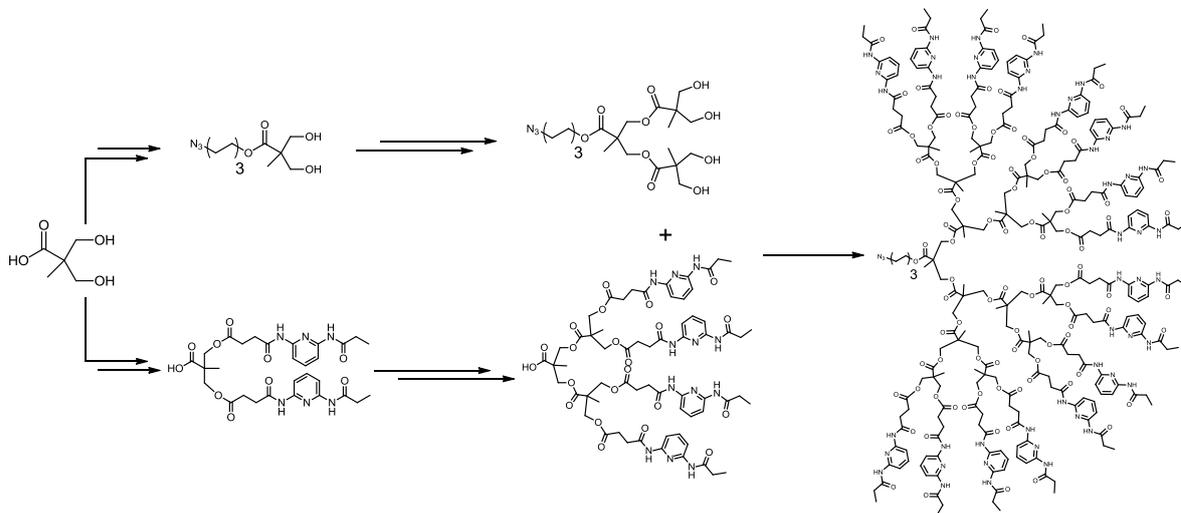
Por otra parte, en el grupo se han descrito copolímeros bloque lineal-lineal con PEG y un polimetacrilato que contiene unidades de 2,6-diacilaminopiridina (DAP) en el que también se introdujeron las unidades azobenceno mediante tres enlaces de hidrógeno usando como base complementaria timina (Figura 1.9). En este caso 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<sup>14</sup> de forma análoga a los derivados covalentes.

<sup>13</sup> E. Blasco, J. Barrio, C. Sánchez-Somolinos, M. Piñol and L. Oriol, *Polym. Chem.*, 2013, **4**, 2246-2254.

<sup>14</sup> A. Concellón, M. Piñol, L. Oriol, E. Blasco, A. Martínez-Felipe, J. C. Martínez, I. Šics, T. A. Ezquerro and A. Nogales, *Macromolecules*, 2016, **49**, 7825-7836

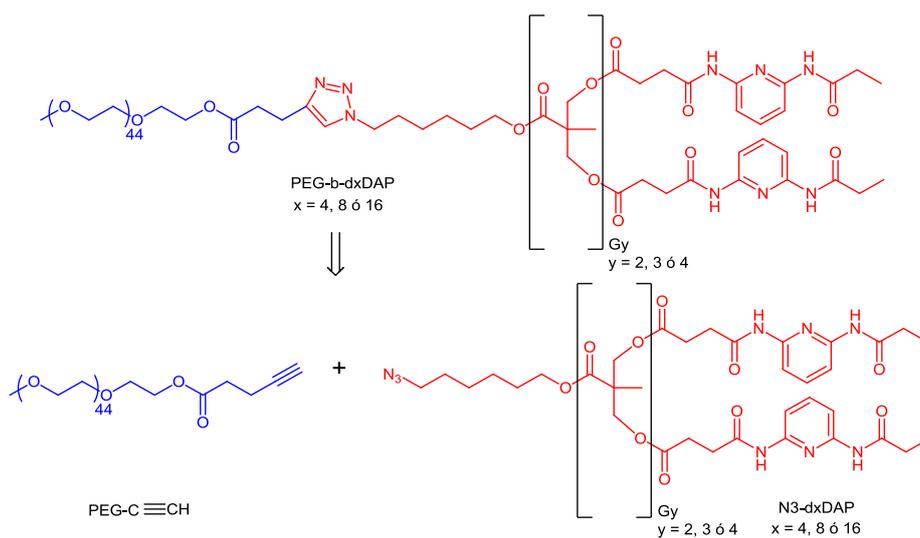


El planteamiento sintético de los dendrones se basa en una síntesis convergente “double exponential growth”<sup>15</sup> que consiste en hacer crecer el dendrón en dos direcciones, tanto en la periferia como en el punto focal para después unirlos en una etapa final (Figura 2.1).



**Fig 2.1.** Estrategia seguida para la preparación del dendrón de cuarta generación

Posteriormente el acoplamiento al bloque de PEG, con un triple enlace terminal, a los bloques derivados de bis-MPA, con una azida, se hará mediante una cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos catalizada por Cu(I) (Figura 2.2).



**Fig 2.2.** Estrategia seguida para la preparación de los copolímeros objetivo de este trabajo

<sup>15</sup> T. Kawaguchi, K. Walker, C. Wilkins and J. Moore, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 2159-2165.

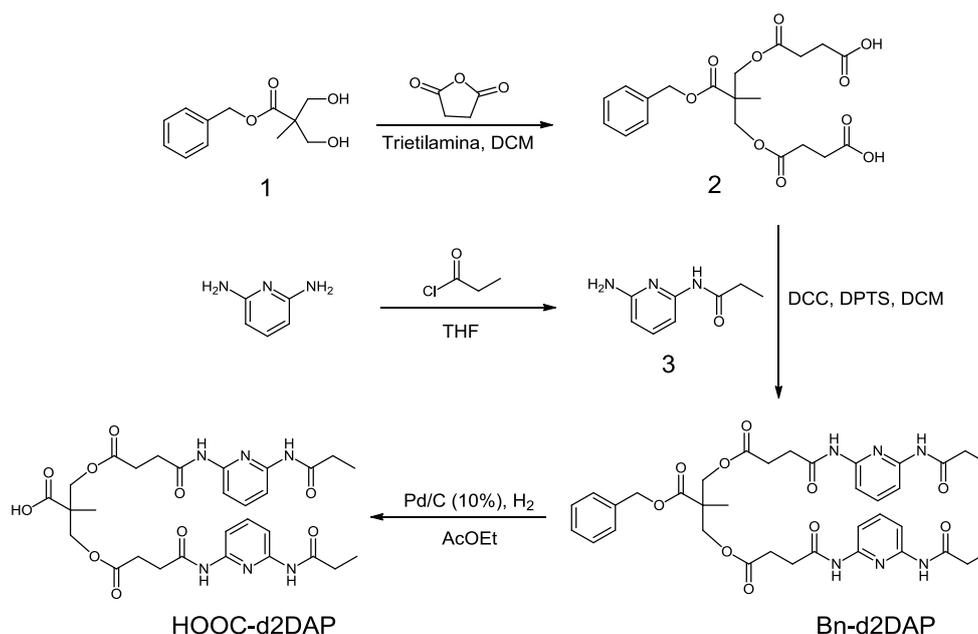
De acuerdo a esto, el planteamiento y las tareas específicas programadas para este TFM han sido las siguientes:

- Síntesis de los dendrones de segunda, tercera y cuarta generación con cuatro, ocho y dieciséis unidades de 2,6-diacilaminopiridina respectivamente.
- Síntesis de los copolímeros por acoplamiento de los dendrones 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 las azidas con unidades 2,6-diacilaminopiridina**

La síntesis de los dendrones tiene como punto de partida la molécula de bis-MPA con el grupo carboxilo protegido con un bencilo (1). La estrategia planteada consiste en funcionalizar los grupos alcohol de la molécula de bis-MPA, protegida en el extremo carboxilo, con los grupos 2,6-diacilaminopiridina que se desean en la periferia (Figura 3.1). Una vez introducidas dichas unidades, se desprotege el ácido carboxílico, de manera que este ácido sirva para la introducción de las unidades 2,6-diacilaminopiridina en las moléculas de bis-MPA funcionalizadas con el grupo azida, compuesto 4 de la Figura 3.2, e ir creciendo en generaciones con la periferia ya funcionalizada.



**Fig 3.1.** Síntesis del ácido derivado de bis-MPA con dos unidades 2,6-diacilaminopiridina

La síntesis del compuesto de partida 2,2-bis(hidroximetil)propanoato de bencilo (1) no fue necesaria ya que se disponía de él en el grupo de investigación. Para la introducción de los grupos 2,6-diacilaminopiridina fue necesario introducir primero el conector succínico en los grupos alcohol, según un procedimiento similar descrito<sup>16</sup>, y posteriormente hacer reaccionar este diácido (2) con 2-propanoilamino-6-aminopiridina (3), obtenida a partir de la reacción de 2,6-diaminopiridina con cloruro de etanoilo mediante un procedimiento previamente descrito<sup>17,18</sup>. Si se introduce primero el conector succínico en la 2-propanoilamino-6-aminopiridina (3), para después esterificar los grupos alcohol del dendrón, se observa la formación de una succinimida.

Una vez introducidos los grupos 2,6-diacilaminopiridina, el último paso fue desproteger el grupo bencilo mediante una hidrogenación con paladio soportado sobre carbono, dejando de esta manera el ácido carboxílico libre para la posterior funcionalización de los grupos alcohol presentes dendrones derivados de bis-MPA con grupos azida en el punto focal (4 ó 6, véase figuras 3.2 y 3.3). A partir de este punto se pueden hacer crecer en generaciones tanto el ácido con dos unidades de 2,6-diacilaminopiridina (HOOC-

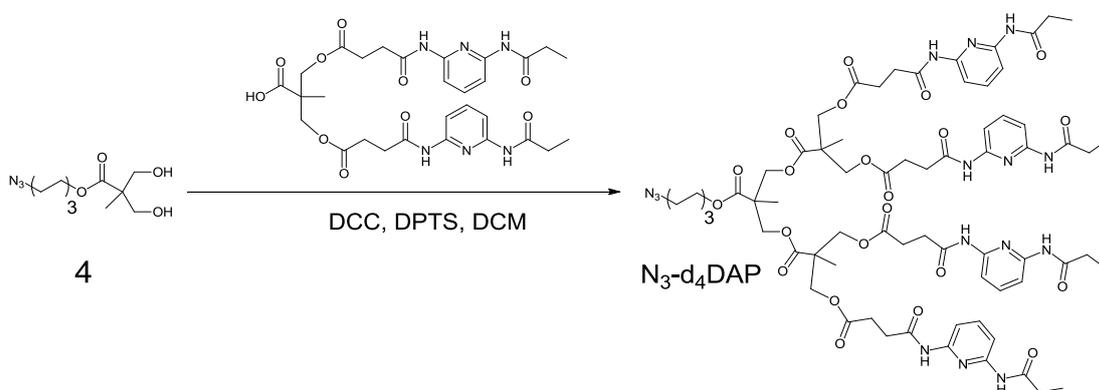
<sup>16</sup> S. Olivier, L. Derue, B. Geffroy, T. Maindrón and E. Ishow, *J. Mater. Chem. C*, 2015, **3**, 8403-8412.

<sup>17</sup> A. Concellón, *Trabajo Fin de Máster*, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, **2013**

<sup>18</sup> V. Nandwana, B. Fitzpatrick, Q. Liu, K. Solntsev, X. Yu, G. Tonga, S. Eymur, M. Tonga, G. Cooke and V. Rotello, *Polym. Chem.*, **2012**, **3**, 3072-3076

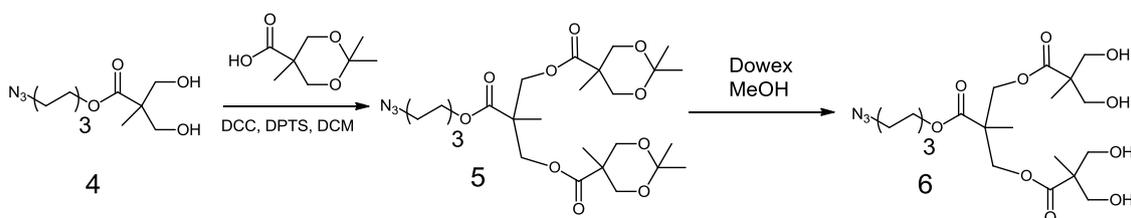
d2DAP) o la molécula de bis-MPA funcionalizada con azida (4), obteniendo con distintas combinaciones los diferentes dendrones deseados.

Para la síntesis del caso más simple, la azida de segunda generación con cuatro unidades 2,6-diacilaminopiridina ( $N_3$ -d4DAP), basta con hacer reaccionar los dos precursores de primera generación (Figura 3.2). La azida de primera generación no fue necesario sintetizarla, ya que fue sintetizada previamente en el grupo de investigación. Esta reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente mediante procedimiento de esterificación previamente descrito<sup>12</sup>.

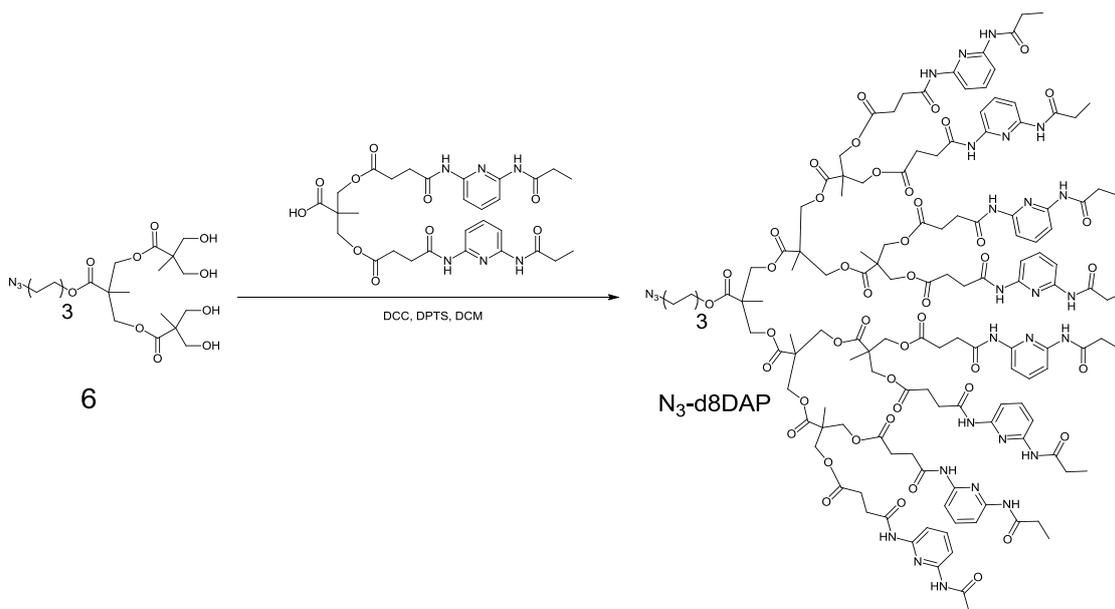


**Fig 3.2.** Síntesis de la azida derivada de bis-MPA con cuatro unidades 2,6-diacilaminopiridina

Posteriormente, para la obtención de la azida de tercera generación con ocho unidades 2,6-diacilaminopiridina en la periferia, se hizo crecer una generación la azida derivada de bis-MPA (4) por reacción con ácido bis-MPA con los grupos hidroxilo protegidos y posterior desprotección del acetal con resina ácida Dowex para dar el dendrón 6, tal y como se muestra en la Figura 3.3. Posteriormente se funcionalizaron los cuatro grupos hidroxilo con el ácido de primera generación (HOOC-d2DAP) (Figura 3.4).



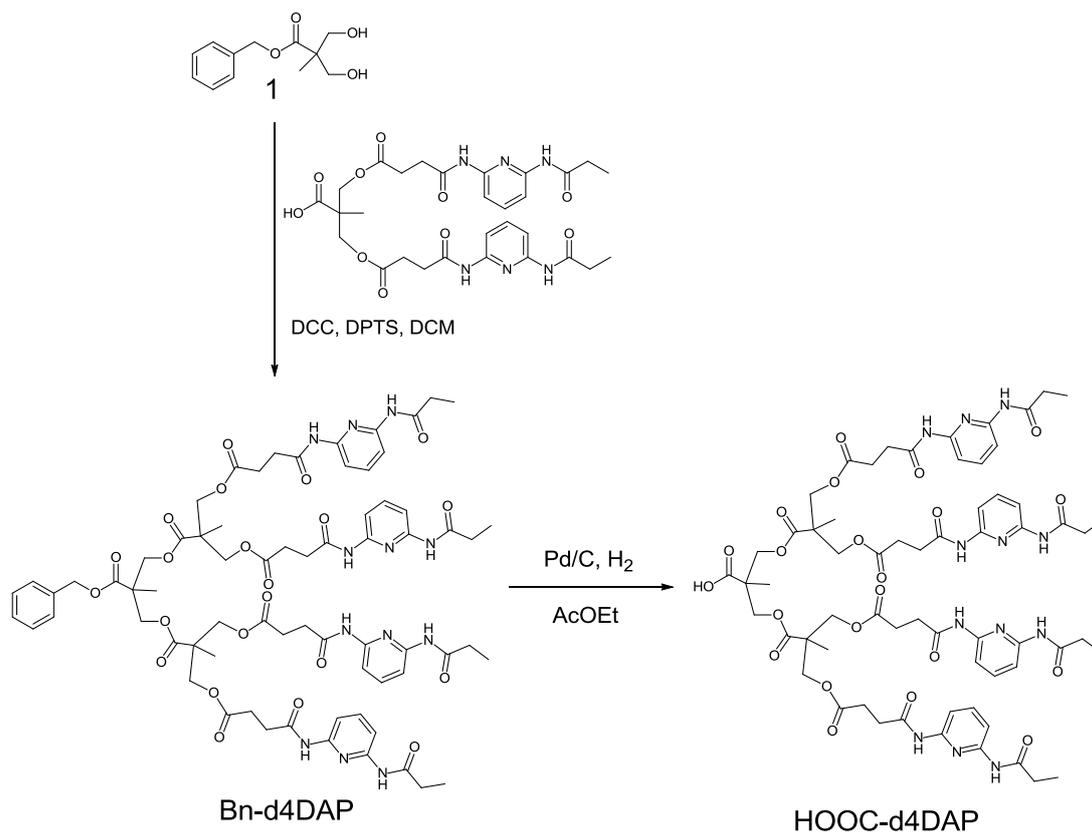
**Fig 3.3.** Síntesis de la azida derivada de bis-MPA de segunda generación



**Fig 3.4.** Síntesis de la azida derivada de bis-MPA con ocho unidades 2,6-diacilaminopiridina

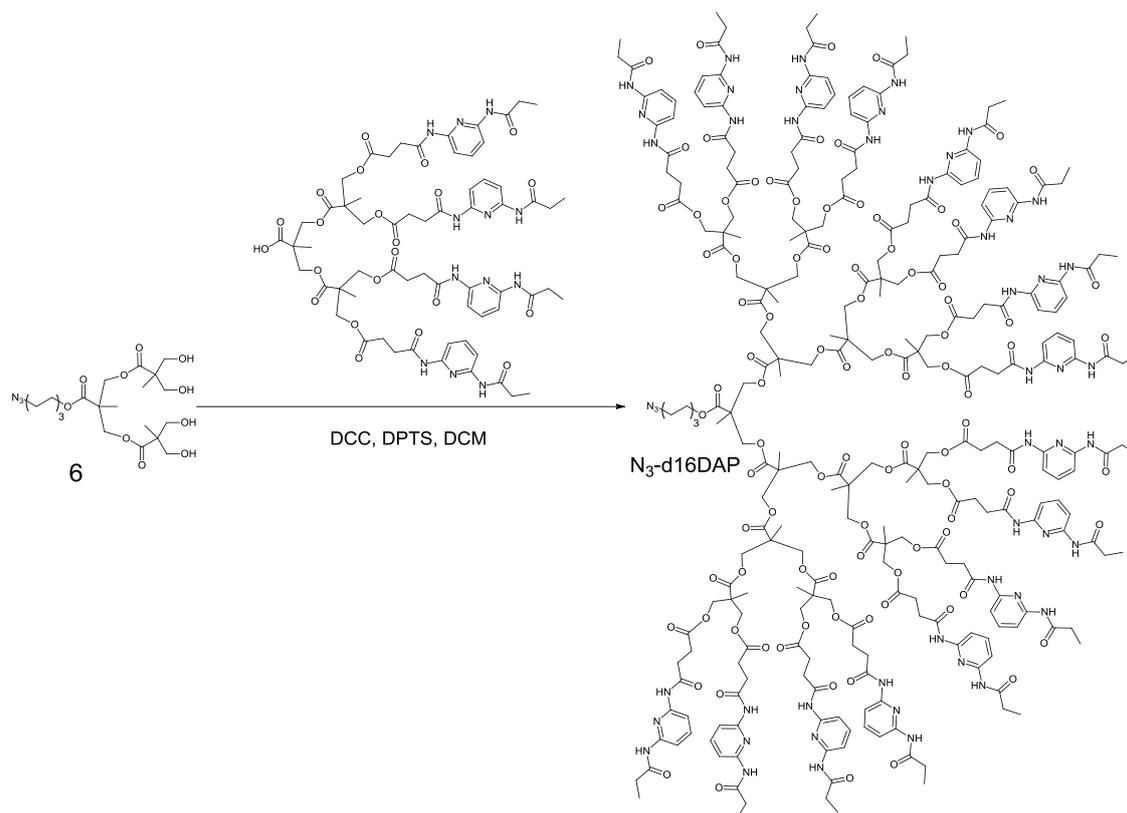
En este caso, la reacción se llevó a cabo mediante el mismo procedimiento de esterificación, pero calentando a 40 °C para favorecer al máximo la esterificación de todos los grupos alcohol. La reacción se siguió por espectrometría de masas hasta comprobar que el producto perseguido  $N_3$ -d8DAP era el único presente en la mezcla de reacción y no se observaban señales correspondientes a esterificación parcial del dendrón **6**.

Finalmente, para la obtención de la azida de cuarta generación con dieciséis unidades 2,6-diacilaminopiridina, se obtuvo inicialmente el ácido  $HOOC$ -d4DAP que se muestra en la Figura 3.5 para hacerlo reaccionar con la azida de segunda generación derivada de bis-MPA (**6**) con cuatro grupos alcohol en la periferia (Figura 3.6).



**Fig 3.5.** Síntesis del ácido derivado de bis-MPA con cuatro unidades 2,6-diacilaminopiridina

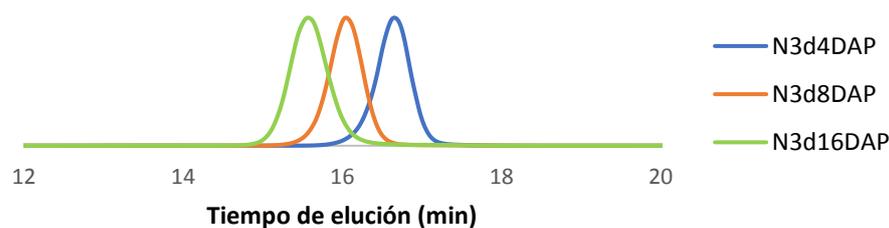
La esterificación inicial en la obtención del ácido HOOC-d4DAP se llevó a cabo a temperatura ambiente con el éster bencílico del ácido bis-MPA para evitar de nuevo posibles reacciones laterales que den lugar a polímeros hiperramificados. Posteriormente se desprotegió el grupo carboxilo utilizando paladio soportado sobre carbono como en el caso del ácido de primera generación (HOOC-d2DAP).



**Fig 3.6.** Síntesis de la azida derivada de bis-MPA con dieciséis unidades 2,6-diacilaminopiridina

La reacción de esterificación para obtener  $N_3$ -d16DAP también se llevó a cabo a 40 °C para favorecer al máximo la sustitución total de los cuatro grupos alcohol y se siguió por espectrometría de masas hasta observar que los productos di- o triesterificados eran minoritarios, aunque no se llegó a observar la total desaparición añadiendo un mayor exceso de ácido al crudo de reacción, por lo que fue necesario eliminarlos al purificar.

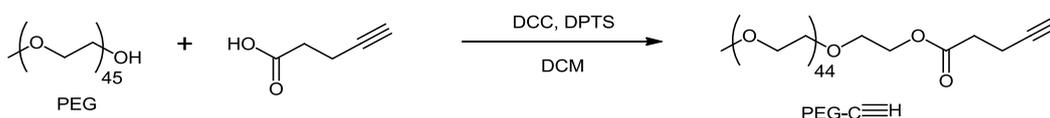
Estas tres azidas han sido caracterizadas por espectroscopía de  $^1\text{H}$ -RMN, FTIR y espectrometría de masas (MALDI) (véase *Apartados B y E en Anexos*). Posteriormente también se hizo un análisis de cromatografía de permeación en gel (GPC) donde pudo observarse un desplazamiento a tiempos menores de elución conforme aumentamos en la generación (Figura 3.7), lo que está de acuerdo a una menor retención de la molécula en la columna de exclusión debido a un mayor tamaño. Puede verse además que los picos son simétricos y que no hay hombros ni colas debidos a impurezas que pudiesen quedar en los productos.



**Fig 3.7.** *Curvas de GPC de las azidas obtenidas*

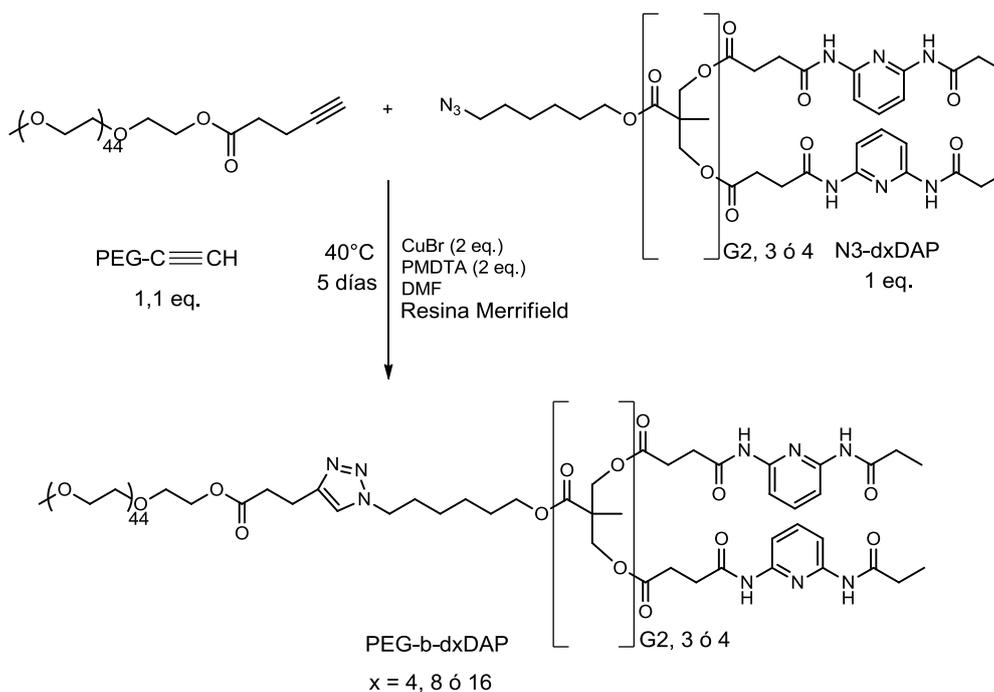
### 3.2. Preparación y caracterización de los copolímeros bloque con unidades 2,6-diacilaminopiridina.

Los copolímeros finales se obtienen por una cicloadición 1,3-dipolar azida-alquino catalizada por Cu(I) a partir de las azidas N<sub>3</sub>-d4DAP, N<sub>3</sub>-d8DAP y N<sub>3</sub>-d16DAP (bloques dendríticos) y polietilenglicol (bloque lineal) con un grupo alquino terminal (PEG-C≡CH) (Figura 3.9). El polietilenglicol usado tiene una masa molar promedio de aproximadamente 2000 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 (Figura 3.8).



**Fig 3.8.** *Funcionalización de PEG con ácido pentínico*

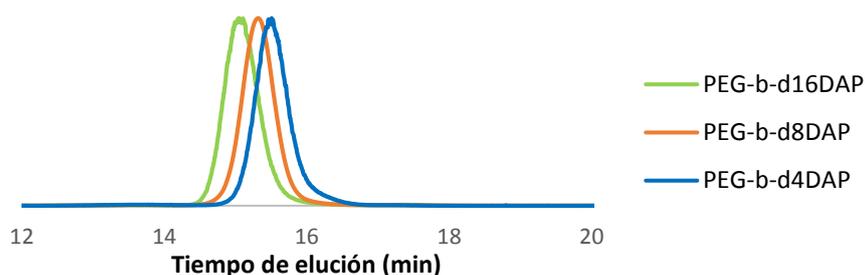
Las reacciones de acoplamiento se llevaron a cabo según un procedimiento previamente descrito<sup>5</sup>, en DMF a 40°C durante 3 días, utilizando CuBr y PMDTA como agente quelante, ambos en un exceso de 2 moles respecto a la azida. La reacción también se hizo con un exceso de alquino frente a la azida, aproximadamente 10 % molar, para favorecer al máximo el acoplamiento.



**Fig 3.9.** Reacción de acoplamiento y obtención de los copolímeros finales PEG-b-d4DAP, PEG-b-d8DAP y PEG-b-d16DAP

De acuerdo a la experiencia previa con el copolímero de primera generación, el exceso de PEG-C≡CH se eliminó utilizando resina Merrifield funcionalizada con azida, ya que por precipitación en metanol no es posible debido a la solubilidad que presentan los copolímeros sintetizados en este disolvente. Dada la solubilidad del PEG en metanol, suele ser la forma más sencilla de obtener copolímeros bloque por esta metodología, si bien el uso de resinas Merrifield que capturen el exceso utilizado, es una metodología sencilla que permite obtener los copolímeros bloque con una estructura precisa, y exentos de impurezas, con relativa facilidad.

Los tres copolímeros han sido caracterizados por espectroscopía de <sup>1</sup>H-RMN, FTIR, espectrometría de masas (MALDI) (véase *Apartados B y E en Anexos*) y cromatografía de permeación en gel (GPC). Los resultados espectroscópicos obtenidos confirman la estructura prevista y no se observan señales que puedan ser debidas a azidas o alquinos residuales que pudieran haber quedado sin reaccionar. Por GPC pudo observarse, como para el caso de las azidas, un desplazamiento a tiempos menores de elución conforme crece la generación de los dendrones que forman el copolímero bloque (Figura 3.9). En este caso también puede verse que los picos son simétricos y que no hay hombros ni colas que también corrobora que no hay restos de bloques que pudieran haber quedado sin reaccionar.

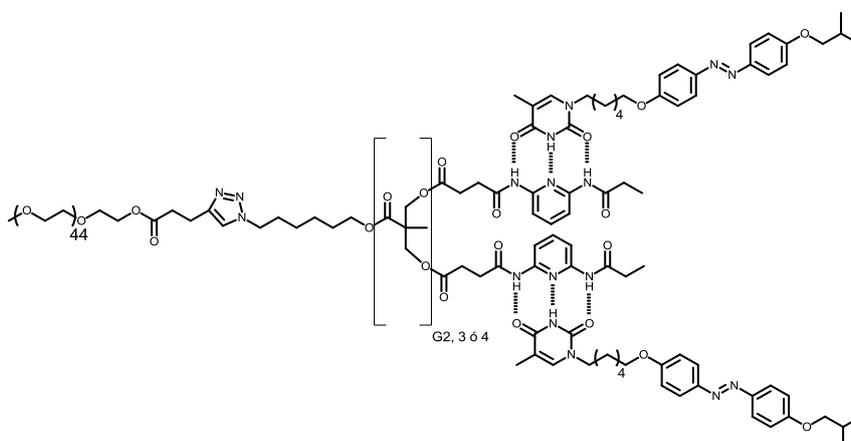


**Fig 3.10.** Curvas de GPC de los copolímeros obtenidos

### 3.3. Preparación y caracterización de los copolímeros bloque supramoleculares

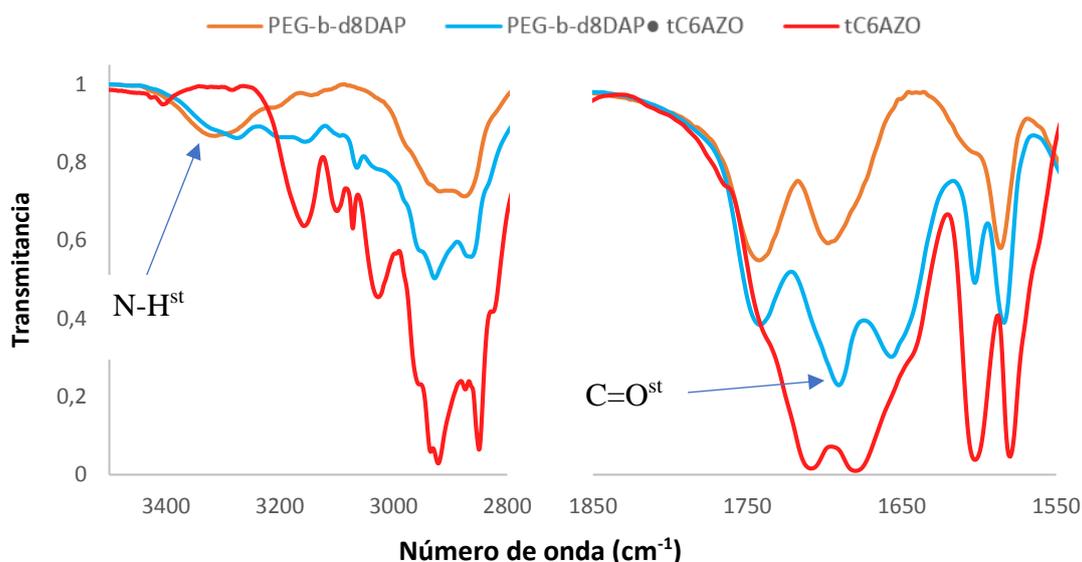
Una vez obtenidos los copolímeros con las unidades de 2,6-diacilaminopiridina, se procedió a la preparación los correspondientes copolímeros bloque supramoleculares utilizando un derivado de timina (**tC6AZO**) que contiene azobenceno, el cual fue sintetizado previamente en el grupo de investigación.

El método de preparación se basa en la disolución de los componentes a partir de los cuales se va a formar el compuesto deseado y la posterior evaporación progresiva del disolvente. Dado que la masa molecular del copolímero bloque es promedio (si bien la dispersidad es muy baja y debida al PEG), para asegurar que no hay exceso de azobenceno se añade un 95 % sobre el calculado estequiométricamente considerando un grado de polimerización promedio del PEG de 45 (obsérvese que el bloque de PEG tiene cierta dispersidad por lo que se toma esta precaución de añadir 95% sobre la estequiometría promedio). Para la preparación de ambas mezclas se utilizó como disolvente THF, ya que es un disolvente común a ambos compuestos.



**Fig 3.11.** Copolímeros supramoleculares preparados en este trabajo PEG-b-d4DAP•tC6AZO, PEG-b-d8DAP•tC6AZO y PEG-b-d16DAP•tC6AZO

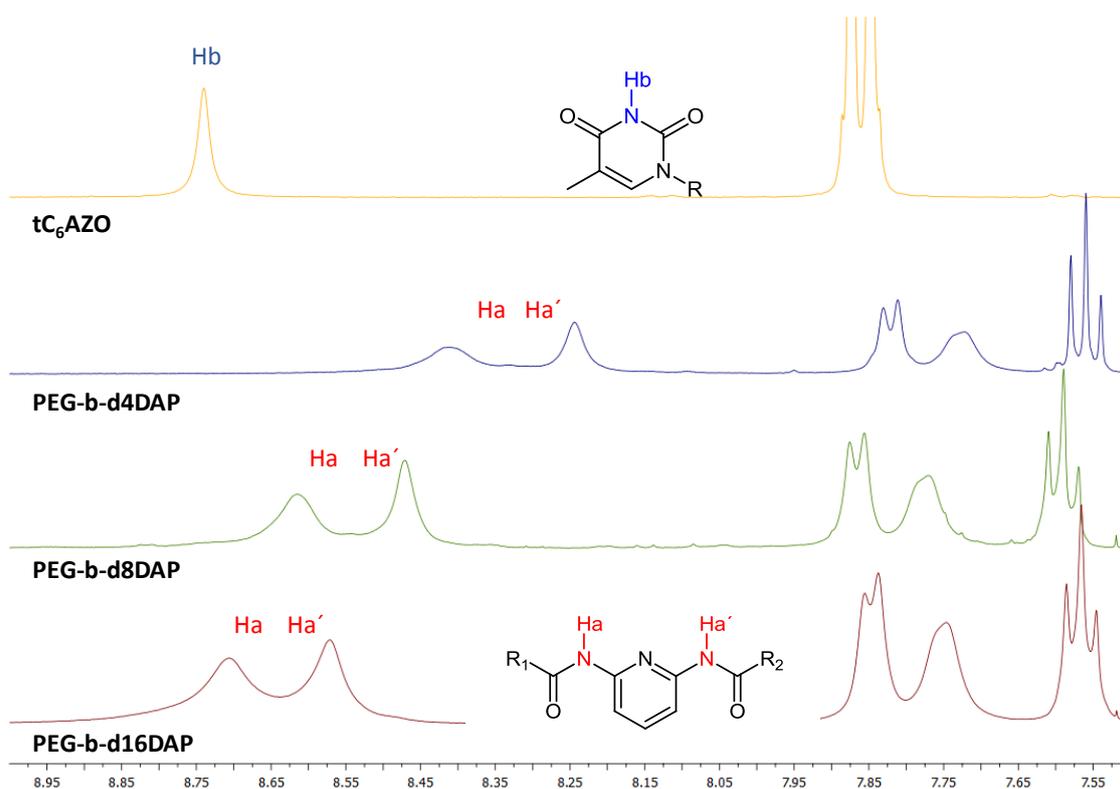
La formación de los polímeros supramoleculares se estudió mediante espectroscopía  $^1\text{H}$ -RMN y FTIR (véase *Apartado B en Anexos*). Utilizando como ejemplo el copolímero de tercera generación, puede verse en los espectros de FTIR (Figura 3.12) del copolímero de tercera generación (PEG-*b*-d8DAP), el respectivo copolímero supramolecular (PEG-*b*-d8DAP•tC<sub>6</sub>AZO) y el derivado de timina (tC<sub>6</sub>AZO), que las bandas correspondientes a la vibración N-H<sup>st</sup> de los enlaces amida del copolímero y las bandas de tensión C=O<sup>st</sup> de los carbonilos de la timina del compuesto tC<sub>6</sub>AZO varían al formar los enlaces de hidrógeno. Inicialmente, las bandas N-H<sup>st</sup> de los enlaces amida aparecen en torno a 3310 cm<sup>-1</sup> y las de tensión C=O<sup>st</sup> de los carbonilos de la timina en torno a 1705 cm<sup>-1</sup>, mientras que en el copolímero supramolecular estas bandas se debilitan apareciendo a números de onda más bajos, en torno a 3260 y 1690 cm<sup>-1</sup> respectivamente, debido a la formación de los enlaces de hidrógeno.



**Fig 3.12.** Espectros de FTIR de las señales de vibración N-H<sup>st</sup> y de C=O<sup>st</sup> del copolímero bloque, el derivado de azobenceno y el copolímero bloque supramolecular formado por reconocimiento molecular de los anteriores.

Por  $^1\text{H}$ -RMN, en este caso en disolución utilizando como disolvente CDCl<sub>3</sub>, también se observa un desplazamiento de las señales de los protones enlazados a los nitrógenos de la unidad 2,6-diacilaminopiridina y a la unidad timina. Antes de formar los enlaces de hidrógeno, el protón de la unidad timina aparece a 8.75 ppm, mientras que los protones de la unidad 2,6-diacilaminopiridina varían según la generación del dendrón desde 8.35 ppm para copolímero de segunda generación hasta 8.65 ppm para el copolímero de

cuarta generación (Figura 3.13). Este hecho puede deberse a una mayor interacción entre las unidades 2,6-diacilaminopiridina conforme aumenta la generación del dendrón. Hay que tener en cuenta que las unidades de 2,6-diacilaminopiridina pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí de manera que al interaccionar estos protones se ven más desapantallados desplazándose a mayores valores de desplazamiento químico.

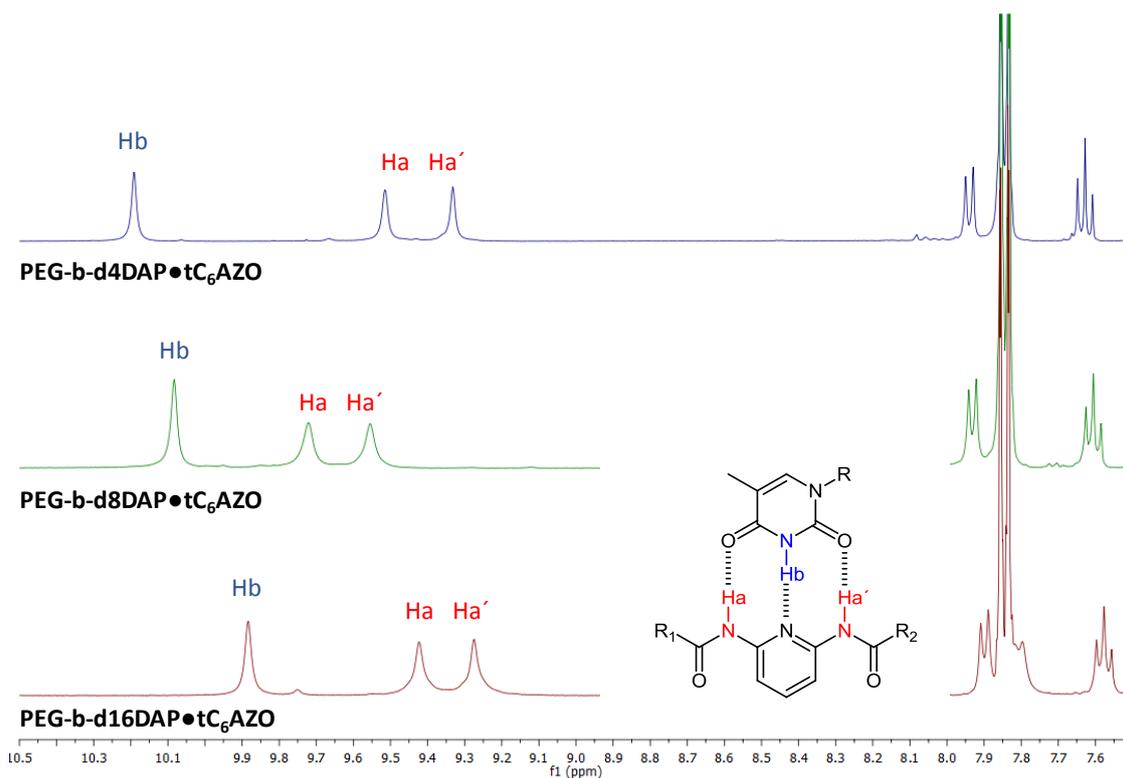


**Fig 3.13.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de los protones de las unidades timina y 2,6-diacilaminopiridina en el derivado de azobenceno y copolímeros bloque antes de la formación de los copolímeros bloque supramoleculares

Al formar los enlaces de hidrógeno en los copolímeros bloque supramoleculares, la señal del protón (marcado como Hb) de la unidad timina se desplaza a mayores valores de desplazamiento químico, pero este desplazamiento también varía en función de la generación del dendrón supramolecular formado como se observa en la Figura 3.14. Como se puede ver, para el caso del copolímero de segunda generación el desplazamiento (con respecto a 8.75, que era la posición que tenía antes de formar el sistema supramolecular) es mayor, llegando hasta 10.2 ppm, mientras que para el caso del copolímero de tercera y cuarta generación llega a valores de 10.1 y 9.9 ppm respectivamente. Esto de alguna manera parece apuntar a que al aumentar la generación

del dendrón esta interacción no es tan fuerte, posiblemente por los impedimentos estéricos que resultan de una mayor densidad de grupos periféricos reaccionantes.

Por otro lado, los protones de las unidades 2,6-diacilaminopiridina también se desplazan a valores de desplazamiento químico mayores, aunque en este caso las señales que más se desplazan son las del copolímero de tercera generación en torno a 9.65 ppm, mientras que las señales de los copolímeros de segunda y cuarta generación aparecen en torno a 9.35 ppm. Aunque las señales del copolímero de tercera generación se desplazan a mayor desplazamiento químico, la diferencia de desplazamiento con respecto a la posición de las señales antes de formar los copolímeros bloque supramoleculares con azobenceno tiene un valor aproximado de 1.1 ppm para los copolímeros de segunda y tercera generación, mientras que para el copolímero de cuarta generación tiene un valor aproximado de 0.7 ppm. Es decir, se desplazan aproximadamente lo mismo para segunda y tercera, y menos para la cuarta generación. Un mayor desplazamiento en las señales de nuevo nos indica una mayor interacción entre las unidades y por tanto una mayor fortaleza de los enlaces de hidrógeno. El menor desplazamiento para la cuarta generación de nuevo puede asignarse al mayor impedimento estérico al aumentar el número unidades en la periferia. Cabe comentar también que las señales debidas a los protones aromáticos del anillo piridina también sufren desplazamientos, aunque con valores bastante más pequeños. No obstante, y en todos los casos, hay que resaltar que se produce de forma efectiva el recocimiento molecular entre unidades de 2,6-diacilaminopiridina-timina.



**Fig 3.14.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de los protones implicados los enlaces de hidrógeno de los copolímeros bloque supramoleculares

### 3.4. Caracterización térmica

Las transiciones y la estabilidad térmica de los materiales preparados se estudiaron mediante calorimetría diferencial de barrido (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*). Por termogravimetría se observa que tanto las azidas como los copolímeros son estables hasta temperaturas aproximadas de  $200^\circ\text{C}$ , con alguna pérdida de volátiles registrada previa en algunos de ellos.

**Tabla 3.1.** Estabilidad y transiciones térmicas de los materiales preparados

	TGA <sup>1</sup>			DSC <sup>2</sup>	
	2 % (°C)	5% (°C)	Tonset (°C)	Tg (°C)	Tm <sub>1</sub> /Tm <sub>2</sub> (°C)
<b>N<sub>3</sub>-d4DAP</b>	144	206	238	30	-
<b>N<sub>3</sub>-d8DAP</b>	215	239	249	71	-
<b>N<sub>3</sub>-d16DAP</b>	194	245	253	73	-
<b>PEG-<i>b</i>-d4DAP</b>	229	249	241	-	42
<b>PEG-<i>b</i>-d8DAP</b>	146	247	263	-9	-
<b>PEG-<i>b</i>-d16DAP</b>	132	226	256	-8	-
<b>PEG-<i>b</i>-d4DAP•tC<sub>6</sub>AZO</b>	211	269	272	-	38/163
<b>PEG-<i>b</i>-d8DAP•tC<sub>6</sub>AZO</b>	177	238	253	2	-/166
<b>PEG-<i>b</i>-d16DAP•tC<sub>6</sub>AZO</b>	213	247	252	18	-/170

<sup>1</sup> 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.

<sup>2</sup> Resultados de calorimetría diferencial de barrido (DSC) con velocidad de barrido de 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, las azidas N<sub>3</sub>-d4DAP, N<sub>3</sub>-d8DAP y N<sub>3</sub>-d16DAP (en el segundo barrido) se comportan como un material amorfo, cuya transición vítrea (Tg) se produce a 30, 71 y 73 °C conforme crece la generación (Figuras D.1, D.2 y D.3 *Apartado D en Anexos*). Por otro lado, los copolímeros PEG-*b*-d4DAP, PEG-*b*-d8DAP y PEG-*b*-d16DAP, en el primer barrido, presentan una transición a unos 40°C que se corresponde con la fusión del bloque de PEG (Figuras D.4, D.5.1 y D.6.1 *Apartado D en Anexos*). Sin embargo, cuando se realiza el segundo barrido en los copolímeros de tercera y cuarta generación (Figuras D.5.2 y D.6.2 *Apartado D en Anexos*), esta transición ya no está presente y se observa una única transición vítrea a -10°C aproximadamente, lo que indica que ambos bloques son miscibles, hecho que se observó también en el análogo lineal-lineal sintetizado anteriormente<sup>19</sup>. Para corroborar que no había una segunda transición debida al bloque dendrítico, se hizo un DSC llegando hasta 150°C y se vio que efectivamente no estaba presente (Figuras D.6.3 y D.6.4 *Apartado D en Anexos*). Sin embargo, en copolímero de

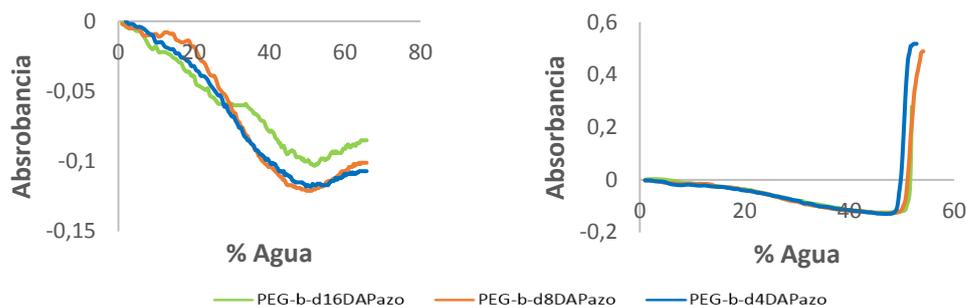
<sup>19</sup> A. Concellón, M. Piñol, L. Oriol, R. Clavería-Gimeno, O. Abian and A. Velázquez-Campoy, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 24066-24075

segunda generación sí que se observa en el segundo barrido una fusión en torno a 40°C. El hecho de que este comportamiento lo presenten únicamente los copolímeros de tercera y cuarta generación, puede ser debido a que en estos últimos el bloque dendrítico es mayor, mientras que en el primero el bloque de PEG es mayoritario y por eso presente unas propiedades más similares a las del PEG. Finalmente, en los copolímeros supramoleculares se produce una clara modificación en el comportamiento térmico. Por un lado, en el copolímero PEG-*b*-d4DAP•tC<sub>6</sub>AZO, en el segundo barrido se sigue observando una transición debida a la fusión del bloque de PEG alrededor de los 40°C, pero aparece una nueva transición a 163°C debida a la fusión de la parte enlazada al bloque dendrítico (Figura D.7 *Apartado D en Anexos*). Para el copolímero PEG-*b*-d8DAP•tC<sub>6</sub>AZO, la T<sub>g</sub> se observa a 2°C, aparece una cristalización a 82°C y una transición a 166°C debida a la fusión de la parte enlazada al bloque dendrítico (Figura D.8 *Apartado D en Anexos*). Para el copolímero PEG-*b*-d16DAP•tC<sub>6</sub>AZO, en el segundo barrido se observa una T<sub>g</sub> a 18°C, una cristalización a 97°C y la fusión de la parte enlazada al bloque dendrítico a 170°C (Figuras D.9.1 y D.9.2 *Apartado D en Anexos*). En definitiva, los copolímeros de tercera y cuarta, se comportan como materiales con poca tendencia a cristalizar, lo hacen cuando se calienta por encima de T<sub>g</sub> y en ese caso solo se observa una fusión debida al complejo supramolecular formado.

### 3.5. Preparación de autoensablados en agua

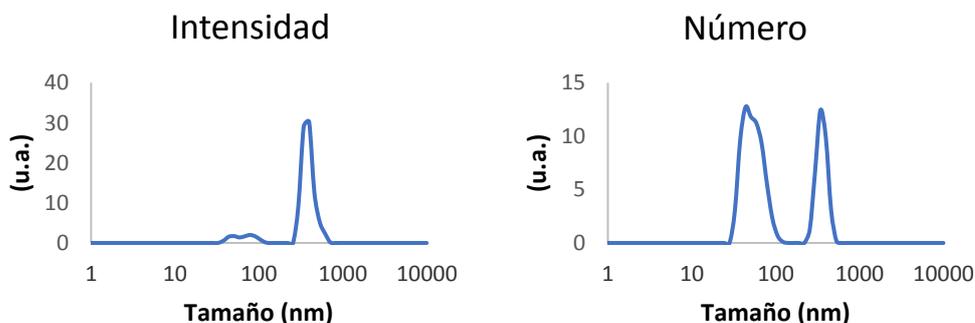
Los agregados poliméricos se prepararon mediante el método de cosolventes o nanoprecipitación. Dicho método consiste en disolver el polímero en un buen disolvente orgánico tanto para el bloque hidrófobo como para el hidrófilo y miscible con agua, en este caso THF, e ir añadiendo lentamente agua hasta 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 al ir añadiendo agua, la turbidez de la disolución se modifica. En general, si partimos de una disolución completa (que no dispersa luz) la agregación provoca una mayor dispersión de la luz y aparentemente un aumento de la absorbancia. En la Figura 3.15 se muestra la evolución de la absorbancia al ir añadiendo agua para los diferentes copolímeros obtenidos. La bajada de absorbancia en los copolímeros iniciales puede ser debida a que

inicialmente hay una cierta agregación en THF que rompe el agua añadida y hay una evolución de agregados hasta que se forman agregados estables. En el caso de los copolímeros bloque supramoleculares se observa la evolución esperada y en un porcentaje determinado se produce un salto consecuencia de la agregación. No obstante, estos agregados no fueron estables y finalmente se formó un precipitado debido al azobenceno.



**Fig 3.15.** Curvas turbidimétricas observadas en la preparación de autoensamblados de los copolímeros bloque antes de su modificación con azobenceno (izquierda) y tras la modificación (derecha)

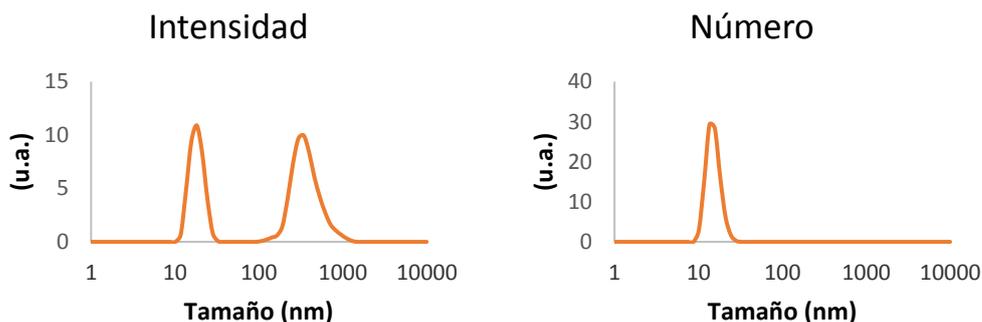
Una vez preparados los agregados, las muestras se dializaron para eliminar el THF de las mismas, y tras dializar se midió el tamaño de los agregados por DLS (Dynamic Light Scattering). En esta técnica se mide la intensidad de la dispersión de luz de las nanopartículas presentes en la muestra, de manera que a mayor diámetro de partícula mayor dispersión de luz y por tanto mayor intensidad. Como este valor no sirve para cuantificar la cantidad de nanopartículas con un tamaño dado debido a la mayor dispersión de luz por parte de las partículas más grandes, se hace un tratamiento matemático por el cual obtenemos el tamaño de las nanopartículas en función del número de nanopartículas con dicho tamaño. Los datos obtenidos para los agregados del copolímero de segunda generación **PEG-b-d4DAP** se muestran en la Figura 3.16.



**Fig 3.16.** Funciones de DLS en intensidad y en número obtenidas para el copolímero PEG-b-d4DAP

Como puede verse se obtienen dos distribuciones de tamaño diferentes que se encuentran en torno a los 60 y 350 nm. En este segundo caso parece ser asignable a la agregación de las propias micelas. No obstante, en la zona en torno a 60 nm el pico no es simétrico y se ve más de una contribución, lo que también parece indicar agregación micelar si bien de menor tamaño que la observada en la zona de 350 nm.

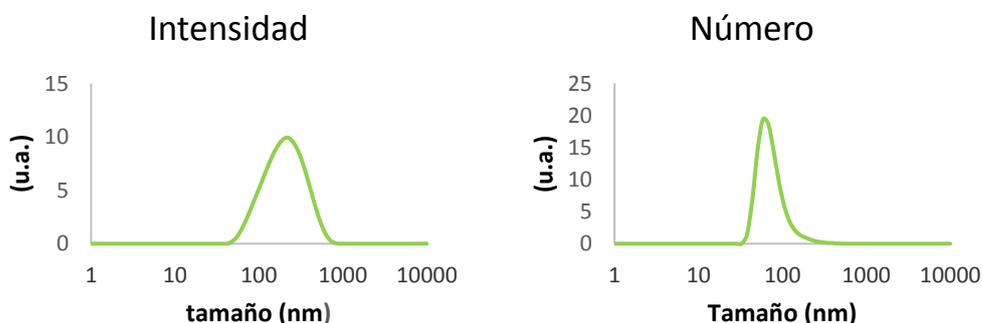
Para el copolímero de tercera generación **PEG-*b*-d8DAP** los datos obtenidos se muestran en la Figura 3.17.



**Fig 3.17.** Funciones de DLS en intensidad y en número obtenidas para el copolímero PEG-*b*-d8DAP

En este caso con los valores de intensidad se obtienen de nuevo dos distribuciones de tamaño en torno a 18 y 340 nm, pero para los valores en número únicamente se obtiene una distribución en torno a 16 nm, lo que nos indica que las nanopartículas de este tamaño son predominantes en la muestra y que apenas hay partículas con un tamaño de 340 nm. O dicho de otro modo, no hay prácticamente agregación de micelas.

Finalmente para el copolímero de cuarta generación **PEG-*b*-d16DAP**, los datos obtenidos se muestran en la figura 3.18.

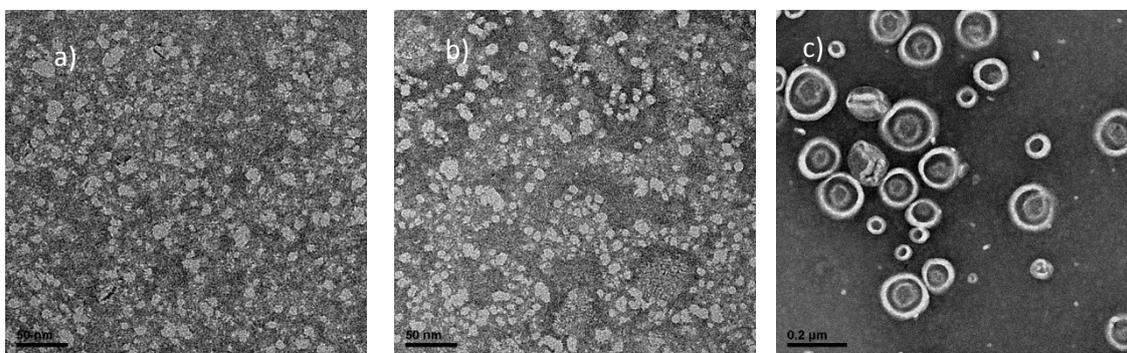


**Fig 3.18.** Funciones de DLS en intensidad y en número obtenidas para el copolímero PEG-*b*-d16DAP

En este caso aparentemente se obtiene una distribución ancha para el caso de intensidad y una distribución de menor anchura para el caso en números de 250 nm y 70 nm

respectivamente. Este resultado puede ser debido a una dispersidad de tamaños o algunos agregados que contribuyen a la intensidad, pero no a la curva en número, donde predominan los agregados con un tamaño de 70 nm.

Posteriormente las nanopartículas obtenidas fueron observadas por microscopía atómica de transmisión (TEM). Para ello, se depositaron las muestras sobre rejillas de cobre recubiertas con una película de carbono, se tiñeron utilizando acetato de uranilo como agente de contraste y posteriormente se secaron. Los agregados encontrados fueron micelas para el caso de los copolímeros PEG-*b*-d4DAP y PEG-*b*-d8DAP y vesículas para el copolímero PEG-*b*-d16DAP, algunas de las imágenes obtenidas se muestran en la Figura 3.19.



**Fig 3.19.** Imágenes de TEM de los agregados formados por los copolímeros PEG-*b*-d4DAP(a), PEG-*b*-d8DAP(b) y PEG-*b*-d16DAP(c)

Las imágenes obtenidas para el copolímero bloque **PEG-*b*-d4DAP** se muestran en la *Figura E.1 del Apartado E en Anexos*. Como puede verse en las imágenes se obtuvieron nanopartículas de tipo micela con una forma irregular y de un tamaño entre 10 y 20 nm, siendo mayoritarias las que miden unos 15 nm. Por otro lado también se ven partículas de tamaños bastante grandes que oscilan entre los 50 y los 150 nm aproximadamente como se veía por DLS, que posiblemente sean debidas a la agregación.

Las imágenes obtenidas para el copolímero **PEG-*b*-d8DAP** se muestran en la *Figura E.2 del Apartado E en Anexos*. En este caso también se obtuvieron nanopartículas del tipo micela con un tamaño de unos 10 nm, en este caso más esféricas y regulares que las formadas con el copolímero de segunda generación. El tamaño encontrado concuerda bien con los resultados obtenidos por DLS.

Las imágenes obtenidas para el copolímero **PEG-*b*-d16DAP** se muestran en la *Figura E.3 del Apartado E en Anexos*. Para este copolímero las nanopartículas obtenidas son del tipo vesícula con un tamaño que oscila entre los 70 a los 240 nm, las más grandes, que está de acuerdo con los datos obtenidos por DLS. Aunque los tamaños sean dispersos el tamaño de lo que parece constituir las paredes de estos agregados, es similar en todos los casos (independiente del diámetro) y se sitúa en torno a 25 nm.

Aunque los los copolímeros bloque supramoleculares precipitaron, se cogió una fracción de sobrenante de cada muestra y se observaron por TEM también. En el caso del copolímero **PEG-*b*-d4DAP•tC<sub>6</sub>AZO** se muestran en la *Figura E.4 del Apartado E en Anexos*. Los agregados formados son del tipo micela y en este caso se ven morfologías mas regulares y de un tamaño de unos 20 nm que pueden ser debidos al autoensamblado del copolímero, mientras que lo que precipitó fue el tC<sub>6</sub>AZO ya que no hay un cambio significativo en el tamaño de las nanopartículas formadas.

Las imágenes obtenidas para el copolímero **PEG-*b*-d8DAP•tC<sub>6</sub>AZO** se muestran en la *Figura E.5 del Apartado E en Anexos*. Este copolímero formó agregados de tipo micela con un tamaño de 30 nm, es decir, con un tamaño 3 veces mayor que en el caso del copolímero que no tiene unidades tC<sub>6</sub>AZO, por lo que es probable que una parte del copolímero haya podido ser funcionalizado. En esta muestra también se encontraron agregados de tipo fibrilar con una anchura de unos 20 nm.

Finalmente, las imágenes obtenidas para el copolímero **PEG-*b*-d16DAP•tC<sub>6</sub>AZO** se muestran en la *Figura E.6 del Apartado E en Anexos*. En este caso se han vuelto a obtener nanopartículas del tipo vesícula, con una distribución de tamaños menor que va desde los 140 a los 240 nm. La morfología en ambos casos (antes y después de funcionalizar con azobenceno) es muy similar, de manera que no puede decirse que los autoensamblados estén formados por el copolímero funcionalizado.

## 4. CONCLUSIONES

Como resumen del trabajo se puede indicar que:

- Se han sintetizado los dendrones de segunda, tercera y cuarta generación con unidades de 2,6-diacilaminopiridina en la periferia mediante una síntesis convergente “double exponential growth” en la que se han ido haciendo crecer la generación de los dendrones por los extremos ácido o alcohol de la molécula de bis-MPA.
- Se han sintetizado los copolímeros bloque por acoplamiento de los dendrones con PEG mediante una reacción de acoplamiento azida-alquino catalizada por Cu(I).
- Se han obtenido los respectivos copolímeros supramoleculares con unidades de azobenceno en la periferia de los dendrones, que han sido estudiados por  $^1\text{H-RMN}$  e IR, demostrándose la formación de enlaces de hidrógeno entre las unidades 2,6-diacilaminopiridina y timina.
- Se ha estudiado la agregación en agua de los diferentes copolímeros obtenidos. Los copolímeros bloque con unidades de 2,6-diacilaminopiridina forman agregados en agua, si bien la modificación con azobenceno, lleva a una precipitación al menos parcial del azobenceno al intentar formar las micelas o vesículas en fase acuosa.

Como conclusión final podemos afirmar que se ha desarrollado una buena estrategia para la síntesis de dendrones con unidades DAP en la periferia, así como para su acoplamiento a un bloque de PEG mediante una cicloadición 1,3-dipolar entre alquinos y azidas para la formación de los respectivos copolímeros bloque dendrítico-lineales. 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. Los copolímeros bloque dendrítico-lineales forman micelas o vesículas que pueden ser utilizadas como nanotransportadores sensibles al pH de forma análoga a los compuestos similares con estructura lineal-lineal. Sin embargo, para la formación de nanotransportadores sensibles a la luz, es necesario investigar nuevas moléculas que no tiendan a precipitar en el proceso de autoensamblaje y micelación.