



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza



Universidad
Zaragoza

Síntesis de reticulantes supramoleculares con respuesta a la luz para la preparación de sistemas de liberación controlada de fármacos

**Trabajo Fin de Grado
Grado en Química
Grupo Cristales Líquidos
Departamento de Química Orgánica
Universidad de Zaragoza
Curso 2018-2019
Oscar García Villar
Directores: Luis T. Oriol Langa
Milagros Piñol Lacambra**

Resumen: Síntesis de reticulantes supramoleculares con respuesta a la luz para la preparación de sistemas de liberación controlada de fármacos

Los copolímeros bloque anfífilos pueden autoensamblarse en disolución acuosa. Los agregados resultantes se emplean para encapsular y transportar moléculas, y liberarlas cuando sea requerido. Estos nanotransportadores pueden disgregarse en medios muy diluidos. Para evitar que esto ocurra, una posibilidad es entrecruzar las cadenas del copolímero que forma el agregado. Además, si estos copolímeros presentan algún grupo sensible a estímulos que provoque algún cambio químico o físico, se puede conseguir la liberación de la carga. Un estímulo de interés es la luz, que en el caso de azobencenos provoca una fotoisomerización *trans-cis* reversible.

El objetivo principal de este trabajo es la preparación y caracterización de entrecruzantes derivados del ácido cianúrico (Cy), en los que también se incorporan azobencenos, como unidad con respuesta a la luz. Estos derivados son capaces de unirse mediante enlaces de hidrógeno a unidades complementarias como son las de 2,6-diacilaminopiridina (DAP). Con este fin, se introducen unidades de DAP en un copolímero bloque anfílico, que permite la unión supramolecular por enlaces de hidrógeno con los derivados de Cy.

En este trabajo, se ha sintetizado y caracterizado cuatro derivados de Cy, algunos de ellos con unidades azobenceno en la molécula. Se estudió su fotorrespuesta en disolución cuando son irradiados con luz UV. Se ha funcionalizado un copolímero de polietilenglicol (bloque hidrófilo) y policarbonato (bloque hidrófobo) para incorporar unidades de DAP. Asimismo, se han estudiado los copolímeros supramoleculares resultantes de la interacción DAP-Cy. Se han realizado los primeros estudios de agregación en agua a partir de estos copolímeros.

Abstract: Synthesis of light responsive supramolecular crosslinkers for controlled drug delivery systems

Amphiphilic block copolymers can self-assemble in aqueous solution. The resulting aggregates are used to encapsulate and transport molecules, and release them when required. These nanocarriers can disassemble in very diluted media. To prevent this, one possibility is to crosslink the copolymeric chains that form the aggregate. Furthermore, if these copolymers have some group with response to stimuli that cause some chemical or physical change, the release of the molecular cargo can be stimuli-induced. A stimulus of interest is light, which in the case of azobenzenes causes a reversible *trans-cis* photoisomerization.

The main objective of this work is the preparation and characterization of crosslinkers derivatives of cyanuric acid (Cy), in which azobenzenes are also incorporated as a unit with response to light. These derivatives are capable of binding by hydrogen bonds to complementary units such as those of 2,6-diacylaminopyridine (DAP). To this end, DAP units are introduced into an amphiphilic block copolymer, which allows supramolecular binding by hydrogen bonds with the Cy derivatives.

In this work, four derivatives of Cy have been synthesized and characterized, some of them with azobenzene units in the molecule. Their photoresponse was studied in solution when they are irradiated with UV light. A copolymer of polyethylene glycol (hydrophilic block) and polycarbonate (hydrophobic block) has been functionalized to incorporate DAP units. Likewise, the supramolecular copolymers resulting from the DAP-Cy interaction have been studied. Preliminary aggregation studies in water have been carried out from these copolymers.

Abreviaturas empleadas en el trabajo:

- ALK: cadena alquílica
- AZO: azobenceno
- CCF: cromatografía de capa fina
- Cy: ácido cianúrico
- DAP: 2,6-diacilaminopiridina
- DBU: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
- DCM: diclorometano
- D_h : diámetro hidrodinámico
- DLS: dispersión dinámica de luz
- DMF: *N,N*-dimetilformamida
- DMSO: dimetilsulfóxido
- DMPA: 2,2-dimetoxi-2-difenilacetofenona
- DPTS: p-toluensulfonato de 4-(dimetilamino)piridinio
- EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
- EPR: permeación y retención aumentada
- FTIR: espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
- HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia
- MS: Espectrometría de masas
- PC: policarbonato
- PEG: polietilenglicol
- RMN: resonancia magnética nuclear
- TEM: microscopía de transmisión electrónica
- THF: tetrahidrofurano
- UV-vis: espectroscopía ultravioleta visible

Índice

1.	Introducción	1
1.1	Transportadores de fármacos.....	1
1.2	Polímeros y copolímeros bloque	1
1.3.	Copolímeros bloque anfífilos	3
1.4.	Copolímeros bloque supramoleculares	4
1.3	Azobencenos y su aplicación a copolímeros bloque con respuesta a la luz.....	5
1.4	Entrecruzamiento de nanotransportadores poliméricos	5
2	Objetivos y planteamiento	7
3	Resultados y discusión.....	8
3.1	Síntesis y caracterización de derivados de ácido cianúrico.....	8
3.2	. Estudio UV-vis de los azobencenos en disolución	9
3.3	. Preparación y caracterización de copolímeros bloque supramoleculares....	11
3.5	Estudio de los autoensamblados en fase acuosa	13
4	Conclusiones.....	17
5.	Parte experimental.....	18
5.1.	Síntesis de compuestos.....	18
5.1.1.	Síntesis de 6–bromohexanoato de bencilo (1).....	18
5.1.2.	Síntesis de 6-(2,4,6-trioxo-1,3,5-triazinan-1-il)hexanoato de bencilo (2)	18
5.1.3.	Síntesis del ácido 6–(2,4,6-trioxo-1,3,5-triazinan-1-il) hexanoico (3)	18
5.1.4.	Síntesis de 4,4'-dihidroxiazobenceno (4).....	19
5.1.5.	Síntesis de Cy-AZO-Cy	19
5.1.6.	Síntesis de Cy-AZO	20
5.1.7.	Síntesis de Cy-ALK-Cy	20
5.1.8.	Síntesis de Cy-ALK	21
5.1.9.	Síntesis de PEG ₁₁₃ -PCDAP ₁₉	21
5.2.	Preparación de polímeros supramoleculares.....	21
5.3.	Irradiación de los azobencenos con ácido cianurico en disolución.....	22
5.4.	Formación de agregados.....	22
5.	Bibliografía:.....	24

1. Introducción

1.1 Transportadores de fármacos

Para obtener una respuesta terapéutica, es indispensable que una cantidad de fármaco activo llegue al sitio de acción, y que esa dosis efectiva se mantenga en el destino por un tiempo definido. Sin embargo, para muchos fármacos, el proceso plantea una serie de problemas tales como su rápida degradación en el entorno *in vivo*, farmacocinética inadecuada, falta de selectividad para los tejidos diana, o fármacos de baja masa molecular insolubles en agua, que se distribuyen a todo el cuerpo después de la inyección intravenosa, lo que limita críticamente la dosis debido al riesgo subyacente de los efectos secundarios, incluso una posible toxicidad.

La denominada Nanomedicina pretende aplicar los principios de la Nanociencia o Nanotecnología a la Medicina. En el caso de los fármacos, algunos de los problemas de solubilidad, dosificación y efectos secundarios se pueden solucionar empleando nuevas terapias basadas en nanomateriales o encapsulando los fármacos convencionales en materiales biocompatibles, tales como los polímeros, que faciliten su dosificación, reconocimiento por las células diana y actividad farmacológica evitando su eliminación del torrente sanguíneo de forma precoz.¹

Los sistemas que, a escala nanoscópica, se usan para encapsular y transportar fármacos pueden denominarse nanotransportadores. La acumulación preferencial de estos fármacos encapsulados es una ventaja significativa para el desarrollo de terapias antitumorales dirigidas. Los nanotransportadores tienen un tamaño tal que facilita que se liberen en las zonas tumorales por el conocido efecto de permeación y retención aumentada (EPR). Además, los tumores presentan características específicas, como el ambiente ácido intratumoral que puede facilitar que una vez llegado a ese punto el nanotransportador libere la carga, si bien es posible el uso de otros estímulos para facilitar dicha liberación, como el aumento de temperatura, reactividad redox o luz. Finalmente es posible incluir en los nanotransportadores biomarcadores específicos para el reconocimiento de células tumorales. Como se ha comentado, entre los tipos de materiales que más se están investigando como nanotransportadores, los polímeros, y en particular copolímeros bloque, ocupan un puesto preferencial por su compatibilidad y versatilidad en el diseño estructural.²

1.2 Polímeros y copolímeros bloque

Un polímero es una macromolécula, normalmente orgánica y con una elevada masa o tamaño, formada por una o varias unidades químicas que se repiten y que derivan de los llamados monómeros. Un polímero es el resultado de un proceso de polimerización en el que dichas unidades monoméricas se unen mediante enlaces covalentes. Los grupos terminales son grupos dispuestos al comienzo y al final de la cadena (como se muestra en la figura 1.1), los cuales, dependiendo del proceso y condiciones de

polimerización suelen tener una contribución muy pequeña a las propiedades del polímero.

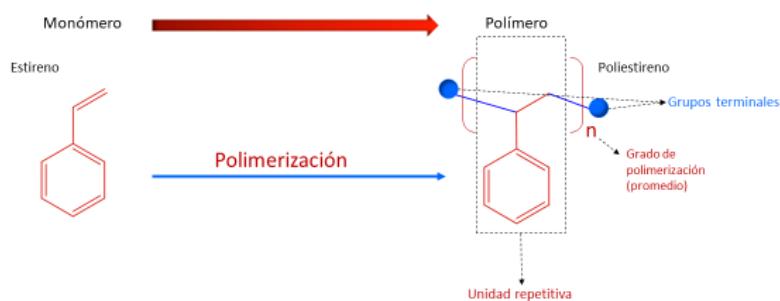


Figura 1.1 Ejemplo de polimerización

Según la estructura de las cadenas moleculares podemos diferenciar, de forma básica, entre:

- Polímeros lineales: los monómeros se unen formando una cadena lineal sencilla.
- Polímeros ramificados: presentan una cadena lineal principal, pero a ella están unidas pequeñas cadenas laterales de tamaños variables.
- Polímeros entrecruzados: aquellos cuyas cadenas poliméricas están unidas entre sí.

También se pueden clasificar los polímeros dependiendo de los monómeros que lo forman: homopolímeros, para los polímeros que están formados por una única unidad repetitiva y copolímeros, para los que su cadena está compuesta por dos o más unidades repetitivas. A su vez, los copolímeros se pueden clasificar según como estén distribuidos los monómeros a lo largo de la cadena polimérica como se muestra en la Figura 1.2 para el caso sencillo de dos unidades repetitivas.^{3 4}

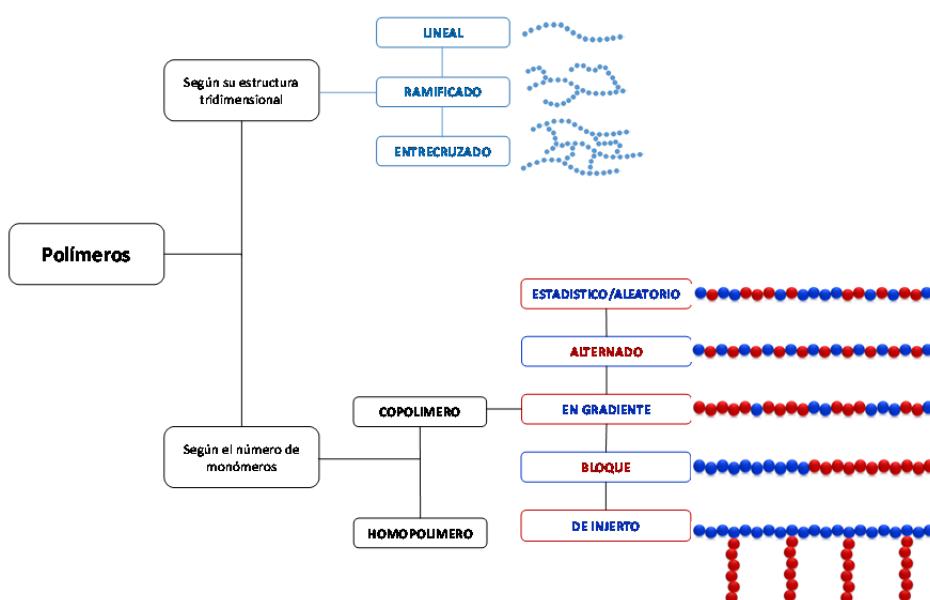


Figura 1.2 Tipos de polímeros según su topología y composición

1.3. Copolímeros bloque anfífilos

Los copolímeros bloque son macromoléculas en las que dos o más monómeros diferentes se agrupan de forma separada en segmentos o bloques. Una de las estrategias más habituales para la obtención de copolímeros bloque es la polimerización secuencial de dos monómeros distintos. Consiste en polimerizar un primer monómero y utilizar el polímero generado como macroiniciador para activar la polimerización de un segundo monómero. La polimerización del segundo monómero puede activarse en el propio medio de polimerización aunque también es posible aislar y purificar dicho macroiniciador antes de utilizarlo en un segundo de proceso de polimerización.

Si la naturaleza química de los bloques constituyentes es suficientemente distinta, estos tienden a segregar en la nanoscala, lo que es la base de su aplicación como nanomateriales.⁵ Un tipo de estos copolímeros bloque son los denominados anfífilos, en los que se combina un bloque hidrófilo y un bloque hidrófobo (supuesto que sea dibloque, o sea con solo dos bloques). Estos copolímeros bloque anfífilos pueden agregarse en medios acuosos formando autoensamblados de tamaño nanométrico entre los que destacan micelas (de diferente morfología) y vesículas. El bloque hidrófilo se encuentra en contacto con la fase acuosa, debido a la afinidad por este medio, mientras que las cadenas hidrófobas interaccionan entre sí tal y como se muestra en la Figura 1.3. Uno de los principales factores que determina si los autoensamblados resultantes son micelas o vesículas es el balance hidrófobo-hidrófilo.



Figura 1.3 Representación de una micela y una vesícula en las que el color azul corresponde al bloque hidrófilo y el rojo al bloque hidrófobo⁶

La investigación en las últimas décadas ha dado lugar a importantes avances en el desarrollo de nanotransportadores mediante copolímeros bloque anfífilos, encapsulando fármacos generalmente en las regiones hidrófobas, dada la poca solubilidad en agua de numerosos fármacos. El bloque hidrófilo suele ser el polietilenglicol (PEG) y en el bloque hidrófobo, donde generalmente se retiene el fármaco, cadenas poliméricas de muy diversos tipos en las que se suele incluir unidades con respuesta a estímulos que dan lugar a una respuesta programada. Estos estímulos pueden ser químico-biológicos (como el pH, redox, enzimática...) o estímulos físicos (temperatura, luz, fuerza mecánica, ultrasonidos...).⁷

1.4. Copolímeros bloque supramoleculares

Generalmente la preparación de la gran mayoría de polímeros comerciales o de investigación, incluidos copolímeros bloque, se basa en una química covalente. Sin embargo, la química supramolecular, que genera copolímeros bloque mediante interacciones no covalentes permite una aproximación más versátil, principalmente a la hora de funcionalizar una cadena polimérica. Por ejemplo, en el diseño de copolímeros bloque con respuesta a estímulos externos, la unidad sensible a un estímulo (unidad funcional) se puede unir a través de enlaces de hidrógeno, la interacción no covalente más empleada en polímeros supramoleculares. Esto confiere mayor versatilidad a la hora de preparar materiales (se puede modificar en los porcentajes deseados o combinando diferentes moléculas, sin necesidad de cambiar de copolímero bloque de partida), así como un carácter dinámico dado que estos enlaces son sensibles a la polaridad del medio, al pH o variación de temperatura.

Figura 1.4.

Copolímero bloque con aproximación covalente:



Copolímero bloque con aproximación supramolecular:

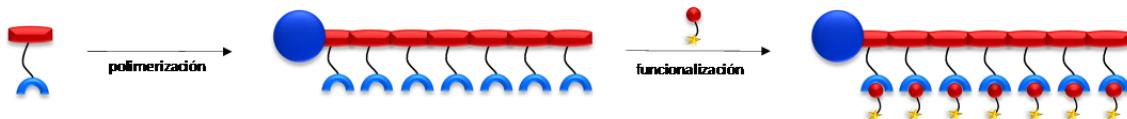


Figura 1.4 Tipos de copolímeros bloques anfífilos

Una forma de conseguir esta funcionalización por enlaces de hidrógeno, recientemente descrita en nuestro grupo de investigación, es el uso de copolímeros que contengan un análogo de una nucleobase como la adenina, capaz de reconocer eficientemente otra nucleobase, como la timina. Para ello se prepararon los copolímeros con unidades de 2,6-diacilaminopiridina (DAP) que se muestran en la figura 1.5.⁸

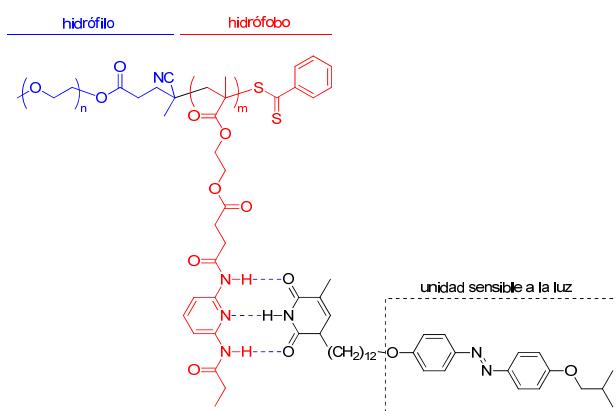


Figura 1.5 Copolímero bloque supramolecular funcionalizado con DAP formando enlaces de hidrógeno con timina

1.3 Azobencenos y su aplicación a copolímeros bloque con respuesta a la luz

Los copolímeros bloque anfífilos que presentan una parte de la molécula con respuesta a un estímulo como el pH, temperatura, potencial redox, ultrasonidos, enzimas..., se han estudiado extensamente. Sin embargo, los que muestran una respuesta frente a un estímulo lumínico tienen la ventaja de que no se requiere ninguna alteración química en el medio en el que se encuentran y que se puede aplicar con un total control temporal y espacial (solo hay respuesta cuando y donde se aplica la luz).

La capacidad de respuesta a la luz es generalmente proporcionada por moléculas fotocrómicas unidas a los polímeros. El azobenceno, y sus derivados se han usado ampliamente con este propósito porque pueden experimentar fotoisomerización reversible *trans-cis* (o *E-Z*) cuando se iluminan con luz UV o visible. El espectro UV-vis del *trans*-azobenceno tiene una banda de absorción intensa característica de la transición $\pi\rightarrow\pi^*$ alrededor de 345 nm que disminuye gradualmente cuando tiene lugar la isomerización fotoinducida *trans-cis*. El espectro presenta además otra banda mucho más débil asociada a la transición $n\rightarrow\pi^*$ a 440 nm, que gradualmente aumenta durante este proceso de isomerización fotoinducida, como se puede observar esquemáticamente en la Figura 1.6.⁹

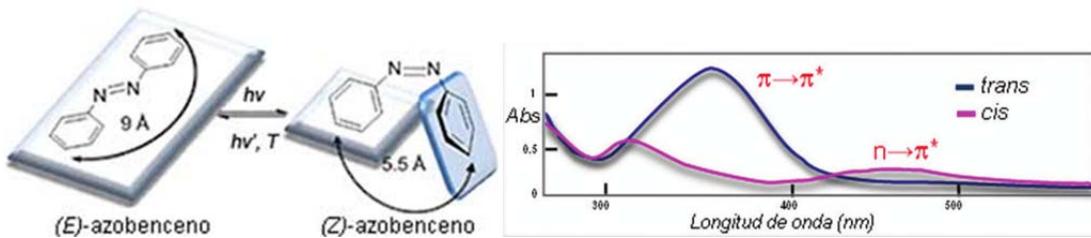


Figura 1.6 Fotoisomerización reversible del azobenceno y variaciones en el espectro UV-vis.¹⁰

La incorporación de azobencenos a copolímeros bloque anfífilos, es una forma habitual de dotar de respuesta a la luz a los agregados (micelas o vesículas) que derivan de los mismos. En el caso de micelas o vesículas que contengan azobenceno, como el isómero *cis* es más polar que el isómero *trans*, el resultado de la irradiación es la alteración del balance hidrófobo-hidrófilo. Esto unido al cambio de geometría de la unidad azobenceno y al movimiento molecular asociado a la isomerización, puede provocar una alteración del agregado suficiente para inducir la liberación de la posible carga que haya sido encapsulada. La introducción de azobencenos en la macromolécula puede ser mediante enlace covalente o interacciones supramoleculares, por ejemplo a través de enlaces de hidrógeno como se muestra en la figura 1.5.¹¹

1.4 Entrecruzamiento de nanotransportadores poliméricos

Los micelas y vesículas poliméricas son termodinámicamente más estables que los agregados análogos formados por anfífilos de bajo peso molecular, como por ejemplo liposomas. Sin embargo, en condiciones de alta dilución como las que se dan en el

medio fisiológico, pueden llegar disociarse liberando la carga de forma prematura si se diluyen por debajo de la concentración micelar crítica. La alternativa habitual para superar esta limitación es entrecruzar las macromoléculas mediante enlaces covalentes. Algunas de las estrategias que se han empleado pasan por introducir grupos con tendencia a formar radicales en el interior o grupos reactivos, algunos ejemplos son dobles enlaces, grupos tiol... Sin embargo, la estabilidad que provoca el entrecruzado covalente también dificulta la liberación de la carga.

Una alternativa es entrecruzar mediante enlaces reversibles o dinámicos como ésteres de boratos, dimerización de cumarina o enlaces de hidrógeno, mucho menos estudiados que el entrecruzado covalente. La interacción mediante enlace de hidrógeno es selectiva y direccional, pero esencialmente es dinámica y reversible, lo que favorece la liberación del material encapsulado, y su estabilidad depende del pH y de la temperatura. Y como se ha mencionado, si se introducen grupos que sean sensible a estímulos externos, se puede conseguir que el autoensamblado responda a dichos estímulos.¹²

2 Objetivos y planteamiento

El objetivo principal del trabajo ha sido la preparación agentes entrecruzantes basados en derivados de ácido cianúrico que puedan utilizarse para el entrecruzado de copolímeros bloque que contengan unidades de 2,6-diacilaminopiridina (DAP), con la finalidad última de estabilizar los posibles agregados que se formen a partir de la combinación de un copolímero bloque con unidades de DAP y el entrecruzante.

El ácido cianúrico (Cy) es capaz de unirse simultáneamente a dos unidades de DAP estableciendo 6 enlaces de hidrógeno, por lo que *a priori* la formación de los agregados será más estable que cuando se utilizan otros derivados de timina, con menor número de enlaces de hidrógeno.

Por ello, se ha planteado la síntesis de los compuestos que se muestran en la Figura 2.1. La serie propuesta incluye no solo compuestos estrictamente reticulantes (con dos Cy), sino también compuestos modelos con una sola unidad de Cy. Aunque cada unidad Cy se une a dos unidades de DAP, y por lo tanto es posible el entrecruzado, en este caso se espera que sea más probable la unión a dos unidades DAP contiguas de la misma cadena.

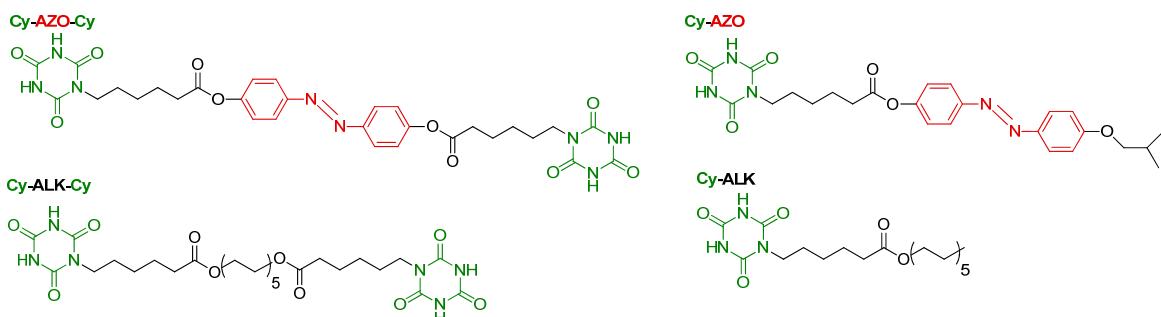


Figura 2.1 Compuestos derivados de ácido cianúrico propuestos

La tarea principal del trabajo ha consistido en sintetizar los compuestos propuestos y que no habían sido descritos previamente, donde **Cy-AZO-Cy** es un reticulante con una unidad azobenceno sensible a la luz (**AZO**); **Cy-AZO** contiene una unidad fotosensible pero no es entrecruzante. **Cy-ALK-Cy** y **Cy-ALK** son análogos a los anteriores, pero sin la unidad fotosensible azobenceno.

Por otro lado, aparte de la preparación de los compuestos indicados se han abordado las siguientes tareas:

- Preparación de polímeros supramoleculares con cada uno de los compuestos y con mezclas entre ellos. Para ello se ha empleado el polímero **PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉**.
- Formación de autoensamblados en agua.

3 Resultados y discusión

3.1 Síntesis y caracterización de derivados de ácido cianúrico

Inicialmente se abordó la síntesis de un derivado del ácido cianúrico (Cy), compuesto 3, con un conector que permita incorporar la unidad azobenceno o el espaciador alifático. Para ello, se propuso la ruta sintética que se muestra en la Figura 3.1. siguiendo un procedimiento ya descrito en la literatura.¹³

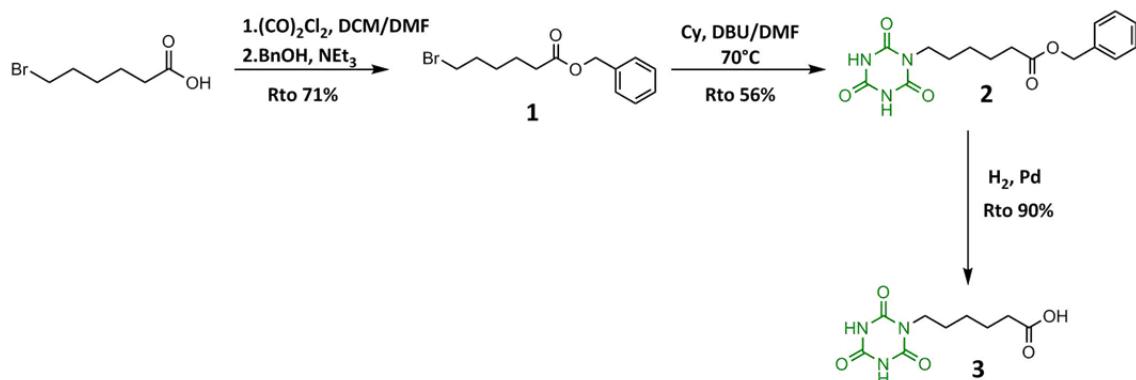


Figura 3.1 Ruta sintética seguida para la síntesis de ácido 6-(2,4,6-trioxo-1,3,5-triazinan-1-il)hexanoico (4)

La primera reacción es una esterificación de un cloruro de ácido con alcohol bencílico que además de proteger el ácido carboxílico, facilita la identificación del producto por cromatografía de capa fina (CCF).¹⁴ El compuesto (1) obtenido se hace reaccionar con un exceso de ácido cianúrico (Cy) para forzar que solo entre una cadena en cada molécula de ácido cianúrico (Cy) obteniéndose el compuesto (2). El producto fue adecuadamente caracterizado, y en particular las señales e integraciones registradas en el espectro de ¹H RMN concuerdan con las esperadas (ver anexo A).¹⁵ Finalmente, se desprotege el grupo ácido carboxílico (2) para obtener el **ácido 6-(2,4,6-trioxo-1,3,5-triazinan-1-il)hexanoico (3)**. Este ácido se ha usado como precursor para preparar todos los compuestos previstos de acuerdo al esquema general que se muestra en la Figura 3.2.

Para la preparación de **Cy-AZO-Cy** se procedió primero a la síntesis de 4,4'-dihidroxiazobenceno (4), para ello se siguió el procedimiento descrito en la literatura,¹⁶ mediante acoplamiento diazoico entre la sal de diazonio del 4-aminofenol y fenol. Este azobenceno (4) se obtuvo un rendimiento del 6%, frente al 12% descrito en el artículo original. El derivado **Cy-AZO-Cy** se obtuvo haciendo reaccionar 4,4'-dihidroxiazobenceno con el compuesto (3) mediante una esterificación tipo Steglich. Este producto **Cy-AZO-Cy** dada su escasa solubilidad, se purificó por lavado con metanol caliente para eliminar las impurezas y posterior filtrado. Mediante ¹H RMN e IR se comprobó que la estructura corresponde a la esperada. En MS se empleó la técnica del electrospray para corroborar su obtención, observándose la señal que corresponde al ion [M+Na]⁺ (ver anexo A).

El compuesto **Cy-AZO** se obtuvo de forma similar utilizando 4-hidroxi-4'-isobutoxiazobenceno, el cual estaba disponible en el laboratorio. En este caso el producto se purificó por recristalización en metanol. La estructura se confirmó mediante técnicas espectroscópicas.

Del mismo modo que en casos anteriores, para la síntesis de **Cy-ALK-Cy** y **Cy-ALK** se recurrió a una esterificación de Steglich con 1,10-decanodiol y 1-decanol respectivamente. Los productos fueron purificados por recristalización en metanol. Los datos de RMN, IR y MS se recogen en el anexo A.

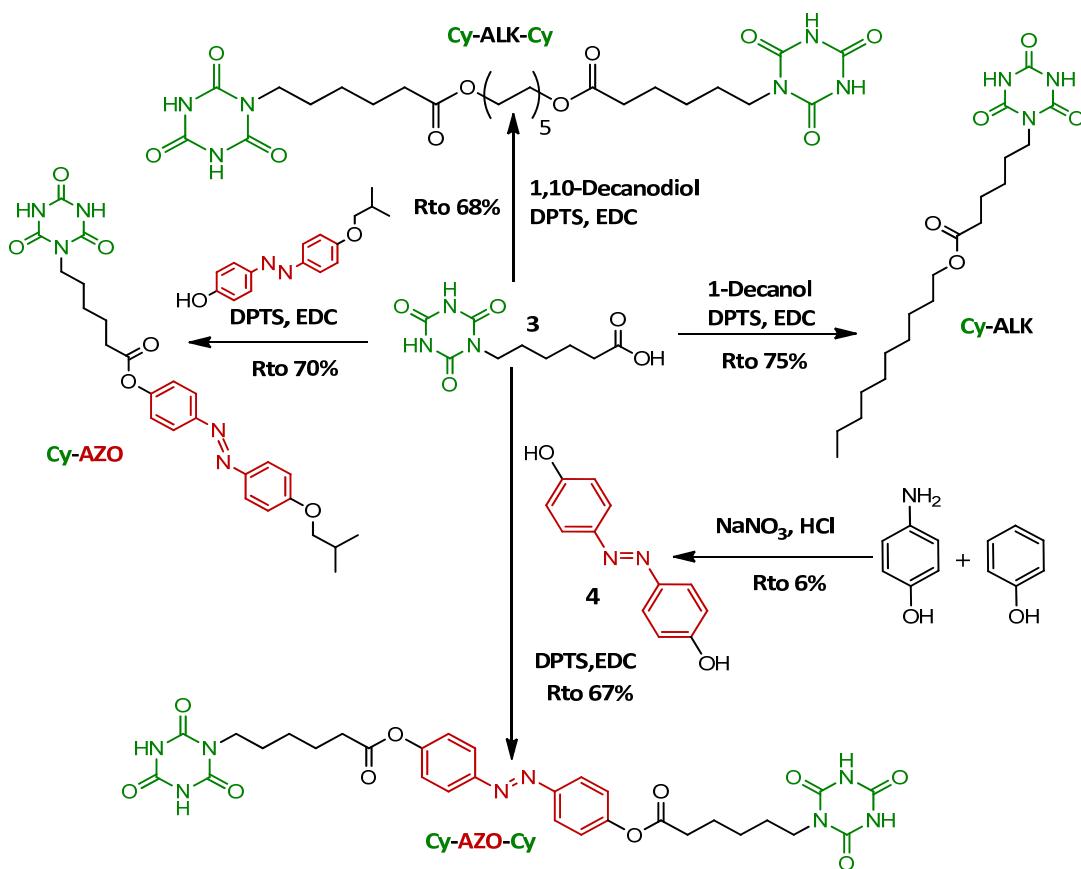


Figura 3.2 Síntesis de los compuestos derivados del ácido cianúrico

3.2. Estudio UV-vis de los azobencenos en disolución

Una vez caracterizados, se estudió la fotoisomerización en disolución de DMSO de los azobenzenos **Cy-AZO-Cy** y **Cy-AZO**. Para ello, las disoluciones se irradiaron a distintos tiempos con una lámpara de mercurio de baja presión (con máximo de radiación a 365nm), hasta que no se registraron variaciones en espectro UV-vis, momento en el que se considera se ha alcanzado el estado fotoestacionario.

El derivado **Cy-AZO-Cy** se estudió a una concentración de 5×10^{-5} M en DMSO. En la Figura 3.3. se muestran los diferentes espectros registrados. En el espectro inicial (*t*0) se observa una banda intensa a 345 nm que corresponde a la transición $\pi-\pi^*$ del isómero *trans* y otra débil a 440 nm que se debe a la transición $n-\pi^*$. Esta segunda es

una transición asociada a conformaciones no planas del *trans* azobenceno. Cuando se irradia la disolución, la intensidad de la banda $\pi-\pi^*$ disminuye y se desplaza a menores longitudes de onda, al mismo tiempo que aumenta la banda $n-\pi^*$ debido a la isomerización *trans-cis*.

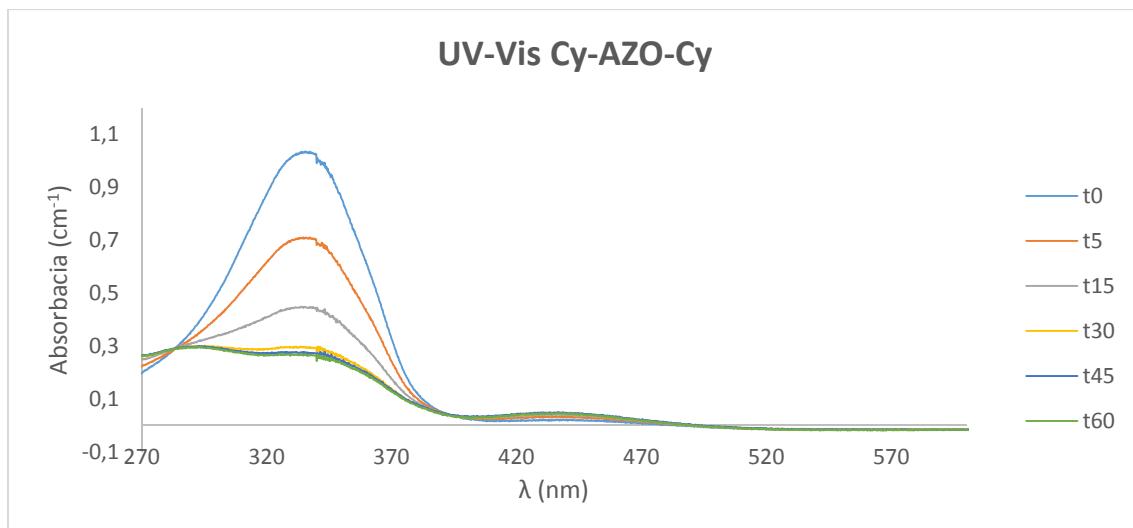


Figura 3.3 Evolución del espectro UV-Vis del compuesto Cy-AZO-Cy al irradiar con luz UV i

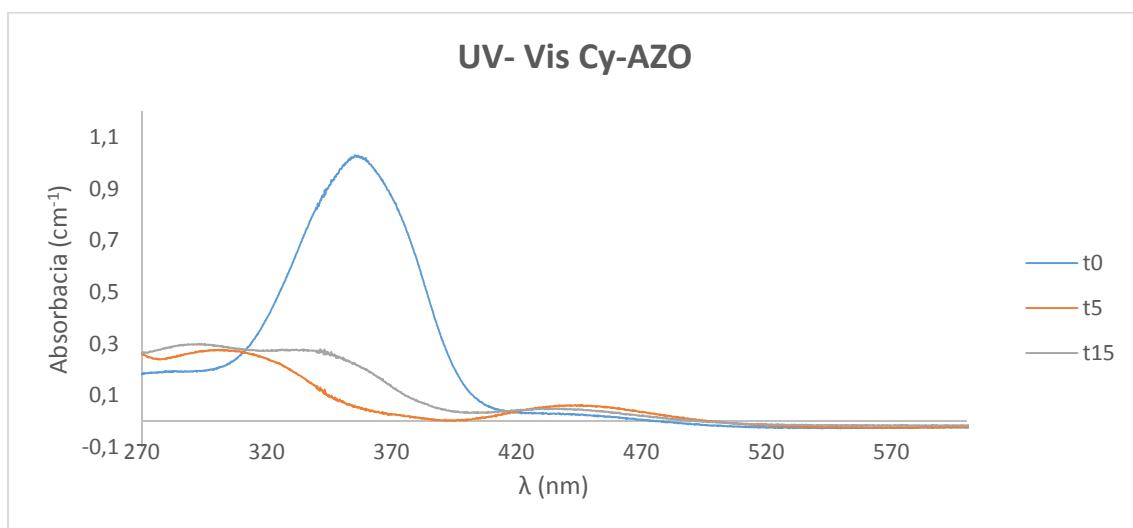


Figura 3.4 Evolución del espectro UV-Vis del compuesto Cy-AZO al irradiar con luz UV

En la Figura 3.4. se recopilan los espectros del compuesto **Cy-AZO** registrados a una concentración 10^{-4} M en DMSO. De nuevo, el espectro inicial (t0) muestra la banda intensa debida a la transición $\pi-\pi^*$ del *trans* **Cy-AZO** a 356 nm y la banda más débil a 448 nm correspondiente a la transición $n-\pi^*$. Al irradiar se observan variaciones en el espectro similares a las indicadas para **Cy-AZO-Cy**. En este caso, la fotoisomerización es más rápida y se alcanza un estado fotoestacionario en 15 s frente a los 60 s de **Cy-AZO-Cy**, con mayor porcentaje de cis como se deduce de la disminución de la intensidad en el máximo de absorción. Esto puede ser debido a las diferencias electrónicas del azobenceno relacionadas con el carácter electrodador de los sustituyentes en posiciones 4,4'.

3.3. Preparación y caracterización de copolímeros bloque supramoleculares

Como paso previo a la obtención de los copolímeros supramoleculares, se sintetizó un copolímero bloque de polietilenglicol (bloque hidrófilo) y un policarbonato con unidades DAP (bloque hidrófobo) **PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉**. Como precursor se usó el copolímero **PEG₁₁₃-b-PC₁₉**, en el que el policarbonato tiene un grupo vinilo lateral. Este copolímero se funcionalizó con un tiol derivado DAP mediante una reacción de tiolenos radicalaria fotoiniciada como se indica en la Figura 3.5. Es una reacción de adición de radicales tiol sobre el doble enlace en la que se utilizó 2,2-dimetoxi-2-difenilacetofenona (DMPA) como fotoiniciador radicalario y una lámpara de baja presión de mercurio para generar los radicales. Para que la funcionalización del polímero sea completa se usó exceso de tiol que se eliminó mediante una columna de exclusión (Biobeads SX1) en THF. De acuerdo al espectro de ¹H RMN (en el que no se detectan los protones vinílicos) y teniendo en cuenta el límite de detección de la técnica, puede considerarse que la funcionalización del polímero ha sido completa.

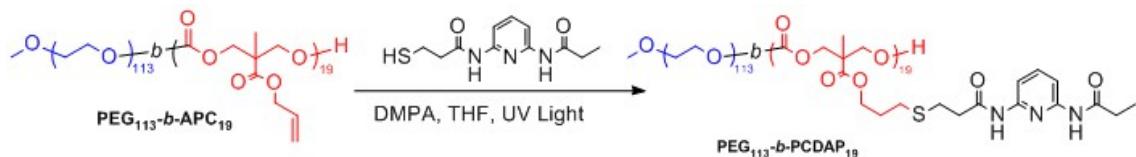


Figura 3.5 Funcionalización del copolímero bloque **PEG₁₁₃-b-PC₁₉** con DAP

Una vez sintetizado, se estudiaron los copolímeros bloque supramoleculares de este copolímero precursor con cada uno de los cuatro derivados de ácido cianúrico obtenidos. Para su preparación, se consideró la funcionalización mediante enlace de hidrógeno de todas las unidades DAP y teniendo en cuenta que cada unidad Cy interacciona con dos DAP. En la tabla 3.1 se muestran los copolímeros supramoleculares estudiados.

Tabla 3.1 Copolímeros supramoleculares estudiados y disolvente empleado en su preparación

Copolímero supramolecular	Disolvente
PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉+ Cy-AZO-Cy	THF+DMSO
PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉+ Cy-AZO	THF
PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉+ Cy-ALK-Cy	THF
PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉+ Cy-ALK	THF

Los polímeros se prepararon en un vial mezclando los componentes (copolímero y derivado cianúrico) en disolución y evaporando posteriormente el disolvente a temperatura ambiente con agitación. Como disolvente se seleccionó THF ya que se evapora con facilidad. Sin embargo, dada su limitada solubilidad, el copolímero supramolecular con **Cy-AZO-Cy** se preparó usando una mezcla THF y DMSO. En este caso, el disolvente se eliminó a presión reducida calentando suavemente en un baño de silicona.

Los copolímeros supramoleculares se estudiaron en disolución mediante ^1H RMN en cloroformo deuterado. Para comprobar las interacciones mediante enlaces de hidrógeno, se comparó el espectro de ^1H RMN del copolímero bloque supramolecular y el copolímero bloque precursor. Como puede verse en la figura 3.6, los protones del grupo amida de la unidad DAP (hidrógenos en rojo) aparecen a mayor desplazamiento químico (se encuentran más desapantallados) cuando están implicados en la formación de enlace de hidrógeno con el ácido cianúrico. En el anexo B se recogen todos los espectros de RMN de los copolímeros supramoleculares. En el caso del polímero **PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉+ Cy-AZO-Cy**, debido a la escasa solubilidad del Cy-AZO-Cy, el estudio se realizó en DMSO deuterado. Como este disolvente compite en la formación del enlace de hidrógeno, la formación del copolímero supramolecular en disolución no pudo establecerse.

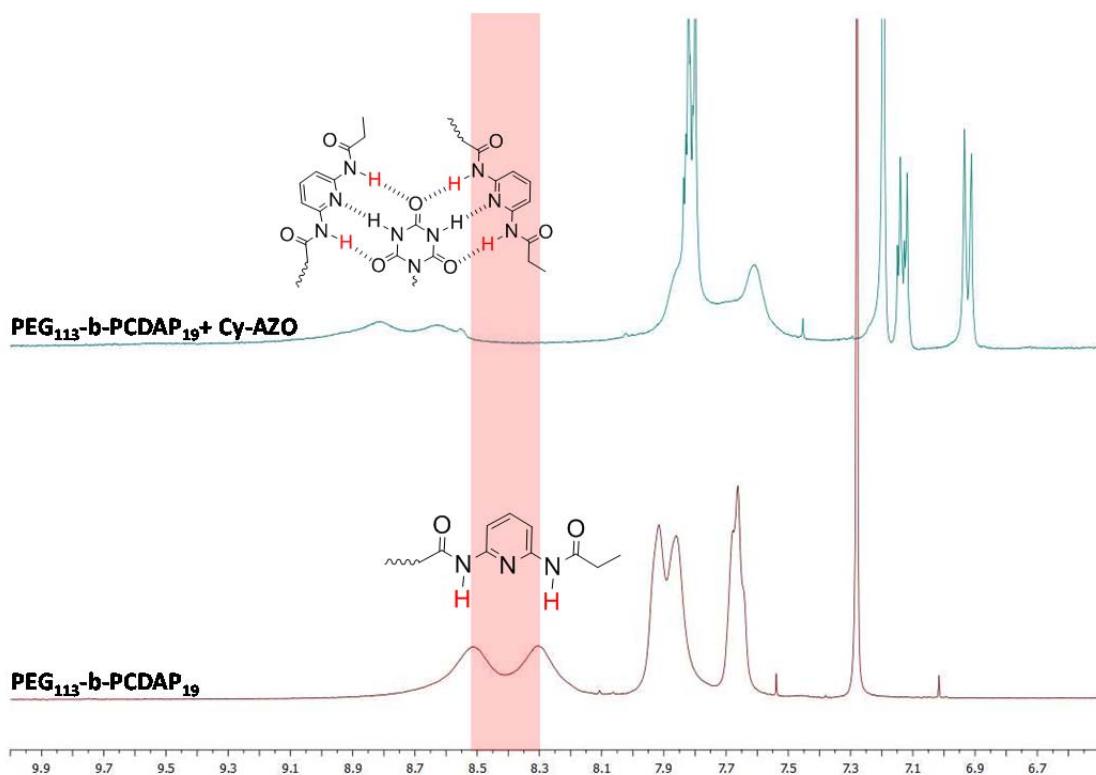


Figura 3.6. Desplazamiento de las señales de los protones ^1H RMN al establecer enlaces de hidrógeno en el copolímero supramolecular **PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉ + Cy-AZO-Cy**

La formación de enlaces de hidrógeno en estado sólido se estudió mediante espectroscopia IR. En las Figuras 3.8 y 3.7 se comparan las bandas de los precursores **PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉** y **Cy-AZO-Cy** con la de copolímero supramolecular **PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉ + Cy-AZO-Cy**. La Figura 3.7 corresponde a la región $3700-2500 \text{ cm}^{-1}$, donde se aprecia como la banda de vibración del enlace N-H del grupo amida del DAP se desplaza a números de onda menores al formarse el copolímero bloque supramolecular.

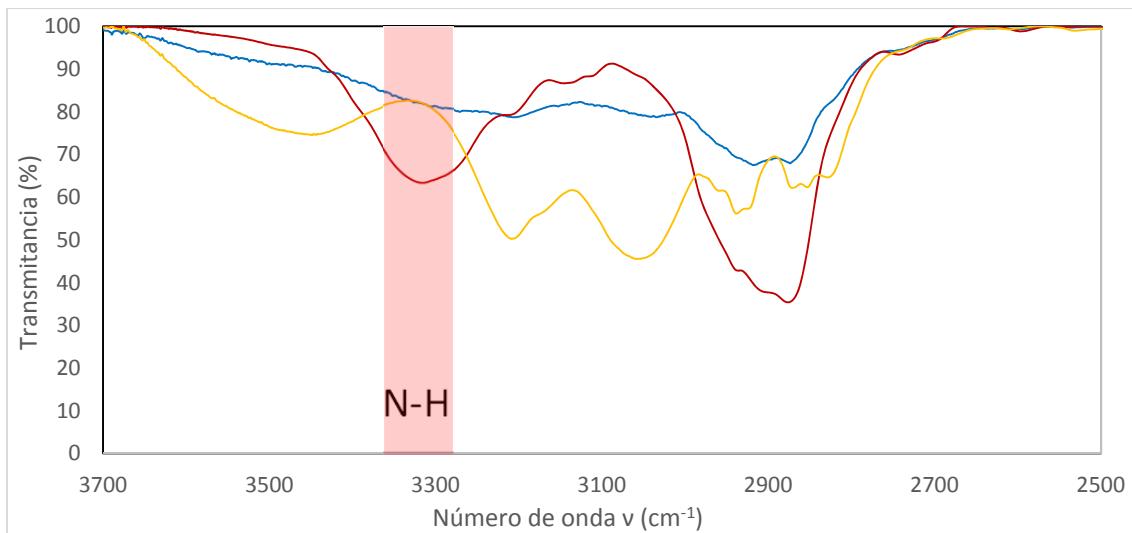


Figura 3.7. Modificación de la banda N-H en FTIR de $\text{PEG}_{113}\text{-b-PCDAP}_{19}$ + Cy-AZO-Cy (línea azul), $\text{PEG}_{113}\text{-b-PCDAP}_{19}$ + (línea roja) y Cy-AZO-Cy (línea amarilla)

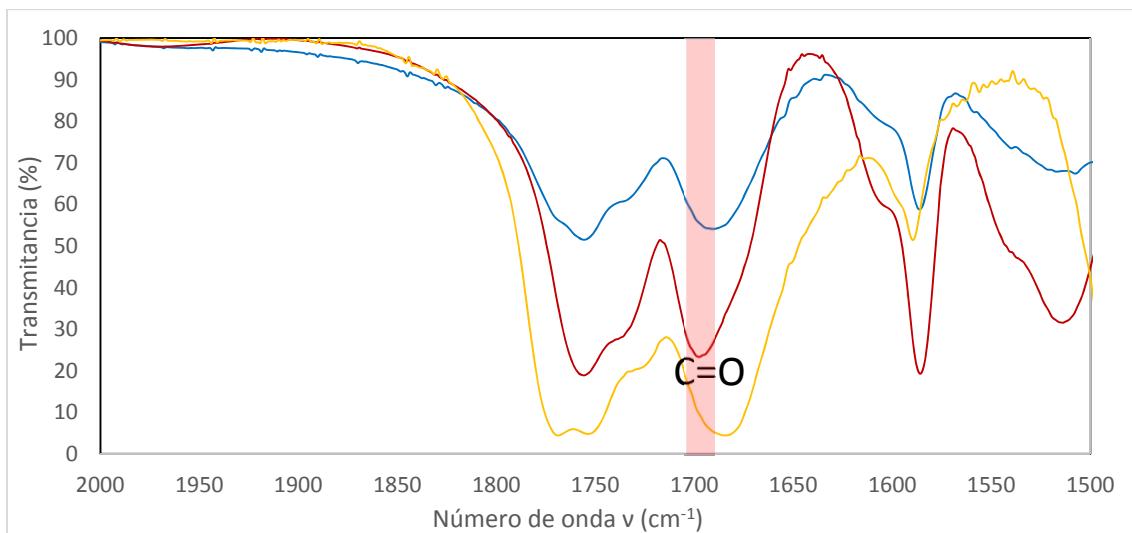


Figura 3.8. Modificación de la banda C=O en FTIR de $\text{PEG}_{113}\text{-b-PCDAP}_{19}$ + Cy-AZO-Cy (línea azul), $\text{PEG}_{113}\text{-b-PCDAP}_{19}$ + (línea roja) y Cy-AZO-Cy (línea amarilla)

En la Figura 3.8, se muestra la variación de la banda de tensión del C=O al formarse los enlaces de hidrógeno. Del mismo modo, cuando el grupo carbonilo establece interacciones por enlace de hidrógeno, la banda de tensión de este enlace aparece a números de onda ligeramente más bajos. En el Anexo B se recogen los espectros FTIR de todos estos polímeros supramoleculares.

3.5 Estudio de los autoensamblados en fase acuosa

Los agregados de los copolímeros supramoleculares se prepararon mediante el método de nanoprecipitación, a partir de una disolución en un disolvente orgánico miscible con agua. Sobre esa disolución se añadió H_2O miliQ en pequeñas porciones mientras se registró en un espectrofotómetro UV-vis la absorbancia a 650 nm. En el

momento en que en la disolución comienzan a formarse los agregados se produce la dispersión de la luz incidente, y por lo tanto, llega menos luz al detector. Consecuentemente la medida aparente de absorbancia aumenta hasta que alcanza un valor constante cuando ya se han formado los agregados. La disolución obtenida en este punto se dializó frente a H₂O miliQ para eliminar el disolvente orgánico. La disolución dializada se diluyó con H₂O miliQ para obtener una dispersión acuosa de agregados con una concentración final de polímero de 1mg/mL.

Los agregados de estos polímeros supramoleculares se prepararon a partir de disoluciones de THF, excepto con **PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉ + Cy-AZO-Cy** que, debido a limitada solubilidad, se usó DMF. En las figuras 3.9 y 3.10 se muestran las curvas de turbidimetría registradas. Debe remarcarse que en todos los casos se detectó la precipitación parcial de la muestra durante la etapa de diálisis. A pesar de esto, se separó la disolución sobrenadante y se estudió mediante dispersión de luz dinámica (DLS) y TEM (*Transmission Electron Microscopy*).

Para intentar superar esta limitación se preparó un nuevo polímero supramolecular con **Cy-AZO-Cy**, en el que solamente se funcionalizaron la mitad de las unidades DAP, denominado **PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉ + Cy-AZO-Cy 50%**. Sin embargo, la disolución precipitó igualmente al dializar.

Finalmente, se prepararon dos últimos copolímeros supramolecular combinando **Cy-AZO-Cy** con **Cy-ALK** y **Cy-AZO** con **Cy-ALK-Cy** en proporción molar 1:1 en ambos casos. El primero de los copolímeros supramoleculares **PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉ + Cy-AZO-Cy 50% + Cy-ALK 50%** no se logró obtener dado que no se pudo solubilizar la mezcla de los componentes en ningún disolvente. Por ello no se intentó la preparación de los agregados. Con el polímero **PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉ + Cy-AZO 50% + Cy-ALK-Cy 50%** se consiguieron dispersiones de agregados estables que se caracterizaron mediante DLS y TEM.

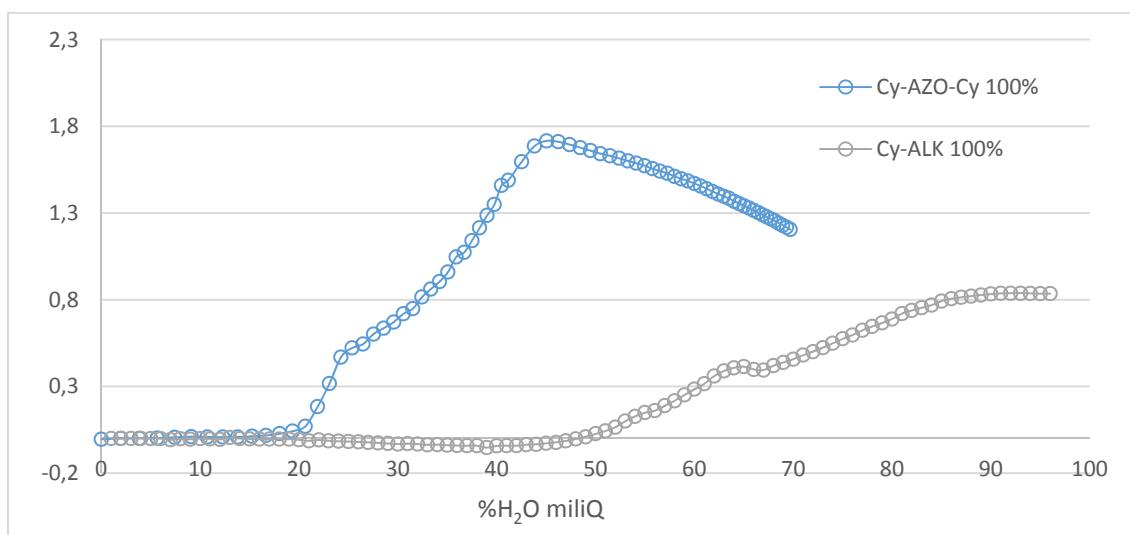


Figura 3.9 Formación de agregados para PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉ con Cy-AZO-Cy (azul) y Cy-ALK (gris)

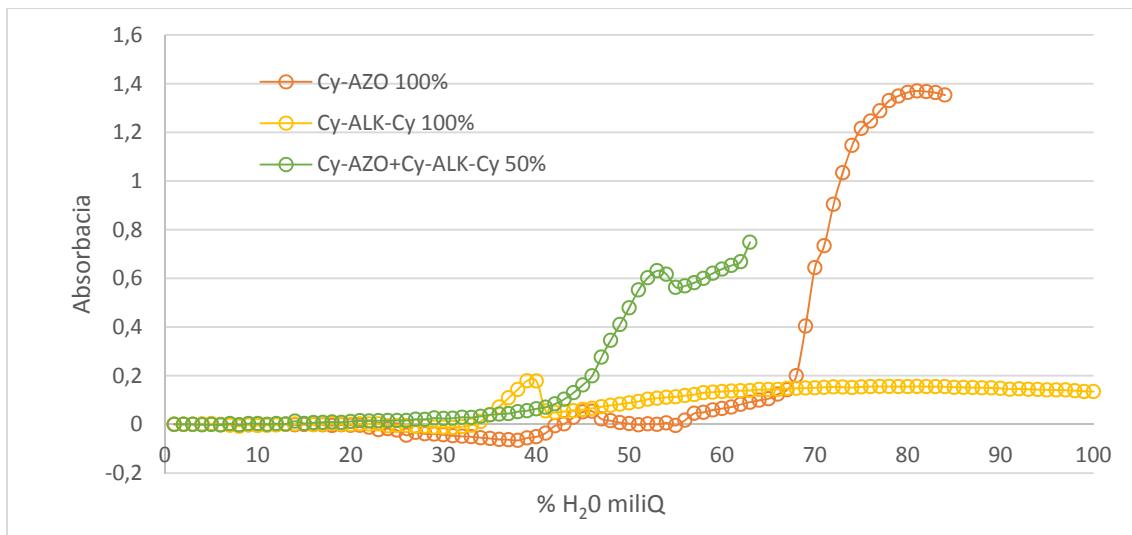


Figura 3.10 Formación de agregados para $\text{PEG}_{113}\text{-b-PCDAP}_{19}$ con Cy-AZO (naranja), por otro lado Cy-ALK-Cy (amarillo) y una mezcla de Cy-AZO y Cy-ALK-Cy al 50% cada uno (amarillo)

El tamaño de los agregados en disolución se determinó mediante dispersión de luz dinámica (DLS). En esta técnica se mide la intensidad de la luz dispersada por las nanopartículas; cuanto mayor sea el tamaño, mayor será la dispersión de luz. La técnica considera que los agregados son idealmente esféricos en disolución y, con esta suposición, se determina el diámetro hidrodinámico (D_h) promedio.

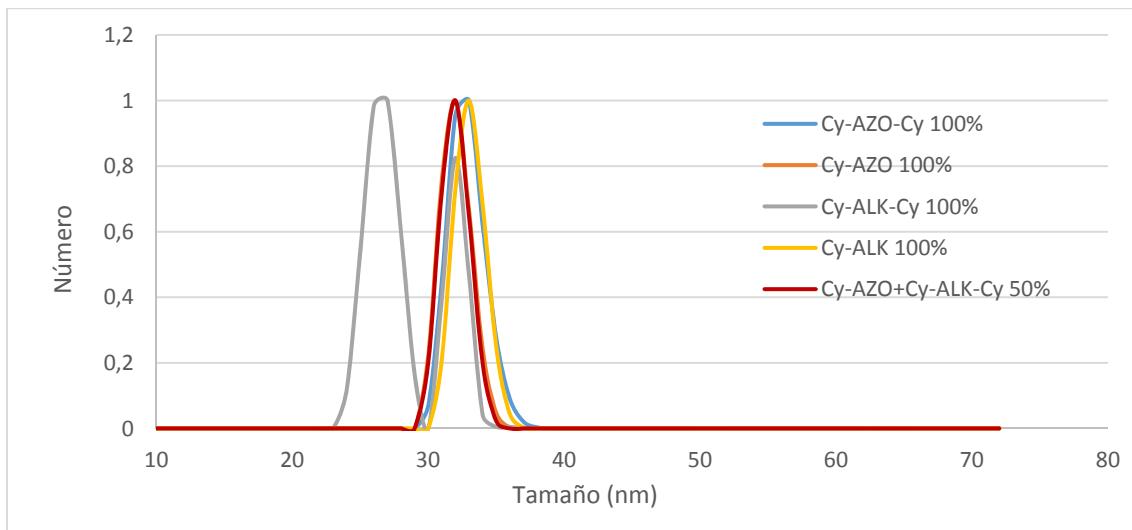


Figura 3.11 Grafica de DSL para la determinación del tamaño de los agregados en disolución acuosa

En la Figura 3.11 se muestran las distribuciones de tamaño, D_h , de los agregados estudiados que está en torno a . Los valores obtenidos no distan mucho del tamaño de los agregados formados únicamente con el copolímero. $\text{PEG}_{113}\text{-b-PCDAP}_{19}$. Con Cy-ALK-Cy se obtienen distribución de valores bimodal probablemente debida formación de agregados de mayor tamaño.

Finalmente, los agregados se estudiaron por TEM (*Transmission Electron Microscopy*) con muestras teñidas con acetato de uranilo. Como puede observarse en la Figura 3.11Se todos los copolímeros supramoleculares forman micelas con un diámetro entre 25 y 35 nm que concuerdan con los determinados por DSL.

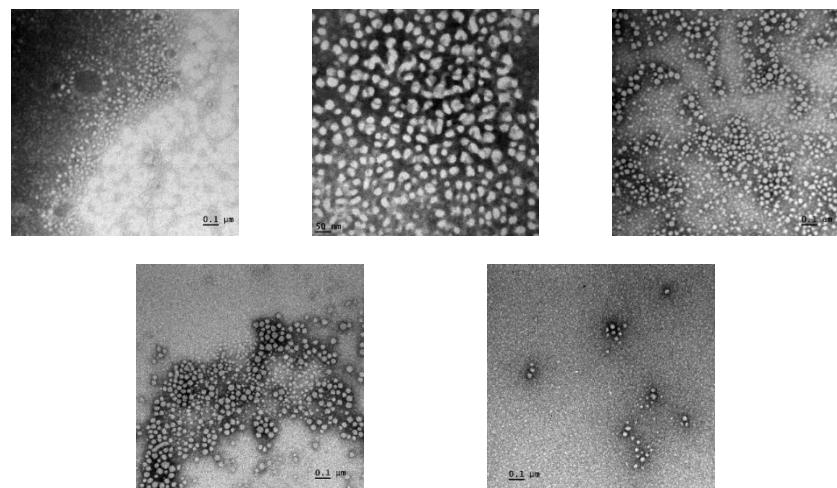


Figura 3.12 Fotografías de TEM. En las imágenes, las barras corresponden a una longitud de 0,1μm; 50nm; 0,1μm; 0,1μm y 0,1μm (de izq a dcha y de arriba abajo)

4 Conclusiones

Tras la finalización de la parte experimental, las principales conclusiones de este trabajo son:

- Se ha diseñado una estrategia sintética adecuada para preparar derivados de ácido cianúrico, en comparación con anteriores trabajos del grupo donde se obtenían derivados di- o tri-sustituidos complicados de separar. Se han obtenido todos los compuestos derivados de ácido cianúrico propuestos. El compuesto 4,4'-dihidroxiazobenceno, no se ha obtenido con el rendimiento esperado, por lo que se debería reconsiderar la obtención del producto mejorando el procedimiento empleado o empleando otro distinto.
- El estudio de los compuestos en disolución acuosa mediante UV-Vis, se ha observado la fotoisomerización *trans-cis*, donde el tiempo de irradiación de la muestra para alcanzar el estado fotoestacionario varía, siendo en este caso más rápido para el **Cy-AZO** que el **Cy-AZO-Cy**.
- En la síntesis de copolímeros bloque supramoleculares mediante su caracterización por RMN e IR se ha podido comprobar las interacciones mediante enlaces de hidrógeno que se establecen entre ambos componentes
- En la formación de autoensamblados en disolución acuosa, no se ha podido introducir de forma efectiva los derivados de ácido cianurico con el método empleado, observándose una precipitación parcial, previsiblemente de los derivados de cianúrico.

Para finalizar, aunque no se han conseguido formar de forma efectiva los agregados fotoestimulables, gracias a la variedad de compuestos derivados de ácido cianúrico obtenidos en este trabajo, es factible la preparación de una variedad de mezclas con estos hasta formar agregados estables, ya sea variando la composición o mezclándolos con otros compuestos previamente sintetizados en el grupo.

5. Parte experimental

5.1. Síntesis de compuestos

5.1.1. Síntesis de 6-bromohexanoato de bencilo (1)

Sobre una disolución de ácido 6-bromohexanoico (20,5 mmol, 4,0 g) en DCM (50 mL) y DMF (0,1 mL) se añade cloruro de oxalilo (26,6 mmol, 2,31 mL). La reacción se mantiene en un baño de hielo durante 18 h. Al cabo de este tiempo se elimina el disolvente en el rotavapor y el residuo se disuelve en DCM (30 mL) y alcohol bencílico (19 mmol, 2 mL) y se enfriá en un baño de hielo. A continuación, se adiciona gota a gota Et₃N (3 mL) en DCM (10 mL). La reacción se deja progresar durante 4 h a temperatura ambiente. La reacción se lava con agua (3×XX mL) y con una disolución de NaCl saturada (1×XX mL). La disolución orgánica se seca con sulfato de magnesio y se elimina el disolvente en el rotavapor. El producto se purifica por cromatografía en gel de sílice usando hexano:acetato de etilo 95:5 como eluyente. (Rendimiento: 71%)

¹H NMR [400 MHz, CDCl₃, δ (ppm)]: 7,35 (m, 5H); 5,12 (s, 2H); 3,38 (t, J = 8 Hz, 2H); 2,38 (t, J = 8 Hz, 2H); 1,86 (m, 2H); 1,68 (m, 2H); 1,47 (m, 2H).

¹³C RMN [100MHz, DMSO, δ (ppm)]: 173,22; 136,02; 128,64; 128,56; 128,34; 128,21; 77,73; 77,33; 77,01; 76,69; 66,19; 65,69; 34,06; 33,41; 32,38; 27,64; 24,06.

FTIR (KBr) ν (cm⁻¹): 1725 (C=O); 3025 (Csp²-H); 1260 (C-O).

5.1.2. Síntesis de 6-(2,4,6-trioxo-1,3,5-triazinan-1-il)hexanoato de bencilo (2)

6-Bromohexanoato de bencilo (1) (5,28 mmol, 1,5 g) y ácido cianúrico (26,4 mmol, 3,4g) se disuelven en DMF (37,5 mL). Sobre esta disolución se añade DBU (5,28 mmol, 0,79 mL) gota a gota y se calienta a 70 °C con agitación. Al cabo de 24 h se elimina la DMF mediante destilación. Al residuo obtenido se le añade metanol para precipitar el ácido cianúrico en exceso y se filtra sobre Celite®. El producto se purifica por cromatografía en columna usando gel de sílice y DCM:metanol 95:5 como eluyente. El sólido obtenido se lava con hexano. (Rendimiento: 56%)

¹H NMR [400 MHz, DMSO, δ (ppm)]: 11,37 (m, 2H); 7,35 (m, 5H); 5,08 (s, 2H); 3,60 (t, J=8 Hz, 2H); 2,34 (t, J=8 Hz, 2H); 1,51 (m, 4H); 1,25 (m, 2H).

¹³C RMN [100MHz, DMSO, δ (ppm)]: 173,15; 150,28; 149,08; 136,75; 128,88; 128,35; 66,76; 33,75; 27,44; 25,96; 24,57.

FTIR (KBr) ν (cm⁻¹): 3200 (N-H); 3086 (Csp²-H); 1736 (C-Ar); 1691 (C=O); 1170 (C-O).

5.1.3. Síntesis del ácido 6-(2,4,6-trioxo-1,3,5-triazinan-1-il) hexanoico (3)

Se añade 6-(2,4,6-trioxo-1,3,5-triazinan-1-il)hexanoato de bencilo (2) (3,15mmol, 1,00g) en THF (100mL) en un matraz que se desoxigena mediante 3 ciclos de vacío-Ar.

A esta disolución se le añade Pd/C (0,85mmol, 0,10g). Se introduce hidrógeno mediante 3 ciclo de vacío/H₂ y se mantiene con agitación 24 h. Tras comprobar mediante ¹H RMN que todavía queda reactivo, se adiciona más Pd/C (0,85mmol, 0,10g) y se deja 24 h más. La reacción se filtra a través de Celite® lavando con THF, la disolución obtenida se evapora y el sólido se lava con dietil éter. (Rendimiento: 90%)

¹H NMR [400 MHz, DMSO, δ (ppm)]: 11,99 (s, 1H); 11,38 (s, 2H); 3,60 (t, J=8 Hz, 2H); 2,18 (t, J = 8 Hz, 2H); 1,49 (m, 4H); 1,24 (m, 2H).

¹³C RMN [100MHz, DMSO, δ (ppm)]: 174,84; 150,28; 149,08; 33,93; 30,88; 27,52; 26,07; 24,60.

FTIR (KBr) ν (cm⁻¹): 3218 (O-H); 3100 (N-H); 1680 (C=O)

5.1.4. Síntesis de 4,4'-dihidroxiazobenceno (4)

Una disolución de NaNO₂ (92 mmol, 6,3 g) en H₂O (130 mL), previamente enfriada en un baño de hielo, se adiciona lentamente sobre una disolución de 4-aminofenol (92 mmol, 10 g) en HCl 2M (180 mL) mantenida con agitación en un baño de hielo. A continuación, se adiciona lentamente una disolución de fenol (96 mmol, 8,6 g) en NaOH acuoso (3 M) también previamente enfriada. La mezcla resultante se mantiene agitando 1h en baño de hielo y 24 h a temperatura ambiente. La reacción se acidifica con HCl (1M) hasta un pH próximo a 2-3 y se extrae con acetato de etilo (5×30 mL). Una vez evaporado el disolvente, el crudo de reacción se adsorbe en gel de sílice y se purifica mediante cromatografía en columna eluyendo con DCM:acetato de etilo inicialmente 95:5 y cuando empieza a salir el producto 90:10. (Rendimiento: 6%)

¹H NMR [400 MHz, DMSO, δ (ppm)]: 10,10 (s, 2H); 7,70 (m, 4H); 6,90 (m, 4H).

¹³C RMN [100MHz, DMSO, δ (ppm)]: 160,44; 145,74; 124,59; 116,24.

FTIR (KBr) ν (cm⁻¹): 3312 (O-H); 3189 (Csp²-H); 1262 (C-O).

5.1.5. Síntesis de Cy-AZO-Cy

En un matraz de dos bocas se disuelve 4,4'-dihidroxiazobenceno (4) (0,90 mmol, 0,19 g), ácido 6-(2,4,6-trioxo-1,3,5-triazinan-1-il) hexanoico (3) (2,47 mmol, 0,6 g) y DPTS (0,81 mmol, 0,23 g) en DCM (10 mL) y DMF (1 mL) en atmósfera de Ar. La disolución se enfriá en un baño de hielo y se añade EDC (2,73mmol, 0,42 g). Tras 30 min, cuando la mezcla está completamente disuelta, se retira el baño de hielo y se deja agitando la reacción durante 3 días. Finalmente se evapora el disolvente y el sólido aislado se lava con metanol caliente. (Rendimiento: 67%)

¹H NMR [400 MHz, DMSO, δ (ppm)]: 11,39 (s, 4H); 7,96 (m, 4H); 7,37 (m, 4H); 3,66 (t, J = 8 Hz, 4H); 2,62 (t, J = 8 Hz, 4H); 1,68 (m, 4H); 1,57 (m, 4H); 1,37 (m, 4H).

¹³C RMN [100MHz, DMSO, δ (ppm)]: 171,99; 153,24; 150,33; 149,93; 149,09; 124,29; 123,39; 33,80; 27,49; 25,92; 24,42.

FTIR (KBr) ν (cm⁻¹): 3200 (N-H); 3034 (Csp²-H); 1676(C=O); 1194 (C-O)

EM (TOF, m/z): 687,21 (Cy-AZO-Cy + Na⁺)

5.1.6. Síntesis de Cy-AZO

Una mezcla de 4-hidroxi-4'-isobutoxiazobenceno (1,40 mmol, 0,40 g), ácido 6-(2,4,6-trioxo-1,3,5-triazinan-1-il)hexanoico (3) (2,02 mmol, 0,49 g) y DPTS (1,33 mmol, 0,38 g) mantenida bajo atmósfera de Ar en un baño de hielo se disuelve en DCM (10mL) y DMF (1mL). Se añade EDC (4,42 mmol, 0,68 g) y, una vez que la mezcla se ha disuelto, se retira el baño de hielo y se mantiene con agitación 3 días. Al cabo de este tiempo, se evapora el disolvente y se recristaliza en metanol. (Rendimiento: 70%)

¹H NMR [400 MHz, DMSO, δ (ppm)]: 11, 41(s, 2H); 7,88(m, 4H); 7,33(m, 2H); 3,87(d, J = 8 Hz, 2H); 3,68(t, J = 8 Hz, 2H); 2,67(t, J = 8 Hz, 2H); 2,06(m, 1H); 1,68(m, 2H); 1,57(m, 2H); 1,37(m, 2H); 1,01(d, 6H).

¹³C RMN [100MHz, DMSO, δ (ppm)]: 171,55; 161,62; 152,13; 149,85; 149,61; 145,95; 124,58; 123,37; 122,77; 115,06; 74,13; 33,30; 27,65; 27,00; 25,43; 23,93; 18,95.

FTIR (KBr) ν (cm⁻¹): 3206(N-H); 3101(Csp²-H); 1681(C=O); 1201(C-O)

EM (TOF, m/z): 518,19(Cy-AZO + Na⁺)

5.1.7. Síntesis de Cy-ALK-Cy

Una mezcla de ácido 6-(2,4,6-trioxo-1,3,5-triazinan-1-il)hexanoico (3) (2,47 mmol, 0,6 g), 1,10-decadíol (0,9 mmol, 0,156 g) y DPTS (0,81 mmol, 0,23g) mantenida bajo atmósfera de Ar en un baño de hielo se disuelve en DCM (10mL) y DMF (1mL). Se añade EDC (2,70 mmol, 0,42g) y, una vez que la mezcla se ha disuelto, se retira el baño de hielo y se mantiene con agitación 3 días. La disolución resultante evapora y el sólido se recristaliza en metanol. (Rendimiento: 68%)

¹H NMR [400 MHz, DMSO, δ (ppm)]: 11,38(s, 3H); 3,98(t, J = 6,6 Hz, 4H); 3,60(t, J = 8 Hz, 4H); 2,26(t, J = 8 Hz, 4H); 1,51(m, 12H); 1,24(m, 16H).

¹³C RMN [100MHz, DMSO, δ (ppm)]: 172,81; 149,78; 63,63; 33,30; 28,78; 28,53; 28,06; 26,96; 25,48; 25,31; 24,11.

FTIR (KBr) ν (cm⁻¹): 3212(N-H); 3101(Csp²-H); 1681(C=O); 1201(C-O).

EM (TOF, m/z): 647,30(Cy-ALK-Cy + Na⁺)

5.1.8. Síntesis de Cy-ALK

Una mezcla de ácido 6-(2,4,6-trioxo-1,3,5-triazinan-1-il)hexanoico (3) (2,02mmol, 0,49g), 1-decanol (1,40 mmol, 0,53g) y DPTS (1,33 mmol, 0,38g) mantenida bajo atmósfera de Ar en un baño de hielo se disuelve en DCM (10mL) y DMF (1mL). Se añade EDC (4,42 mmol, 0,68 g) y, una vez que la mezcla se ha disuelto, se retira el baño de hielo y se agita a temperatura ambiente durante 3 días. Se evapora el disolvente y el crudo se recristaliza en metanol. (Rendimiento: 75%)

¹H NMR [400 MHz, DMSO, δ (ppm)]: 11,36 (s, 2H); 3,98 (t, J = 8 Hz, 2H); 3,59 (t, J = 8 Hz, 2H); 2,26 (t, J = 8 Hz, 2H); 1,51 (m, 6H); 1,23 (m, 17H); 0,84 (m, 3H)

¹³C RMN [100MHz, DMSO, δ (ppm)]: 172,80; 149,78; 148,56; 63,62; 33,31; 31,25; 28,88; 28,64; 28,56; 28,07; 26,96; 25,48; 25,31; 24,12; 22,06; 13,91.

FTIR (KBr) ν (cm⁻¹): 3206(N-H); 3093(Csp²-H); 1684(C=O); 1181(C-O).

EM (TOF, m/z): 406,24(Cy-ALK + Na⁺)

5.1.9. Síntesis de PEG₁₁₃-PCDAP₁₉

En un matraz Schlenk cargado con un tiol derivado de 2,6-diacilaminopiridina (DAP) (ver Figura 3.5.) (1,3 mmol, 328 mg) y PEG₁₁₃-PC₁₉ (previamente sintetizado por el grupo de investigación) (0,022 mmol, 300mg) sometido a ciclos de vacío/Ar se adiciona THF seco (7 mL). Una vez disuelta la mezcla, se añade DMPA (1,1x10⁻³mmol, 0,42mg) y se irradia la disolución con una lámpara de Hg Philips PL-S 9W con una intensidad 365nm en una caja tapada (ver Figura 5.1) durante 4 h. La reacción se vierte, con la ayuda de una pipeta, sobre dietil éter (300 mL) frío bajo agitación para precipitar el polímero y se deja enfriar 24 h en el congelador. El polímero se aísla por filtración y se lava con dietil éter frío. El polímero se purifica disolviéndolo en THF y precipitando en dietíter, se pasa a través una columna de exclusión (Biobeads SX1) disuelto en THF y se precipita nuevamente en diétil éter frío.

5.2. Preparación de polímeros supramoleculares

Se prepararon disolviendo en un vial 25 mg de copolímero PEG₁₁₃-PCDAP₁₉ y la cantidad necesaria de los derivados de cianúrico correspondiente, usando la mínima cantidad de disolvente de calidad HPLC. La disolución se filtró con filtro de teflón de 0,2 micras, y el disolvente se evaporó a temperatura ambiente en un agitador orbital. Finalmente, se secó en un desecador a vacío para eliminar las trazas de disolvente. La cantidad de ácido cianúrico se calculó considerando la funcionalización de todas las unidades de DAP. Sobre esa cantidad calculada, se utilizó solamente el 95% para evitar que un exceso experimental del derivado cianúrico pudiera precipitar e interferir en el proceso de formación de los agregados.

Tabla 5.1. Resumen de todos los copolímeros supramoleculares sintetizados.

Copolímero supramolecular	Porcentaje DAP modificado	masa derivado Cy (mg)	Disolvente
PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉+ Cy-AZO-Cy	100%	5,50	THF+DMSO
PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉+ Cy-AZO-Cy	50%	2,25	DMF
PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉+ Cy-AZO	100%	8,47	THF
PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉+ Cy-ALK-Cy	100%	1,17	THF
PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉+ Cy-ALK	100%	6,35	THF
PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉+ Cy-AZO-Cy + Cy-ALK	50% + 50%	3,67	DMF
PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉+ Cy-AZO + Cy-ALK-Cy	50% + 50%	2,82	THF

5.3. Irradiación de los azobencenos con ácido cianurico en disolución

Se preparan disoluciones aprox. 10^{-4} M que se irradiaron en cubetas de cuarzo de 1 cm con una lámpara de Hg Philips PL-S 9W con una intensidad 365 nm según el montaje de la Figura 5.1.



Figura 5.1. Montaje de irradiación

5.4. Formación de agregados

En un vial se disolvieron 5 mg del copolímero supramolecular en 1 mL del disolvente seleccionado. La disolución se filtró a través de un filtro de teflón de 0,2 micras en una cubeta de cuarzo. Sobre esta disolución se añadieron porciones de 20 μ L de H₂O miliQ mientras se registró el valor de la absorbancia a 650 nm. Una vez alcanzado un valor estable, la dispersión obtenida se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa de 5 micras y se dializó durante 2 días frente a agua usando una membrana de acetato de celulosa regenerada (Spectra-Por7). El agua se renovó 12h. El resultado tras la dialización se recogió en una probeta y se diluyó hasta un volumen de 5 mL. En la tabla 5.1. se

recogen los disolventes que se emplearon para solubilizar cada copolímero supramolecular:

Tabla 5.1. Resumen de todos los agregados formados

Copolímero supramolecular	Disolvente
PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉+ Cy-AZO-Cy (100%)	DMF
PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉+ Cy-AZO (100%)	THF
PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉+ Cy-ALK-Cy (100%)	THF
PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉+ Cy-ALK (100%)	THF
PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉+ Cy-AZO + Cy-ALK-Cy (50%+50%)	THF
PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉+ Cy-AZO-Cy (50%)	DMF

5. Bibliografía:

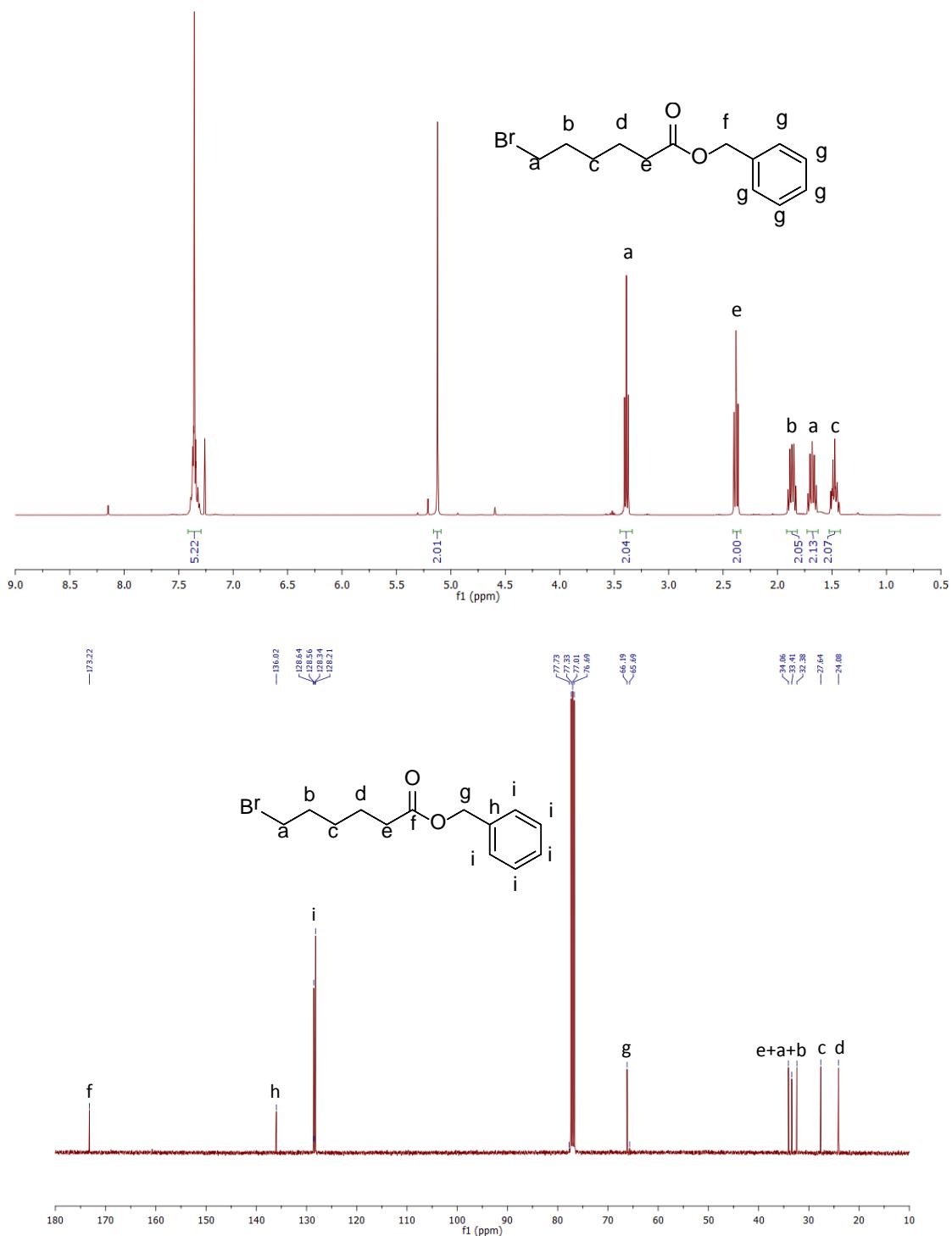
- (1) Nanoparticles, A. Nanoscale Microlandscaping on Graphene Oxide Film via Localized Decoration Of. **2013**, No. 207890. <https://doi.org/10.1039/b000000x>.
- (2) Horacio Cabral, Kanjiro Miyata, Kensuke Osad, and K. K. Block Copolymer Micelles in Nanomedicine Applications.Pdf. 2018, p 49.
- (3) 1. CALLISTER, W.D., R. Ciencia e Ingeniería de Materiales, 2 edición.; 2016.
- (4) AREIZAGA, J., CORTÁZAR, M.M., ELORZA, J.M., IRUÍN, J. J. Polímeros; Síntesis 20021.2.
- (5) Geoffrey A Ozin & André Arsenault. Self-Assembling Block Copolymer. In *Nanochemistry, a chemical approach to nanomaterials*; RSC Publishing: Cambridge, 2005; p 435.
- (6) Alejandro Martinez. TFM: COPOLÍMEROS BLOQUE ANFÍFIOS PARA LA PREPARACIÓN DE NANOTRANSPORTADORES EN AGUA, Universidad de Zaragoza, 2017.
- (7) Xiuli Hu, Yuqi Zhang, Zhigang Xie, Xiabin Jing, A. B. and Z. G. Stimuli-Responsive Polymericosomes for Biomedical Applications.Pdf. Biomacromolecules 2017.
- (8) Huihui Kuang, Suhong Wu, Zhigang Xie, Fanbo Meng, X. J. and Y. H. Biodegradable Amphiphilic Copolymer Containing Nucleobase: Synthesis, Self-Assembly in Aqueous Solutions, and Potential Use in Controlled Drug Delivery.Pdf. Biomacromolecules 2012, p 9.
- (9) Hu, D.; Li, Y.; Niu, Y.; Li, L.; He, J.; Liu, X.; Xia, X.; Lu, Y.; Xiong, Y.; Xu, W. Photo-Responsive Reversible Micelles Based on Azobenzene-Modified Poly(Carbonate)s via Azide-Alkyne Click Chemistry. *RSC Adv.* **2014**, 4 (89), 47929–47936. <https://doi.org/10.1039/c4ra07345b>.
- (10) Merino, E.; Ribagorda, M. Control over Molecular Motion Using the Cis-Trans Photoisomerization of the Azo Group. *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, 8, 1071–1090. <https://doi.org/10.3762/bjoc.8.119>.
- (11) Concellón, A.; Blasco, E.; Martínez-Felipe, A.; Martínez, J. C.; Šics, I.; Ezquerra, T. A.; Nogales, A.; Piñol, M.; Oriol, L. Light-Responsive Self-Assembled Materials by Supramolecular Post-Functionalization via Hydrogen Bonding of Amphiphilic Block Copolymers. *Macromolecules.* 2016, pp 7825–7836. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.6b01112>.
- (12) Rijcken, C. J. F.; Lammers, T.; Barz, M.; Talelli, M.; Kiessling, F.; Hennink, W. E. Core-Crosslinked Polymeric Micelles: Principles, Preparation, Biomedical Applications and Clinical Translation. *Nano Today* **2015**, 10 (1), 93–117.
- (13) Yang., D.-H. W. D.-J. Z. W. D. M. X. and Y. Tuning Fluorescence of Tetraphenylethylene in Dilute Solution via Modulating of Multiple-Hydrogebonding Interactions between Hamilton Receptor and Cyanuric Acid. *Royal Society Chem.* **2018**, 18.
- (14) Yanchi Chen, G. M. and H. G. Copper-Catalyzed Reductive Trifluoromethylation of Alkyl Iodides with Togni's Reagent. **2012**, 1–30.
- (15) Hager, K.; Franz, A.; Hirsch, A. Self-Assembly of Chiral Depsipeptide Dendrimers. *Chem. - A Eur. J.* **2006**, 12 (10), 2663–2679. <https://doi.org/10.1002/chem.200501300>.
- (16) Lv, J. A.; Wang, W.; Xu, J.; Ikeda, T.; Yu, Y. Photoinduced Bending Behavior of Cross-Linked Azobenzene Liquid-Crystalline Polymer Films with a Poly(Oxyethylene)

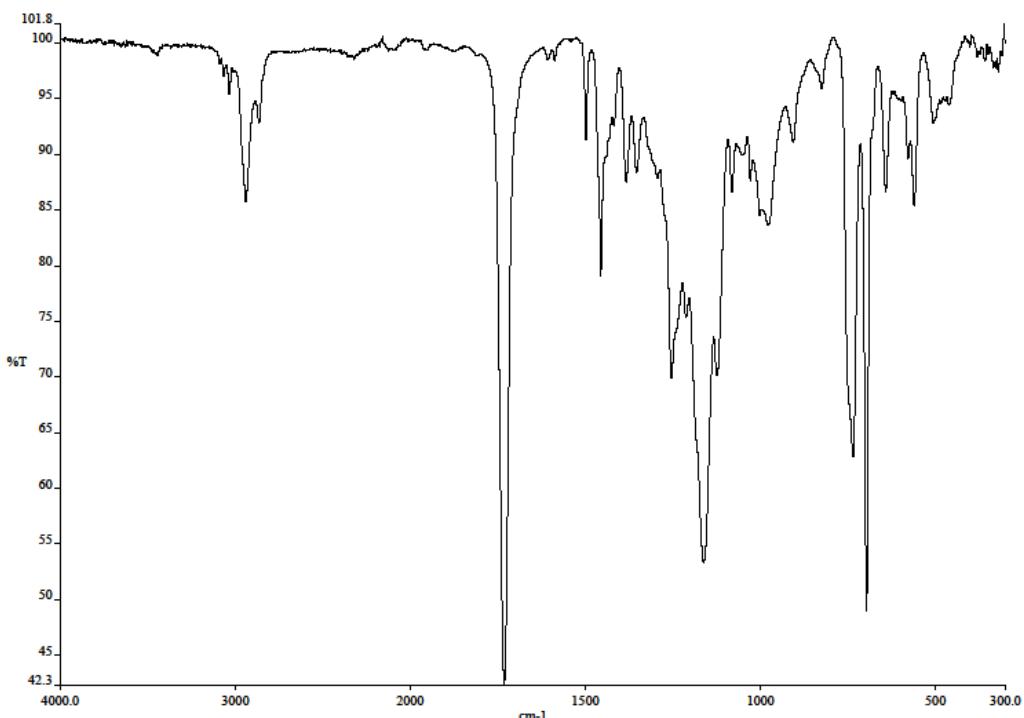
Backbone. *Macromol. Rapid Commun.* **2014**, 35 (14), 1266–1272.

Anexos

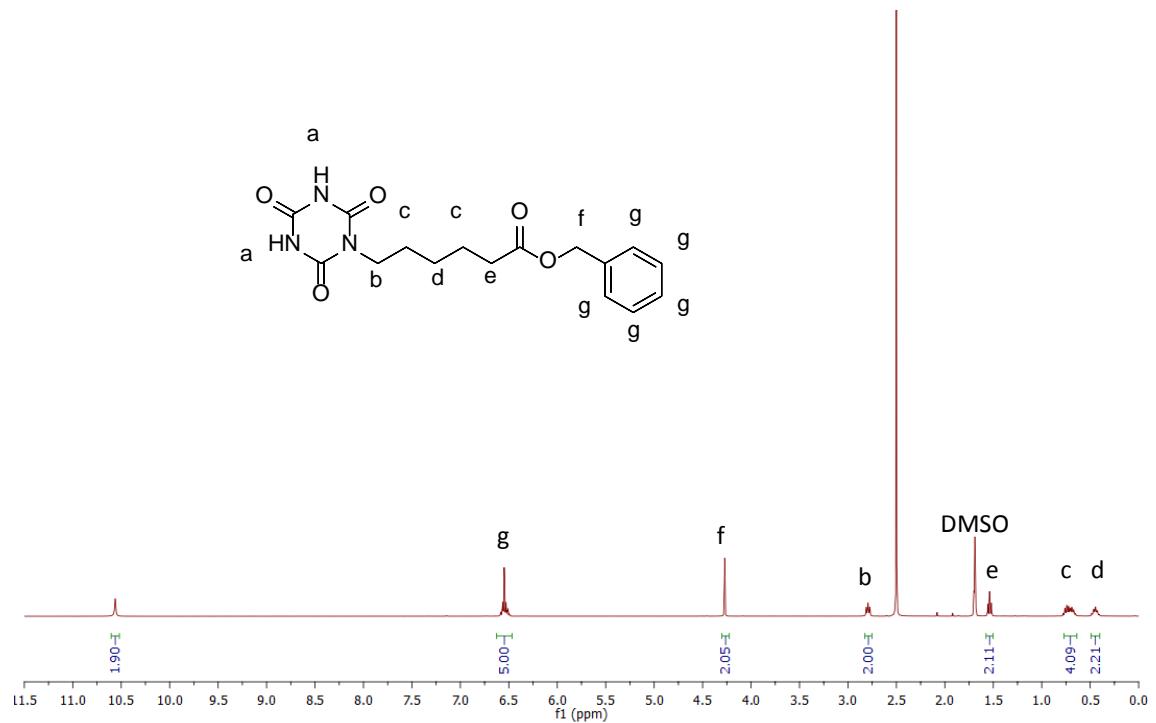
Anexo A ($^1\text{H-RMN}$; $^{13}\text{C-RMN}$, FTIR, Masas)

1. 6 – bromohexanoato de bencilo (1)

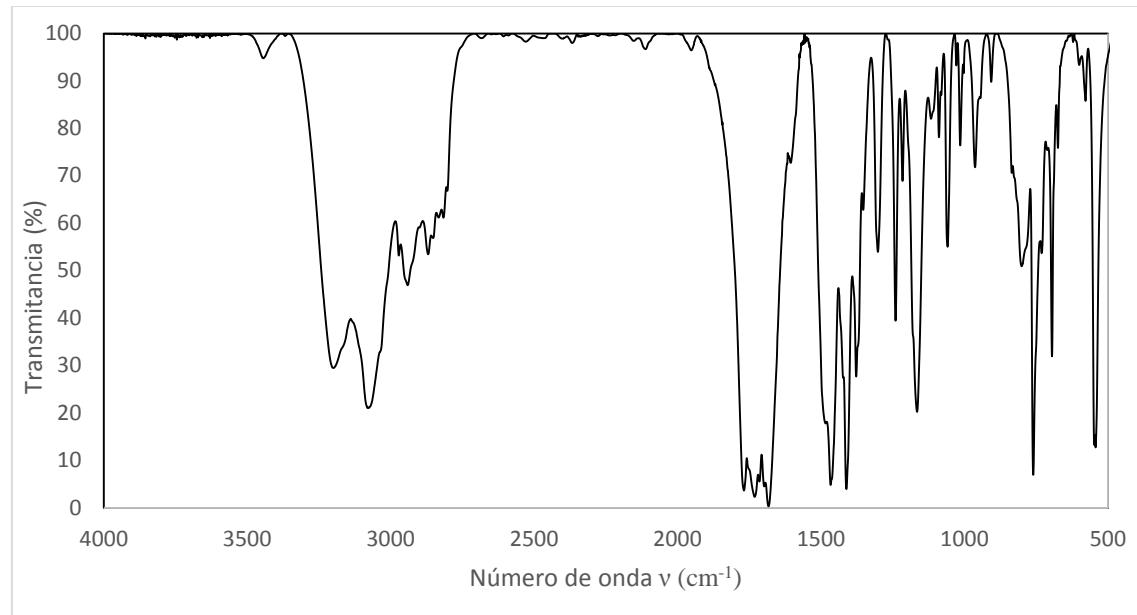
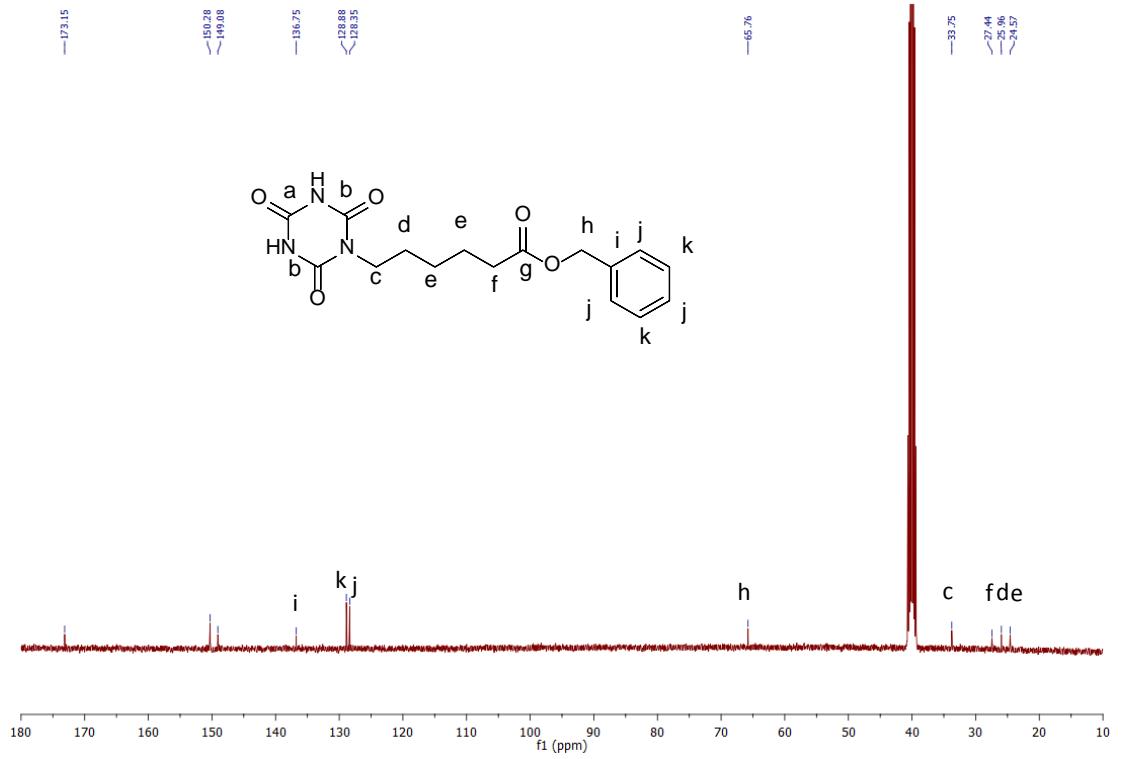




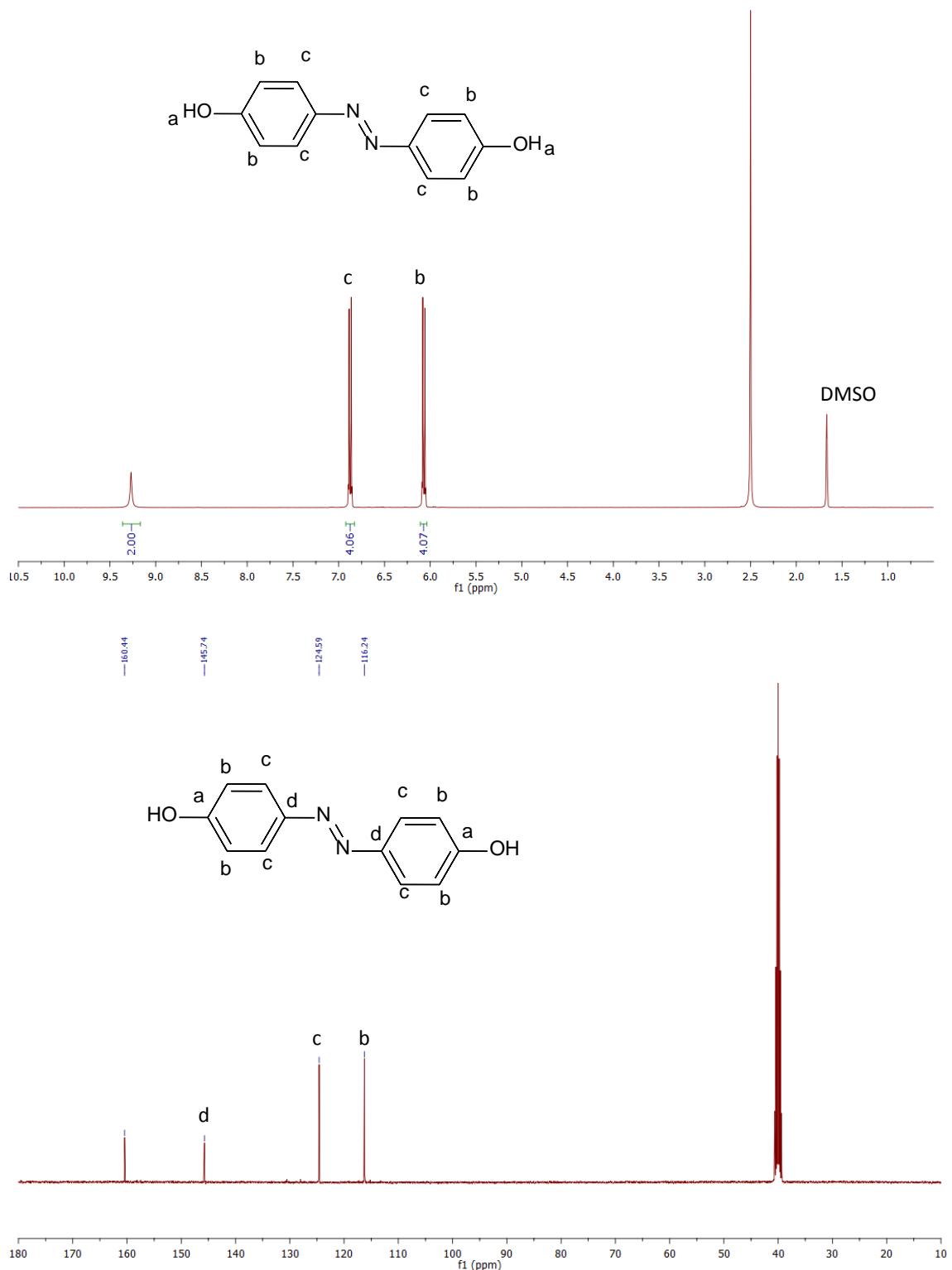
2. 6-(2,4,6-trioxo-1,3,5-triazinan-1-il)hexanoato de bencilo (2)

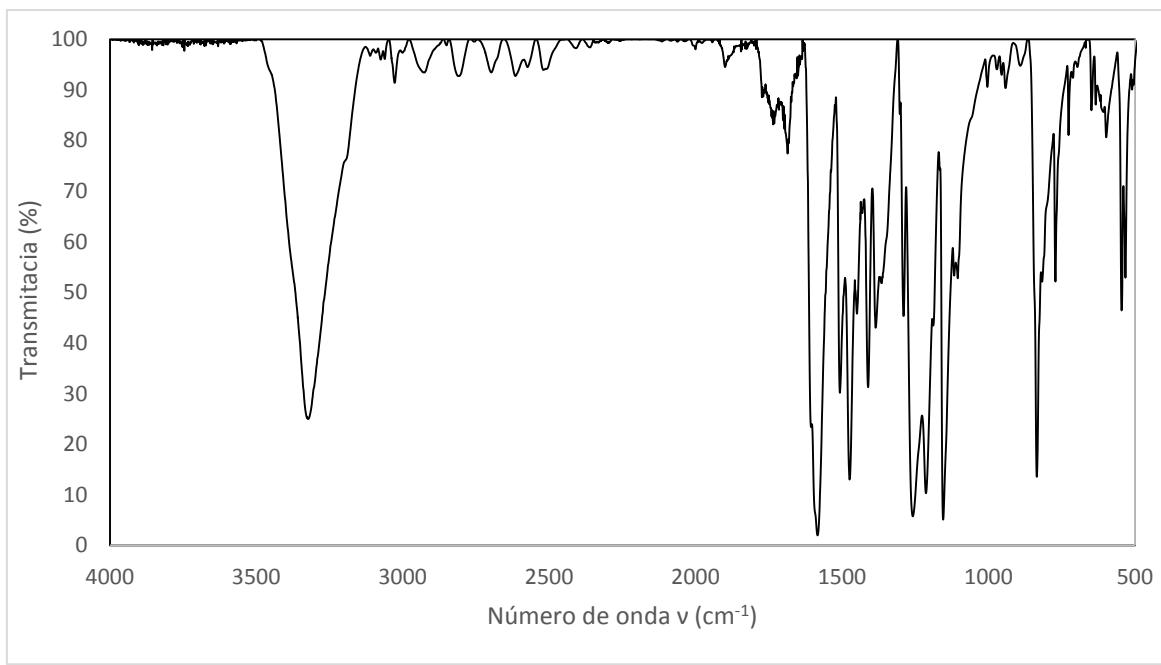


ii

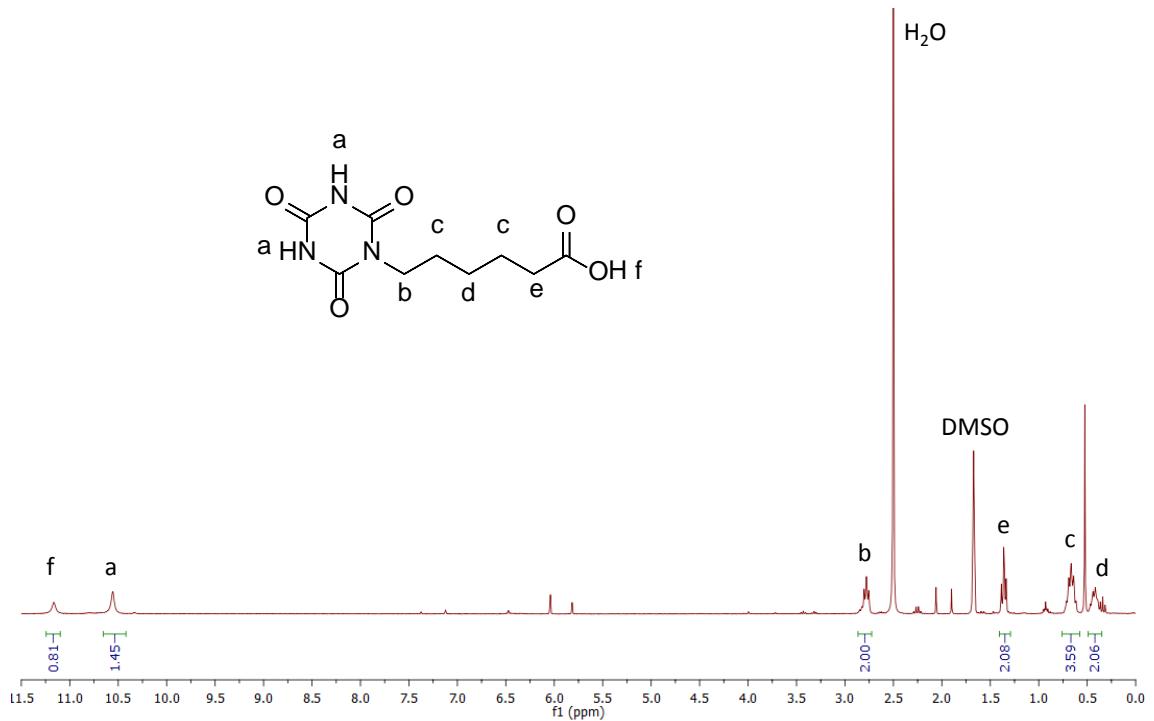


3. 4,4'-dihidroxiazobenceno (4)

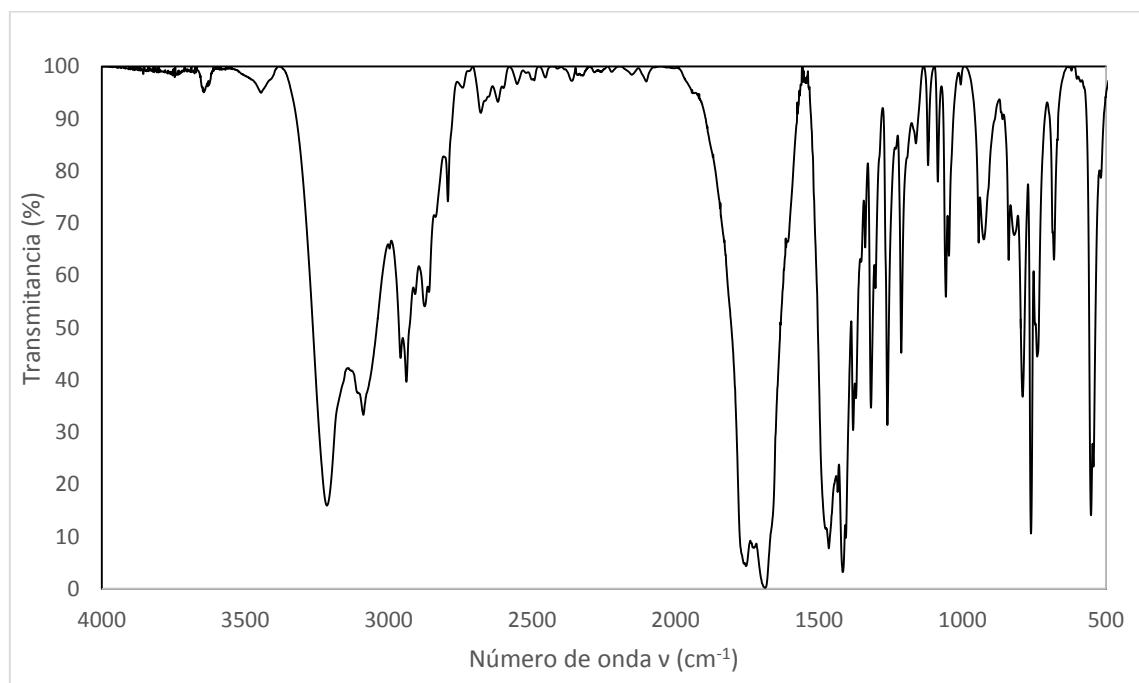
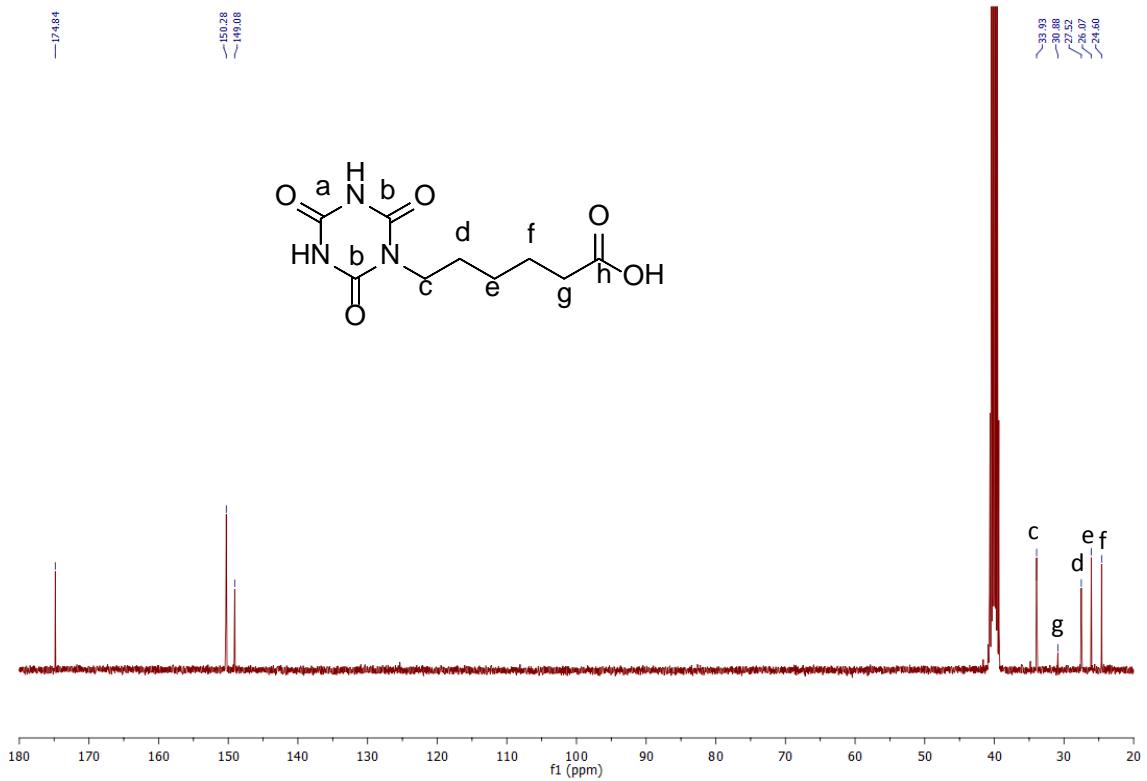




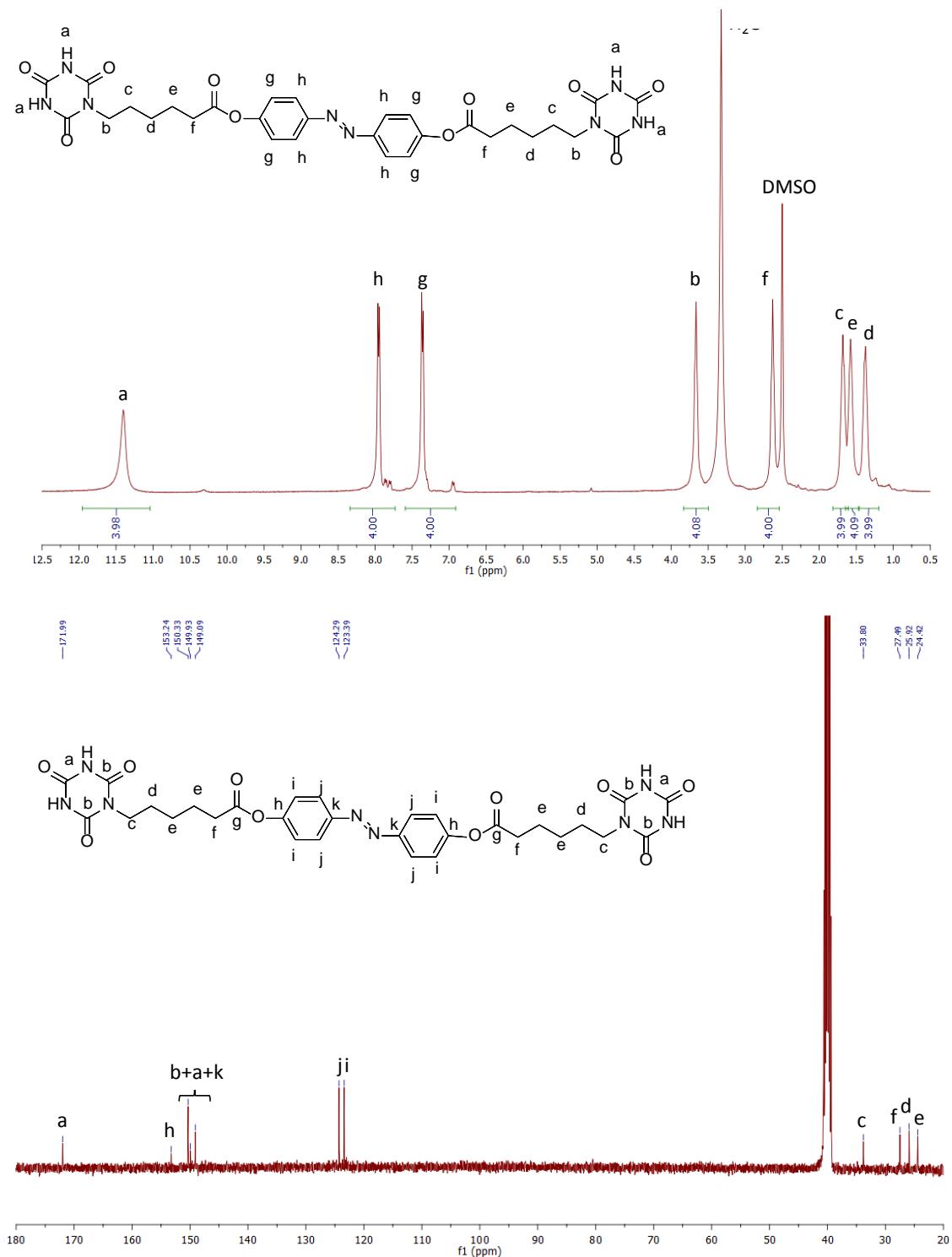
4. ácido 6-(2,4,6-trioxo-1,3,5-triazinan-1-il) hexanoico (3)

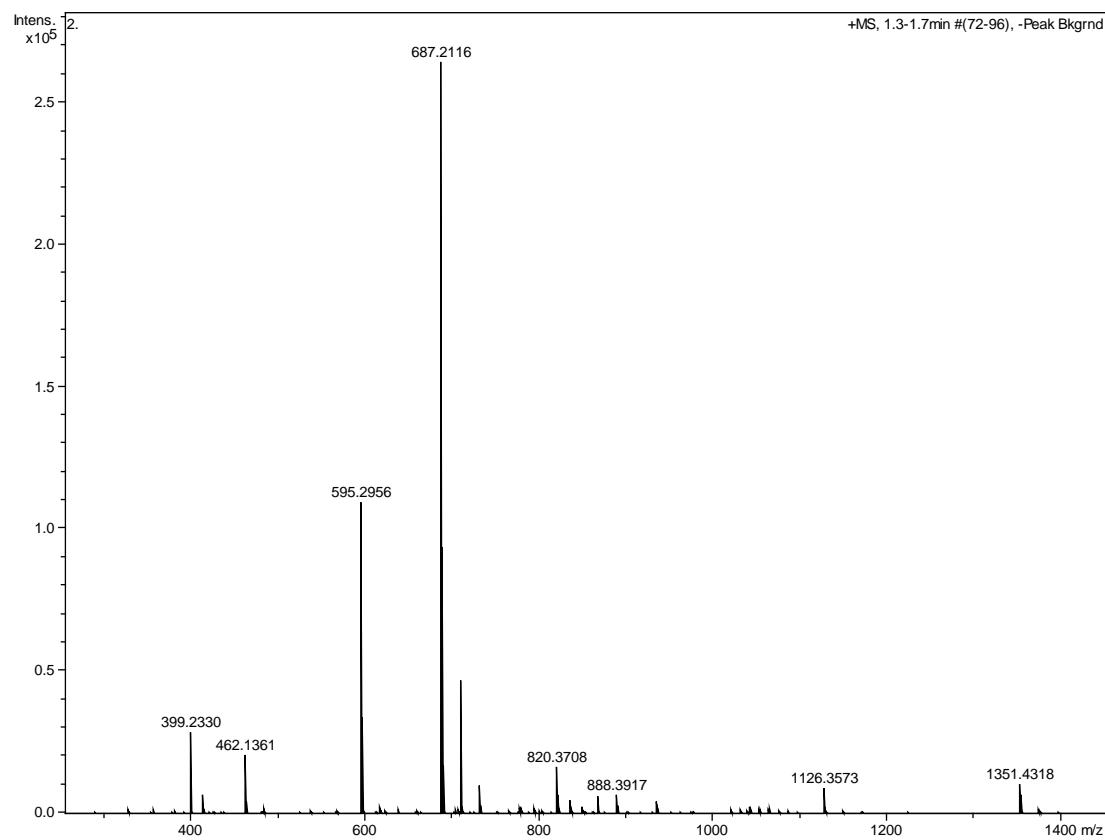
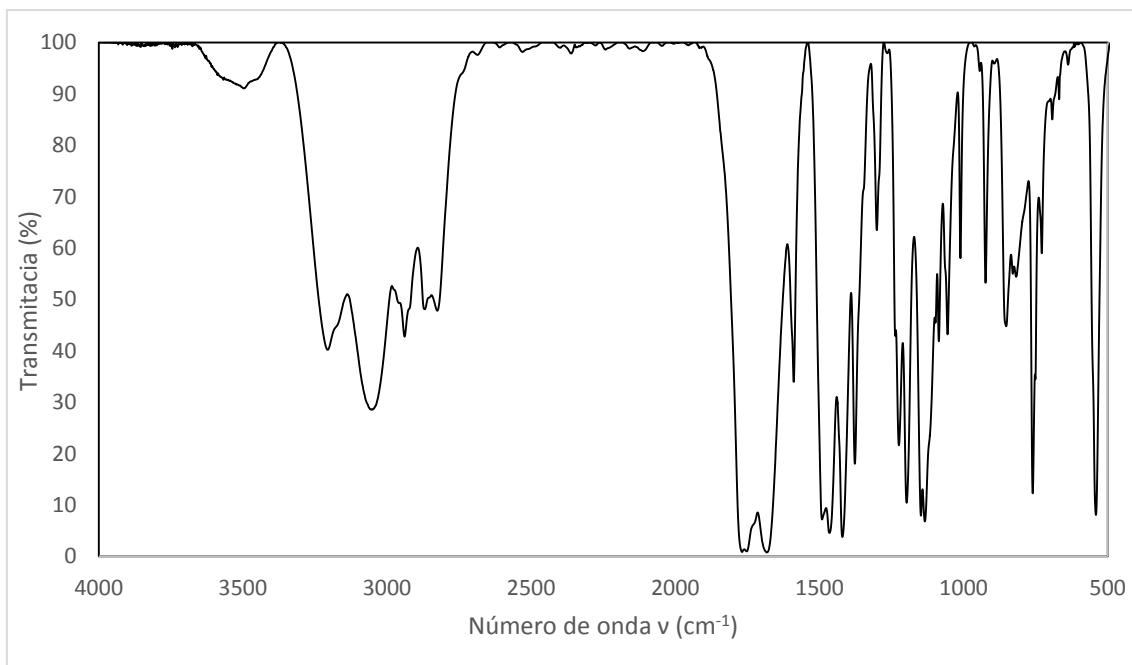


v

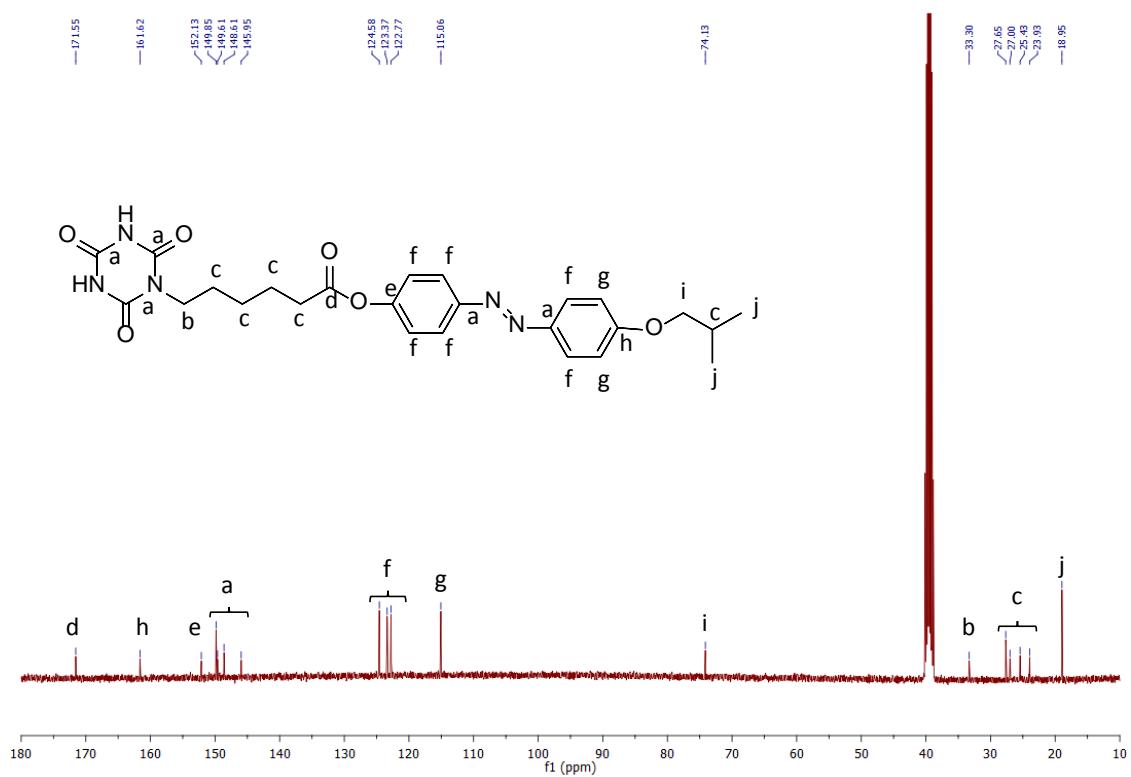
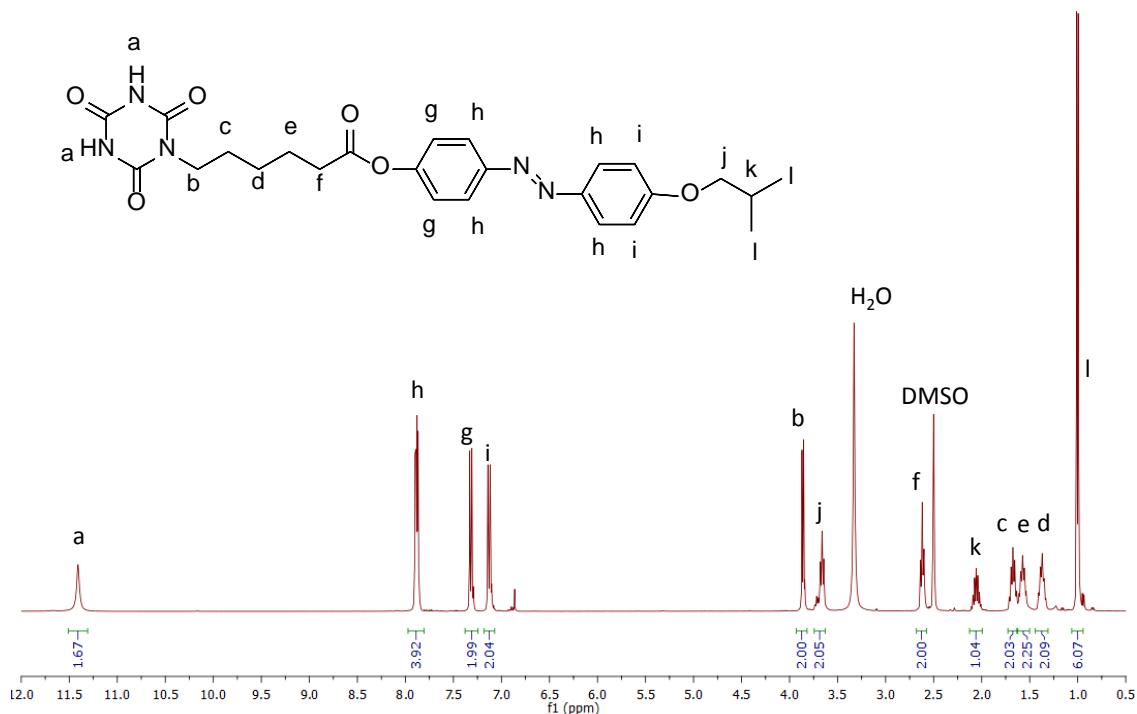


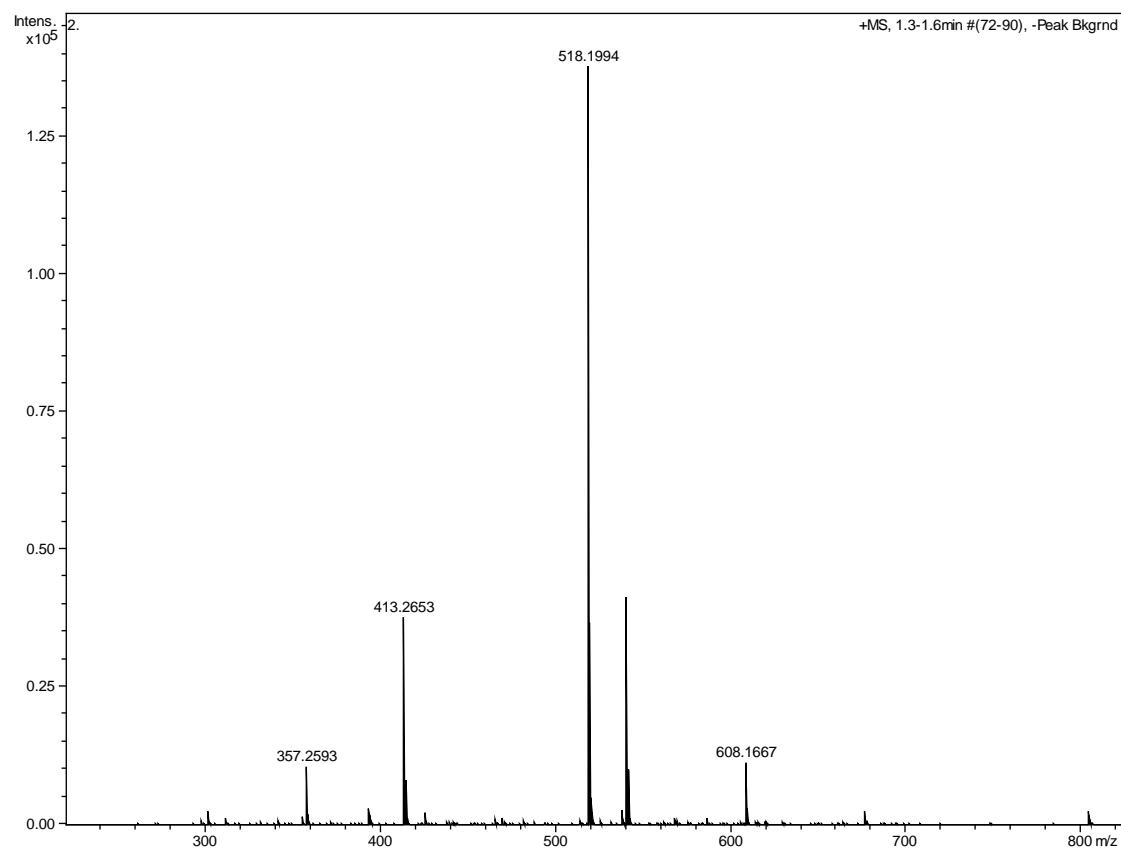
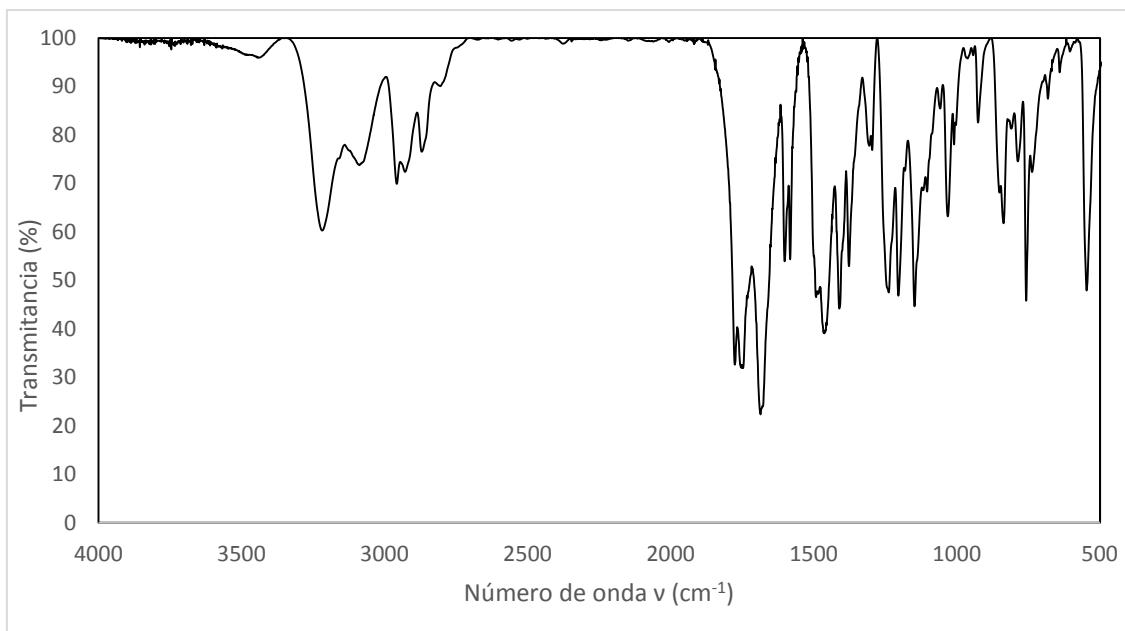
5. Cy-AZO-Cy





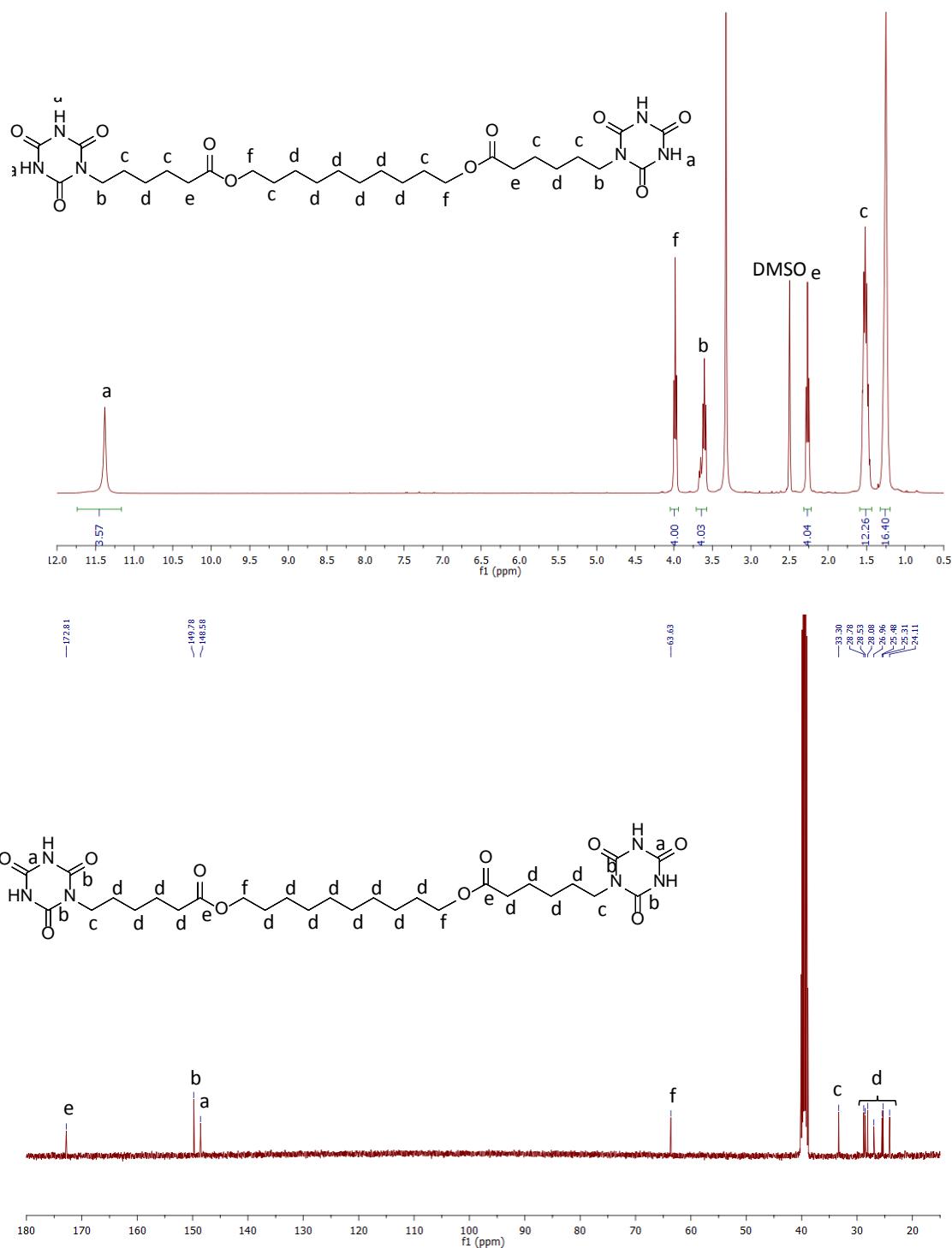
6. Cy-AZO

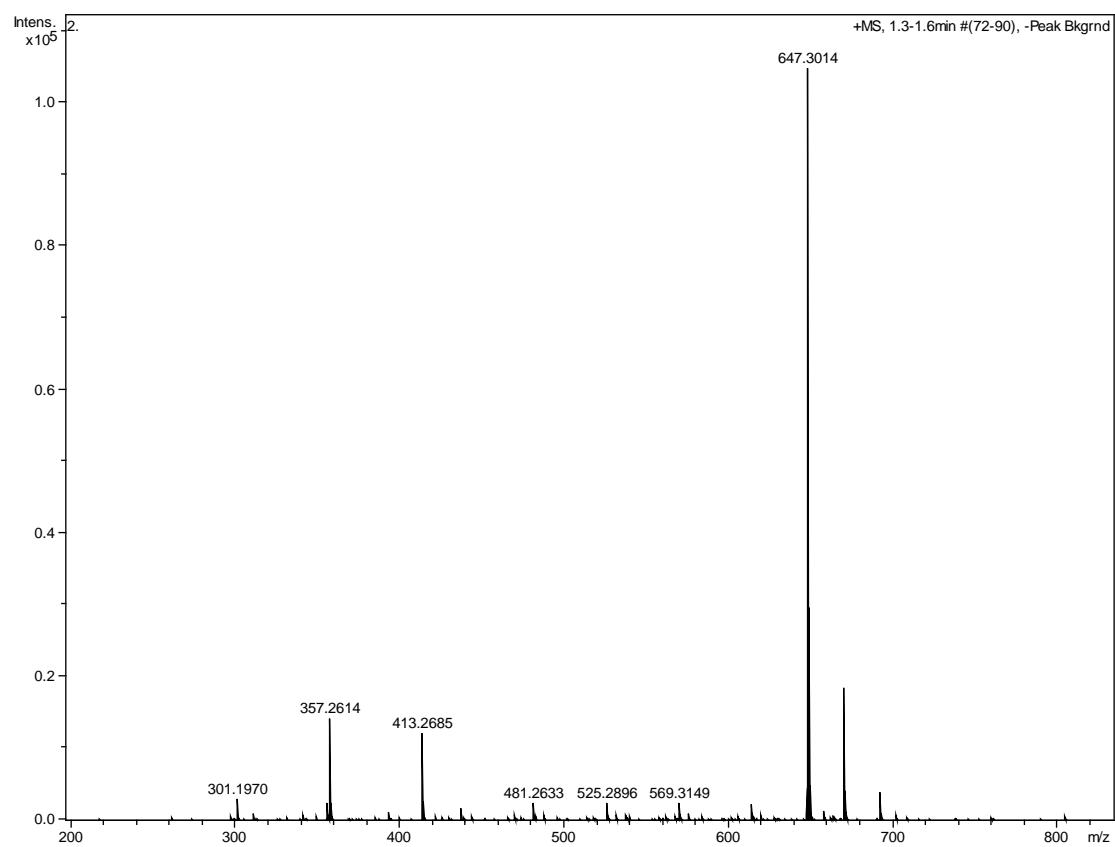
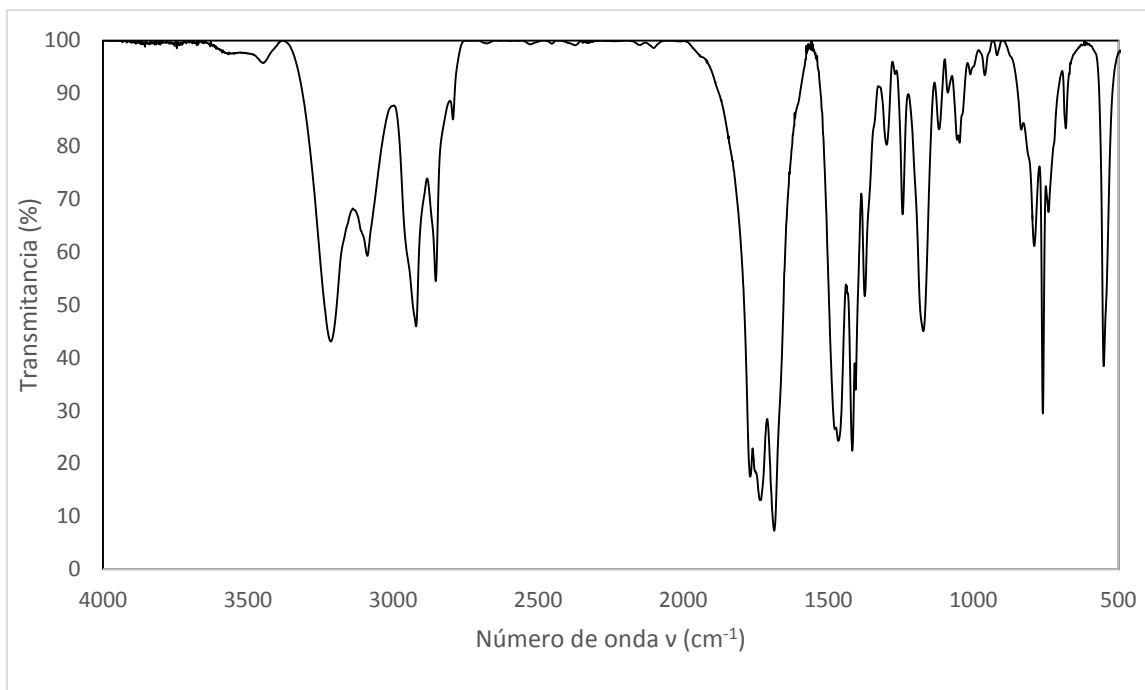




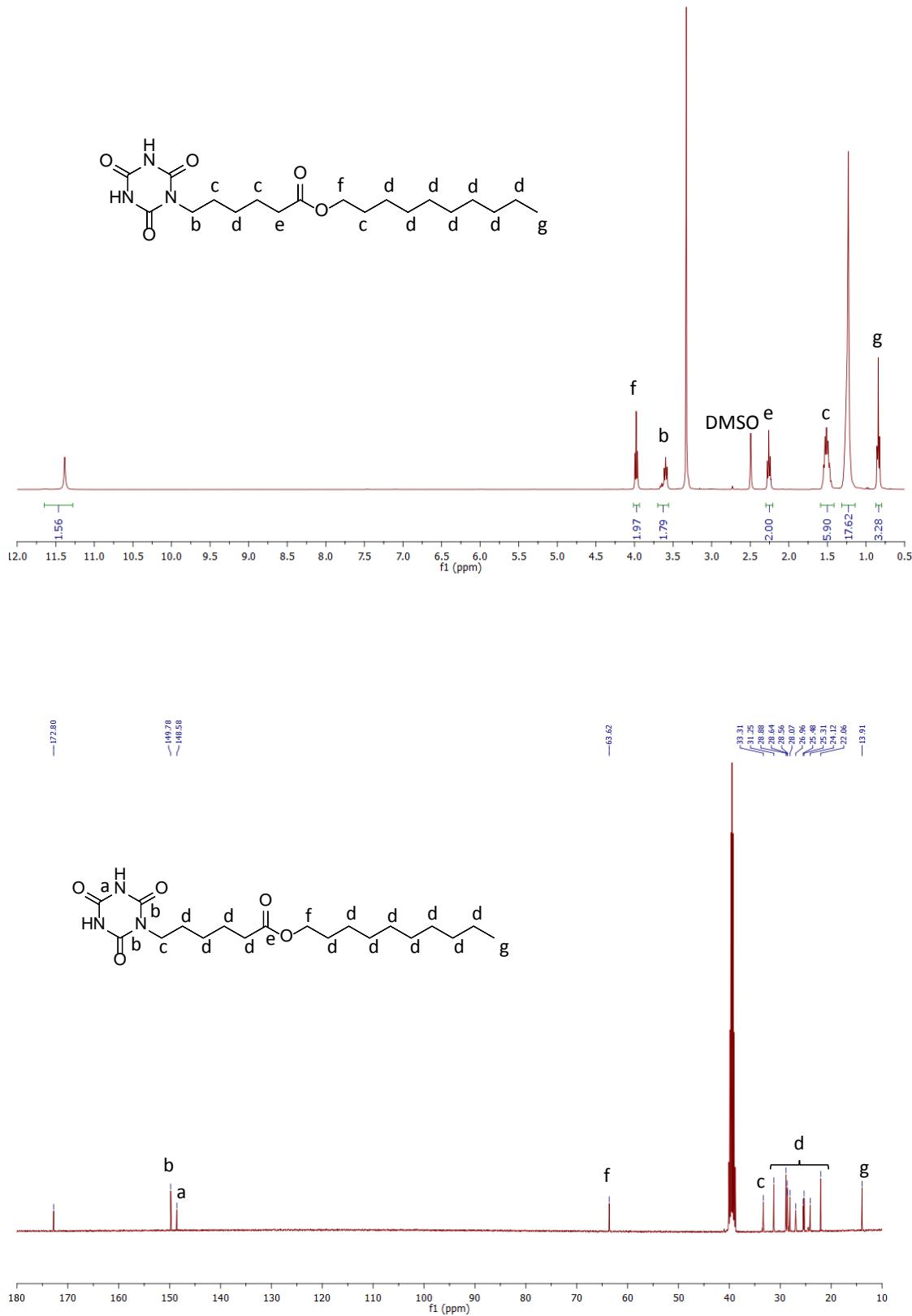
X

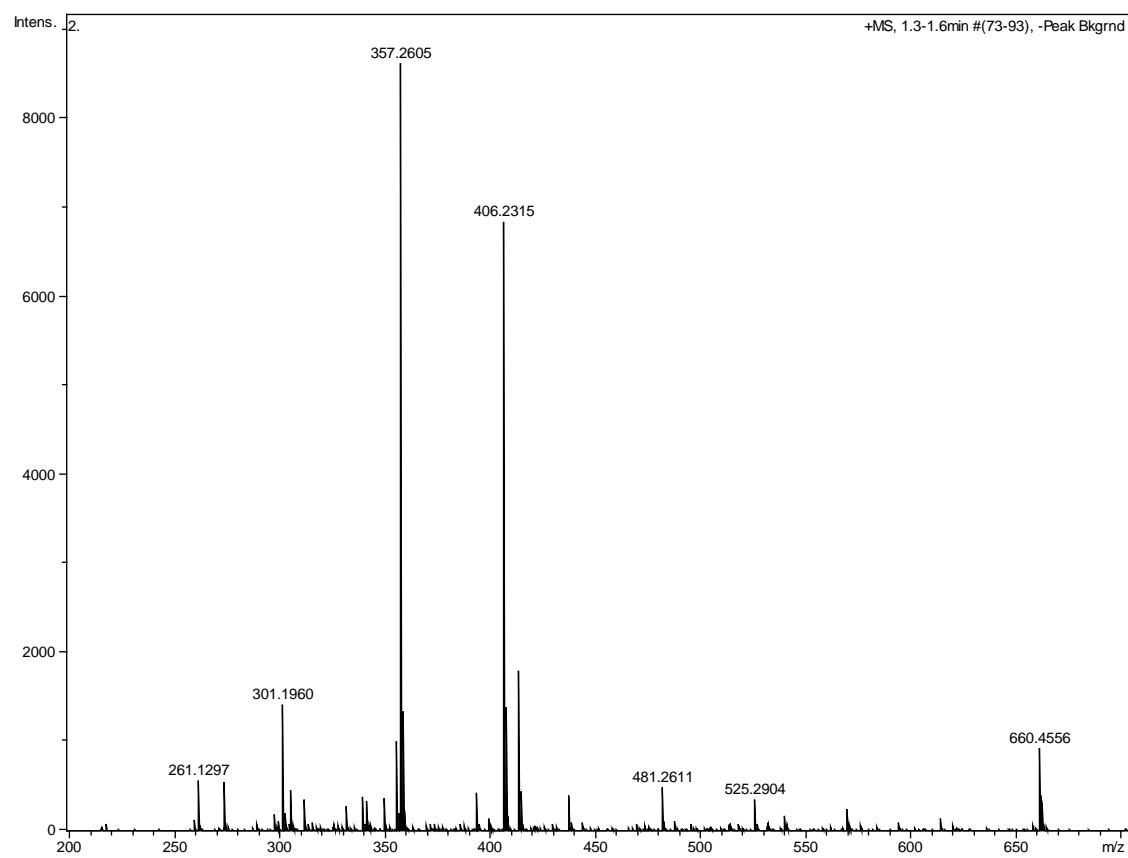
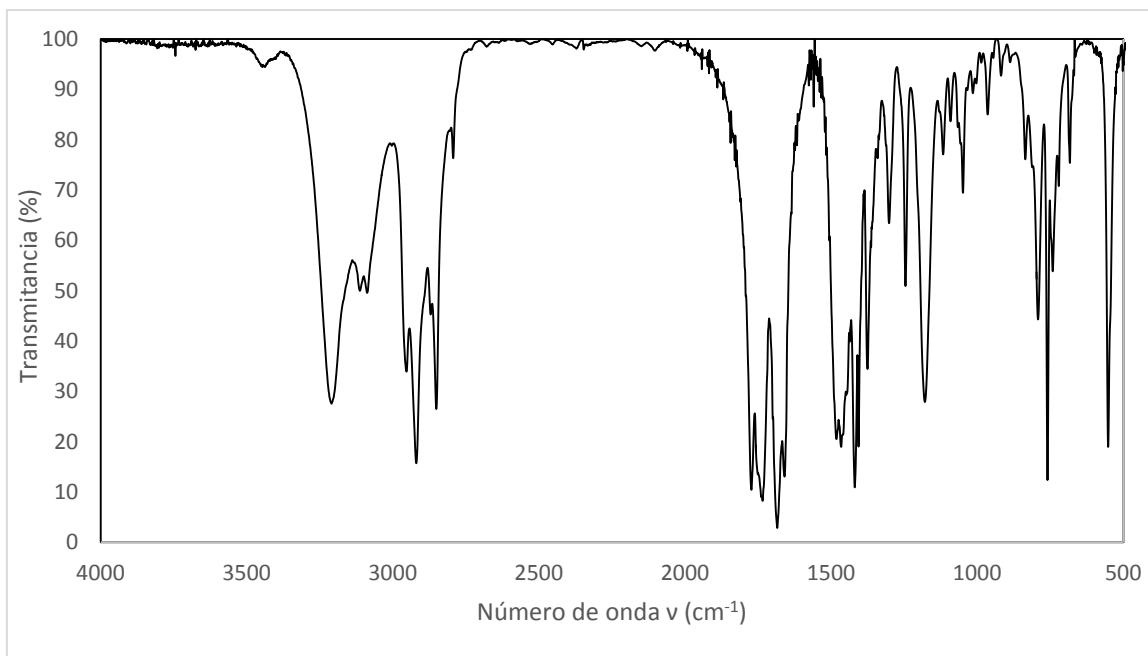
7. Cy-ALK-Cy





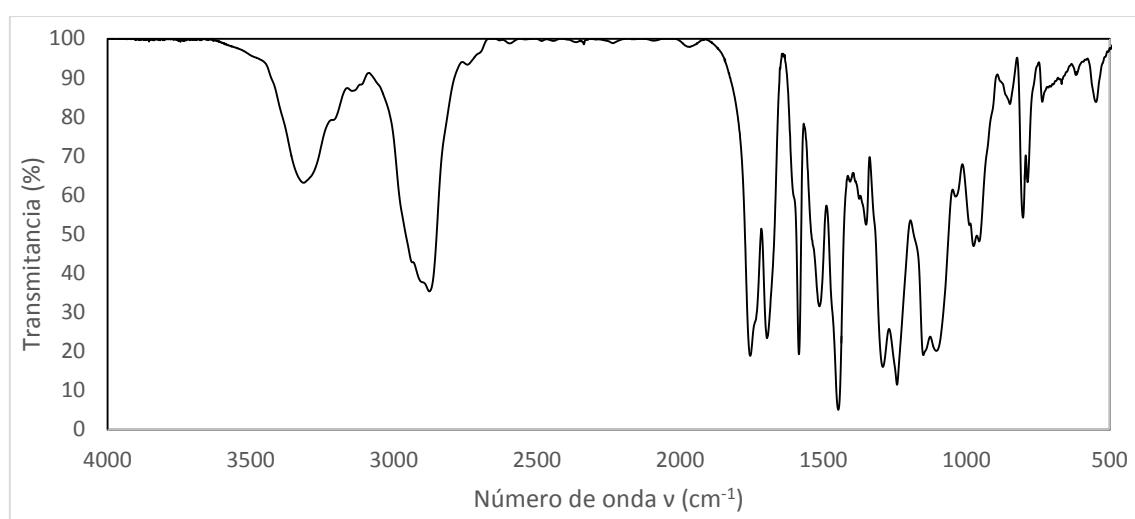
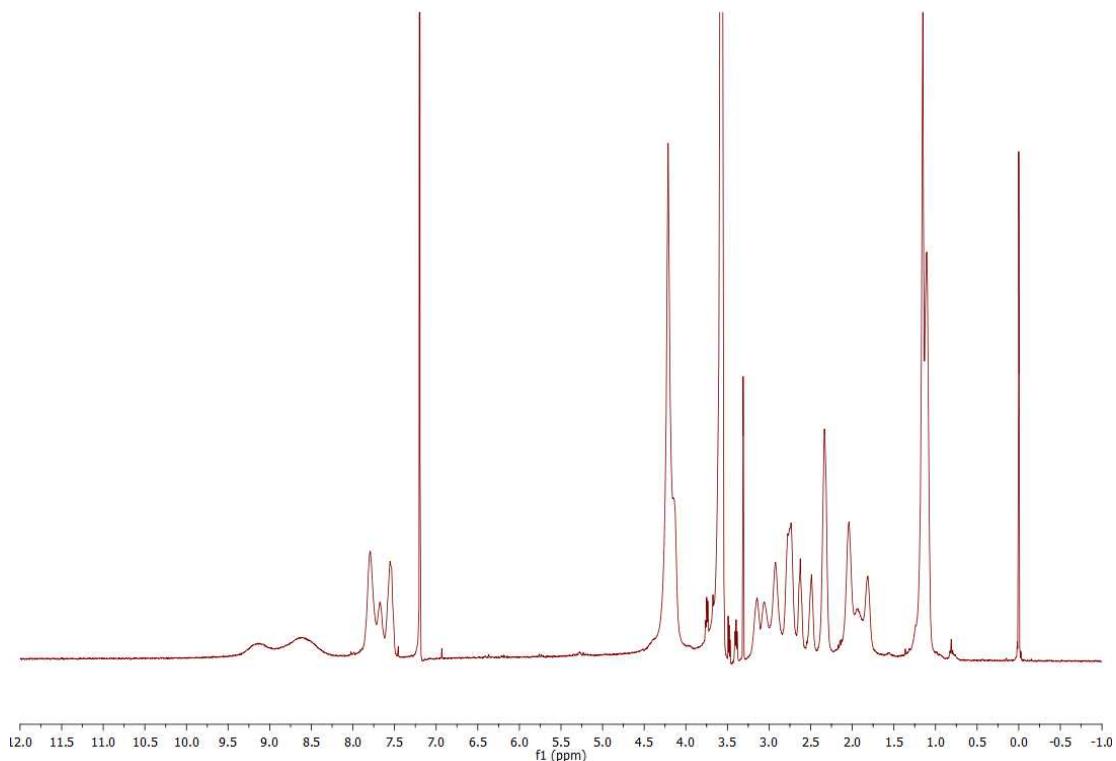
8. Cy-ALK



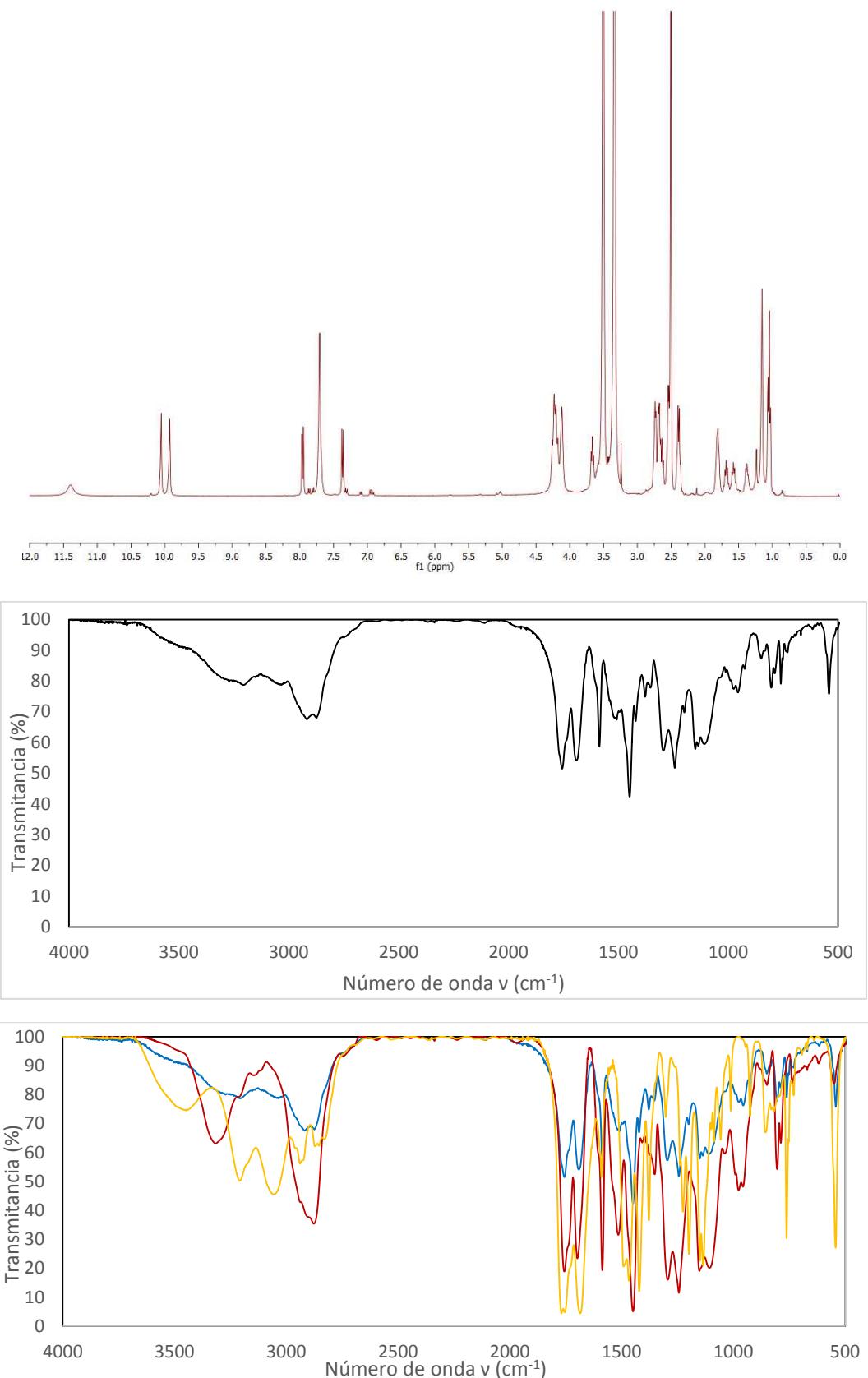


ANEXO B: Copolímeros bloque supramoleculares ($^1\text{H-RMN}$, FTIR)

1. PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉

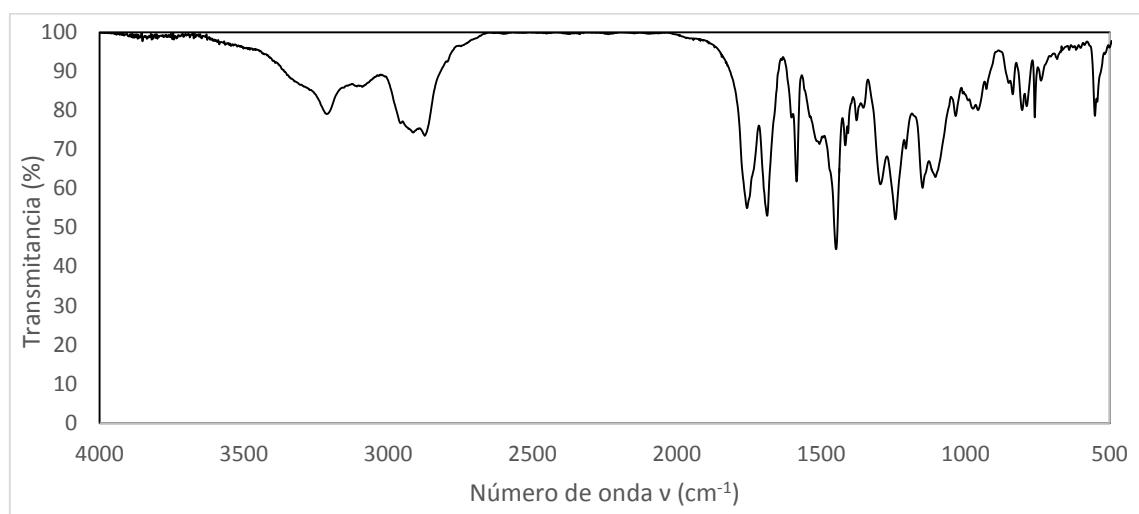
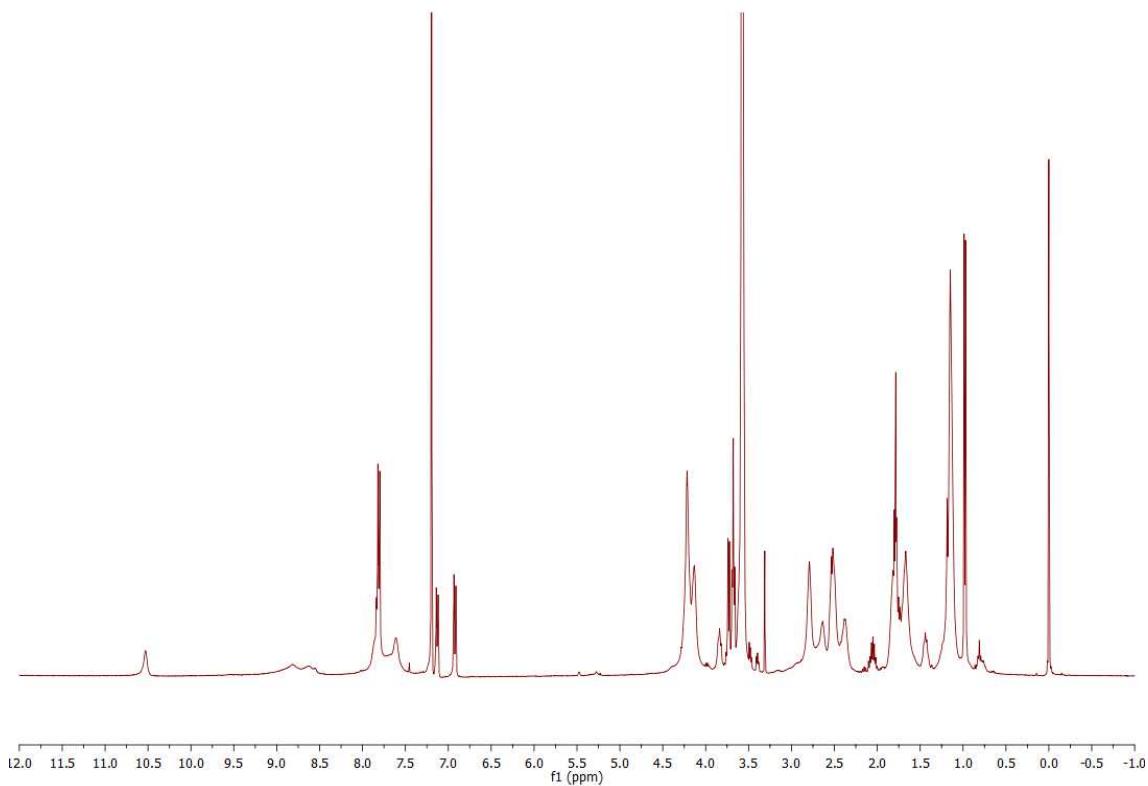


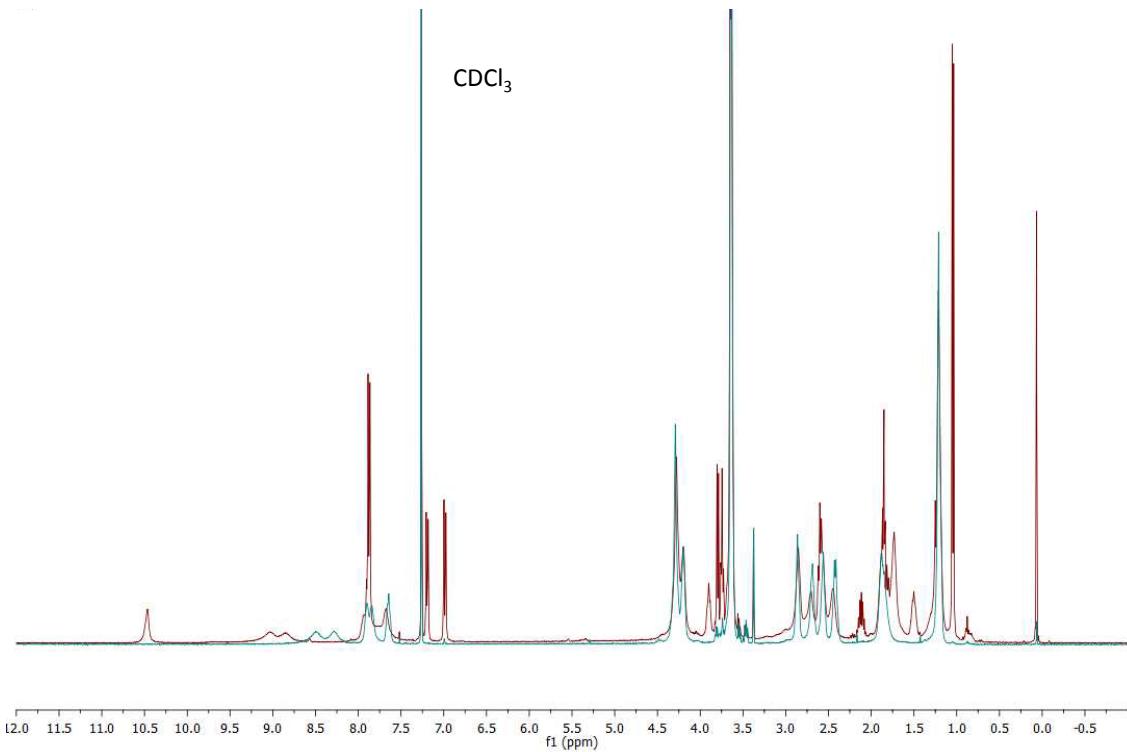
2. PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉ + Cy-AZO-Cy



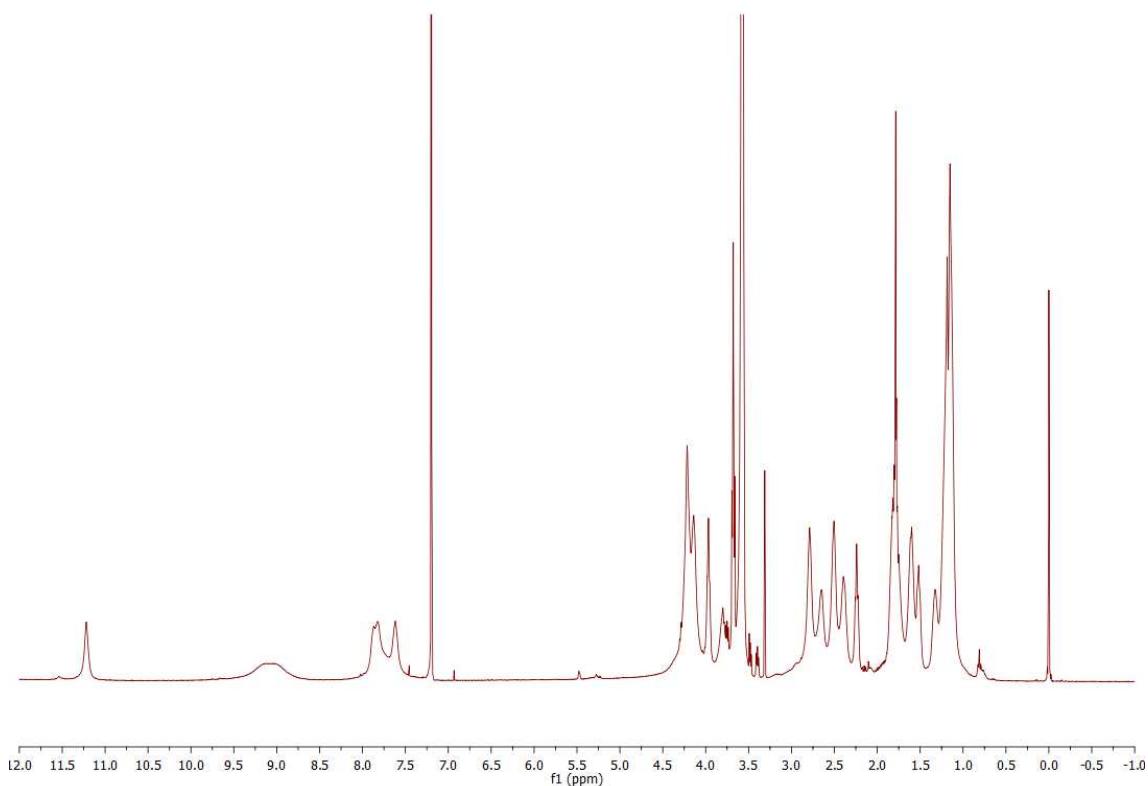
IR comparativo: en color rojo el polímero solo; en color amarillo Cy-AZO-Cy y en azul el copolímero bloque supramolecular.

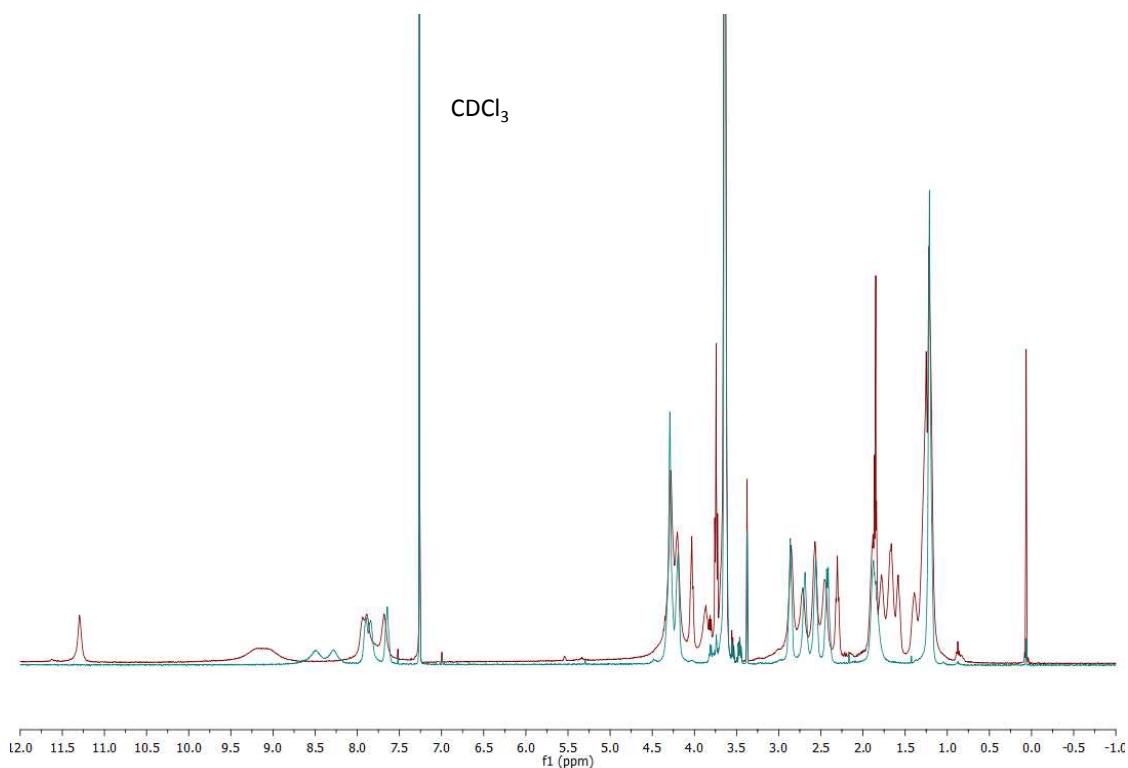
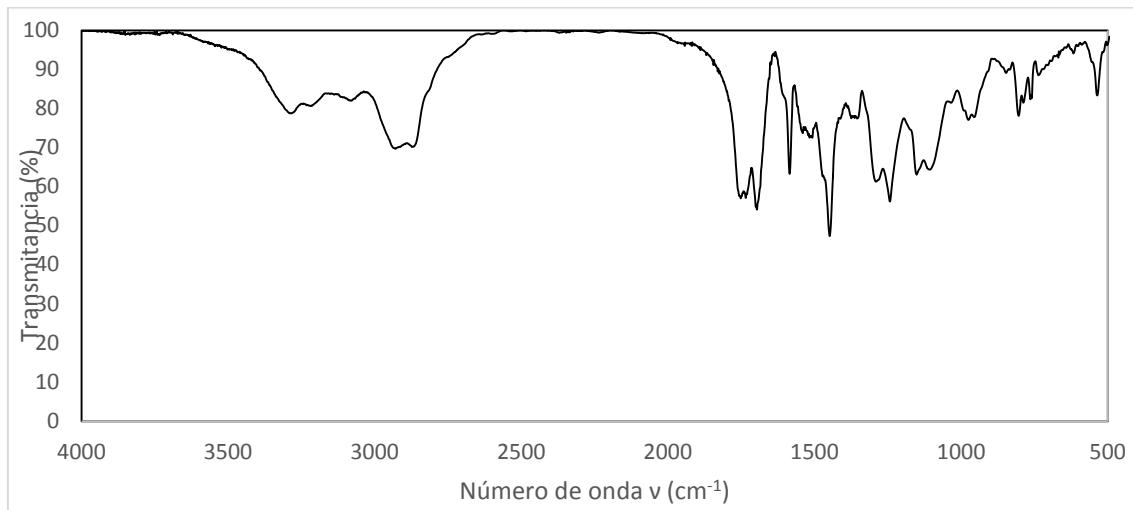
3. PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉ + Cy-AZO



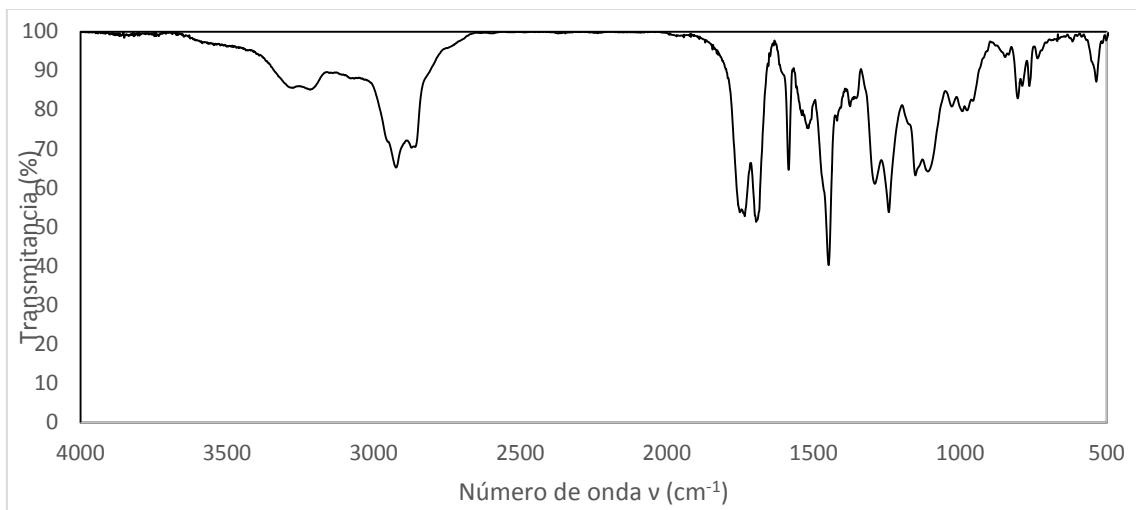
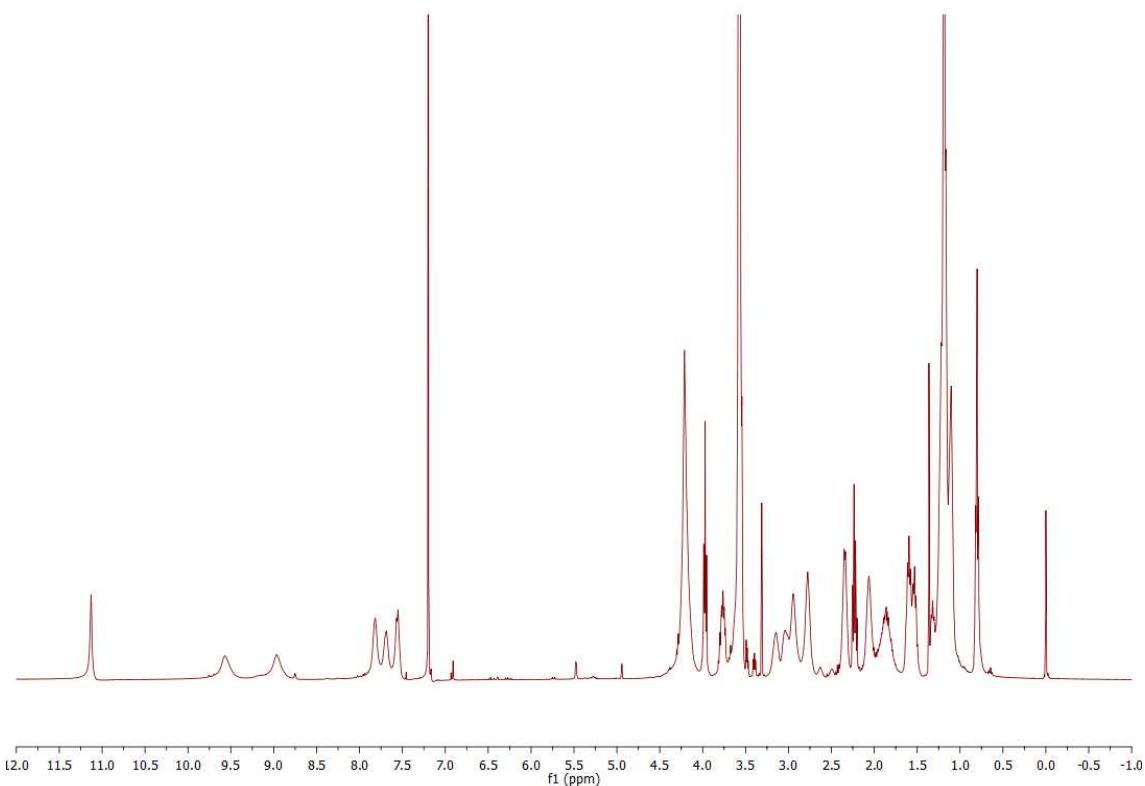


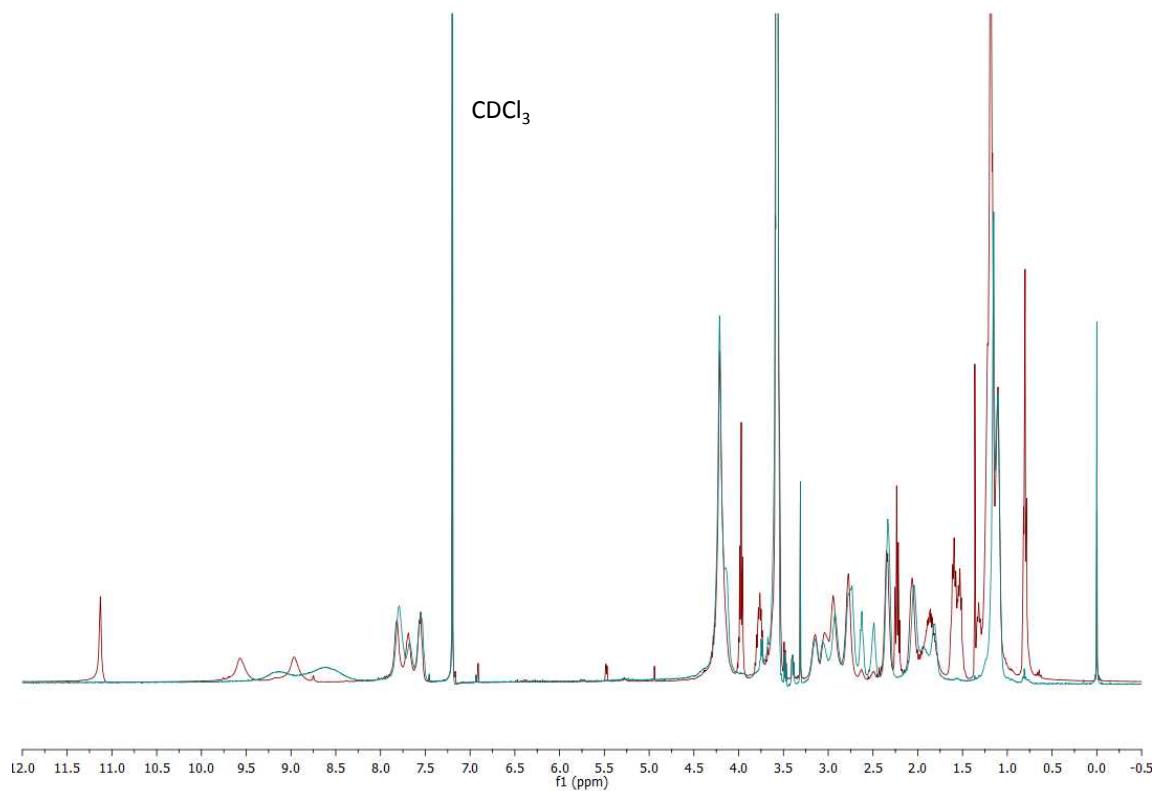
4. $\text{PEG}_{113}\text{-}b\text{-PCDAP}_{19} + \text{Cy-ALK-Cy}$



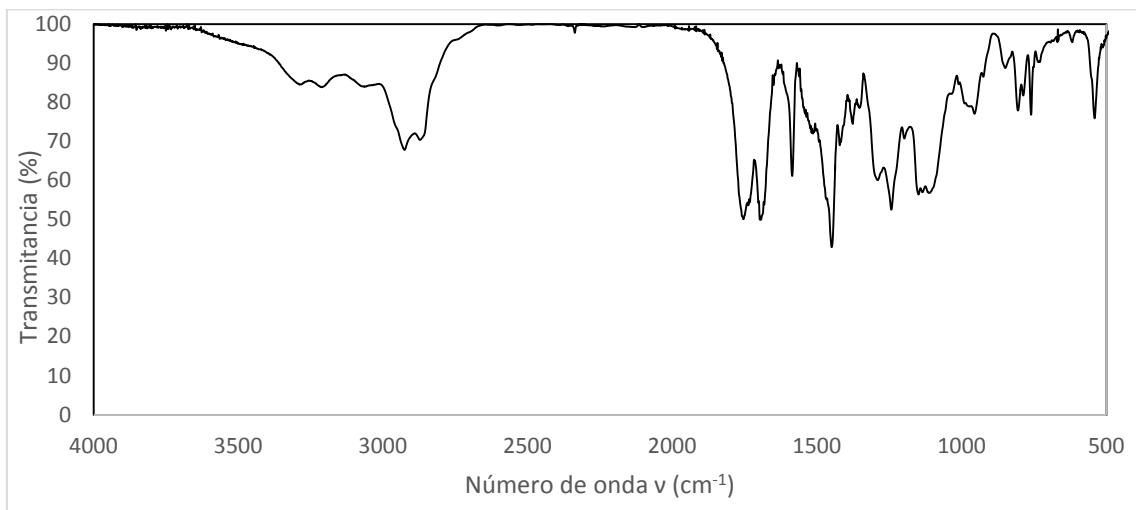


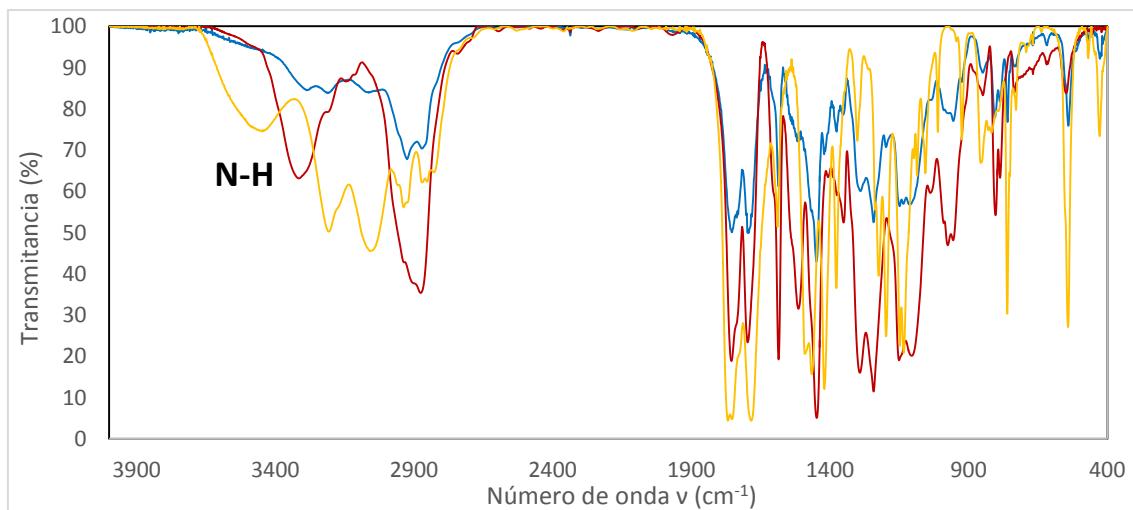
5. PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉ + Cy-ALK





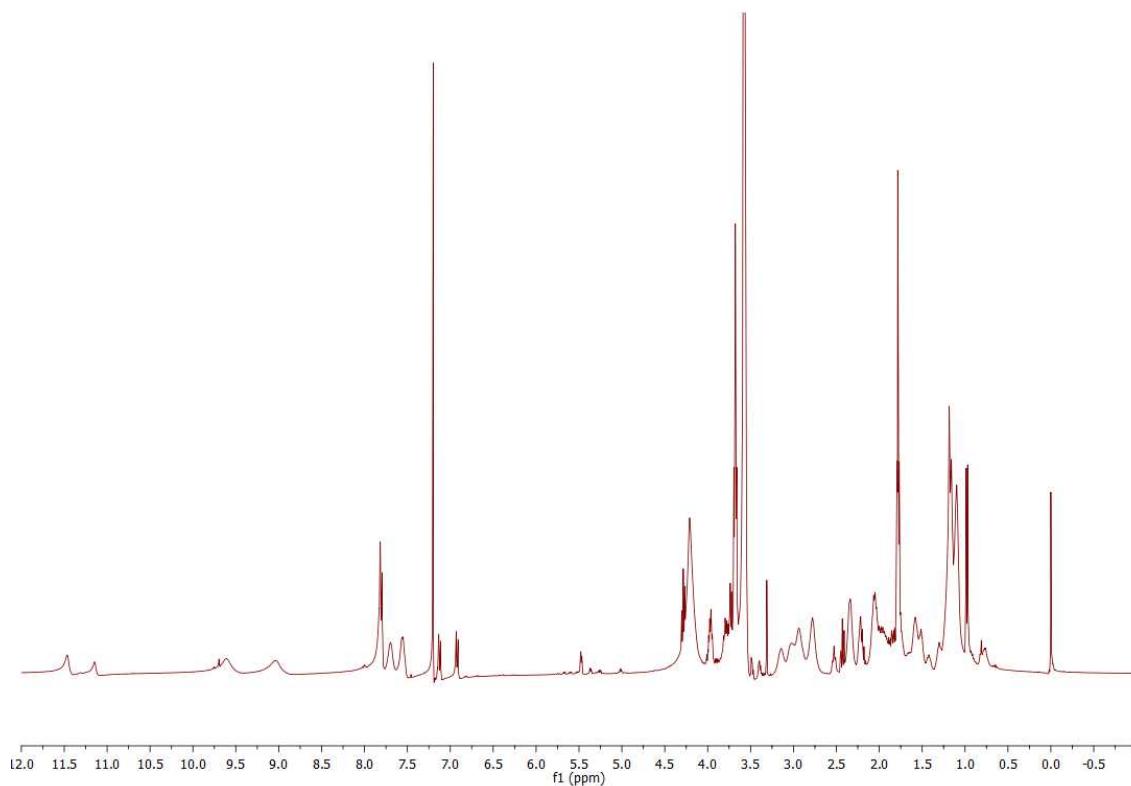
6. PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉ + Cy-AZO-Cy + Cy-ALK

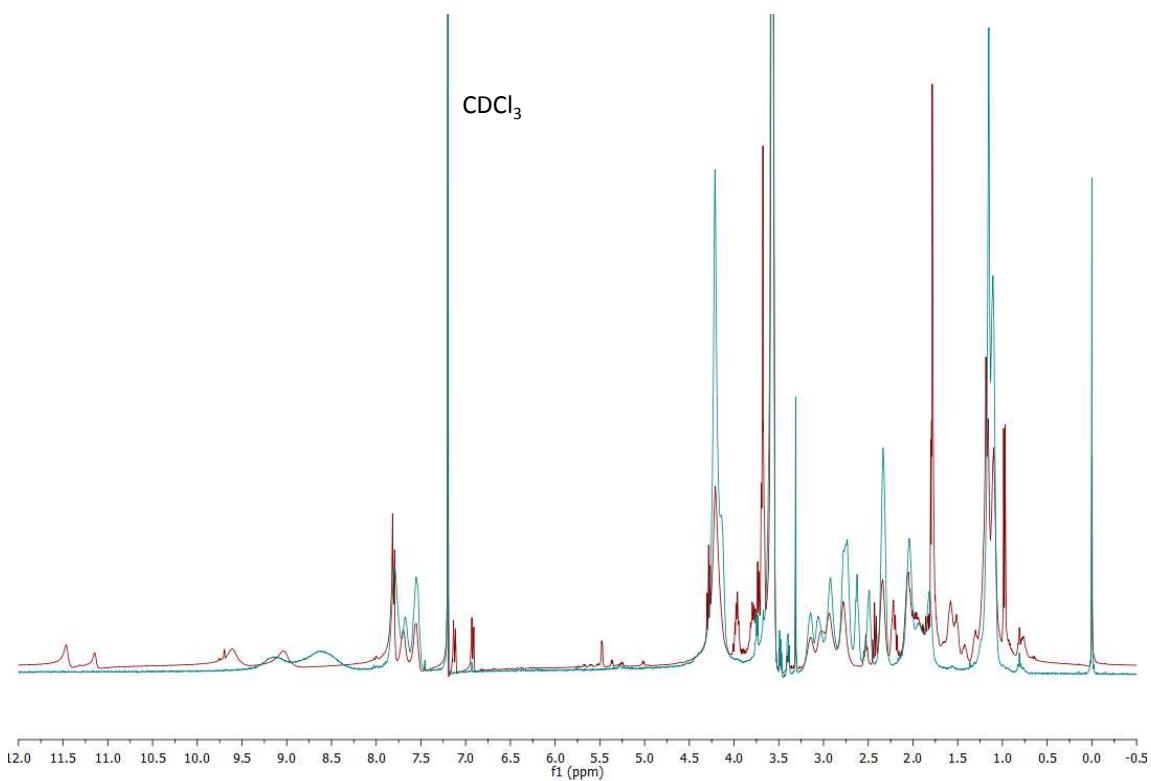
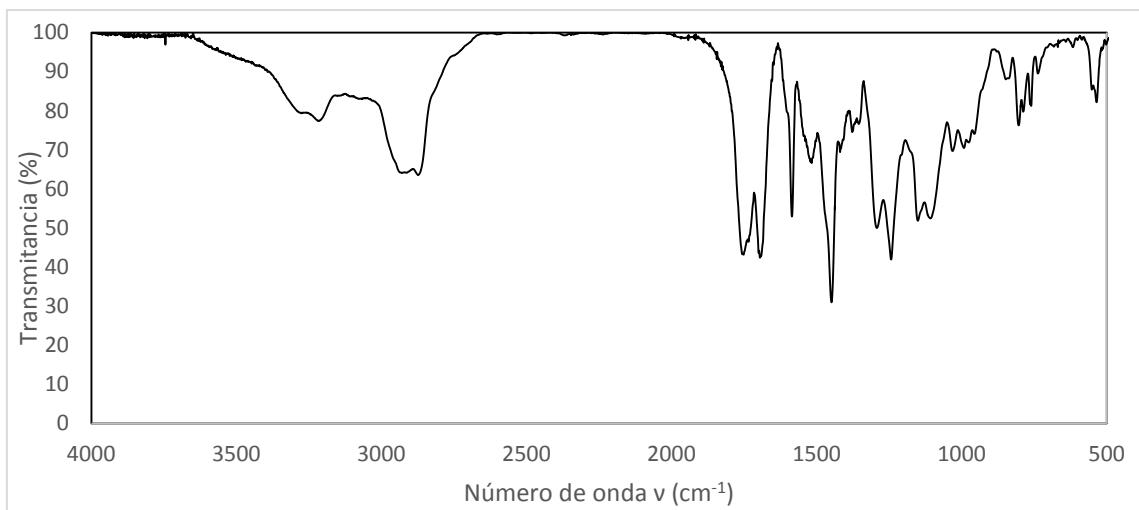




IR comparativo: en color rojo el polímero solo; en color amarillo Cy-AZO-Cy y en azul el copolímero supramolecular.

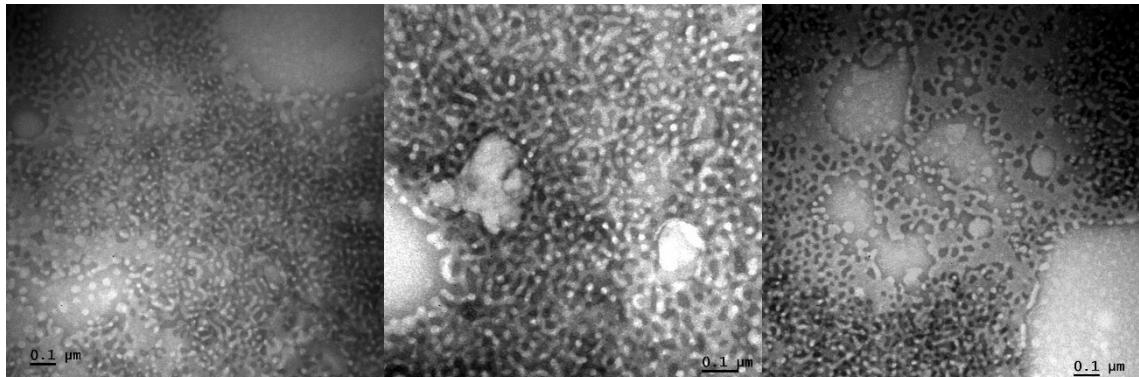
7. PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉ + Cy-AZO + Cy-ALK-Cy



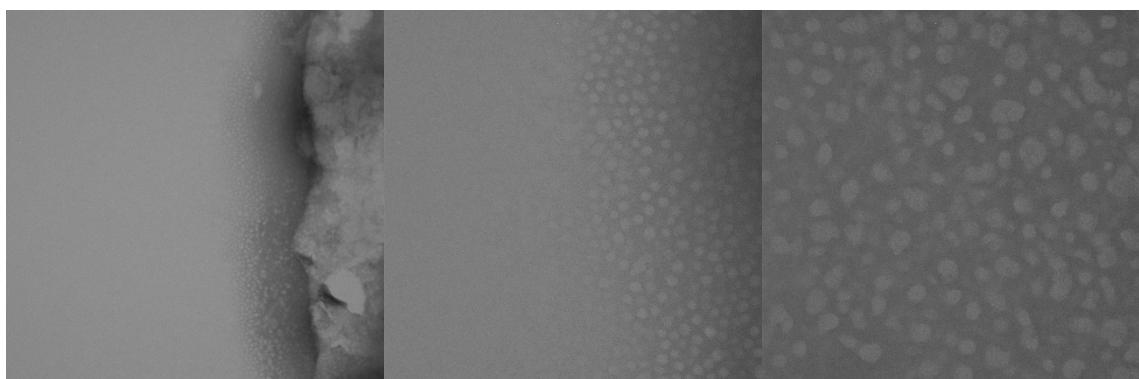


Anexo C: Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

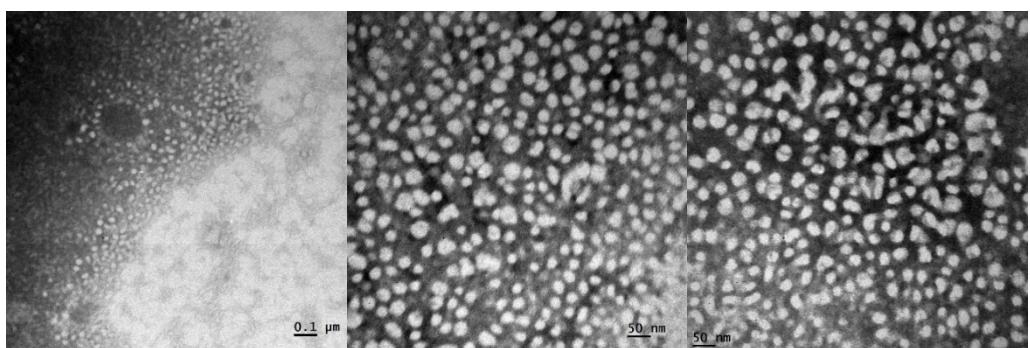
1. PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉ + Cy-AZO-Cy



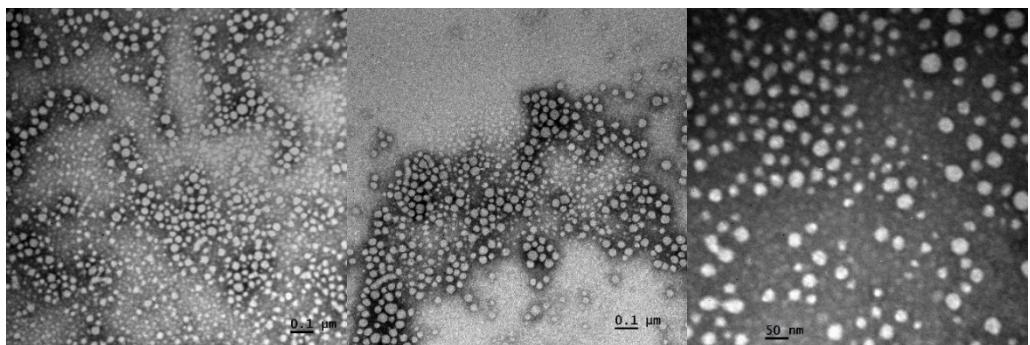
2. PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉ + Cy-AZO



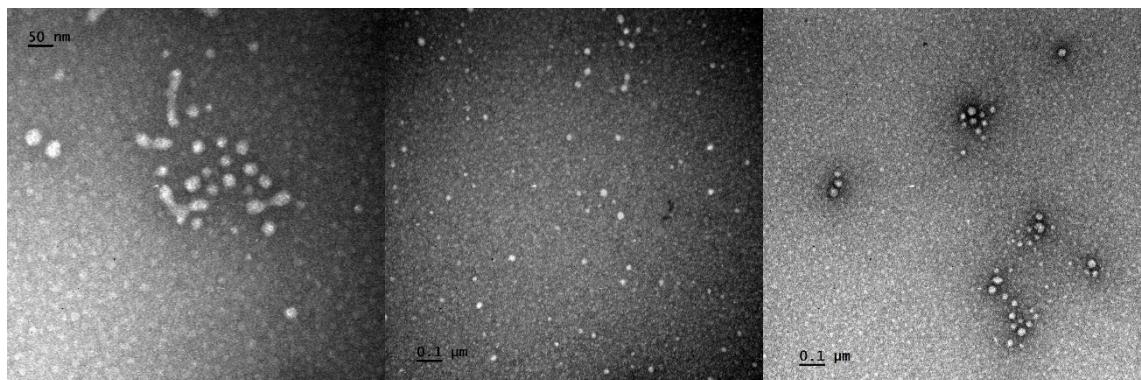
3. PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉ + Cy-ALK-Cy



4. PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉ + Cy-ALK



5. PEG₁₁₃-b-PCDAP₁₉ + Cy-AZO + Cy-ALK-Cy



Anexo D: Técnicas e instrumentos

- **Resonancia magnética nuclear (RMN)**

Se ha empleado un equipo Bruker AV-400, el cual opera a 400 MHz para ^1H RMN y a 100MHz para ^{13}C . Todos los espectros han sido realizados en CDCl_3 y en DMSO deuterado, pesando 10mg de cada producto.

- **Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)**

Todas las muestras se prepararon en pastillas de KBr pesando 1mg de cada compuesto en el equipo Bruker Tenso 27.

- **Microbalanza de precisión**

Se ha empleado la balanza Mettler ME30

- **Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)**

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

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

Las muestras se prepararon diluyendo las disoluciones con agregados en agua Mili-Q primero con una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y luego de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en cubetas de poliestireno desechables. Las medidas se llevaron a cabo en el equipo Malvern Instrument Nano ZS usando un láser He-Ne con una longitud de onda de 633 nm.

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

Se ha empleado dos microscopios electrónicos de transmisión: Fei Tecnai T20 y Jeol JEM 1010 Electron Microscope. Para la preparación de las rejillas de TEM, se deposita 20 μL de la disolución con las nanoparticulas sobre una rejilla del modelo CF 400-CU Carbono Film, se espera 30 segundo para asegurarse de que tu compuesto se deposita en la rejilla. A continuación, con mucho cuidado, se retira el exceso de disolución y se repite el mismo proceso con el agente de tinción, en este caso con acetato de uranilo. Finalmente, se deja secando en el desecador a vacío las rejillas y se llevan a medir.

- **Espectrometría de masa (MS)**

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