

Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea
Facultad de Ciencias Químicas/ Kimika Zientzien Fakultatea

Grado en Química

SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS UNIMOLECULARES Y MICELAS FLUORESCENTES

Autora: Ane Puente Irizar
Director: Josexo Pomposo
Co-directora: Edurne Gonzalez

Donostia/San Sebastian, Julio 2017

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a mi director de proyecto Josetxo Pomposo y a mi co-directora de proyecto Edurne Gonzalez, por aceptarme y darme la oportunidad de participar en este proyecto. Gracias por la ayuda, la orientación, la supervisión y el seguimiento prestados.

Gracias a Isabel Asenjo por enseñarme las técnicas utilizadas a lo largo del proyecto y por los muchos consejos que me ha dado, y sobre todo agradecer a todo el equipo de “Polymers and Soft Matters Group” y a los trabajadores del Centro de Física de Materiales la paciencia que han tenido conmigo y por toda la ayuda que me han dado.

Por todo eso, muchas gracias a todos.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCION.....	3
INTRODUCCIÓN A LOS POLÍMEROS.....	3
TIPOS DE POLIMERIZACION	6
POLIMERIZACIÓN RADICALARIA.....	6
POLIMERIZACIÓN RADICALARIA CONTROLADA O CRP.....	8
ATRP	8
SFRP.....	9
RAFT.....	9
NANOPARTICULAS POLIMÉRICAS UNIMOLECULARES O SCNPs	12
SCNPs EXTENDIDAS	13
SCNPs GLOBULARES	14
MICELAS	14
PARTE EXPERIMENTAL.....	16
SINTESIS DE PRECURSORES POLIMERICOS.....	16
P(MMA-co-AEMA).....	16
P(OEGMA-co-AEMA)	17
SINTESIS DE SCNPs.....	19
SCNPs DE P(OEGMA-co-AEMA) EN AGUA.....	19
SCNPs de P(OEGMA-co-AEMA) y P(MMA-co-AEMA) EN THF	21
SINTESIS DE COPOLIMEROS DE BLOQUE P(AEMA-b-OEGMA)	23
SINTESIS DE MICELAS.....	24
TECNICAS EXPERIMENTALES	25
SEC o GPC	25
RMN	26
DLS	28
RESULTADOS Y DISCUSION.....	29
RESULTADOS DE PRECURSORES P(MMA-co-AEMA)	31
RESULTADOS DE PRECURSORES P(OEGMA-co-AEMA).....	31
RESULTADOS DE SCNPs EN AGUA.....	33
P(OEGMA-co-AEMA)	33
RESULTADOS DE SCNPs EN THF	36

P(MMA-co-AEMA).....	36
P(OEGMA-co-AEMA)	38
RESULTADOS DE COPOLIMEROS DE BLOQUE (AEMA-b-OEGMA).....	39
RESULTADOS DE MICELAS	40
RESULTADOS DE SCNPs FLUORESCENTES	41
CONCLUSIONES.....	43
CONCLUSSIONS.....	44
BIBLIOGRAFIA	45

RESUMEN

En las últimas décadas las nanopartículas poliméricas unimoleculares o SCNPs han sido área de intenso estudio por sus potenciales aplicaciones en biomedicina y catálisis, entre otras. El presente trabajo se centra en el estudio de la síntesis de SCNPs, a partir de distintos precursores poliméricos y en distintos medios de reacción (disolvente). Dos precursores poliméricos han sido sintetizados y caracterizados mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y resonancia magnética nuclear de protón (^1H RMN). Se ha utilizado la polimerización de adición fragmentación y transferencia de cadena o RAFT para sintetizar polímeros precursores de alto y bajo peso molecular y distinta relación monomérica. Las nanopartículas han sido sintetizadas mediante adición de un entrecruzador de cadenas o "cross-linker", $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (acetato de cobre) o TMT (trimetilol propano triacrilato), en disolvente acuoso o THF (tetrahidrofurano), logrando nanopartículas extendidas y globulares. La caracterización de nanopartículas se ha realizado mediante SEC, RMN y DLS o dispersión dinámica de luz. Las micelas han sido creadas en medios acuosos, a partir de copolímeros de bloque, ambas han sido caracterizadas por RMN, SEC y DLS. Se han investigado distintas rutas de síntesis y obtención de nanopartículas. Asimismo, se ha estudiado el efecto de los distintos entrecruzadores para el mismo precursor polimérico. Todas estas nanopartículas han sido utilizadas para la síntesis de SCNPs fluorescentes, mediante la encapsulación de moléculas no fluorescentes, por Eva Rodríguez Carreira (Proyecto de Master de Nanociencias).

ABSTRACT

In the past decades single-chain nanoparticles or SCNPs have been intensely studied because of their potential applications in biomedicine and catalysis. This work is focused on the study of SCNPs synthesis, from different polymeric precursors and in different reaction conditions (solvent). Two polymeric precursors have been synthesized and characterized through size exclusion chromatography (SEC) and nuclear magnetic resonance (^1H RMN). Reversible addition and fragmentation chain-transfer (RAFT) polymerization has been used to synthesize polymeric precursors with low and high molecular weights and different monomer percentage. Nanoparticles have been synthesized with a cross-linker, $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (copper acetate) and TMT (trimethylolpropane triacrylate), in water or tetrahydrofuran (THF), resulting on extended or globular nanoparticles. Their characterization has been possible using SEC, RMN and DLS (dynamic light scattering). Micelles have been created in water solutions from block copolymers and both, have been characterized by SEC, RMN and DLS. Different nanoparticle synthesis protocols have been investigated and also the effects of different cross linkers. All this nanoparticles have been used to create fluorescent SCNPs from encapsulating non-fluorescent molecules in good solvent, by Eva Rodriguez Carreira (Nanoscience Master Project).

INTRODUCCION

INTRODUCCIÓN A LOS POLÍMEROS

Los polímeros son macromoléculas compuestas por largas cadenas formadas a base de unidades monoméricas repetidas, en su mayoría formadas por carbono, hidrogeno, oxígeno y otros elementos no metálicos. Su estructura en forma de cadenas hace que los polímeros posean propiedades mecánicas diversas, pudiendo ser muy flexibles y ligeros.

Existen dos principales formas de clasificar los polímeros; por estructura y por composición. La **Figura 1** muestra la clasificación de polímeros según su estructura. Podemos encontrar polímeros lineales, ramificados (con ramas laterales conectadas a las cadenas principales), reticulados (cadenas unidas por aditivos) y entrecruzados (entrecruzamiento debido a unidades monoméricas con tres enlaces covalentes activos).

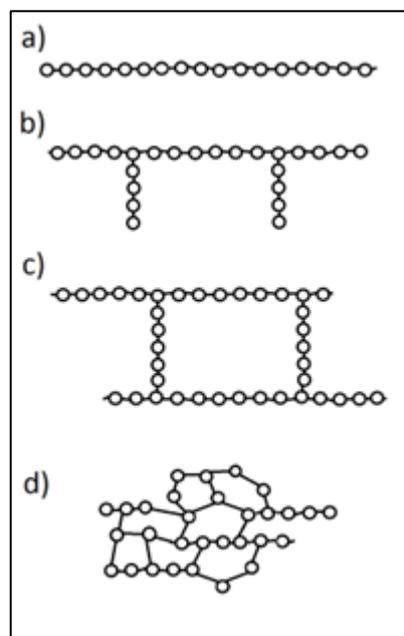


Figura 1: Clasificación de los polímeros según su estructura: a) polímeros lineales. b) polímeros ramificados. c) polímeros reticulados. d) polímeros entrecruzados.

En caso de la clasificación de polímeros por composición, las cadenas formadas por un único monómero son homopolímeros, mientras que las cadenas compuestas por dos o más monómeros diferentes son copolímeros.

Entre los copolímeros existen varias clasificaciones como se puede ver en la **Figura 2**. Los copolímeros que alternan un monómero (A) con otro monómero (B), dando lugar a cadenas tipo ABABABABAB son copolímeros alternantes y los copolímeros que no tienen orden alguno son copolímeros al azar (P. ej. AABAABBBBABBBBBABABABAAAABAABAA). Los copolímeros en bloque combinan cadenas de un monómero con cadenas de otro monómero, dando lugar a cadenas compuestas por bloques (P. ej. AAAAAAABBBBBBAAAAAAAAABBBBBBAAAAAAAA). Por último los polímeros injertados presentan una cadena principal compuesta por un monómero y unas ramas laterales formadas por otro monómero.

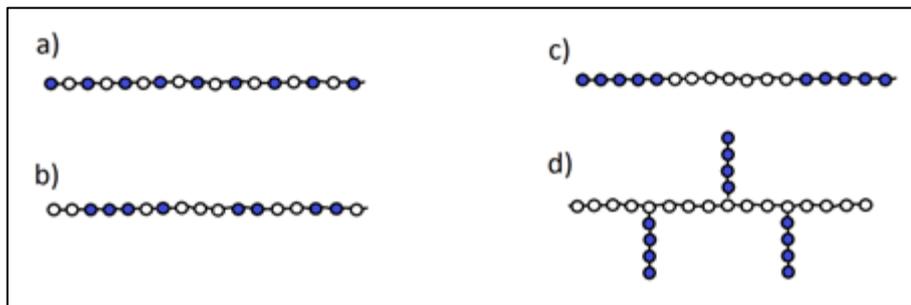


Figura 2: Tipos de copolímeros: a) alternante. b) al azar. c) en bloque. d) injertado.

La forma de expresar el tamaño de una macromolécula viene dada por el grado de polimerización o "n", el cual nos da el número de unidades monoméricas incorporadas a la cadena durante el proceso de polimerización. En las reacciones de polimerización se consiguen mezclas de cadenas, cada una de un peso molecular determinado, por lo tanto, al caracterizar un polímero se determina una distribución de pesos moleculares, la cual tendrá un peso molecular promedio en peso y en número M_w y M_n respectivamente.

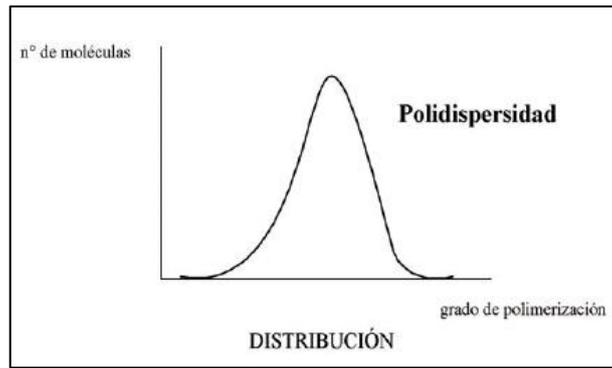


Figura 3: Representación gráfica de la distribución de pesos moleculares de un polímero¹.

El peso molecular en número, M_n , es la media aritmética de la masa y el peso molecular en peso o M_w representa el peso promedio de las cadenas. Estos valores vienen descritos por las siguientes ecuaciones:

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i}$$

$$M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i}$$

La relación entre ambas (M_w y M_n) nos da el índice de polidispersidad o \mathfrak{D} ("Dispersity"). Este valor cuando es cercano a 1 indica una distribución de pesos estrecha, y un valor altamente superior a 1 indica distribución de pesos muy ancha.

$$\mathfrak{D} = \frac{M_w}{M_n} \geq 1$$

TIPOS DE POLIMERIZACION

En cuanto a tipos de polimerización, existen dos clasificaciones en base a su mecanismo que han sido aceptadas a lo largo de la historia: polimerización por crecimiento en cadena o por etapas.

Por un lado, en las polimerizaciones por crecimiento en cadena, la molécula entera del monómero pasa a formar parte del polímero, sin dar subproductos en la reacción. Este tipo de polimerización se da con monómeros vinílicos, es decir, con monómeros que tengan enlaces dobles (o enlaces π) de carbono a carbono. Para iniciar la polimerización, se utiliza un iniciador (I), para crear especies R^* con un centro reactivo, que puede ser un radical, un catión o un anión. El centro reactivo es capaz de causar la apertura de los enlaces π de los monómeros uniéndolos unos con otros, dando lugar a largas cadenas poliméricas. Por la tanto, la polimerización ocurre mediante la propagación del centro reactivo con la adición de una gran cantidad de monómeros. Cada monómero reacciona con la cadena polimérica creciente para crear un polímero más largo; las cadenas en crecimiento no pueden reaccionar entre sí. Dependiendo de la especie reactiva (anión, catión o radical) formada por el iniciador, la polimerización por crecimiento de cadenas se clasifica en: polimerización anionica, polimerización catiónica o polimerización radicalaria.

Por otro lado, en la polimerización por etapas, los monómeros utilizados son bifuncionales y al reaccionar entre sí, se forman subproductos (H_2O o HCl por lo general) y además las cadenas en crecimiento pueden unirse entre ellas, sin importar el tamaño de cada cadena².

POLIMERIZACIÓN RADICALARIA

Por lo general la polimerización radicalaria se inicia con una especie radical (R^*) producida por el iniciador (I), el cual funciona como una fuente de generación de radicales. La especie reactiva, un radical, se une a la molécula de monómero mediante la apertura de un enlace π , formando a su vez un nuevo compuesto. El proceso se repite hasta lograr el peso molecular

esperado. La reacción termina en el momento en el que se da la destrucción del centro reactivo de las cadenas, lo cual sucede de distinta forma dependiendo del centro reactivo y las condiciones de la reacción².

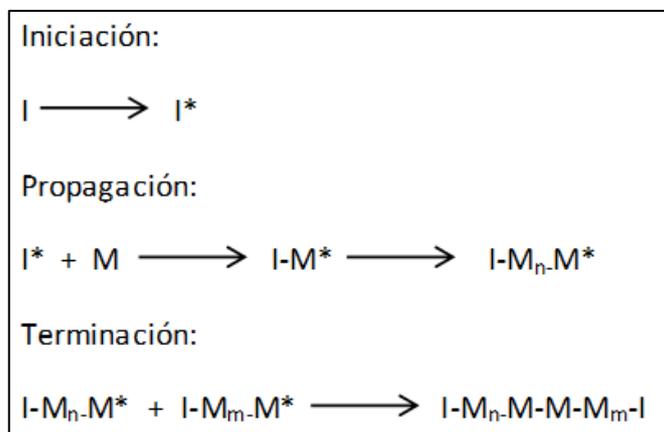


Figura 4: Esquema general de la polimerización radicalaria.

La mayor desventaja de la polimerización radicalaria reside en la auto-aceleración o efecto gel. Lo normal en una reacción sería que fuera más despacio a medida que avanza, puesto que la relación monómero/iniciador va disminuyendo, sin embargo, en estos casos ocurre lo contrario: la reacción se acelera con la conversión, dando como resultado polímeros gelificados. A este efecto se le llama efecto gel, efecto Trommsdorf o efecto Norrish-Smith.

El efecto ocurre porque en un momento dado la reacción ocurre más rápido en un lugar que en otro del reactor, aumentando la viscosidad en un lugar concreto y dificultando el movimiento de los monómeros en el reactor y logrando como producto un polímero agregado y muy viscoso. Este efecto se puede controlar con la cantidad de disolvente añadida, o disminuyendo la concentración total de monómeros en el reactor².

Otra gran desventaja reside en el descontrol de la reacción, puesto que no hay ningún componente que controle el crecimiento uniforme de las cadenas, no se obtienen polímeros con pesos moleculares similares.

POLIMERIZACIÓN RADICALARIA CONTROLADA O CRP

La polimerización radicalaria controlada o CRP (del inglés, "Controlled Radical Polymerization") es una buena opción para sintetizar polímeros de manera controlada, de forma más eficiente y sencilla que mediante otros métodos, debido a su amplia tolerancia a grupos funcionales e impurezas, comparada con métodos de polimerización iónica. En las últimas décadas se han desarrollado, investigado y aplicado los distintos métodos de CRP, como "Atom transfer Radical Polymerization" o Polimerización Radicalaria por Tranferencia Atómica (ATRP), "Stable Free-Radical Polymerization" o Polimerización via Radicales Libres Estables (SFRP), "Reversible Addition-Fragmentation chain-Transfer" o polimerización por Adición, Fragmentación y Transferencia Reversible de cadenas (RAFT) y "Nitroxide-mediated Radical Polymerization" o polimerización radicalaria mediante nitróxidos (NMP) los cuales se basan en una rápida evolución de un equilibrio dinámico entre especies activas y desactivadas o durmientes.

Para lograr una polimerización radicalaria controlada de manera eficaz hay que tener en cuenta algunos criterios: lo más importante es que la iniciación debe darse rápidamente (comparando con la velocidad de propagación) para que las cadenas se formen y crezcan simultáneamente. Los cuatro métodos de polimerización radicalaria controlada (SFRP, ATRP, RAFT, NMP) son bastante similares en cuanto al control, pero difieren en los mecanismos^{3,4}.

ATRP

"Atom transfer Radical Polymerization" o Polimerización Radicalaria por Tranferencia Atómica utiliza un haluro orgánico que soporta una reacción redox. Este método requiere un iniciador muy rápido para que todas las especies comiencen a crecer al mismo tiempo, para lograr pesos moleculares parecidos.

Este sistema es complejo pero debido a su aplicabilidad y el número de investigadores trabajando en ATRP, se han obtenido un número de materiales poliméricos asombrosos con funcionalidades muy novedosas. Los desarrollos más recientes han sido los copolímeros

gradientes, copolímeros de bloque, copolímeros de injerto, copolímeros dendríticos y tipo estrella, así como vías para preparar polímeros telequéticos y macromonomeros².

SFRP

“Stable Free-Radical Polymerization” o Polimerización via Radicales Libres Estables ofrece un crecimiento controlado de las cadenas poliméricas a través del concepto de terminación reversible. En este proceso se da un fenómeno llamado efecto radical persistente (o PRE, del inglés “Persistent Radical Effect”) que consiste en pequeños excesos en la concentración del radical persistente con respecto al propagador, que llevan a desplazar el equilibrio hacia la desactivación, siendo este efecto un proceso auto regulador, que es el hecho cinético principal de las reacciones SFRP³. Un tipo de SFRP es la polimerización radicalaria mediante nitróxidos o NMP (del inglés “Nitroxide-mediated Radical Polymerization”), la cual se ha convertido en una de las herramientas indispensables para la síntesis de polímeros con control exquisito en el tamaño de la macromolécula. Esta técnica emergida en los años 90 ha hecho avanzar enormemente campos como la nanociencia y la nanotecnología, permitiendo acceso a polímeros complejos que sirven como bloques de construcción para crear nanoestructuras con parámetros predecibles, como el tamaño, la morfología y la regioselectividad de los grupos funcionales⁴.

RAFT

La polimerización por Adición, Fragmentación y Transferencia Reversible de cadenas o RAFT (del inglés “Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer”) es la forma más creciente de CRP, que fue reportado por primera vez por el grupo de científicos de *Rizzardo, Moad, y Thang* en 1998⁵. Esta fue la primera publicación sobre la técnica RAFT y demostró la efectividad y versatilidad de este proceso degenerativo con tioesteres. Esta transferencia degenerativa dio lugar al acrónimo RAFT. Desde entonces la polimerización RAFT ha sido estudiada extensivamente mostrando gran variedad de aplicaciones.

Este tipo de polimerización es muy versátil por las condiciones de reacción necesarias, entre otras cosas. Se puede llevar a cabo de manera sencilla, con un agente de transferencia de cadena o CTA (del inglés “Chain Transfer Agent”) adecuado. Los agentes de transferencia de cadena, como se puede apreciar en la **Figura 5** son compuestos orgánicos con grupos tioester (ditiocarbonatos, tritiocarbonatos...)³.

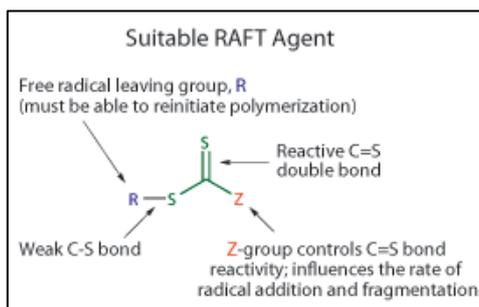


Figura 5: Estructura general de agentes de transferencia de cadena⁶.

La importancia de utilizar un agente de transferencia de cadena reside en que se controla la reacción, de manera más eficiente, para lograr polímeros cuyos pesos moleculares se acercan más entre sí que de manera convencional. De manera que se obtienen \bar{M} más cercanos a 1, tal y como se ilustra en la **Figura 6**.

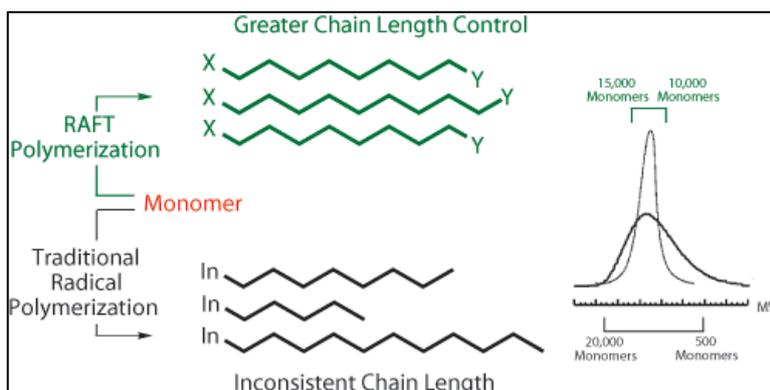


Figura 6: Esquema de ventajas que ofrece la polimerización RAFT frente al método tradicional de CRP⁶.

En las últimas dos décadas mucho esfuerzo y trabajo de científicos de todo el mundo ha logrado demostrar la versatilidad y eficiencia de la polimerización RAFT. Es posible llevar

polimerizaciones RAFT a altas conversiones y lograr grados de polimerización comercialmente aceptables. Estas polimerizaciones pueden darse exitosamente en medios heterogéneos (emulsión, suspensión). Existe compatibilidad con una gran cantidad de monómeros, disolventes e iniciadores. Sin embargo, lo más importante de la polimerización RAFT reside en la elección del agente RAFT o agente de transferencia de cadena (CTA) y las condiciones de reacción⁷.

El mecanismo propuesto para RAFT se puede observar en la **Figura 7** y se describe a continuación:

- I. La iniciación es muy rápida, generando dos radicales por cada iniciador.
- II. La adición del monómero al radical también sucede de prisa, creando cadenas radicalarias (1).
- III. Al principio de la reacción la adición de los radicales se da sobre el CTA (2), con una velocidad constante, creando otra especie radicalaria intermediaria (3). Esta especie se fragmenta, dependiendo de las constantes de velocidad de la reacción, dando o bien los productos iniciales, o generando la nueva especie durmiente (4) y una especie radicalaria R* (5).
- IV. La nueva especie radicalaria (5) puede o volver a reaccionar con el macro CTA durmiente (4) o reiniciar la reacción por adición de monómeros formando nuevas especies propagadoras (6)
- V. La formación de un rápido equilibrio en la reacción es esencial para asegurar el crecimiento de cadenas propagadoras antes de llegar al estado durmiente. Bajo las condiciones de equilibrio la fragmentación de las especies radicalarias intermedias (7) a cualquier lado de la reacción resulta en la producción de polímeros idénticos.
- VI. la reacción termina en el momento en que se agota el monómero, o bien si se da un cambio brusco en las condiciones de reacción, como podría ser un cambio de temperatura.

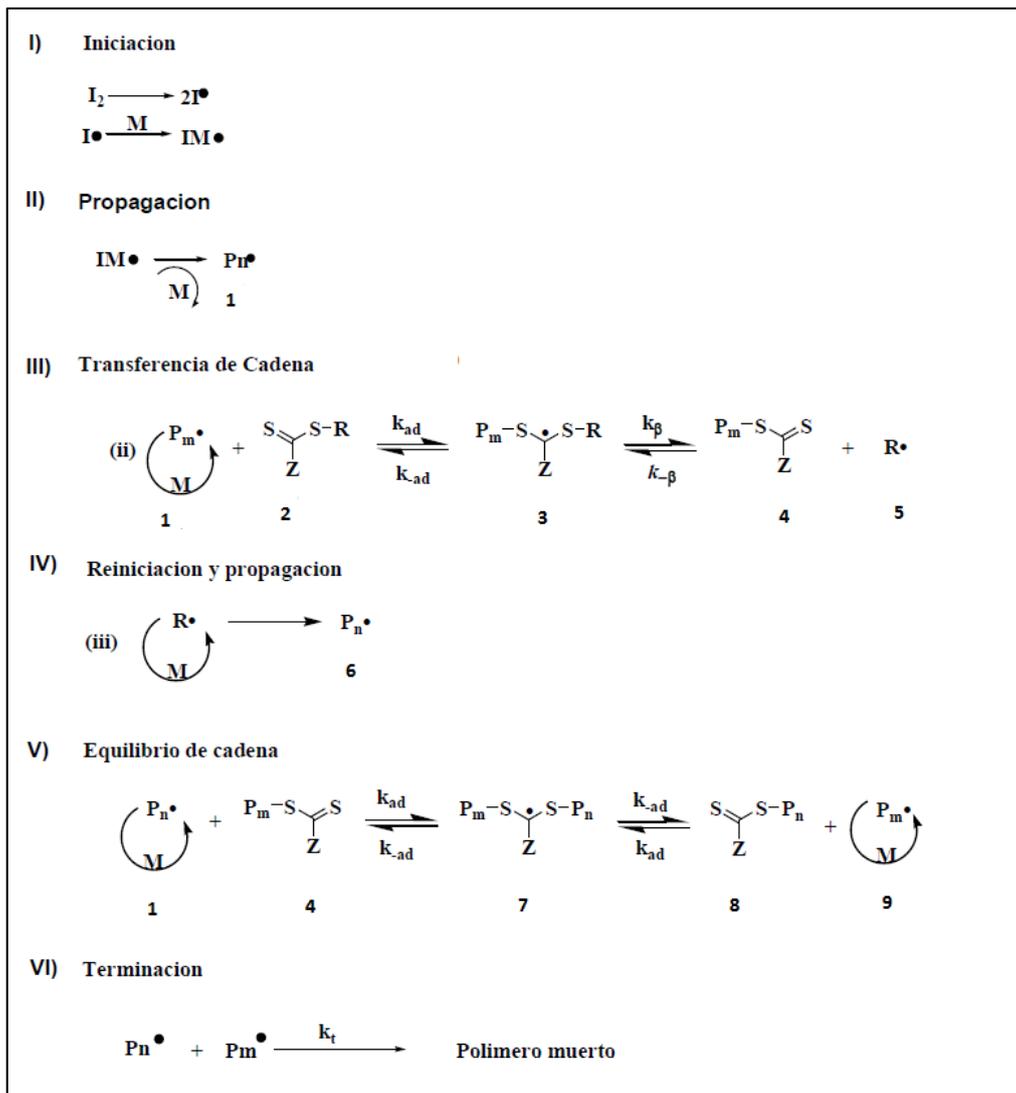


Figura 7: Representación del mecanismo RAFT en cada etapa³.

NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS UNIMOLECULARES O SCNPs

Las nanopartículas poliméricas unimoleculares del inglés “Single-Chain Nanoparticles” (SCNPs) se definen como nano-objetos blandos con un tamaño inferior a 100nm. Estas nanopartículas son las más pequeñas que se pueden crear a partir de un precursor polimérico lineal mediante el proceso de auto ensamblaje o “intrachain folding/collapse”.

Este proceso consiste en que grupos funcionales de una misma cadena reaccionen entre sí para entrecruzar o colapsar el polímero lineal. Las nanopartículas se pueden crear utilizando un “cross-linker” o entrecruzador de cadenas, de manera que será el entrecruzador de cadenas quien enlace los grupos funcionales entre sí⁸.

Las nanopartículas, en general, son objeto de intenso estudio por sus potenciales aplicaciones en biomedicina y catálisis, entre otras. Se utilizan en la terapia contra el cáncer, como nanoportadores de fármacos, o inhibidores de moléculas tumorales; por ejemplo, el quimioterapéutico Paclitaxel (Abraxane®), ha sido uno de los más evaluados. Estas nanopartículas poliméricas interfieren con la función de las células cancerígenas, resultando en apoptosis (vía de destrucción celular o muerte celular programada) de las células tumorales¹⁰.

Dependiendo de la naturaleza del precursor polimérico y la ruta de síntesis empleada, se obtienen dos tipos de nanopartículas poliméricas unimoleculares: extendidas y globulares¹¹.

SCNPs EXTENDIDAS

Las nanopartículas extendidas imitan la morfología típica de las proteínas intrínsecamente desordenadas o IDPs (del inglés “Intrinsically Disordered Proteins”), tal como se puede apreciar en la siguiente figura. Esta morfología se obtiene cuando se realiza la síntesis de las nanopartículas un buen disolvente¹¹.

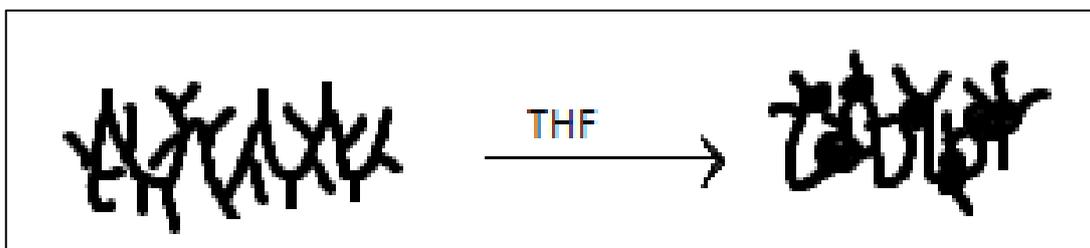


Figura 8: Esquema general de la síntesis de nanopartículas extendidas.

SCNPs GLOBULARES

Las nanopartículas globulares presentan una estructura que imita la morfología compacta de las enzimas y por lo general se forman en disoluciones acuosas, utilizando un polímero precursor anfifílico, es decir, que esté formada por monómeros tanto hidrofóbicos como hidrofílicos. La presencia del agua provoca una orientación de los grupos funcionales, y el polímero orienta la parte hidrofílica hacia el exterior y la hidrofóbica hacia el interior, formando nanopartículas globulares. En presencia de un entrecruzador de enlaces, las nanopartículas formadas en el agua crean enlaces covalentes permanentes. Se han sintetizado exitosamente diversas nanopartículas¹¹.

La siguiente figura representa un esquema típico para lograr este tipo de SCNPs:

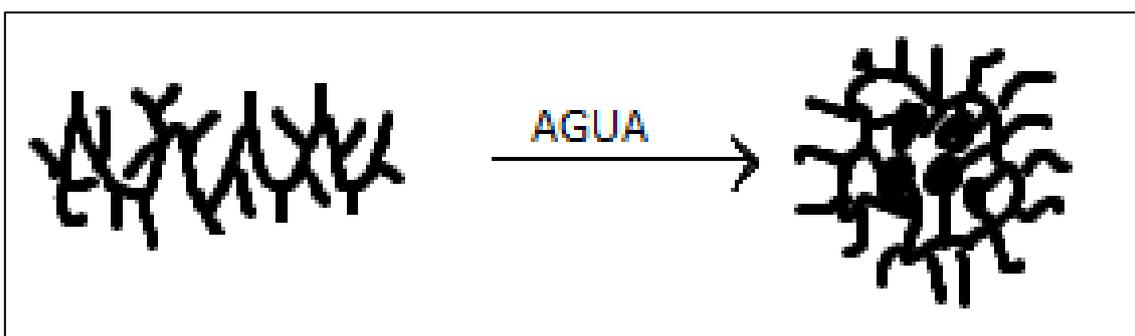


Figura 9: Esquema general de la síntesis de nanopartículas globulares.

MICELAS

Las micelas son moléculas anfifílicas, que en presencia del agua forman estructuras globulares orientando los grupos hidrofílicos hacia el exterior, evitando todo contacto entre el agua y la parte hidrofóbica de la molécula¹².

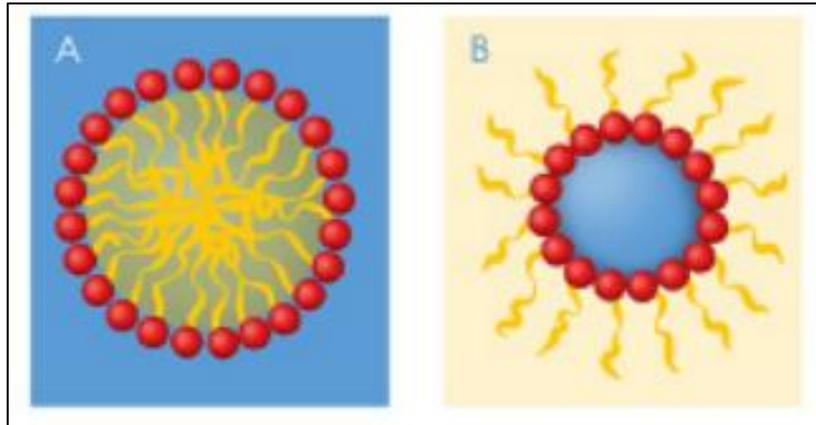


Figura 10: Estructura general de las micelas en agua A y estructura de las micelas invertidas¹².

Una de las muchas propiedades coloidales que presentan los copolímeros de bloque anfifílicos es su capacidad para formar micelas o estructuras globulares en diversos tipos de disolventes. Los estudios científicos se centran en el uso de copolímeros de bloque (formadas por dos bloques, AB; o formadas por tres bloques, ABA) para formar micelas y su estructura interna puede estudiarse mediante difusión de rayos X a pequeño ángulo, SAXS, entre otras. Entre los factores que más influyen en la estructura de las micelas y en su comportamiento en disolución, se halla en la estructura, la masa molar y la composición del copolímero¹³.

Las micelas, como las nanopartículas, también han sido área de estudio para aplicaciones tales como portadores de fármacos, mediante el uso de micelas poliméricas biodegradables¹⁴.

PARTE EXPERIMENTAL

SINTESIS DE PRECURSORES POLIMERICOS

P(MMA-co-AEMA)

Los materiales utilizados son los siguientes: metacrilato de metilo (MMA, Aldrich, 99%) y 2-acetoacetoxi etil metacrilato (AEMA, Aldrich, %95) previamente purificadas en alúmina. Como CTA, cianopropil dibenzoato (CPDB, características), el iniciador 2,2-azobis(2-metilpropilonitrilo) (AIBN, Aldrich, %98) recristalizado, acetato de etilo (Aldrich, ACS reagent) como disolvente y metanol (Aldrich, 98%) como precipitante.

Las reacciones de polimerización se realizaron en unos viales de vidrio. En primer lugar, se introdujeron en los viales cantidades previamente calculadas de CTA (CPDB), Iniciador (AIBN), monómeros (1 ml de MMA y cantidades variables de AEMA) y disolvente (3.12ml de acetato de etilo). Los viales se cerraron utilizando un septum y se purgaron con argón para crear una atmosfera inerte. Para iniciar la polimerización se introdujeron los viales un baño de etilenglicol a 65 °C durante 18 horas en agitación constante.

Transcurrido ese tiempo, las reacciones se pararon introduciendo los viales nitrógeno líquido. Para terminar, el polímero obtenido tras cada reacción fue precipitado en una solución de metanol, después se filtró y se secó durante toda la noche en un horno al vacío a temperatura ambiente¹⁵.

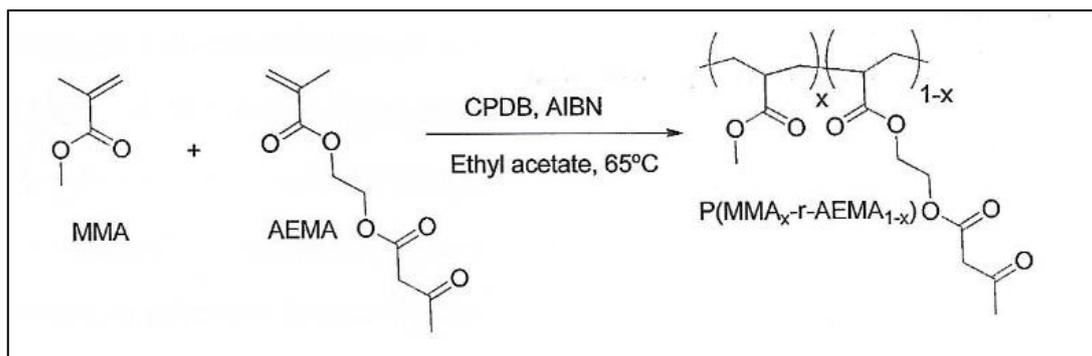


Figura 11: Esquema de la síntesis de P(MMA-co-AEMA)¹⁵.

Se realizaron distintas polimerizaciones utilizando distintas relaciones de MMA/AEMA (%mol), monómeros/CTA y CTA/I tal y como se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Condiciones de reacción utilizadas para sintetizar los copolímeros de P(MMA-co-AEMA).

Nombre	MMA/AEMA mol %	M/CTA	CTA/I
R1	90/10	368.6	4
R2	80/20		
R3	70/30		
R4	90/10	1800	1.2
R5	80/20		
R6	70/30		

P(OEGMA-co-AEMA)

Los materiales utilizados son los siguientes: oligo (etilenglicol) metil éter metacrilato (OEGMA, Aldrich, Mn = 300KDa) y 2- acetoacetoxy etil metacrilato (AEMA, Aldrich, %95) previamente purificadas en alúmina. Como CTA, o ácido cianopentanoico ditiobenzoato (CPADB, Strem Chemicals), el iniciador 2,2-azobis(2-metilpropilonitrilo) (AIBN, Aldrich, %98) recristalizado, 1,4 dioxano (anhidro, 99,8%) como disolvente y hexano (anhidro, %95) como precipitante.

De la misma manera que en la sección anterior, las reacciones de polimerización se realizaron en viales de vidrio en los cuales se añadieron los monómeros (OEGMA y AEMA), el CTA (CPADB), el Iniciador y el disolvente (1,4-Dioxano). Tras purgar los viales con argón, estos fueron introducidos en un baño a 70 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo, las reacciones se enfriaron introduciéndolas en nitrógeno líquido. Los polímeros sintetizados fueron recuperados tras precipitarlos en hexano, filtrarlos y secarlos durante toda una noche en un horno al vacío a temperatura ambiente¹⁶.

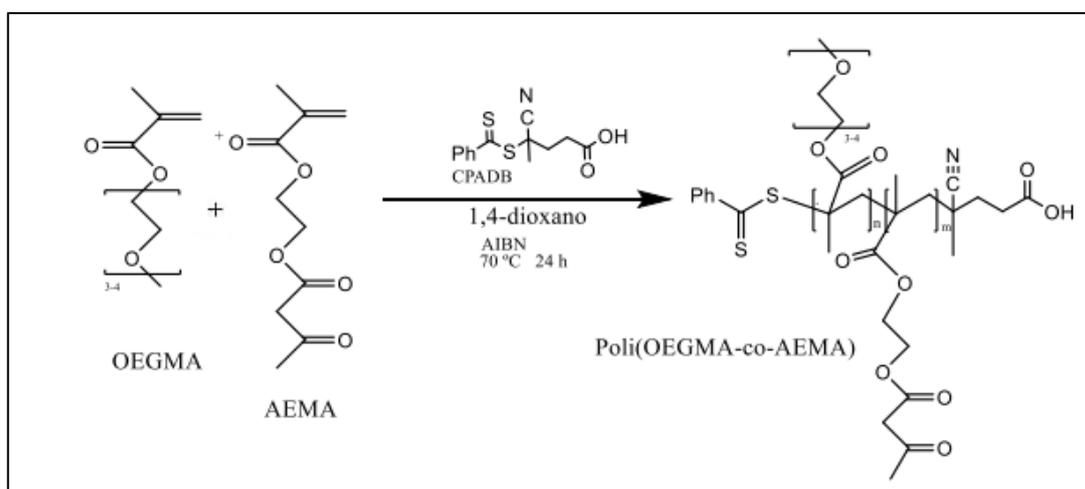


Figura 12: Esquema de la síntesis de P(OEGMA-co-AEMA)¹⁷.

En este caso también se realizaron distintas reacciones utilizando distintas relaciones de OEGMA/AEMA y monómeros/CTA tal y como se muestra en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Condiciones de reacción utilizadas para sintetizar los copolímeros de P(OEGMA-co-AEMA). la concentración de monomero inicial fue 0.019mmol/ml en todos los casos.

Nombre	MMA/AEMA mol %	M/CTA	CTA/I
R7	90/10	167	5
R8	80/20		
R9	70/30		
R10	90/10	667	5
R11	80/20		
R12	70/30		

SINTESIS DE SCNPs

Los materiales utilizados han sido los siguientes: Como entrecruzador de cadenas acetato de cobre (Aldrich, 98%) y trimetilolpropano triacrilato (TMT, Aldrich). Agua desionizada mediante Thermo Scientific Barnstead TII, THF (Scharlau, ACS reagent), hexano (Scharlau, 96%), dietil éter (Aldrich).

SCNPs DE P(OEGMA-co-AEMA) EN AGUA

Para la síntesis de las SCNPs en agua, en primer lugar se prepara una disolución de polímero precursor P(OEGMA-co-AEMA) en agua y se agita durante al menos 24 horas.

A esa disolución se le añade el agente de entrecruzamiento de cadenas o “*cross-linker*” ($\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (50% de moles respecto a AEMA) o TMT (33% de moles respecto a AEMA)) que será quien se ocupe de crear nuevos enlaces para dar lugar a nanopartículas.

En el caso del $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, se añade disuelto en una pequeña cantidad de agua y se deja reaccionar durante 24 horas. En el caso del TMT, éste se añade disuelto en una pequeña cantidad de THF (además previamente habremos añadido KOH en una relación equimolar respecto a los moles de AEMA) y se deja agitar durante 72 horas. Transcurrido este tiempo, la solución se liofiliza y se recuperan las nanopartículas en estado sólido.

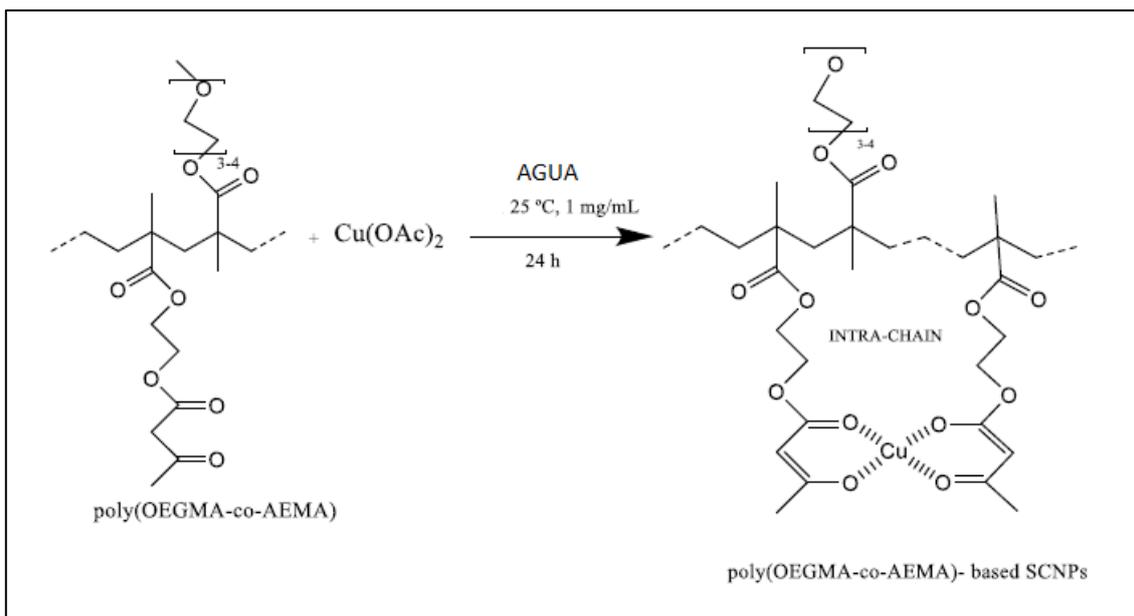


Figura 13: Síntesis de SCNPs, a partir de P(OEGMA-co-AEMA) en agua con acetato de cobre¹⁷.

Las síntesis realizadas en agua se resumen en las siguientes tablas.

Se han realizado distintas series de pruebas para realizar comparaciones. En primer lugar la **Tabla 3** muestra SCNPs sintetizadas a distintas concentraciones para ver el efecto de la concentración de precursor en las síntesis, utilizando el mismo “cross-linker”. (Los precursores tienen aproximadamente el mismo contenido en AEMA: 20%).

Tabla 3: Datos de síntesis de SCNPs de P(OEGMA-co-AEMA), con distintas concentraciones.

NP	PRECURSOR	Mn (kDa)	[] mg/ml	“Cross-linker”
NP6	R17	402.9	1	Cu(OAc) ₂
NP7	R17	402.9	100	Cu(OAc) ₂
NP8	R14	52.6	1	Cu(OAc) ₂
NP9	R14	52.6	100	Cu(OAc) ₂

La siguiente serie de síntesis se han preparado para observar el efecto del entrecruzador de cadenas y del peso molecular en la reacción. (Los precursores tienen aproximadamente el mismo contenido en AEMA: 20%).

Tabla 4: Datos de síntesis de SCNPs de P(OEGMA-co-AEMA), con distintos entrecruzadores de cadena.

NP	PRECURSOR	Mn (kDa)	[] mg/ml	“Cross-linker”
NP16	R17	402.6	1	Cu(OAc) ₂
NP17	R17	402.6	1	TMT
NP20	R19	114	1	Cu(OAc) ₂
NP21	R19	114	1	TMT
NP24	R14	52.6	1	TMT
NP8	R14	52.6	1	Cu(OAc) ₂

SCNPs de P(OEGMA-co-AEMA) y P(MMA-co-AEMA) EN THF

En primer lugar, se prepara una disolución de polímero precursor en THF a una concentración de 1mg/ml. La disolución debe estar agitando durante al menos 24 horas para la completa disolución del polímero. A esa disolución se le añade el agente de entrecruzamiento de cadenas (Cu(OAc)₂ o TMT, disuelto en una mínima cantidad de THF que será quien se ocupe de crear nanopartículas. El Cu(OAc)₂ se deja reaccionar durante 24 horas (50% de moles respecto a AEMA) y el TMT durante 72 horas (33% de moles respecto a AEMA) además en este último caso se habrá añadido previamente KOH (cantidad equimolar respecto al AEMA) al medio de reacción. Transcurrido este tiempo, La solución se rotavaporiza para eliminar la mayor parte del disolvente, y se precipita en: dietil éter, cuando el precursor es P(MMA-co-AEMA) y hexano, cuando el precursor es P(OEGMA-co-AEMA).

Para finalizar, el polímero se seca en un horno a temperatura ambiente durante 12 horas.

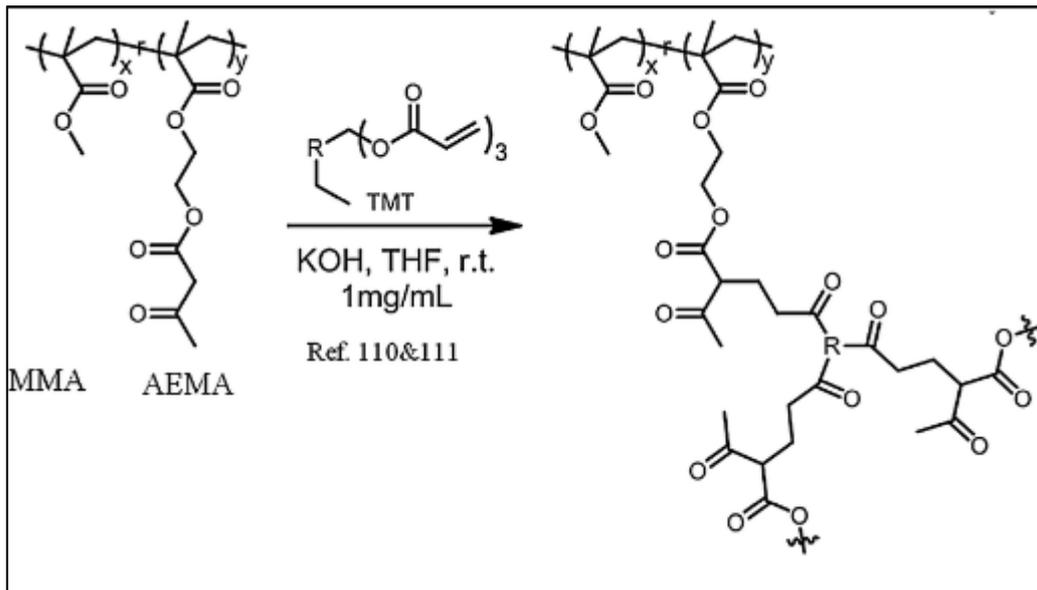


Figura 14: Síntesis de SCNPs a partir de P(MMA-co-AEMA) en THF, con TMT¹⁷.

Las síntesis realizadas en THF se resumen en las siguientes tablas:

Se han realizado distintas series de pruebas para realizar comparaciones. En primer lugar la **Tabla 5** muestra SCNP sintetizadas a partir de P(MMA-co-AEMA), de distintos pesos moleculares y con distintos entrecruzadores de cadena, con el mismo contenido de AEMA: 30%.

Tabla 5: Datos de síntesis de SCNPs de P(MMA-co-AEMA), con distintos pesos moleculares.

NP	PRECURSOR	Mn (kDa)	[] mg/ml	"Cross-linker"
NP10	R3	66.3	1	Cu(OAc) ₂
NP11	R6	257.3	1	Cu(OAc) ₂
NP12	R3	66.3	1	TMT
NP13	R6	257.3	1	TMT

Por último la **Tabla 6** nos muestra nanopartículas sintetizadas en THF, cuyos precursores son P(OEGMA-co-AEMA). Se han realizado experimentos para poder observar el efecto del peso molecular y del entrecruzador de cadenas. Esta vez, también se podrá observar el efecto del contenido en AEMA.

Tabla 6: Datos de síntesis de SCNPs de P(OEGMA-co-AEMA), con distintos entrecruzadores de cadena, distintos pesos moleculares y diferente contenido en AEMA.

NP	PRECURSOR	%AEMA mol	Mn (kDa)	[] mg/ml	“Cross-linker”
NP14	R13	11	58	1	Cu(OAc) ₂
NP15	R13	11	58	1	TMT
NP18	R19	9	115	1	Cu(OAc) ₂
NP19	R19	9	115	1	TMT
NP22	R14	17	52.6	1	Cu(OAc) ₂
NP23	R14	17	52.6	1	TMT

SINTESIS DE COPOLIMEROS DE BLOQUE P(AEMA-b-OEGMA)

Estas síntesis se efectúan en dos etapas, la primera etapa es la síntesis de los homopolímeros de AEMA. Para ello se introducen en un vial el monómero AEMA, el CTA, el iniciador térmico (AIBN) y el 1,4dioxano (3ml) y se purga el vial con argón para crear una atmosfera inerte. La reacciones se efectuaron durante 5 horas a 70°C utilizando diferentes relaciones monómero/CTA con el objetivo de obtener homopolímeros de distintos pesos moleculares (ver Tabla 7). Una vez transcurrido este periodo, las reacciones se detuvieron introduciendo los viales en nitrógeno líquido.

Tabla 7: Relaciones CTA/I y M/CTA para la primera etapa.

1.ETAPA: P(AEMA)	CTA/I	M/CTA
AEMA1	5	10
AEMA2	5	50
AEMA3	5	100

La segunda etapa consiste en la síntesis de los copolímeros de bloque mediante reacciones de extensión de cadena. En este caso, se añadió OEGMA, iniciador (AIBN) y 1,4dioxano (5ml) en diferentes cantidades a 2g de las disoluciones de P(AEMA) (macroRAFT) preparadas en la etapa

anterior. Los viales fueron purgados con argón y las polimerizaciones se realizaron a 70°C durante 17 horas. Una vez más, las reacciones fueron finalizadas enfriándolas en nitrógeno líquido y los copolímeros de bloque fueron recuperados mediante precipitación en hexano y secado a vacío durante 12 horas. Estas reacciones se efectuaron con diferentes proporciones de monómeros e iniciador con el fin de lograr copolímeros de bloque de distintos pesos moleculares. La siguiente tabla muestra las condiciones utilizadas para efectuar la primera parte de la síntesis.

Tabla 8: relaciones CTA/I y M/CTA utilizados en la segunda etapa.

2.ETAPA: P(AEMA-b-OEGMA)	CTA/I	M/macroCTA
BC1	5	20
BC2	5	50
BC3	5	100

SINTESIS DE MICELAS

La síntesis de micelas se ha realizado partiendo de un copolímero de bloque anfifílico: P(OEGMA-b-AEMA). Las micelas se forman de manera natural en disolventes polares, sin necesidad de añadir entrecruzador de cadenas, por lo que se prepara una disolución de 5mg/ml de precursor en agua y se deja agitando durante 24 horas. Pasado el tiempo las micelas estarán formadas.

Tabla 9: Datos de los precursores utilizados para la síntesis de micelas obtenidos mediante GPC.

	Mn (kDa)	Đ
BC1	4.4	1.013
BC2	14.4	1.048
BC3	34.5	1.135

TECNICAS EXPERIMENTALES

SEC o GPC

Del inglés, “Size Exclusion Chromatography”, la cromatografía por exclusión de tamaño también llamada GPC o cromatografía de permeabilidad sobre gel, es una de los muchos tipos de cromatografía que son utilizados hoy en día para la separación y cuantificación de componentes que se hallan en un mismo disolvente.

Esta técnica se inició a partir de la preparación de micro esferas de geles de compuestos orgánicos solubles en agua, las cuales fueron utilizadas para la separación de polímeros disueltos en disolventes orgánicos, mediante un relleno de poli estireno. Por ello la técnica se denominó permeabilidad en gel o GPC.

En la actualidad esta técnica es rápida y permite el uso de altas presiones mediante el empleo de rellenos nuevos con distribuciones de poros muy precisas, y la apropiada resistencia mecánica para las altas presiones. La fase estacionaria es inerte por lo que la columna no se desactiva y la muestra no interacciona químicamente con la fase estacionaria, ni con la móvil. Los solutos suelen ser moléculas de peso molecular alto, dependiendo del cual se retienen o se eluyen a través de la columna¹⁸.

Las primeras en salir (mayor peso), no entran en los poros, y muestran menores tiempos de retención, en cambio, las moléculas más pequeñas se cuelan en los poros dando lugar a recorridos más largos y por lo tanto mayores tiempos de retención, como muestra la **Figura 15**.

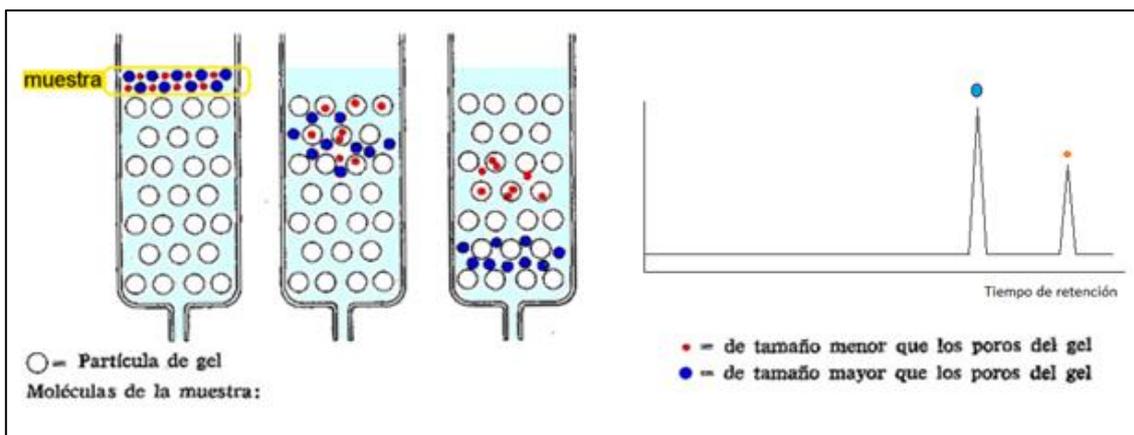


Figura 15: Esquema de cromatografía por exclusión de tamaño¹⁹.

Cuando los componentes se han separado, se utilizan distintos métodos de detección para caracterizar y cuantificar la muestra, tales como los detectores de luz, del índice de refracción y/o viscosímetros. En este caso los detectores utilizados fueron los siguientes:

- Wyatt miniDAWN TREOS.
- Wyatt ViscoStar-II viscosimeter.
- WYatt Optilab rex.

Las muestras se analizaron mediante disoluciones de precursores o nanopartículas en THF en una concentración de 4mg/ml o 1mg/ml.

RMN

La espectrometría de resonancia magnética nuclear o RMN, es una técnica que se basa en las propiedades magnéticas de ciertos núcleos. Las aplicaciones más importantes para su uso en la química son la RMN de protones o ¹H RMN y la de carbono 13. Esta técnica aporta muchos tipos de información mediante un espectro, como el número y tipo de unidades químicas de una molécula. La RMN muy útiles para entender la estructura de una molécula o los mecanismos de reacción y se puede aplicar tanto en solución como en estado sólido.

La base del RMN es la siguiente: cuando los núcleos activos de RMN (^1H , ^{13}C) son situadas dentro de un campo magnético, resuenan a frecuencias determinadas en base a su entorno. Dependiendo de ese entorno químico local, los diferentes protones (o C) de una molécula vibran a frecuencias ligeramente distintas.

Por lo tanto, cada protón diferente, dejara un pico concreto en el espectro, y un desplazamiento químico ligero. Comprendiendo los distintos entornos químicos, el desplazamiento químico puede ser usado para obtener información estructural sobre la muestra.

El tamaño y la forma de los picos del espectro son los indicadores de la estructura química y de su composición. Mediante softwares de análisis moderno permite analizar muestras de forma rápida y sencilla²⁰.

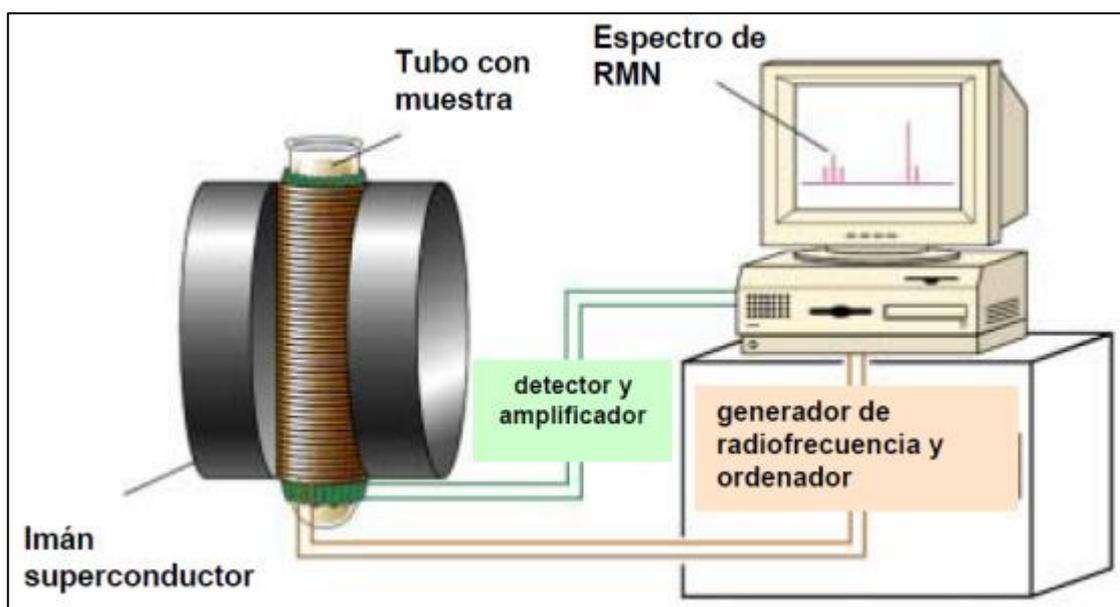


Figura 16: Esquema de un RMN convencional²¹.

Las muestras de RMN se prepararon con una concentración aproximada de 7mg/ml en cloroforo deuterado.

DLS

La Dispersión de Luz Dinámica o DLS (del Inglés, Dynamic Light Scattering) es una técnica no invasiva y no destructiva, bien establecida para poder medir el tamaño y la distribución de tamaño de las moléculas y partículas de tamaño submicrométricas, y con la última tecnología, hasta de 1nm. Su mayor aplicación es la caracterización de partículas, emulsiones o moléculas que se han dispersado o disuelto en un líquido. El movimiento Browniano de las moléculas hace que la luz láser se disperse en intensidades distintas. El detector mide estas fluctuaciones de intensidad y por lo tanto el tamaño de la partícula²².

La siguiente imagen muestra el funcionamiento de una maquina DLS típica.

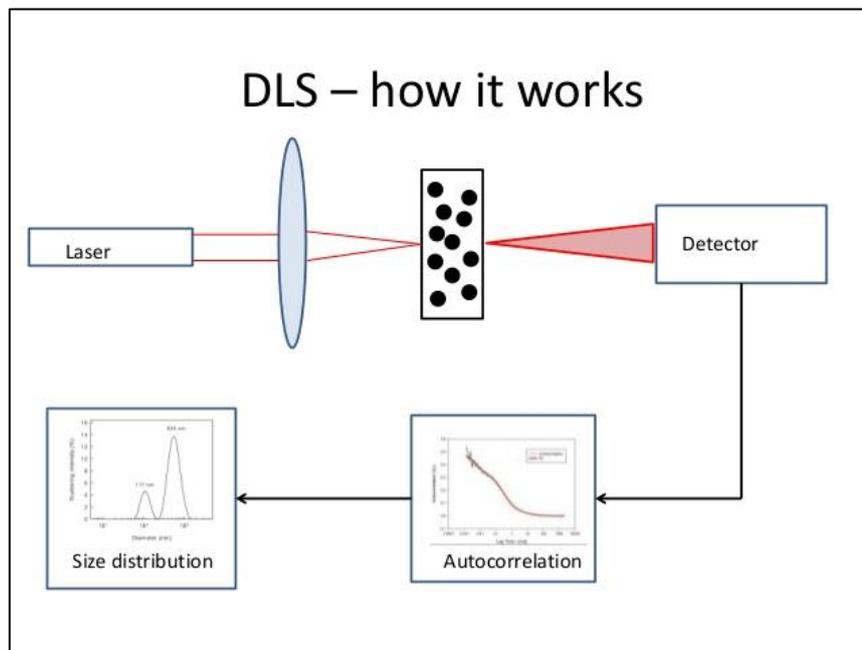


Figura 17: esquema general de un DLS²³.

Cuando la luz láser alcanza las numerosas partículas que hay en una muestra, se dispersa a todas las direcciones posibles. A consecuencia del movimiento browniano, el detector mide la dispersión generada y mediante maquinas sofisticadas, se realiza la auto-correlación y posterior gráfica de distribución de tamaño. Este método es muy eficaz para medir el radio hidrodinámico de las nanopartículas poliméricas²⁴.

Las muestras analizadas fueron preparadas en disoluciones de 0.25-1mg/ml en agua o THF.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos se resumen en los siguientes apartados.

Por un lado, los datos de porcentajes molares finales de cada precursor polimérico, han sido obtenidos mediante la integración de los picos de cada unidad repetitiva, logrados en el espectro de resonancia magnética nuclear de protón. El RMN también ha sido utilizado para confirmar enlaces covalentes entre entrecruzadores de cadena y monómeros, en la síntesis de las nanopartículas con TMT.

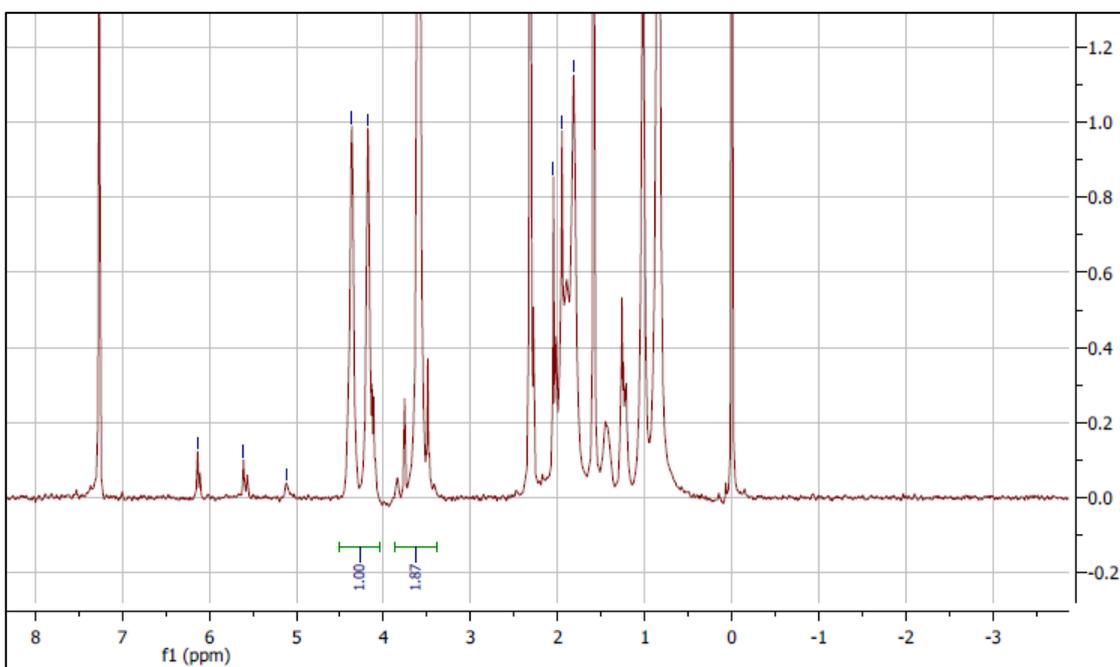


Figura 18: espectro de RMN protónico utilizado para caracterizar el precursor polimérico R3.

Por otro lado mediante GPC se han determinado pesos moleculares e índices de polidispersidad. La imagen que viene a continuación muestra un ejemplo.

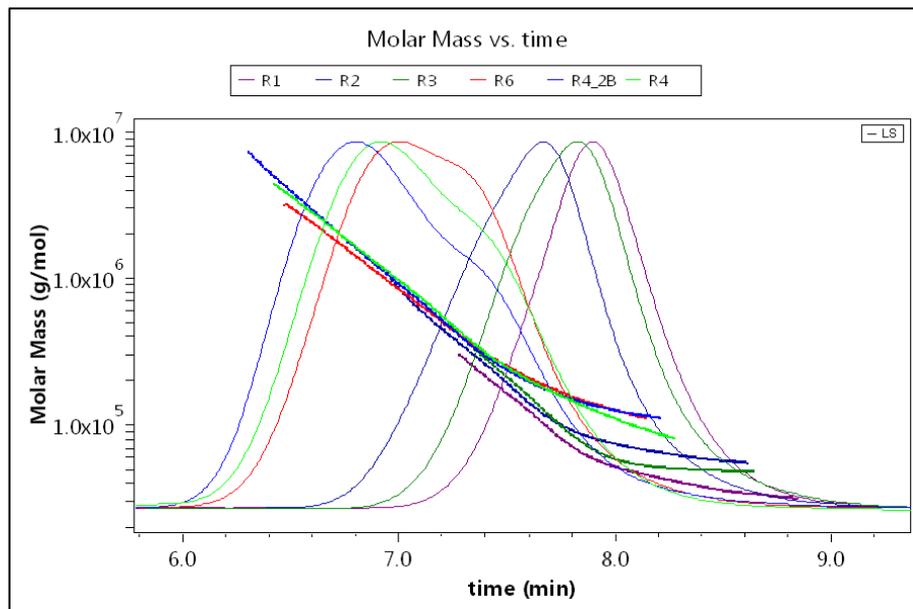


Figura 19: GPC de precursores poliméricos R1-R6, a mayor tiempo de retención menor peso molecular.

Por último, el método del DLS ha sido utilizado para medir el diámetro de las nanopartículas. La siguiente imagen muestra el ejemplo de la NP13, sintetizada a partir del precursor polimérico R6.

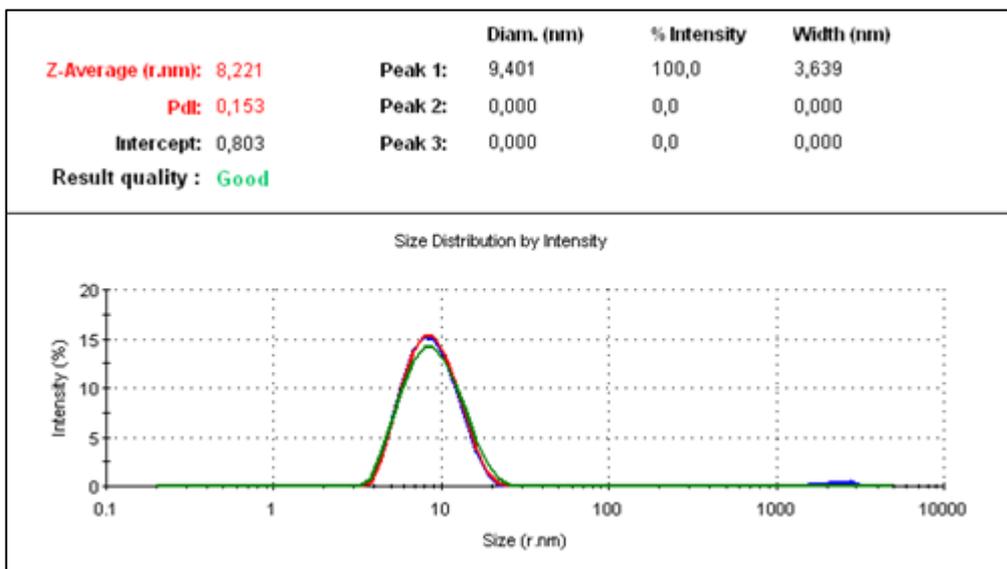


Figura 20: Datos obtenidos mediante DLS de la NP13.

RESULTADOS DE PRECURSORES P(MMA-co-AEMA)

La **Tabla 10** muestra las características, en términos de composición y peso molecular, de los copolímeros de P(MMA-co-AEMA) sintetizados. Tal y como es de esperar, el peso molecular aumenta al aumentar la relación monómero/CTA. Además, también observamos que cuanto mayor es la relación monómero/CTA más difícil resulta controlar la reacción y por lo tanto se obtienen polidispersidades mayores. Se utilizaron los polímeros R3, R5 y R6 para la creación de las nanopartículas.

Tabla 10: Resultados obtenidos por GPC de los copolímeros P(MMA-co-AEMA).

Nº	MMA/AEMA mol % Inicial	$\frac{CTA}{I}$	$\frac{M}{CTA}$	Final (%)	\bar{M}_n	Rend. (%)	Mn (kDa) Experim.
R1	90/10	4	368	74/26	1,159	91	51.6
R2	80/20	4	368	80/20	1,358	61	92.8
R3	70/30	4	368	64/35	1,275	58	66.3
R4	90/10	1,2	1800	73/27	2,104	77	217.3
R5	80/20	1,2	1800	81/19	1,383	41	168.8
R6	70/30	1,2	1800	66/34	1,464	57	257.3

RESULTADOS DE PRECURSORES P(OEGMA-co-AEMA)

La **Tabla 11** muestra los resultados obtenidos en la primera serie de reacciones.

Los resultados no son lo esperado ya que los pesos moleculares obtenidos eran muy altos (sobre todo en las reacciones del R7 al R9) y la composición de los copolímeros finales era muy alta en AEMA. Además las polidispersidades indican una distribución de pesos moleculares ancha, la cual no es conveniente. Por lo que esta serie de reacciones no se dieron por válidas.

Tabla 11: Resultados obtenidos por GPC de los copolímeros P(OEGMA-co-AEMA).

Nº	MMA/AEMA mol % Inicial	$\frac{CTA}{I}$	$\frac{M}{CTA}$	Final (%)	\bar{D}	Rend. (%)	Mn (kDa) Experim.
R7	90/10	5	167	72/28	1.46	55	80.7
R8	80/20	5	167	65/35	1.65	41	163.5
R9	70/30	5	167	60/40	1.39	58	159.8
R10	90/10	5	667	GELIFICADO			
R11	80/20	5	667	81/19	1,383	41	134.4
R12	70/30	5	667	66/34	1,464	57	107.61
[M]=0.0024 mol/ml [I] = 0.002 g/ml [CTA] = 0.01 g/ml							

En la siguiente **Tabla 12** muestra la repetición de la primera serie de reacciones. Los resultados son mucho mejores en las reacciones donde se usaron relaciones de monómero/CTA bajos (R13-R15) de lo contrario, las reacciones se descontrolaron y gelificaron cuando se usaron relaciones monómero/CTA altas. La gelificación ocurre debido al efecto gel o la autoaceleración. Se utilizaron los polímeros R14 y R17 para la síntesis de las nanopartículas.

Tabla 12: : Resultados de la repetición de las reacciones anteriores, obtenidos por GPC de los copolímeros P(OEGMA-co-AEMA).

Nº	MMA/AEMA mol % Inicial	$\frac{CTA}{I}$	$\frac{M}{CTA}$	Final (%)	\bar{D}	Rend. (%)	Mn (kDa) Experim.
R13	90/10	5	167	89/11	1.17	56	58
R14	80/20	5	167	83/17	1.19	69	52.6
R15	70/30	5	167	75/25	1.17	42	30.9
R16	90/10	5	667	GELIFICADO			
R17	80/20	5	667	81/19	1.04	29	402.9
R18	70/30	5	667	GELIFICADO			
[M]=0.0024 mol/ml							

$$[I] = 0.005 \text{ g/ml}$$

$$[CTA] = 0.05 \text{ g/ml}$$

Se repitieron las reacciones R16-18 con menor concentración de monómeros, para evitar el efecto gel y los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 13**. Aunque el efecto gel haya desaparecido, los pesos moleculares son menores a los esperados (alrededor de 200.000 kDa) aunque se da por válida la R20 para crear nanopartículas.

Tabla 13: Resultados de la repetición de las reacciones anteriores, obtenidos por GPC de los copolímeros P(OEGMA-co-AEMA).

Nº	MMA/AEMA mol % Inicial	$\frac{CTA}{I}$	$\frac{M}{CTA}$	Final (%)	\bar{D}	Rend. (%)	Mn (kDa) Experim.
R19	90/10	5	500	91/9	1.08	32	114.9
R20	80/20	5	500	82/18	1.13	35	153.8
R21	70/30	5	500	74/26	1.17	28	78.6

$[M]=0.0012 \text{ mol/ml}$
 $[I] = 0.01 \text{ g/ml}$
 $[CTA] = 0.05 \text{ g/ml}$

RESULTADOS DE SCNPs EN AGUA

P(OEGMA-co-AEMA)

La **Tabla 14**, de acuerdo con estudios anteriores¹⁷, muestra datos concluyentes de que las nanopartículas obtenidas con precursores poliméricos de alto peso molecular en agua (R17, Mn = 402 kDa), son más grandes que las nanopartículas obtenidas con precursores de bajo peso molecular (R14, Mn = 52 kDa) en agua. Además se concluye que la concentración no tiene efecto alguno entre 1-100mg/ml de precursor, cuando la reacción se efectúa en medio acuoso.

Las NP6 y NP7 se han agregado y no se disuelven en THF, posiblemente por el alto peso molecular que el precursor R17 (Mn = 402 kDa) tiene. Estas nanopartículas se han sintetizado con el mismo entrecruzador de cadenas: Cu(OAc)₂.

Tabla 14: Resultados de síntesis de SCNPs P(OEGMA-co-AEMA) en agua, para distintas concentraciones de síntesis: a) resultados obtenidos mediante GPC. b) resultados obtenidos mediante DLS.

NP	[] mg/ml	Z(nm) ^{b)}	R _h (nm) ^{a)}	Đ ^{a)}	Mn (kDa) ^{a)}	P	“Cross-likier”
NP6	1	27	AGREGADAS			R17	Cu(OAc) ₂
NP7	100	34	AGREGADAS			R17	Cu(OAc) ₂
NP8	1	13	10.6	1.32	61.3	R14	Cu(OAc) ₂
NP9	100	14	15.8	1.29	60.3	R14	Cu(OAc) ₂

En las siguientes imágenes se muestran los gráficos obtenidos por DLS de las NP6 y NP7 y el gráfico que compara los resultados de NP8, NP9 y R14 obtenido mediante GPC. En esta última se aprecia que las nanopartículas son de menor tamaño que el precursor, puesto que tienen un mayor tiempo de retención.

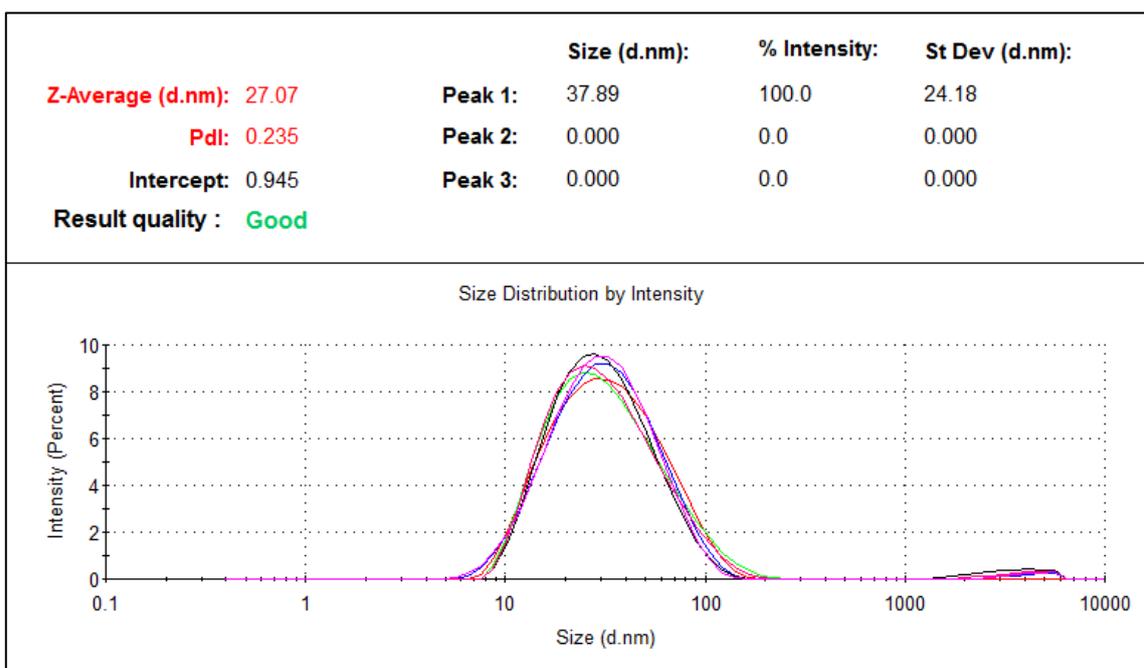


Figura 21: Grafica obtenida mediante DLS, para NP6.

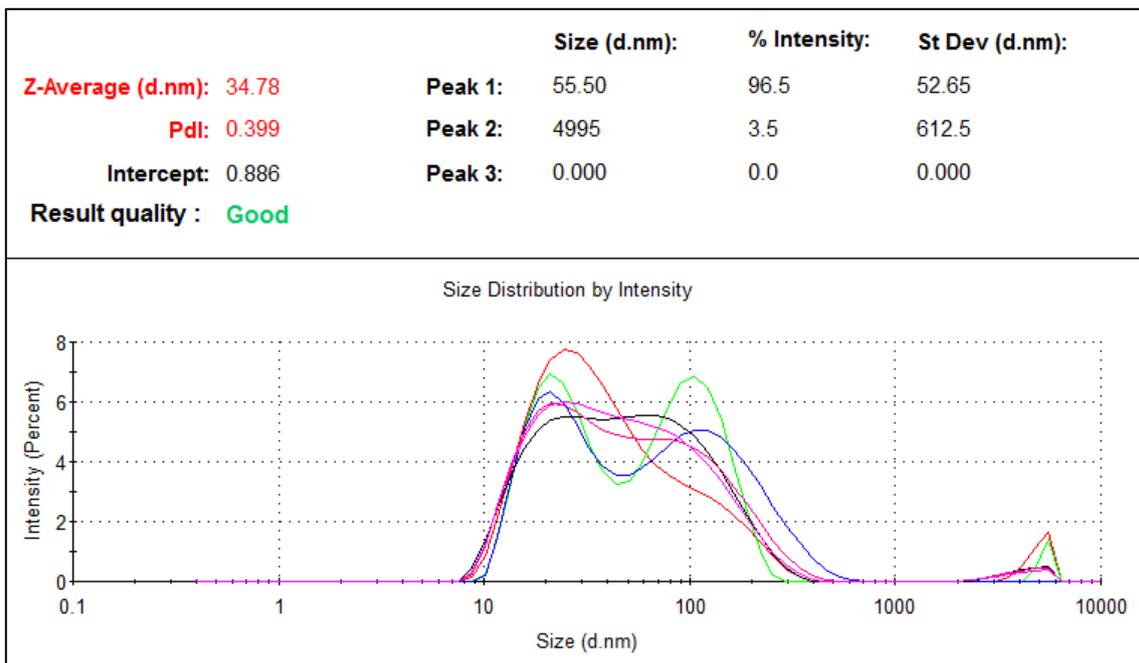


Figura 22: Grafica obtenida mediante DLS para NP7.

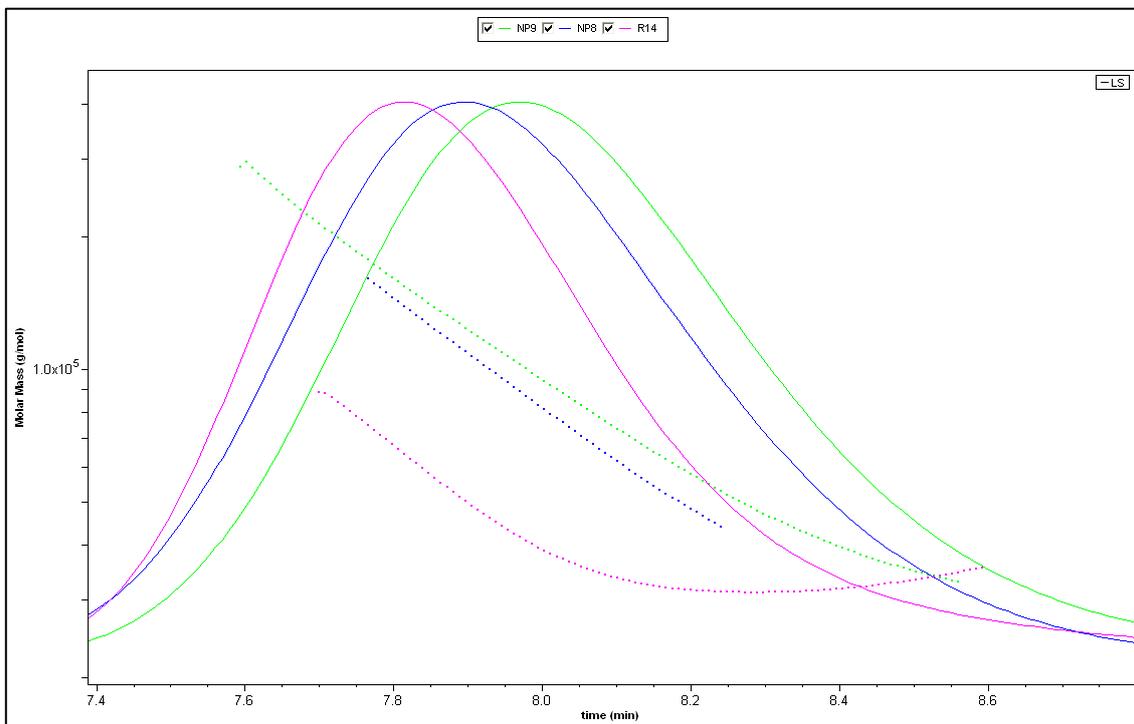


Figura 23: Grafica obtenida mediante GPC de NP8, NP9 y R14, a mayor tiempo de retención menor tamaño.

La **Tabla 15** resume los datos obtenidos con nanopartículas sintetizadas a partir de distintos “cross-linkers”. En este caso debería observarse un ligero descenso del radio (z (nm)) de las nanopartículas sintetizadas con TMT, respecto a las sintetizadas con acetato de cobre, puesto que el primero es trifuncional y el segundo bifuncional, y se compacta más el primero. Sin embargo, las reacciones en agua no presentan esa compactación con un entrecruzador trifuncional, y el acetato de cobre da nanopartículas más pequeñas que el TMT.

Tabla 15: Resultados de síntesis de SCNPs P(OEGMA-co-AEMA) en agua, con distintos entrecruzadores de cadenas: a) resultados obtenidos mediante DLS.

NP	[] mg/ml	Z(nm) ^{a)}	P	“Cross-linker”
NP16	1	16	R17	Cu(OAc) ₂
NP17	1	70	R17	TMT
NP20	1	41	R19	Cu(OAc) ₂
NP21	1	68	R19	TMT
NP24	1	20	R14	TMT
NP8	1	14	R14	Cu(OAc) ₂

RESULTADOS DE SCNPs EN THF

P(MMA-co-AEMA)

La **Tabla 16** muestra los resultados obtenidos para las nanopartículas de P(MMA-co-AEMA) en THF. Como previamente se ha comentado, las nanopartículas son más grandes a medida que el tamaño del precursor aumenta. El efecto del entrecruzador de cadenas es el esperado, el radio o z (nm), disminuye en las nanopartículas sintetizadas con TMT en THF, al contrario de lo que ocurre en las síntesis en agua.

Tabla 16: Resultados de síntesis de SCNPs en THF de P(MMA-co-AEMA), para distintos pesos moleculares. a) resultados obtenidos mediante GPC, b) resultados obtenidos mediante DLS.

NP	[] mg/ml	Z(nm) ^{b)}	R _h (nm) ^{a)}	Đ ^{a)}	Mn (kDa) ^{a)}	P	“Cross-likers”
NP10	1	10	9.4	1.04	46.1	R3	Cu(OAc) ₂
NP11	1	145	AGREGADA			R6	Cu(OAc) ₂
NP12	1	6.8	4.8	1.06	59.3	R3	TMT
NP13	1	16	8.2	1.17	274.6	R6	TMT

La NP11 muestra el mayor diámetro, seguramente porque las partículas se han agregado o por su alto peso molecular (Mn = 257kDa).

En la próxima imagen se muestran los gráficos obtenidos mediante GPC para R3, NP10 y NP12 y para R6 y NP13, en ella se observa claramente la diferencia de tamaño de cada nanopartícula con respecto a su precursor.

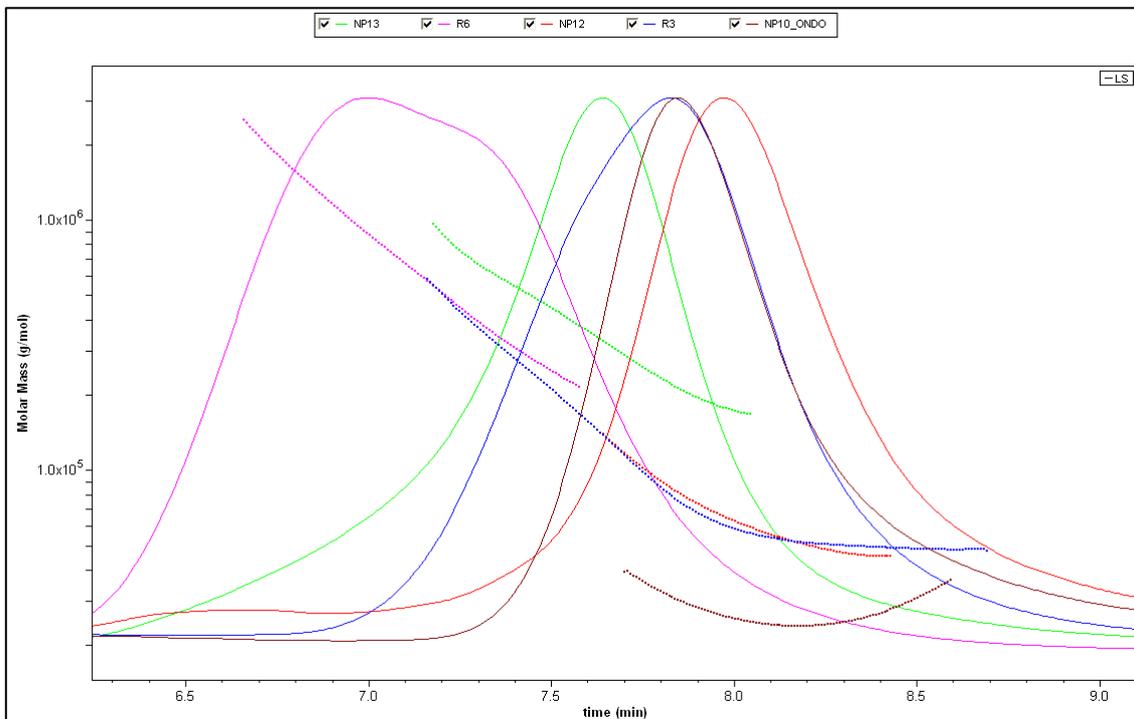


Figura 24: Grafica obtenida mediante GPC para R3, NP10, NP12, R6 y NP13.

P(OEGMA-co-AEMA)

La **Tabla 17** resume los resultados obtenidos para nanopartículas sintetizadas a partir de P(OEGMA-co-AEMA) en THF.

El efecto del entrecruzador de cadenas es el esperado. Al contrario de lo que ocurre en disoluciones acuosas, en disolventes orgánicos las nanopartículas sintetizadas con TMT muestran una ligera disminución del radio (z (nm)).

Con respecto al contenido en AEMA se comparan las SCNPs realizadas a partir de R14, R19 y R13, y debería observarse un ligero descenso en el tamaño de las nanopartículas a medida que aumenta el contenido en AEMA. Este ligero descenso se observa al comparar las nanopartículas con alrededor de 10% de AEMA con las que tienen 17% de AEMA; cuanto mayor es el contenido en AEMA, más pequeñas son las nanopartículas.

Tabla 17: Resultados de síntesis de SCNPs de P(OEGMA-co-AEMA) en THF. a) resultados obtenidos mediante GPC, b) resultados obtenidos mediante DLS.

NP	%AEMA ^{a)} (mol)	[] mg/ml	Z(nm) ^{b)}	R _h (nm) ^{a)}	Đ ^{a)}	Mn (kDa) ^{a)}	P	“Cross-likier”
NP14	11	1	20	5.15	1.04	31	R13	Cu(OAc) ₂
NP15		1	17	6.6	1.15	71	R13	TMT
NP18	9	1	13	6.9	1.01	51	R19	Cu(OAc) ₂
NP19		1	11	8.15	1.02	57	R19	TMT
NP22	17	1	6	5.08	1.05	47	R14	Cu(OAc) ₂
NP23		1	7	9.5	1.11	60	R14	TMT

RESULTADOS DE COPOLIMEROS DE BLOQUE (AEMA-b-OEGMA)

La **Tabla 18** resume los datos obtenidos en la primera parte de la síntesis de copolímeros de bloque. Se han obtenido homopolímeros con pesos moleculares muy similares a los esperados y con polidispersidades bajas, lo que indica una reacción de polimerización RAFT adecuadamente controlada.

Tabla 18: Resultados de la síntesis de P(AEMA). Todos los resultados han sido obtenidos mediante GPC.

	Mn (kDa)^{a)}	Đ^{a)}
AEMA1	2.79	1.024
AEMA2	10.4	1.025
AEMA3	16.37	1.036

La **Tabla 19** muestra los resultados obtenidos de los copolímeros de bloque, en la segunda etapa de la síntesis. Los resultados obtenidos son los adecuados: los pesos moleculares son los esperados y los índices de polidispersidad adecuados.

Tabla 19: Resultados de la síntesis de P(OEGMA-b-AEMA). Todos los resultados han sido obtenidos mediante GPC.

	Mn (kDa)^{a)}	Đ^{a)}
BC1	4.5	1.013
BC2	14.4	1.024
BC3	34.5	1.135

En la siguiente imagen se muestra la gráfica obtenida mediante GPC, y en ella se aprecia claramente la relación entre el tiempo de retención y el tamaño: a mayor tiempo de retención, menor tamaño de copolímeros de bloque.

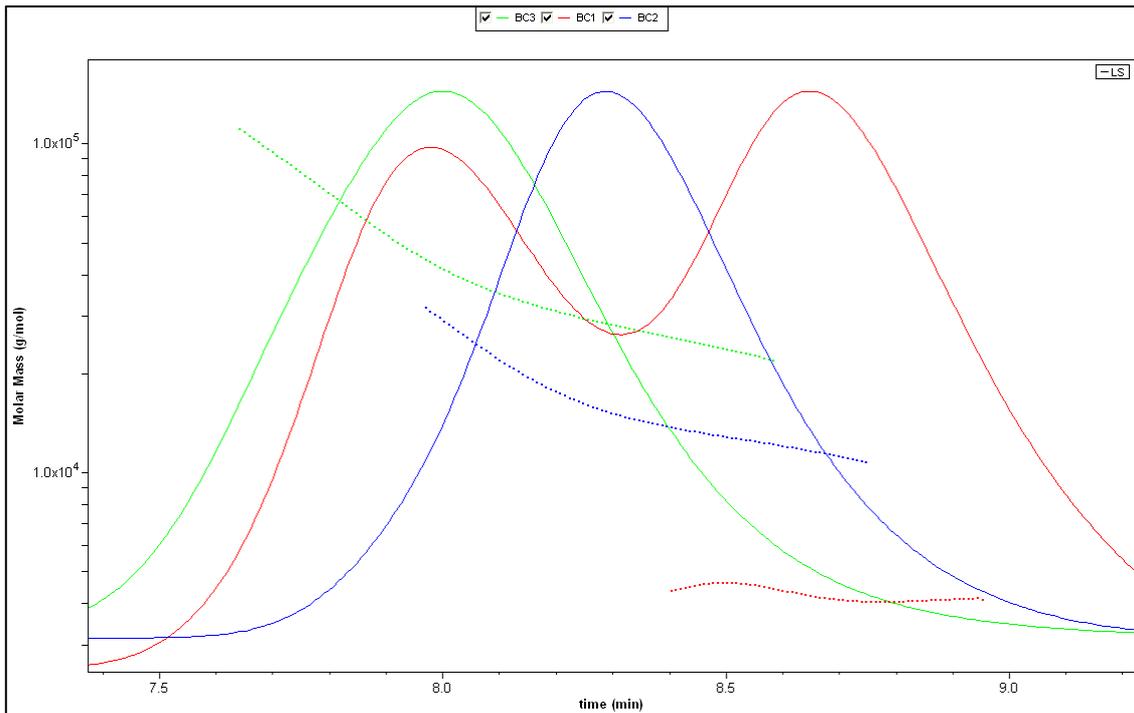


Figura 25: Grafica obtenida mediante GPC, de los BC1, BC2 y BC3

RESULTADOS DE MICELAS

La **Tabla 20** muestra los resultados obtenidos mediante GPC de las micelas formadas en disoluciones acuosas. Se observa que el diámetro ($Z(\text{nm})$) obtenido por DLS corresponde al tamaño de las nanopartículas (1-100nm) y se concluye que se han formado micelas de manera exitosa en agua. Estos datos no coinciden con el R_h (nm) obtenido mediante GPC, porque este dato corresponde al de los copolímeros de bloque disueltos en THF, y en ese medio no se forman las micelas.

Tabla 20: Resultados de las micelas sintetizadas a partir de P(OEGMA-*b*-AEMA). a) resultados obtenidos mediante GPC, b) resultados obtenidos mediante DLS.

	$Z(\text{nm})^b$	R_h (nm) ^{a)}
M1	9.4	1.6
M2	8.7	2.8
M3	26.8	4.5

RESULTADOS DE SCNPs FLUORESCENTES

El objetivo final de este trabajo consiste en verificar si es posible crear SCNPs fluorescentes: en teoría, el encapsulamiento de sondas de tipo AIG (aggregation-induced emission) en nanopartículas poliméricas unimoleculares debería restringir a la molécula encapsulada de todo movimiento (vibracional o rotacional). Cuando esto ocurre la molécula AIE debería emitir fluorescencia puesto que los electrones excitados no tienen otro modo de liberar la energía y pasar a estado de relajación.

Las pruebas realizadas han mostrado el éxito de la síntesis de nanopartículas unimoleculares con propiedades fluorescentes, como se puede ver en la siguiente imagen.

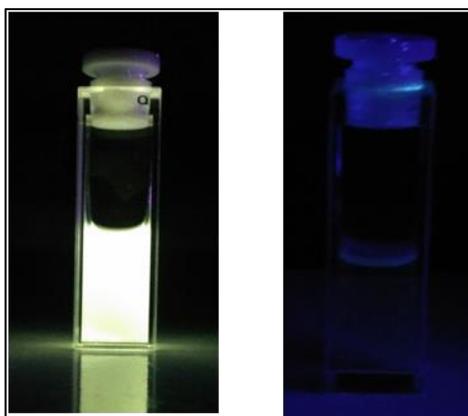


Figura 26: SCNPs fluorescentes de P(OEGMA-co-AEMA) con HPS (hexafenilsilol) encapsulado y disolución de HPS no fluorescente en agua.

La siguiente grafica muestra la intensidad de la fluorescencia en diferentes condiciones, de una nanopartícula sintetizada a partir de P(OEGMA-co-AEMA) y la sonda HPS.

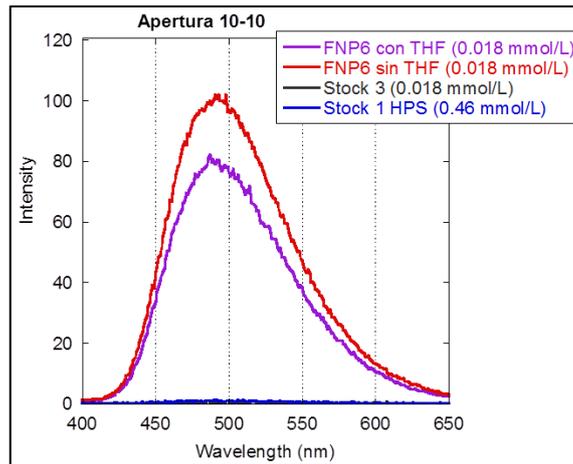


Figura 27: Fluorescencia medida para nanopartículas poliméricas de P(OEGMA-co-AEMA) con HPS encapsulado.

Se ha demostrado que tanto el disolvente como el entrecruzador de cadena interfieren en la fluorescencia, pero se puede decir que se han sintetizado exitosamente nanopartículas poliméricas unimoleculares con propiedades fluorescentes, a partir de copolímeros de P(OEGMA-co-AEMA).

La siguiente imagen muestra los datos obtenidos por el fluorímetro para las micelas fluorescentes de P(AEMA-b-OEGMA). La sonda HPS ha sido exitosamente encapsulada, aunque también se ha apreciado el efecto del disolvente.

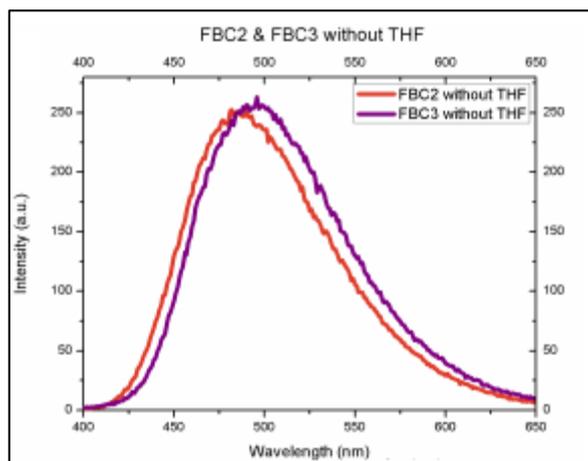


Figura 28: Fluorescencia medida para micelas fluorescentes a partir de copolímeros de bloque P(AEMA-b-OEGMA).

CONCLUSIONES

El presente trabajo ha consistido en la síntesis y caracterización de diversas nanopartículas poliméricas unimoleculares a partir de distintos precursores poliméricos (P(MMA-co-AEMA) y P(OEGMA-co-AEMA)). Las síntesis se han llevado a cabo exitosamente, en dos medios de reacción distintos: uno acuoso y el otro en disolvente orgánico, dando lugar a nanopartículas globulares o extendidas. Los precursores poliméricos se han sintetizado mediante la polimerización RAFT, un método efectivo entre los métodos de polimerización radicalaria controlada, y caracterizado mediante RMN y GPC, determinando así, sus proporciones molares monoméricas, su peso moléculas y su polidispersidad.

Se ha estudiado el efecto del contenido en AEMA en las nanopartículas, así como, el efecto del peso molecular del precursor, y el efecto de utilizar un entrecruzador de cadenas bifuncional o trifuncional. De acuerdo con estudios realizados anteriormente, a medida que aumenta el contenido molar en AEMA, disminuye el tamaño de las nanopartículas. Como es lógico y de acuerdo con los datos obtenidos, cuanto mayor sea el peso molecular mayores serán las nanopartículas. Además, el entrecruzador de cadenas trifuncional da lugar a nanopartículas ligeramente más compactas, que el entrecruzador bifuncional, en caso de las síntesis en THF, pero las nanopartículas sintetizadas en agua no siguen ese patrón.

Se han sintetizado también micelas a partir de copolímeros de bloque P(AEMA-b-OEGMA), dando lugar a nanopartículas de distintos tamaños, dependiendo del peso molecular del precursor empleado.

Resumiendo, se han sintetizado exitosamente toda una serie de nanopartículas y micelas, cuyas aplicaciones potenciales son numerosas. Además, se ha logrado sintetizar exitosamente nanopartículas poliméricas unimoleculares fluorescentes, a partir de precursores poliméricos distintos mediante la encapsulación de moléculas orgánicas no fluorescentes, cuyas potenciales aplicaciones en medicina podrían ser muy interesantes, como detección de tumores o nanoportadores de medicamentos.

CONCLUSIONS

This work is about the synthesis and characterization of multiple SCNPs, from two different polymeric precursors: P(MMA-co-AEMA) y P(OEGMA-co-AEMA)). These syntheses have been carried out successfully, in two different reaction conditions: water and organic solvent, giving place to extended or globular nanoparticles. Polymeric precursors have been prepared by RAFT polymerization, and characterized with SEC and NMR.

The effect of AEMA content in SCNPs has been studied, such as the effect of the molecular weight and the cross-linker. According to recent researches, as AEMA content increases, smaller SCNPs are synthesized and as molecular weight increases, bigger SCNPs are synthesized. Also, when TMT is used in THF, nanoparticles are smaller than using copper acetate. In water, when TMT is used as cross-linker bigger nanoparticles are synthesized.

Micelles have been created from block copolymers made of P(AEMA-b-OEGMA), taking place to nanoparticles of different sizes.

To sum up, nanoparticles and micelles have been successfully synthesized, whose potential applications are numerous and very interesting. Also fluorescent SCNPs have been successfully created from different polymeric precursors by encapsulating non fluorescent organic molecules, with P(OEGMA-co-AEMA) and P(AEMA-b-OEGMA). These fluorescent nanoparticles may be able to detect tumors or can be used as drug nanocarriers.

BIBLIOGRAFIA

1. Gabino A. Carriedo, "Polimeros y Polimeros Inorganicos", Anales de la Real Sociedad Española de Química, Abril-Junio 2004, 12-19.
2. "Principles of Polymerization" 4ed. George Odian, 2004.
3. C. D. Grande y F. Zuluaga, "Polimerización por Adición, Fragmentación y Transferencia Reversible, RAFT: Una Revisión del Mecanismo y de la Técnica", Revista Iberoamericana de Polímeros Volumen 11(6), (2010), 339-359.
4. Nam S. Lee, Karen L. Wooley, Texas A&M University, "Block Copolymer Synthesis Using a Commercially Available Nitroxide-mediated Radical Polymerization (NMP) Initiator". Sigma Aldrich. Recuperado de: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/SAJ/Brochure/1/controlled-radical-polymerization-guide.pdf>
5. Chiefari J, Chong Y, Ercole F, Krstina J, Jeffery J, Le T, Mayadunne R, Meijs G, Moad L, Moad G, Rizzardo E, Thang S, Macromolecules, 1998, 31, 5559.
6. Recuperado de: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/polymer-science/raft-polymerization.html>
7. G. Moad, Y.K Chong, A. Postma, E. Rizzardo, San H. Thang "Advances in RAFT polymerization: the synthesis of polymers with defined end-groups" Polymer, 2005, 46, 8458-8468.
8. A. Sanchez, I. Perez-Baena, J.A. Pomposo, "Advances in Click Chemistry for Single Chain Nanoparticle Construction", Molecules, 2013, 18, 3339-3355.
9. C. Gomez Gaete, "Polymeric Nanoparticles: technology and pharmaceutical applications", Revista Farmacológica de Chile, 2014, 7(2) 7-16.
10. S. Hasan, "A Review on Nanoparticles: Their Synthesis and Types", Research Journal of Recent Sciences, 2015, vol. 4, 1-3.

11. S. Barroso, M. Gonzalez-Burgos, A.J. Moreno, F. Lo Verso, A. Arbe, J. Colmenero, J. A. Pomposo, "A Solvent-Based Strategy for Tuning the Internal Structure of Metallo-Folded Single-Chain Nanoparticles", *Macromolecular Journals*, 2016. DOI: 10.1002/marc.201600139.
12. Georgina Garza Ramos Martínez, 2015, "Proteínas Atrapadas En micelas". Recuperado de: <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num1/art04/>
13. I. Katima, J.R. Quintana, M. Villacampa, "Micelas" *Revista Iberoamericana de Polimeros*", abril 2003, vol. 4(2).
14. Saez et al. "Liberación Controlada de Fármacos. Micropartículas", *Revista Iberoamericana de Polimeros*, julio 2004, vol. 5(2).
15. A. Sanchez, S. Akbari, A. Etxeberria, A. Arbe, U. Gasser, A. J. Moreno, J. Colmenero, J. A. Pomposo, "Michael Nanocarriers Mimicking Transient Binding Disordered Proteins", *ACS Macro Letters*, 2013, 2, 491-495.
16. A. Sanchez, A. Arbe, J. Kohlbrecher, J. Colmenero, J.A. Pomposo, "Efficient Synthesis of Single-Chain Globules Mimicking the Morphology and Polymerase Activity of Metalloenzymes", *Macromolecular Journals*, 2015, 36, 1592-1597.
17. Senda Barroso, "Síntesis de Nanopartículas Poliméricas Unimoleculares a partir de Precursores Anfifílicos de Poli(OEGMA-co-AEMA)", Febrero 2016, Trabajo de Fin de Grado.
18. M.C Gutiérrez-Bouzán, A. Burdó, J. Cegarra, "La Cromatografía de Exclusión: análisis de la distribución de pesos moleculares en siliconas por GPC", *Boletín Intexter*, 2009, Nº 135.
19. Recuperado de: <http://biomodel.uah.es/tecnicas/crom/inicio.htm>
20. Guillermo Pérez, Recuperado de: http://www.espectrometria.com/espectrometra_de_resonancia_magntica_nuclear

21. Nefter Dario Yáñez Vanegas, “Resonancia magnética nuclear de sólidos aplicada a la caracterización de arcillas”, Recuperado de: <http://www.monografias.com/trabajos104/resonancia-magnetica-nuclear-solidos-aplicada-caracterizacion-arcillas/resonancia-magnetica-nuclear-solidos-aplicada-caracterizacion-arcillas2.shtml#ixzz4kawCNq00>

22. Recuperado de: <https://www.malvern.com/es/products/technology/dynamic-light-scattering>

23. E. Mansfield, Recuperado de: <https://www.slideshare.net/EdwardMansfield1/dynamic-light-scattering-48645581>

24. A. Cuadros-Moreno, R. Casañas, E. San Martín, “Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas”, *Lat. Am. J. Phys. Educ.*, diciembre 2014, vol. 8, no 4.