

**UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO/EUSKAL
HERRIKO UNIBERTSITATEA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS/KIMIKA
ZIENTZIEN FAKULTATEA**

GRADO EN QUÍMICA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS UNIMOLECULARES
FLUORESCENTES**

Autor/a: Julen Gorospe Trujillo

Dirigido por: José Pomposo Alonso y Edurne González Gandara

Donostia, julio de 2018

Índice

1. Introducción	3
1.1. Polímeros	3
1.2. Síntesis de polímeros	7
1.2.1. Polimerización radicalaria no controlada	7
1.2.2. Polimerización radicalaria controlada	7
1.2.2.1. Polimerización por Adición, Fragmentación y Transferencia de cadena Reversible (RAFT)	8
1.2.2.1.1. Mecanismo RAFT	8
1.2.2.1.2. Principales agentes de transferencia de cadena RAFT	9
1.3. Nanopartículas poliméricas unimoleculares (NPU)	9
1.4. Nanopartículas poliméricas unimoleculares (NPU) fluorescentes	10
1.5. Química “click”	11
1.5.1. Cicloadición 1,3-dipolar de azidas y alquinos catalizada con cobre (CuAAC)	12
2. Trabajo experimental	13
2.1. Materiales	13
2.2. Síntesis de P(OEGMA-co-PA) como precursor de las NPUs	14
2.3. Síntesis de nanopartículas poliméricas unimoleculares, NPUs	15
2.3.1. Utilizando diacidobutano como entrecruzante	15
2.3.2. Utilizando silol-N ₃ como entrecruzante	15
2.4. Técnicas de caracterización	16
2.4.1. Cromatografía por permeación de gel (GPC)	16
2.4.2. Resonancia magnética nuclear (RMN)	18
2.4.3. Temperatura inferior crítica de disolución (LCST)	18
2.4.3.1. Espectroscopía Ultravioleta/visible (UV/visible)	19
2.4.3.2. Dispersión de Luz Dinámica (DLS)	20
2.4.4. Espectroscopía de fluorescencia	22
3. Resultados y discusión	23
3.1. Caracterización de P(OEGMA-co-PA) como precursor de las NPUs	23
3.2. Caracterización de NPUs con DAB como entrecruzante	26
3.3. Caracterización de NPUs con Silol-N ₃ como entrecruzante	31
4.1. Conclusions	38
4.2. Conclusiones	38
5. Bibliografía	39
6. Anexos	40

1. Introducción

Abstract:

This project can be divided in some parts. On one hand, the synthesis of the precursor copolymers P(OEGMA-co-PA). Besides, the change of conformation from polymeric chain to nanoparticle. In addition, characterize both the precursors (copolymers) and the products (nanoparticles) by the use of various techniques and after optimizing the reaction conditions, repeat the reaction replacing the crosslinker with a fluorescent probe. Finally, obtain some characteristics of the product in THF solvent and afterwards, in water.

This work is part of a bigger project, the objective of which is to obtain a certain polymer based on two different monomers and then its corresponding nanoparticle. All this is done in an organic phase and then the intention is to take it to an aquatic phase, in order to finally insert the final product in a cell. The result of using a fluorescent probe in the synthesis is that the nanoparticle turns fluorescent, so we are able to know whether the cell has accepted it or not.

Resumen:

El trabajo realizado se puede dividir en varias partes. Por un lado, la síntesis de copolímeros precursores P(OEGMA-co-PA). Por otro, ejecutar el paso de cambio de conformación de cadena polimérica a nanopartícula. Además, caracterizar los precursores (copolímeros) y los productos (nanopartículas poliméricas unimoleculares, NPU) mediante la utilización de varias técnicas y tras optimizar las condiciones de reacción, repetir la reacción sustituyendo el entrecruzante con una sonda fluorescente. Finalmente, obtener características del producto en disolvente THF y posteriormente en agua.

En sí, este trabajo es parte de un proyecto más grande cuyo objetivo es conseguir un polímero concreto a partir de dos monómeros diferentes y a continuación su correspondiente nanopartícula. Todo esto se hace en una fase orgánica y luego hay intención de pasarlo a una fase acuática, para finalmente insertar el producto final en una célula. Al haber utilizado una sonda fluorescente en la síntesis, la nanopartícula se vuelve fluorescente y se puede saber si la célula la ha aceptado.

1.1. Polímeros

Un polímero es una macromolécula, compuesta por una repetición de subunidades llamadas monómeros. Gracias a su amplia variedad de propiedades, tanto los polímeros sintéticos (p. ej. poliestireno) como los naturales (ADN, proteínas...) forman parte del día a día. Su gran masa

molecular comparada con otras moléculas simples proporciona propiedades físicas únicas, incluida la resistencia, viscoelasticidad y tendencia a formar estructuras vítreas y semicristalinas en vez de cristales.

Principalmente se clasifican en naturales o sintéticos, pero hay muchos criterios de clasificación, según la característica que se quiera resaltar. Por ejemplo, en cuanto a los componentes, si está formado por un mismo tipo de monómero, será un homopolímero. Si está formado por distintos monómeros, será un heteropolímero o copolímero.



Ilustración 1. Estructuras poliméricas, donde A y B son monómeros diferentes. 1: Homopolímero, 2: Copolímero alternante, 3: Copolímero aleatorio, 4: Copolímero de bloque y 5: Copolímero de injerto.

Dentro del grupo de copolímeros también se pueden hacer más distinciones según la organización de los distintos monómeros (ilustración 1).

Si se tiene en cuenta la estructura, se puede diferenciar entre lineales, ramificados y entrecruzados como se muestra en la ilustración 2.

Los polímeros lineales suelen ser termoplásticos, es decir, que al calentarlos se funden o ablandan y entonces se les puede dar forma. Si se enfrían, pueden mantener la forma y se pueden volver a calentar para cambiar la forma de nuevo.

Los ramificados se crean por reacciones secundarias y contienen cadenas laterales enlazadas a la cadena principal.

Los polímeros entrecruzados se crean cuando entran en juego tres enlaces covalentes o más. Son resistentes, insolubles e infusibles.

Los polímeros entrecruzados son termoestables. Esto quiere decir que al calentarlos (a veces junto con presión) se entrecruzan y endurecen. Por eso, al contrario que los termoplásticos no se pueden reciclar.

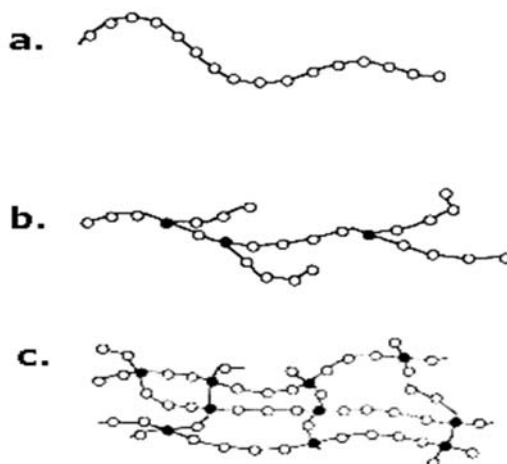


Ilustración 2. Estructura espacial de los polímeros, donde a. es un polímero lineal, b. ramificado y c. entrecruzado.

La tacticidad describe la relativa estereoquímica de los centros quirales, dividiendo los polímeros en tres grupos: isotácticos, los que tienen todos los sustituyentes en el mismo lado; atácticos, los que tienen los sustituyentes en posición aleatoria; y los sindiotácticos, los que tienen los sustituyentes en posición alternante.

El grado de polimerización se utiliza para hacer referencia al número de unidades repetitivas o al tamaño de las cadenas.

En general, es difícil controlar el proceso de polimerización y la longitud de las cadenas acaba siendo diferente. Por eso se dan dos formas de promedio de las masas moleculares: M_n y M_w , como muestra la ilustración 3.

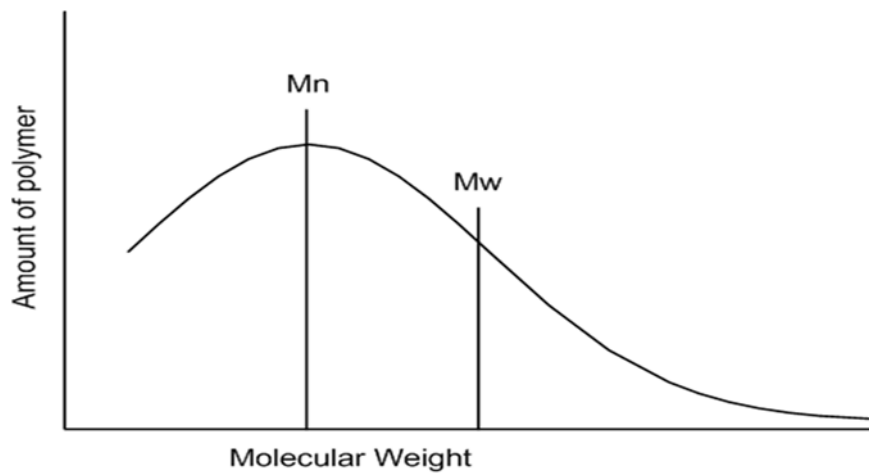


Ilustración 3. Representación esquemática de una distribución de masas moleculares de un polímero y las correspondientes masas moleculares promedio en número (M_n) y en masa (M_w).

La masa molecular promedio en número, M_n , es la media aritmética de la masa, donde MW_i es la masa molecular de la cadena y n_i el número de cadenas de masa molecular MW_i (Ecuación 1).

$$M_n = \frac{\sum n_i (MW_i)}{\sum n_i}$$

Ecuación 1.

La masa molecular promedio en masa, M_w , representa el promedio en peso de cada cadena (Ecuación 2).

$$M_w = \frac{\sum w_i (MW_i)}{\sum n_i (MW)_i}$$

Ecuación 2.

La relación entre M_w y M_n se conoce como polidispersidad, \mathcal{D} (Ecuación 3). Valores altos de \mathcal{D} corresponden a una distribución de tamaño ancha, y viceversa. Cuando el valor se acerca a 1 (el mínimo), el tamaño de las cadenas es aproximadamente uniforme.

$$\mathbb{D} = \frac{M_w}{M_n}$$

Ecuación 3.

1.2. Síntesis de polímeros

Las principales técnicas de polimerización son: polimerización por adición o condensación; y polimerización por crecimiento de cadena o en etapas.

La polimerización por adición se da cuando el monómero pasa a formar parte del polímero sin pérdida de átomos, mientras que en la condensación los monómeros pierden átomos en forma de moléculas pequeñas como agua (se crean subproductos).

En la polimerización por etapas la reacción se da entre grupos funcionales, mientras que en la polimerización por crecimiento de cadena los monómeros se van adicionando progresivamente a una cadena en crecimiento.

Dentro de la polimerización por crecimiento de cadena hay tres tipos principales: por vía radicalaria, por vía iónica (catiónica o aniónica) y polimerización de coordinación. La vía radicalaria presenta significantes ventajas sobre la vía iónica y de coordinación, por ejemplo, ya que las condiciones de reacción no suelen ser tan estrictas y permite cierta presencia de impurezas.

1.2.1. Polimerización radicalaria no controlada

Es un tipo de polimerización por crecimiento de cadena. Ocurre mediante la ruptura de un enlace doble, convirtiendo el monómero en un radical propagante activo². A pesar de los beneficios y su uso extendido, el rápido crecimiento de cadena y la presencia de terminación rápida e irreversible limitan el control sobre la distribución de masa y la estructura³. Tampoco es práctica para producir copolímeros de bloque o polímeros de estructura compleja.

1.2.2. Polimerización radicalaria controlada

La Polimerización Radicalaria Controlada (en inglés, *Controlled Radical Polymerization*, CRP) comprende tres tipos: la Polimerización Mediada por Nitróxidos (NMP), Polimerización

Radicalaria por Transferencia Atómica (ATRP) y polimerización por Adición, Fragmentación y Transferencia de cadena Reversible (RAFT). A continuación describimos la polimerización radicalaria RAFT, que ha sido la empleada en este trabajo.

1.2.2.1. Polimerización por Adición, Fragmentación y Transferencia de cadena Reversible (RAFT)

1.2.2.1.1. Mecanismo de RAFT:

En la polimerización RAFT la iniciación ocurre mediante la descomposición del iniciador radicalario libre, que conduce a la formación de cadenas propagadoras. A continuación, se añade el radical propagador al agente de transferencia de cadena RAFT. Después ocurre la fragmentación del intermediario radicalario, dando lugar a un agente RAFT polimérico y un nuevo radical. Este radical reinicia la polimerización para formar nuevos radicales propagadores. Se puede ver el mecanismo en la ilustración 4.

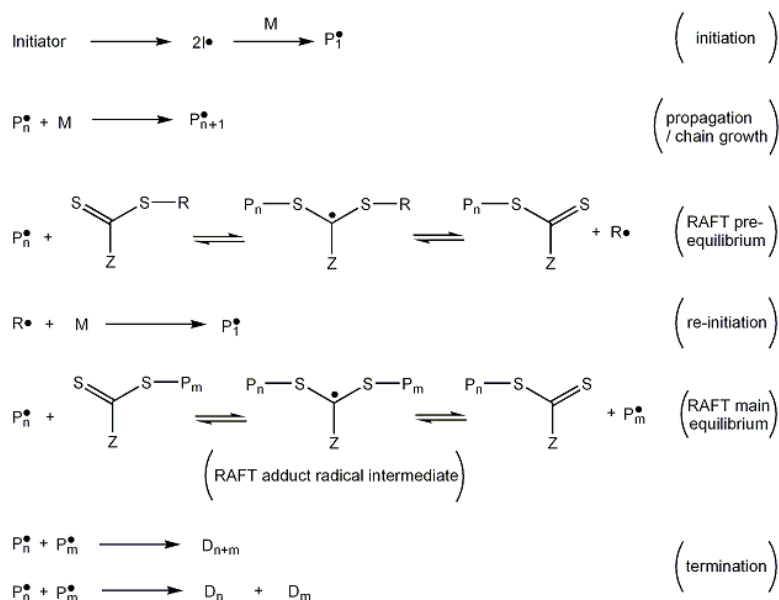


Ilustración 4. Mecanismo RAFT.

Los sistemas de adición, fragmentación y transferencia de cadena reversible (o *Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer*, RAFT) son versátiles, pues permiten la utilización de varios monómeros en medios tanto homogéneos como heterogéneos. La ventaja más

significante es su compatibilidad con un amplio rango de monómeros, tales como el estireno, acrilatos, metacrilatos y derivados. Esta característica ofrece la oportunidad de crear bibliotecas de polímeros bien definidas mediante la combinación de diferentes monómeros.

1.2.2.1.2. Principales agentes de transferencia de cadena RAFT:

Los ditiobenzoatos poseen muy altas constantes de transferencia, son propensos a la hidrólisis y pueden causar retrasos en grandes concentraciones.

Los tritiocarbonatos también poseen altas constantes de transferencia, son más estables frente a la hidrólisis y causan menos retrasos.

Los ditiocarbamatos son efectivos con los monómeros ricos en electrones y su actividad está determinada por los sustituyentes en el nitrógeno.

1.3. Nanopartículas poliméricas unimoleculares (NPU)

La nanociencia es la ciencia emergente que se centra en los objetos que poseen un tamaño entre 1 y 100 nm. Recientemente, las nanopartículas poliméricas unimoleculares (NPU) han surgido como útiles nano-objetos blandos artificiales que pueden imitar eficientemente la actividad catalítica de las enzimas.

En función de su naturaleza las nanopartículas pueden ser duras, fabricadas con materiales inorgánicos que mantienen su forma y tamaño durante todo el proceso; o blandas, fabricadas con materiales orgánicos susceptibles al cambio de tamaño y forma (hasta cierto punto) cuando se enfrentan a diferentes condiciones biológicas (tales como pH, fuerza iónica y presión).

Dentro de las blandas se pueden encontrar las poliméricas, y entre éstas la tecnología de cadena única ha ganado importancia en los últimos años. La tecnología de cadena única hace referencia a la capacidad de construir nano-objetos blandos al nivel de una sola cadena de polímero por reticulación intramolecular. Por tanto, se podría definir a las NPU como nanopartículas creadas tras el plegado y/o colapso de cadenas de polímero sintético individuales mediante entrecruzamiento intramolecular.

Es necesario que el proceso de colapso intracatenario se realice en concentraciones muy diluidas para evitar el entrecruzamiento entre distintas cadenas. Dependiendo del disolvente en el que se realice la reacción de compactación de estas NPU, se pueden encontrar dos morfologías diferentes: dispersa y globular, que afecta a la actividad y selectividad. La síntesis de NPU en un buen disolvente produce arquitecturas moleculares similares a las mostradas por las proteínas intrínsecamente desordenadas. De lo contrario, si la síntesis se produce en

agua a partir de copolímeros anfifílicos al azar la morfología resultante es más parecida a la de las enzimas globulares, muchas de las cuales poseen una zona interna hidrofóbica y una capa externa altamente hidrófila⁴⁻⁶.

Aunque hay varias técnicas para preparar NPU a partir de polímeros precursores funcionales apropiados, en nuestro caso se ha utilizado el colapso por entrecruzamiento, en el que se emplea un entrecruzante multifuncional externo para promover la formación de NPUs. Este colapso se ha llevado a cabo gracias a la química “click” de la que hablaremos más adelante.

1.4. Nanopartículas poliméricas unimoleculares (NPUs) fluorescentes

Un fluoróforo es un compuesto fluorescente que puede reemitir luz tras una excitación de luz. Suelen contener varios grupos aromáticos combinados, o moléculas planares o cíclicas con varios enlaces π ⁷.

Las moléculas fluoróforas pueden ser monitorizadas por espectroscopía y microscopía de fluorescencia, las cuales son técnicas altamente útiles y muy usadas en biología celular, bioquímica y medicina (p. ej. análisis de biomarcadores, ensayos de inmunología, diagnóstico de cáncer).

En comparación con las pequeñas moléculas orgánicas fluorescentes convencionales, los nanomateriales fluorescentes presentan varias ventajas tales como superior fotoestabilidad, emisión ajustable por tamaño y funcionalidad múltiple^{8,9}.

En las últimas décadas se han desarrollado e investigado ampliamente nanopartículas fluorescentes duras (NPDs), pero una de sus deficiencias más importantes es que no son biodegradables y pueden ser potencialmente tóxicas para los organismos vivos.

Las nanopartículas fluorescentes blandas (NPBs) sin embargo, se basan en sondas orgánicas conjugadas con polímeros, polímeros luminiscentes de coordinación metálica, proteínas fluorescentes, etc. y pueden ser fácilmente modificadas y funcionalizadas. Además, tienen mayor biocompatibilidad y biodegradabilidad. No obstante, la agregación de las sondas en el núcleo de las nanopartículas reduce su fluorescencia debido a procesos de transferencia de energía no radiativa.

La solución a esto son las sondas fluorescentes con emisión inducida por agregación (EIA), las cuales se vuelven intensamente fluorescentes sólo cuando tienen una movilidad intramolecular restringida o son sometidas a una rigidificación estructural. Las nanopartículas

fluorescentes basadas en EIA son muy atractivas para su uso en bioimagen, especialmente en imagen celular.

1.5. Química “click”

La química “click” es un tipo de reacciones específicas de pequeñas moléculas biocompatibles. Describe una manera de generar productos siguiendo ejemplos de la naturaleza.

Las reacciones click ocurren en un único reactor (*one pot*), son insensibles al agua, generan productos secundarios mínimos e inofensivos, y se caracterizan por haber una alta fuerza termodinámica que conduce al producto rápida e irreversiblemente en una sola reacción, con alta especificidad de reacción (a veces, regio- y estéreo-especificidad a la vez).

Son muchas las reacciones químicas que podrían cumplir todos estos criterios, aunque una clasificación más sencilla las englobaría en cuatro tipos principales:

- Reacciones de cicloadición como las 1,3-dipolares, o las cicloadiciones [4 + 2] como las hetero Diels-Alder.
- Reacciones de sustitución nucleofílica, particularmente las reacciones de apertura de anillo, sobre todo los electrófilos heterocíclicos tales como epóxidos, aziridinas, sulfatos, iones aziridinio y episulfonio.
- Reacciones de grupo carbonilo de tipo no aldólica, como la formación de éteres de oxima, hidrazonas y heterociclos aromáticos.
- Reacciones de adición a enlaces múltiples C-C, en particular reacciones de oxidación tales como la epoxidación, dihidroxilación, aziridinación y adiciones de haluros nitrosilo y sulfonilo. Algunas reacciones tipo Michael pueden incluirse también en este grupo.

La ilustración 5 muestra un ejemplo esquemático de algunos tipos de reacción “click”.

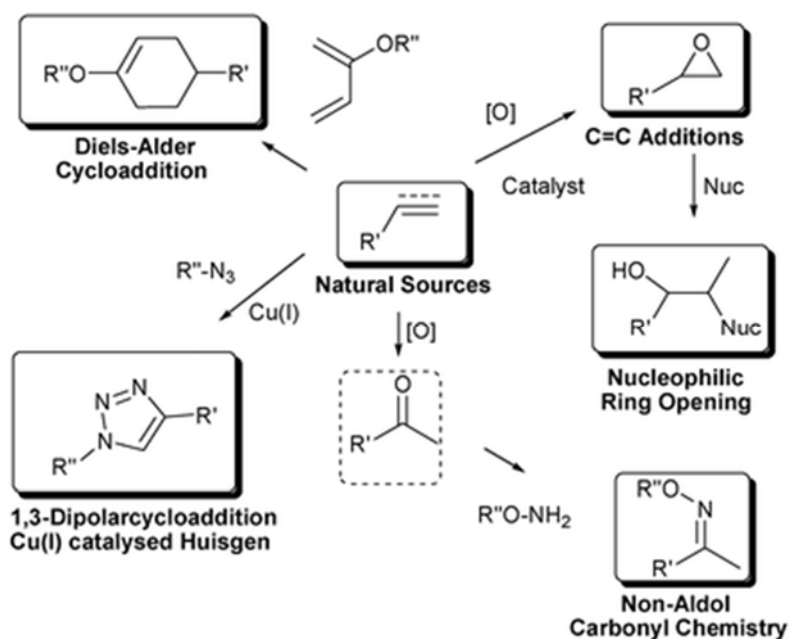


Ilustración 5. Selección de algunos tipos de reacciones que cumplen con los principios de química "click".

En nuestro caso la reacción utilizada ha sido la cicloadición 1,3-dipolar de azidas y alquinos catalizada con cobre (CuAAC).

1.5.1. Cicloadición 1,3-dipolar de azidas y alquinos catalizada con cobre (CuAAC)

La forma clásica de esta reacción¹⁰, es la reacción de una azida con un alquino catalizada mediante cobre para formar un anillo de 5 átomos, algunos de ellos siendo heteroátomos. A ésta se le llama "cicloadición de azidas y alquinos catalizada con Cu(I) (CuAAC).

La cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen cuenta con dos versiones, una catalizada por cobre (posterior) que da sólo el isómero 1,4; y la versión no catalizada que da los isómeros 1,4 y 1,5; además de ser más lenta y requerir una temperatura de 100 °C (ilustración 6).

La versión catalizada además, no requiere de ligandos en el metal, aunque también se pueden utilizar ligandos que aceleren el proceso, como derivados de tris(azolil)metil amina en medio acuático.

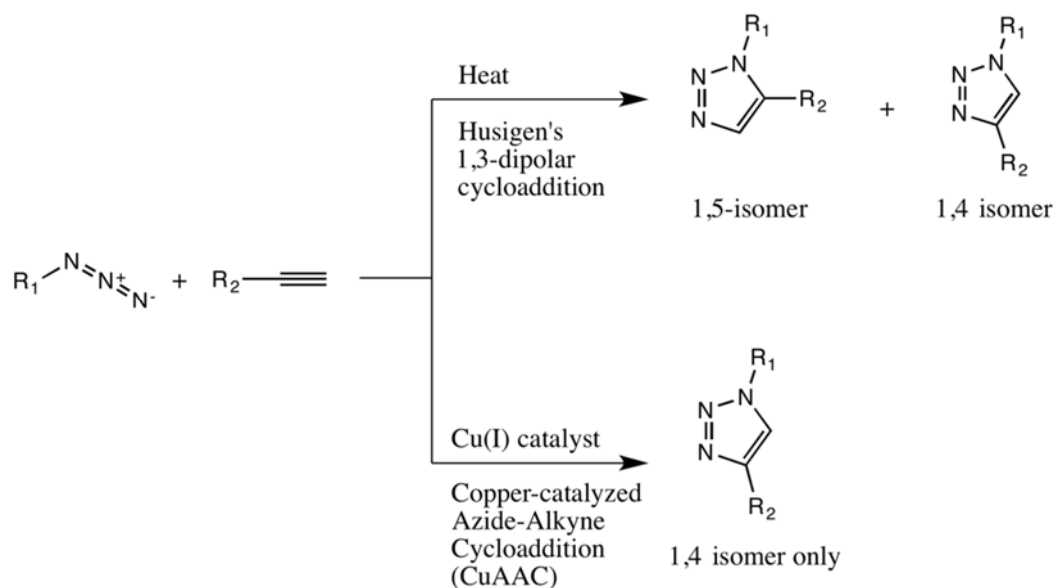


Ilustración 6. Cicloadición 1,3-dipolar de azidas y alquinos bajo condiciones térmicas y catalizada por Cu (I).

2. Trabajo experimental

Ha consistido en la síntesis de un copolímero precursor, dos tipos de nanopartículas y la caracterización de dichos sistemas, incluyendo sus propiedades fluorescentes.

2.1. Materiales:

Para la síntesis del polímero precursor se han empleado los monómeros oligoetilenglicol metil éter metacrilato (OEGMA) (Aldrich, promedio Mn: 300) y propargil acrilato (PA) (Aldrich, 98%), purificados mediante la filtración a través de alúmina básica y neutra respectivamente. El par redox iniciador se compone de peróxido de benzoilo (BPO) (75% hidratado, Aldrich), purificado por recristalización en cloroformo, y N,N-dimetilanilina (DMA) ($\geq 99,5\%$, Aldrich). Como agente RAFT se empleó 2-(2-cianoprop-2-il)-S-dodeciltiocarbonato (CSTC) (min. 97%), suministrado por Strem Chemicals.

Para la síntesis del entrecruzante 1,4-diacidobutano (DAB) se utilizó 1,4-dibromobutano (DBB) (99 %) y acida sódica (NaN_3) ($\geq 99,5\%$), ambas de Aldrich.

La sonda fluorescente, 2,5-bis(acidometilfenil)-1,1-dimetil-3,4-difenil-1H-silol (Silol- N_3), el catalizador, bromuro de cobre (I) (CuBr) (99,999%) y la base N,N,N',N'',N''-pentametildietilentriamina (PMDETA) (99%), fueron suministrados por Aldrich.

Los disolventes utilizados fueron tetrahidrofurano (THF) y hexano (96%, purísimo) de Scharlab, cloroformo deuterado (CDCl_3) [99,8 atom % D, 0,03 % (v/v) TMS] de Aldrich y N,N-dimetilformamida (DMF) (reagent grade, Scharlab). El agua empleada en las disoluciones se obtuvo del equipo de purificación Barnsted TII de Thermo Fisher Scientific (pureza Tipo II según ASTM).

2.2 Síntesis de P(OEGMA-co-PA) como precursor de las NPU:

Se han pesado 0,01120 g ($3,24 \cdot 10^{-5}$ mol) de CSTC y se han disuelto en 1 ml de THF. A continuación, se ha llevado a un matraz. Se han disuelto 0,0280 g ($1,156 \cdot 10^{-4}$ mol) de BPO en otro mililitro de THF y se ha añadido al matraz. Se han añadido los monómeros; 5 ml (0,0175 mol) de OEGMA y 0,828 ml (0,00750 mol) de PA, y después de sellar el matraz con septum se ha puesto bajo flujo de argón 10 minutos, con el objetivo de eliminar el oxígeno presente. Por otro lado, se han tomado 0,01470 ml ($1,16 \cdot 10^{-4}$ mol) de DMA en un vial y después de añadirle 1,8 ml de THF, se ha inyectado en el matraz atravesando el septum con una aguja. Se ha completado con THF de modo que en total sean 20,26 mL de disolvente. Tras quitar el flujo de argón, se ha dejado la reacción durante 7 h y para pararla se ha sumergido el vial en nitrógeno líquido.

Una vez finalizada la reacción, el polímero se ha recuperado precipitándolo en aproximadamente 60 ml de hexano. Seguido, se ha dializado durante 24 horas con el objetivo de purificarlo y quitarle el monómero residual.

Finalmente se ha sometido a liofilización durante 48 h. El copolímero final tiene un aspecto meloso y ha sido caracterizado por RMN y GPC.

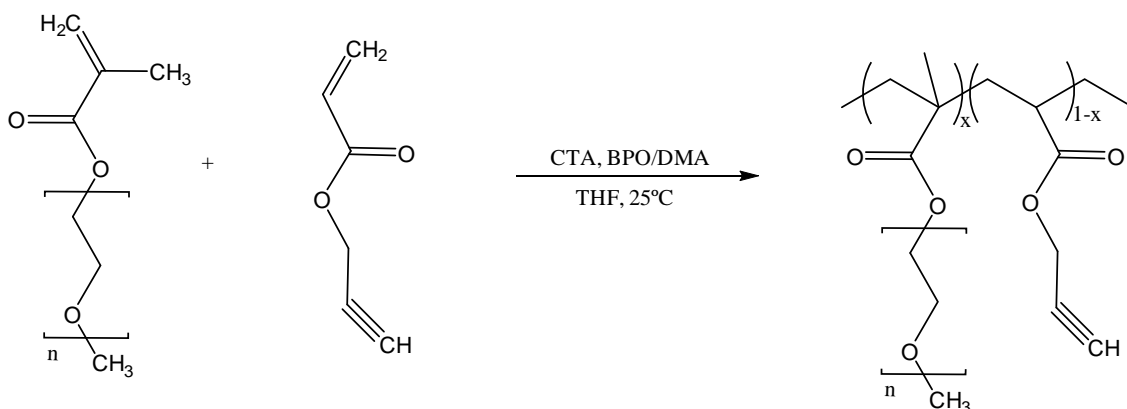


Ilustración 7. Reacción RAFT entre los monómeros OEGMA y PA para dar el polímero P(OEGMA-co-PA).

2.3. Síntesis de nanopartículas poliméricas unimoleculares, NPUs:

2.3.1. Utilizando diazidobutano como entrecruzante:

En primer lugar se ha preparado una disolución de copolímero precursor (100 mg) en THF (95 ml) y se ha dejado agitando durante 24 h para obtener una completa solubilización. Una vez transcurrido el tiempo, se ha purgado con argón durante 10 minutos y se han añadido por goteo con jeringa dos disoluciones anteriormente preparadas y purgadas (durante 10 minutos con flujo de argón) de CuBr/PMDETA en THF y 1,4-diazidobutano (DAB) en THF. La cantidad de THF se ha ajustado con el objetivo de obtener una concentración final de 1 mg/ml de polímero en THF. La cantidad de DAB añadida corresponde a 1 mol de DAB por cada 2 moles de PA presentes en el polímero precursor. Asimismo, la cantidad de CuBr se ha variado entre 0,1 y 1 mol de Cu por cada mol de PA presente en el polímero precursor. La relación molar CuBr/PMDETA ha sido en todos los casos 1/1. Tras la completa adición de todos los compuestos la reacción se ha dejado agitando durante 20-23 h a 25 °C.

Transcurrido el tiempo de reacción la disolución se ha pasado por alúmina con el objetivo de quitar el complejo Cu/PMDETA del medio. Se ha evaporado la mayoría del disolvente mediante el uso del rotavapor y finalmente se han recuperado las NPUs mediante precipitación en hexano y secado a vacío durante 24 horas.

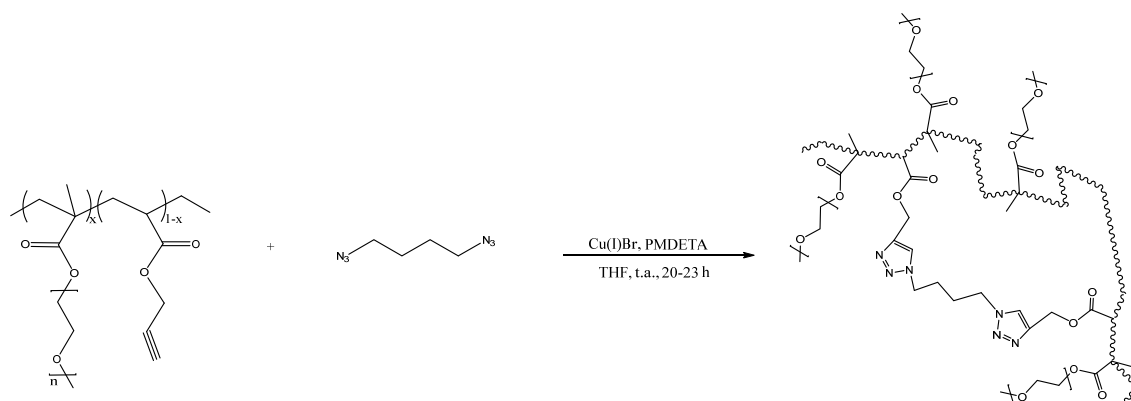


Ilustración 8. Reacción click utilizando diazidobutano como entrecruzante.

2.3.2. Utilizando silol-N₃ como entrecruzante.

En este caso se ha ejecutado la síntesis de las NPUs usando silol-N₃ como entrecruzante en vez de diazidobutano y manteniendo la estequiometría y condiciones explicadas en el apartado

2.3.1. pero sin filtrar al final. Para el cambio de disolvente, se han añadido 5 ml de agua al producto y después se ha dejado evaporar el THF mediante agitación bajo flujo de argón.

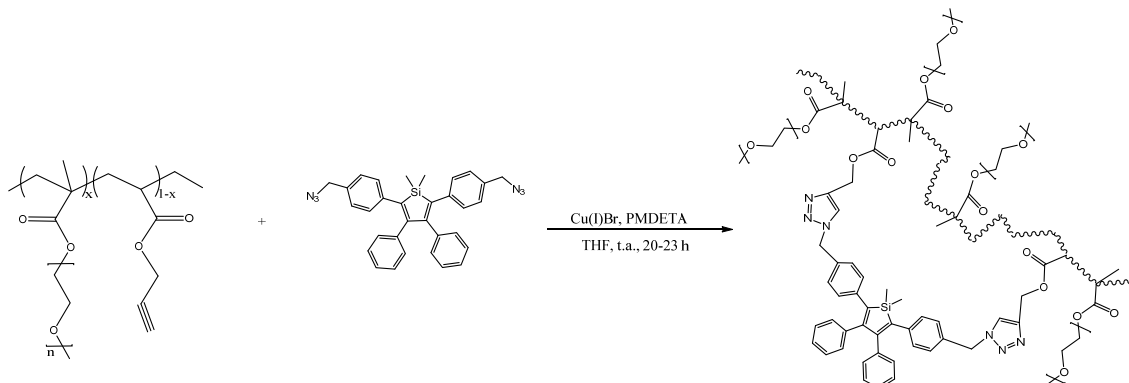


Ilustración 9. Reacción click utilizando silol-N₃ como entrecruzante.

2.4. Técnicas de caracterización

2.4.1. Cromatografía por permeación de gel (GPC)

También llamada cromatografía por exclusión de tamaño (SEC), es una técnica de separación controlada en la que las moléculas son separadas en función de su volumen hidrodinámico¹¹, que a su vez puede relacionarse con su masa molecular. Para ello se precisa de una fase móvil (disolvente en el que la muestra se encuentra disuelta), y una fase estacionaria, empaquetada en una columna a través de la cual se hace pasar la fase móvil. El interior de la columna está lleno de poros, que permiten o evitan ser atravesadas por las moléculas de la muestra, siendo las moléculas más grandes las primeras en ser eluidas, seguidas por las de menor tamaño¹². De este modo, puede establecerse una correlación entre tiempo de elución y masa molecular del polímero. Ésta última puede ser determinada a partir de la calibración de la columna, o gracias a detectores sensibles a la masa molecular del polímero, como los detectores de dispersión de luz (*Multi-Angle Light Scattering*, MALLS).

En un experimento con detector MALLS, es posible obtener tanto la masa molecular promedio en masa (M_w), como el radio de giro promedio (R_g) de un polímero en solución diluida gracias a la dependencia angular del exceso en la intensidad de dispersión de luz, conocida como índice de Rayleigh, $R(\theta)$, determinado por la ecuación 4.

$$\frac{KC}{R(\theta)} \cong \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{1}{3} R_g^2 q^2\right)$$

Ecuación 4

Donde K es una constante óptica y $q = (4\pi n/\lambda_0) \sin(\theta/2)$, n es el índice de refracción del disolvente, λ_0 es la longitud de onda de la radiación incidente en el vacío y θ es el ángulo de dispersión¹³.

Mediante esta técnica se ha procedido a analizar los precursores y las nanopartículas. Para preparar las muestras, se disuelven aproximadamente 4 mg en 1 ml de THF (+0,2 % de tolueno) y se inyecta en el cromatógrafo. La función del tolueno es obtener la señal de referencia en el cromatograma. La información principal que proporciona este método es la diferencia de tiempos de retención entre el precursor y la nanopartícula, ya que ésta última al compactarse ha reducido su volumen y radio hidrodinámico (Rh), y por tanto, se retiene en más orificios del relleno de la columna, eluyendo más tarde. Por otra parte, también nos da información de ciertos parámetros útiles para la caracterización de los productos, como: Mn (promedio de masa molecular en número), Đ (índice de polidispersidad) y Rh.

Para este trabajo el equipo utilizado ha sido un cromatógrafo Agilent serie 1200 con inyector manual, equipado con una precolumna PLgel MIXED LS 10 μ m y columna PLgel 10 μ m MIXED-B LS y triple detección: MALLS (MiniDawn Treos, Wyatt), viscosímetro (ViscoStar-II, Wyatt) e índice de refracción (Optilab Rex, Wyatt). El eluyente utilizado ha sido THF (grado GPC) en un flujo constante de 1 ml/min y 30 °C. El análisis de datos ha sido realizado con el software Astra, proporcionado por Wyatt.



Ilustración 10. Cromatógrafo Agilent 1200 y detectores Wyatt utilizados en este trabajo.

2.4.2. Resonancia magnética nuclear (RMN)

La resonancia magnética nuclear es una técnica espectroscópica no destructiva que estudia la interacción de la materia en un campo magnético con la radiación electromagnética, normalmente en el rango de la radiofrecuencia.

La técnica solamente es aplicable para el estudio de núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones (o de ambos), como es el caso de los átomos ^1H , ^{13}C , ^{19}F y ^{31}P . Este tipo de núcleos son magnéticamente activos, poseen un *spin* que se orienta cuando se somete a un campo magnético. Los núcleos con *spin* positivo se orientan en un estado de mínima energía denominado estado de *spin* α , mientras que los que tienen *spin* negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía denominado β .

Cuando una muestra que contiene un compuesto orgánico es irradiada brevemente por un pulso intenso de radiación, los núcleos en estado α son promovidos al estado β . Cuando vuelven a su estado inicial emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía (ΔE) entre los dos estados. El espectrómetro detecta estas señales y las registra como una gráfica de frecuencias frente a intensidad.

Mediante esta técnica se ha determinado la estructura química de los precursores y las nanopartículas, y una vez más se ha verificado que realmente se ha conseguido el producto. Para preparar las muestras, se disuelven entre 7 y 10 mg en 0,7 ml de CDCl_3 . Se ha calculado la proporción de monómeros en los precursores por medio de la integración de las señales de los protones.

En este trabajo, las medidas de ^1H RMN han sido llevadas a cabo a temperatura ambiente en un equipo BRUKER 400 MHz.

2.4.3. Temperatura inferior crítica de disolución (LCST)

La LCST (*Lowest Critical Solution Temperature*) o temperatura inferior crítica de disolución, es la temperatura a partir de la cual la muestra se vuelve insoluble y precipita. Por debajo de ella, el sistema es completamente miscible en todas proporciones^{14,15}.

En el caso de los polímeros, algunos de los factores determinantes son el grado de polimerización, la polidispersidad y la ramificación¹⁶, así como la composición y la estructura¹⁷. También pueden influir la proporción de monómeros en copolímeros y la naturaleza hidrofílica o hidrofóbica de los mismos.

Lo que diferencia la LCST de otros comportamientos de mezcla es que se da con una entropía de mezcla desfavorable¹⁸. Dado que la mezcla de las dos fases es espontánea por debajo de la LCST y no por encima, el incremento de energía libre de Gibbs (ΔG) para la mezcla es negativa por debajo de la LCST y positiva por encima, y el incremento de entropía $\Delta S = - (d\Delta G/dT)$ es negativa para el proceso de mezcla. Esto ocurre al contrario que los casos más comunes, en los que la entropía va a favor de la mezcla debido al aumentado volumen accesible a cada componente.

Hay dos razones principales para explicar este fenómeno. La primera son las fuertes interacciones polares o enlaces de hidrógeno que impiden la mezcla aleatoria. La segunda es el efecto de compresibilidad, es decir, que la mezcla requiere la contracción del disolvente para ser compatible con el polímero, lo que implica pérdida de entropía¹.

En este trabajo, la LCST ha sido medida por dos métodos diferentes: la espectroscopía ultravioleta/visible y la dispersión de luz dinámica. En ambos casos se ha ido incrementando la temperatura, pero en cada una se ha ido viendo la respuesta de diferentes parámetros: en el caso de la espectroscopía UV/vis, la transmitancia de la muestra y en el caso de la DLS, el diámetro de partícula. A simple vista también se puede ver cómo la muestra precipita por encima de la LCST al observar el paso de una disolución transparente a una disolución de aspecto blanquecino.

2.4.3.1. Espectroscopía Ultravioleta/visible (UV/visible)

La espectroscopía ultravioleta-visible (UV/Vis) es una espectroscopía de emisión de fotones y una espectrofotometría. Utiliza radiación electromagnética (luz) de las regiones visible, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana (NIR) del espectro electromagnético, es decir, una longitud de onda entre 380nm y 780nm. La radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas.

Cuando un haz de radiación UV-Vis atraviesa una disolución conteniendo un analito absorbente, la intensidad incidente del haz (I_0) es atenuada hasta I . Esta fracción de radiación que ha logrado traspasar la muestra es denominada transmitancia (T) ($T = I/I_0$).

Se ha utilizado un espectrómetro UV/vis para medir la absorbancia de un modo orientativo, es decir, se ha relacionado la disminución de la transmitancia con la precipitación de las nanopartículas a ciertas temperaturas.

Dicho de otro modo, la disminución de la transmitancia (o el aumento de absorbancia) se debe a la turbidez de la muestra, ya que a partir de cierta temperatura la nanopartícula precipita. Se ha tomado la transmitancia al 50 % de la inicial como punto de LCST.

Las medidas de espectroscopía UV/vis se ha llevado a cabo en un equipo Agilent 8453A con celda termostatzada controlada por un Peltier T-controler 89090A, como muestra la ilustración 11.



Ilustración 11. Equipo UV/vis Agilent 8453A con celda termostatzada controlada por Peltier T-controler 89090A utilizado en este trabajo.

2.4.3.2. Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

La dispersión de luz dinámica (DLS, Dynamic Light Scattering) es una técnica utilizada para la medida de partículas de tamaño inferior a la micra.

El equipo de DLS mide el movimiento browniano y lo relaciona al tamaño de las partículas. El movimiento browniano es el movimiento aleatorio de las partículas debido al bombardeo de las moléculas del disolvente que las rodea.

A mayor tamaño de partícula, más lento será el movimiento browniano, ya que las partículas pequeñas son más fácilmente desplazadas por las moléculas del disolvente. Este movimiento puede verse afectado por parámetros como la temperatura y la viscosidad.

La velocidad del movimiento browniano se define por una propiedad conocida como coeficiente de difusión translacional (D). El tamaño de partícula es calculado a partir de este coeficiente mediante la ecuación Stokes-Einstein (ecuación 5);

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

Ecuación 5

Donde $d(H)$ es el diámetro hidrodinámico, D es el coeficiente de difusión translacional, k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta y η es la viscosidad.

El diámetro que se observa en DLS se refiere a la difusión de una partícula en un fluido, así que se le llama diámetro hidrodinámico. El diámetro hidrodinámico es el diámetro que tendría una esfera con el mismo coeficiente de difusión translacional que la partícula.

La velocidad de difusión se obtiene midiendo el ratio al cual la intensidad de la luz dispersada fluctúa cuando es detectada.

El tamaño se obtiene de la función de correlación a través de varios algoritmos. La distribución de tamaño obtenido es el reflejo de la intensidad relativa de la luz dispersada por partículas de distintos tipos de tamaño y por tanto, es conocida como distribución de tamaño por intensidad.

El equipo de DLS está formado por seis componentes principales. Primeramente un láser (1), la fuente de luz irradiada a la muestra contenida en una celda o cubeta (2). Un detector (3) es usado para medir la luz dispersada, situada a 90° o 173° . Se usa un atenuador (4) para regular la intensidad de la fuente de luz. El correlador (5) compara la intensidad de la dispersión a sucesivos intervalos de tiempo para derivar el ratio al que varía la intensidad. La información del correlador es transferida a un ordenador (6) para analizarla y derivarla a información del tamaño.

Las muestras han sido preparadas en concentración de 1 mg/ml en agua, y de estas disoluciones se ha analizado 1 ml, previamente filtrado, en una cubeta desechable. Para temperaturas superiores a 60°C , se ha medido en cubeta de vidrio de apertura circular. El detector utilizado ha sido el situado a 173° .



Ilustración 12. Equipo DLS Zetasizer nano-zs utilizado en este trabajo.

2.4.4. Espectroscopía de Fluorescencia

El proceso de luminiscencia consiste en la absorción y posterior emisión de radiaciones electromagnéticas por parte de átomos o moléculas electrónicamente excitables.

La técnica se basa en la excitación de la muestra mediante una fuente de energía. El estado excitado es estable sólo durante un breve período de tiempo (10^{-10} – 10^{-9} segundos). Seguidamente, sus moléculas o átomos excitados vuelven al estado fundamental con la correspondiente emisión de fotones. La excitación puede producirse por luz UV o visible, rayos X, infrarrojos o catódicos, fricción, calor o presión, entre otros.

Cuando un átomo o molécula absorbe un fotón con una energía determinada, se excita un electrón desde el nivel vibracional menor del estado fundamental a un nivel vibracional del estado excitado. Si regresa al estado fundamental emitiendo energía en forma de fotones, la cesión de energía será de tipo fluorescente. Su intensidad es directamente proporcional a la concentración de sustancia, a una longitud de onda determinada.

Cuando se desconocen las propiedades fluorescentes de la muestra, se debe determinar la longitud de onda a la cual excitar la muestra (λ_{exc}) mediante la espectroscopía UV/vis, que debe coincidir con la banda de máxima absorción de la muestra.

En la caracterización experimental de las NPU's fluorescentes se ha utilizado un espectrofotómetro de luminiscencia Agilent Cary Eclipse (ilustración 13). Además, se cuenta

con una lámpara ultravioleta con irradiación a 365 nm de Spectroline, en la que se puede visualizar la fluorescencia de la muestra a simple vista (ilustración 23). Las muestras se encontraban en una disolución de 1 mg/ml en THF o agua.

El aparato tiene aperturas (o *slits*) para la entrada y salida de la radiación de luz. Para las muestras que presentan una fluorescencia baja se utilizan aperturas de 20-10 nm, mientras que para las que presentan una fluorescencia alta se utilizan aperturas de 5-2,5 nm.



Ilustración 13. Fluorímetro Cary Eclipse de Agilent utilizado en este trabajo.

3. Resultados y discusión

3.1. Caracterización de P(OEGMA-co-PA) como precursor de las NPUs

Por medio de la síntesis RAFT de los monómeros OEGMA y PA, se ha obtenido un copolímero al que hemos llamado JG3. Por otra parte, también se han analizado otros dos copolímeros P(OEGMA-co-PA) sintetizados anteriormente, con una proporción ligeramente diferente de PA/OEGMA llamados RU3 y RU6.

Composición:

Mediante ^1H NMR hemos procedido a calcular la proporción PA/OEGMA en cada precursor mediante el siguiente método: se ha seleccionado un pico característico de cada monómero, en este caso el del protón de propargilo de PA (**e**) y el de los protones del metilo terminal de OEGMA (**d**). A continuación se utiliza la ecuación 6:

$$\chi = \frac{\frac{A_e}{n_e}}{\frac{A_d}{n_d} + \frac{A_e}{n_e}}$$

Ecuación 6

Donde χ es la fracción molar, A_e y A_d son las áreas correspondientes a los picos **e** y **d**, y n_d y n_e es el número de protones que dan la señal.

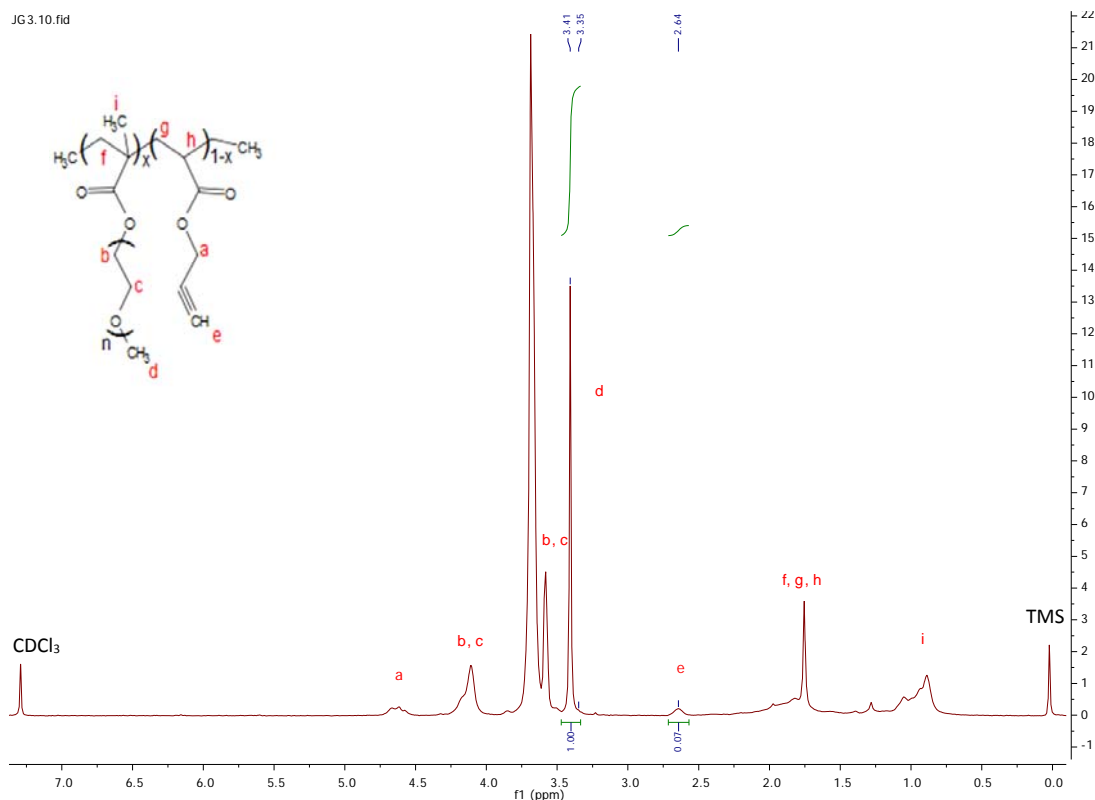


Ilustración 14. Espectro RMN del polímero precursor P(OEGMA-co-PA)

Tabla 1. Datos de los precursores obtenidos por RMN y GPC

Polímero precursor	PA (%)	Mn (kDa)	Mw (kDa)	\bar{D}	Rh (nm)
JG3	17 %	46,9 (\pm 3,7 %)	48,7 (\pm 3,1 %)	1,039 (\pm 0,020 %)	5,5 (\pm 0,3 %)
RU3	20 %	64,2 (\pm 1,9 %)	72,6 (\pm 1,9 %)	1,131 (\pm 2,648 %)	6,8 (\pm 0,3 %)
RU6	22 %	109,7 (\pm 1,5 %)	110,0 (\pm 1,6 %)	1,002 (\pm 2,185 %)	9,1 (\pm 0,3 %)

LCST:

Tabla 2. Datos de los precursores obtenidos por DLS y UV/vis

Polímero precursor	LCST			
	DLS		UV/vis	
	T(°C) ascendente	T(°C) descendente	T(°C) ascendente	T(°C) descendente
JG3	43-44	43-44	42,5	42,5
RU3	44-45	44-45	42,5	42,5
RU6	43-44	43-44	41,5	41

Comparando los diferentes precursores podemos ver que su temperatura crítica inferior de disolución es muy parecida, y como tal, se puede concluir que la masa molecular no es decisiva en cuanto a este parámetro, pues ya hemos visto en la tabla 1 lo diferentes que son sus masas moleculares.

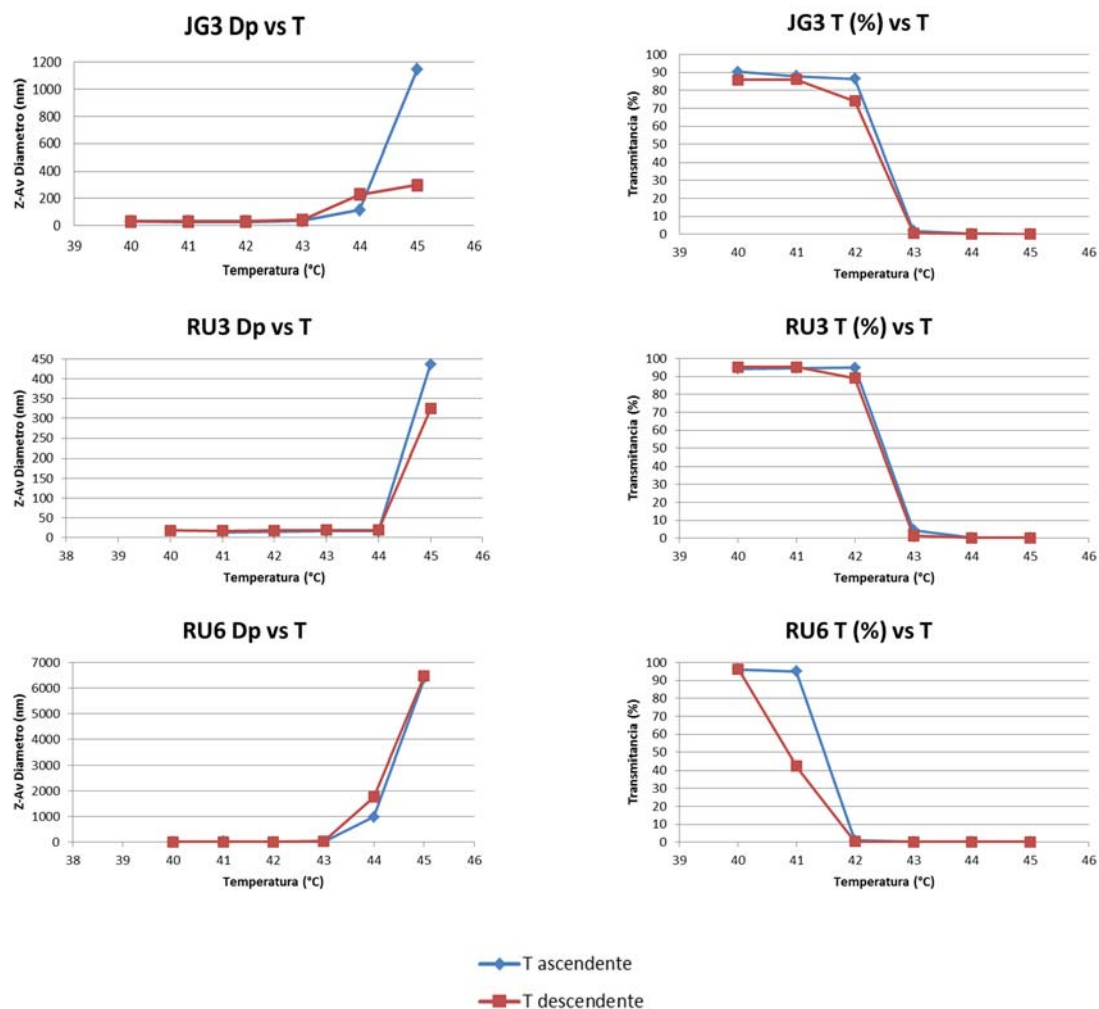


Ilustración 15. Gráficos de LCST de los precursores obtenidos por DLS (primera columna) y UV/vis (segunda columna), donde la línea azul corresponde a la temperatura medida de modo ascendente y la roja a la temperatura medida de modo descendente.

3.2. Caracterización de NPU con DAB como entrecruzante

Utilizando diacidobutano como entrecruzante, se han sintetizado nanopartículas a partir de los copolímeros anteriores. Así pues, del precursor JG3 se han obtenido dos nanopartículas: JG3NP, empleando la cantidad estequiométrica de cobre; y JG3NP_2, empleando una décima

parte de esta cantidad. Por su parte, del precursor RU3 se ha obtenido la nanopartícula RU3NP y de RU6 la nanopartícula RU6NP.

Cromatogramas de GPC:

En los cromatogramas (Ilustración 16, ilustración 17) se puede apreciar que la señal de la nanopartícula sale más desplazada a la derecha, debido a que al cerrar su estructura, su volumen disminuye y por tanto, se queda más tiempo retenido entre las cavidades de la columna y se eluye más tarde. Esto ha ocurrido con las dos nanopartículas sintetizadas mediante el entrecruzante diazidobutano, ya sea utilizando cantidad estequiométrica de cobre (el caso de la nanopartícula JG3NP), o una décima parte de esta cantidad (el caso de la nanopartícula JG3NP_2).

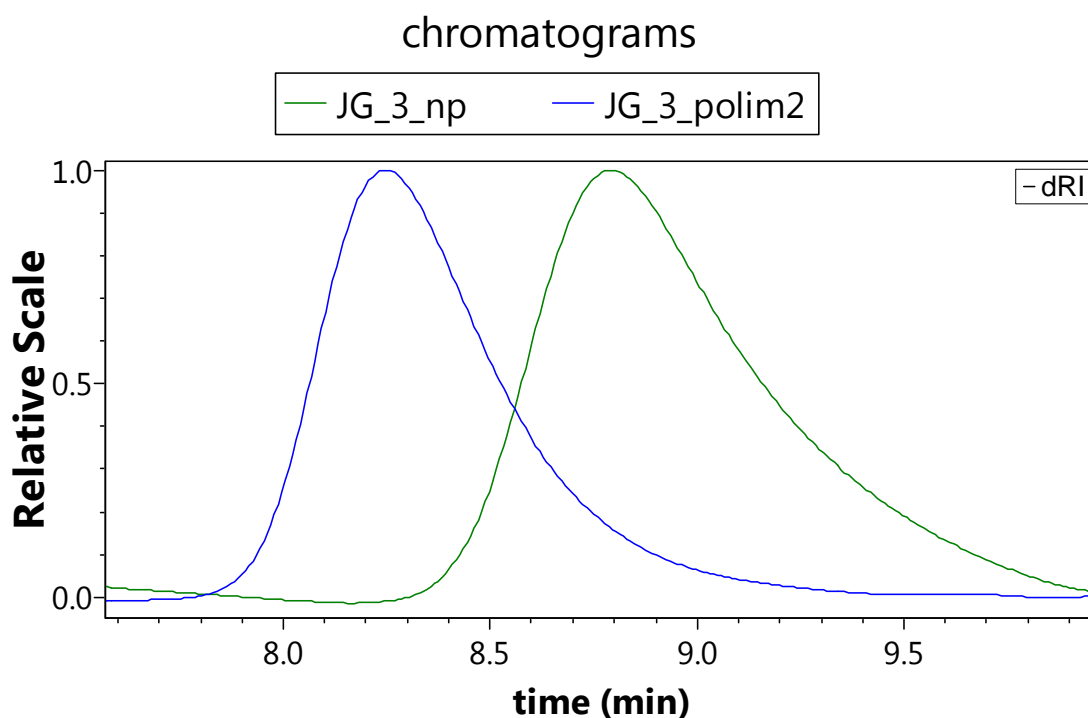


Ilustración 16. Cromatograma de comparación del precursor JG3 con la nanopartícula JG3NP.

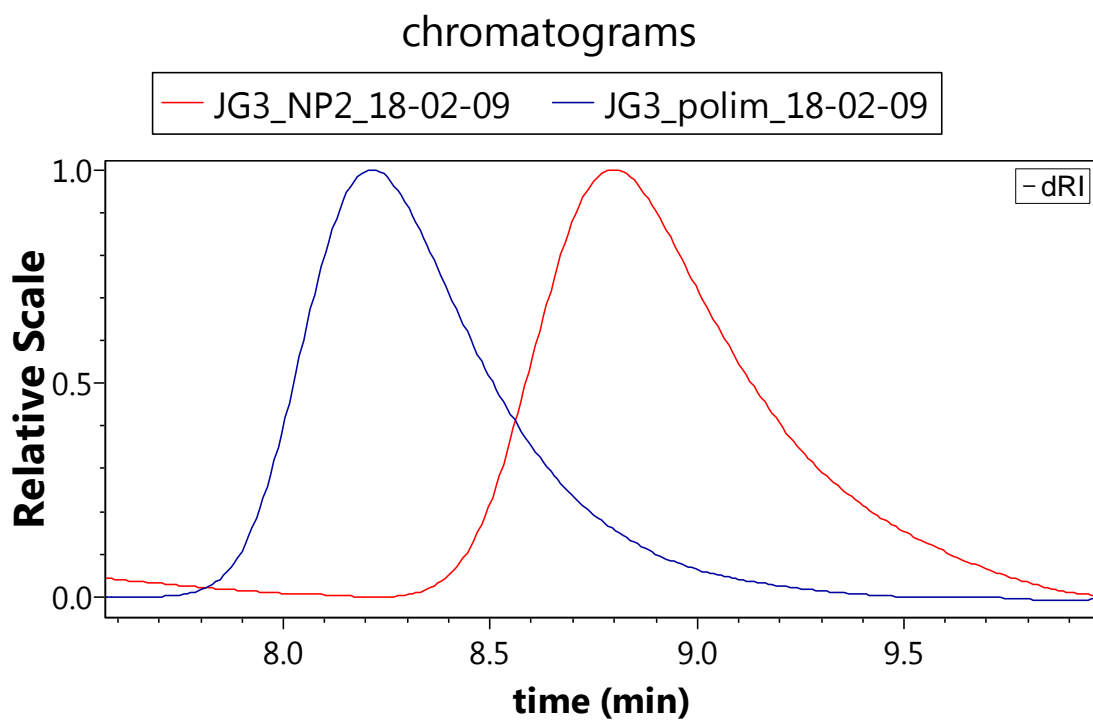


Ilustración 17. Cromatogramas de comparación del precursor JG3 con la nanopartícula JG3NP_2.

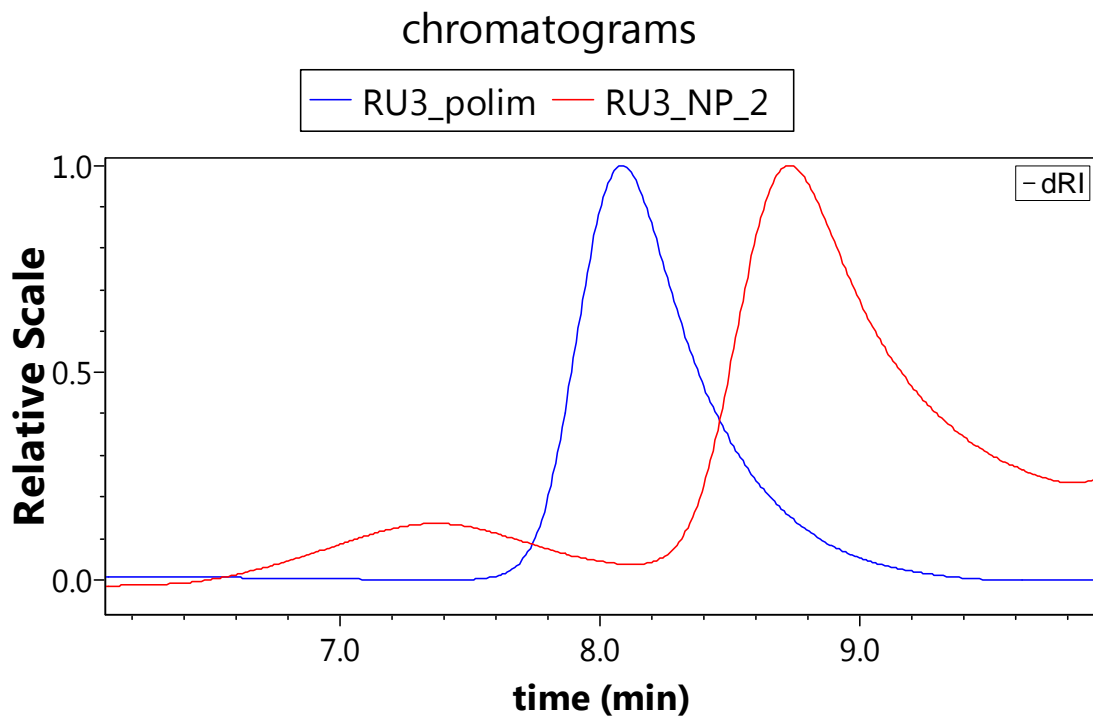


Ilustración 18. Cromatograma de comparación del precursor RU3 con su respectiva nanopartícula.

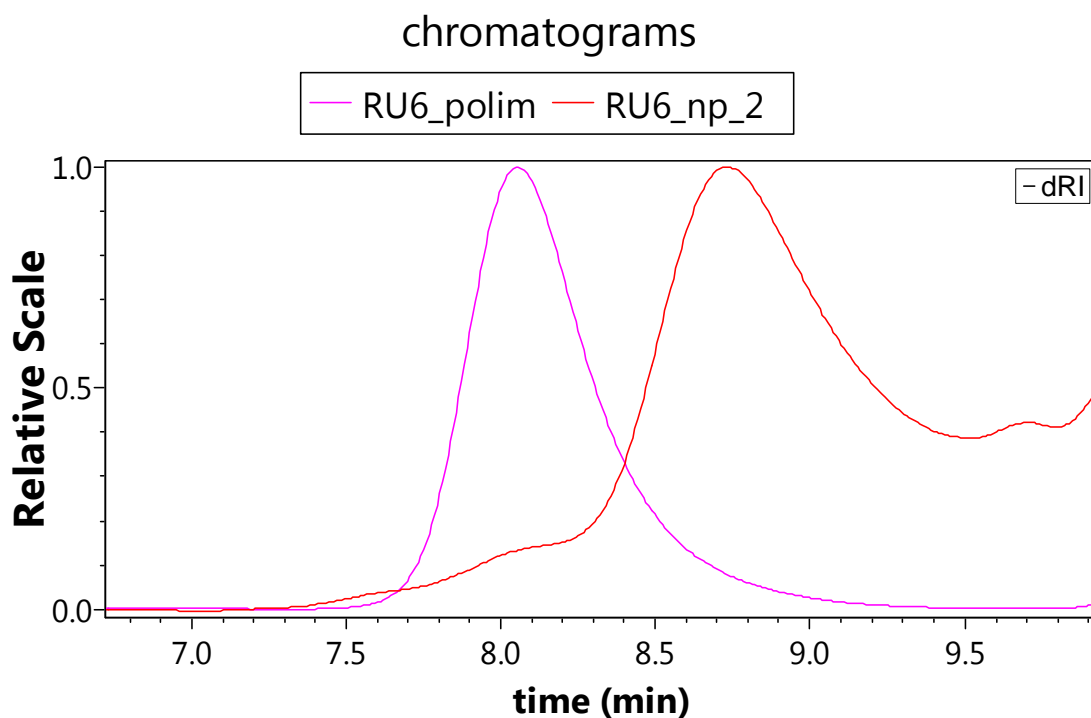


Ilustración 19. Cromatograma de comparación del precursor RU6 con su respectiva nanopartícula.

En las ilustraciones 18 y 19 se puede ver el desplazamiento en todas las comparaciones de los precursores (RU3 y RU6) con sus respectivas nanopartículas (RU3NP y RU6NP). Los cromatogramas de éstas últimas presentan una aparición de agregados antes del máximo de masa molecular.

Tabla 3. Radios hidrodinámicos de los precursores y sus nanopartículas obtenidos por GPC.

Polímero precursor	Rh (nm)	Nanopartícula	Rh (nm)
JG3	5,5 ($\pm 0,3$ %)	JG3NP	3,9 ($\pm 0,1$ %)
		JG3NP_2	3,9 ($\pm 0,3$ %)
RU3	6,8 ($\pm 0,3$ %)	RU3NP	-
RU6	9,1 ($\pm 0,3$ %)	RU6NP	-

Comparando las características del precursor JG3 con sus correspondientes nanopartículas NP (síntesis realizada con proporción CuBr/PA = 1) y NP_2 (síntesis realizada con proporción CuBr/PA = 0,1); podemos afirmar que hemos obtenido resultados aceptables, puesto que el radio hidrodinámico ha menguado como estaba previsto. Las nanopartículas también dan similares valores entre ellas, lo que se puede concluir que la cantidad de catalizador dentro de un cierto rango no afecta.

* Los errores en los resultados de las nanopartículas RU3NP y RU6NP son mayores del 5% y por tanto, han sido retiradas.

RMN:

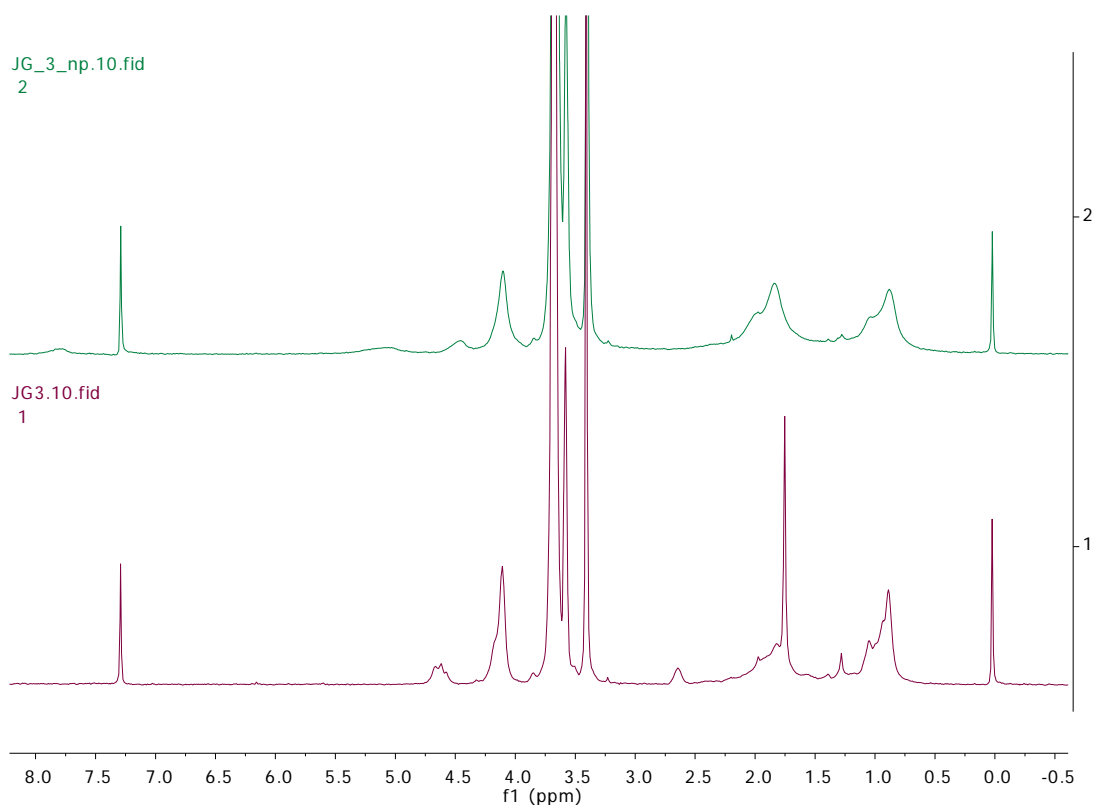


Ilustración 20. Espectro RMN de comparación del precursor JG3 (en rojo) y su nanopartícula (verde).

Comparando los espectros de los precursores con los de sus correspondientes nanopartículas, podemos observar que el cambio más notable es que en la nanopartícula desaparece la señal del protón propargílico alrededor de 2,5-2,75 ppm y las señales entre 4,5 y 4,75 ppm se desplazan hacia la derecha debido al nuevo medio. Entre 7,75 y 8 ppm aparece una nueva señal relacionada con el protón del anillo triazol que se forma al reaccionar el grupo azida con el grupo alquino a través de química “click”. Por otro lado, las señales en general se ensanchan debido a la aparición de nuevos enlaces covalentes que disminuyen la movilidad de los protones.

LCST:

Tabla 4. Comparación de LCST de JG3 y su nanopartícula.

		LCST			
		DLS		UV/vis	
		T(°C) ascendente	T(°C) descendente	T(°C) ascendente	T(°C) descendente
Polímero precursor	JG3	43-44	43-44	42,5	42,5
Nanopartícula	JG3NP	64-65	64-65	65,5	65

Mediante esta prueba hemos visto que a medida que aumenta la temperatura, la nanopartícula tarda más en precipitar, se mantiene disuelta a temperaturas mayores que su precursor.

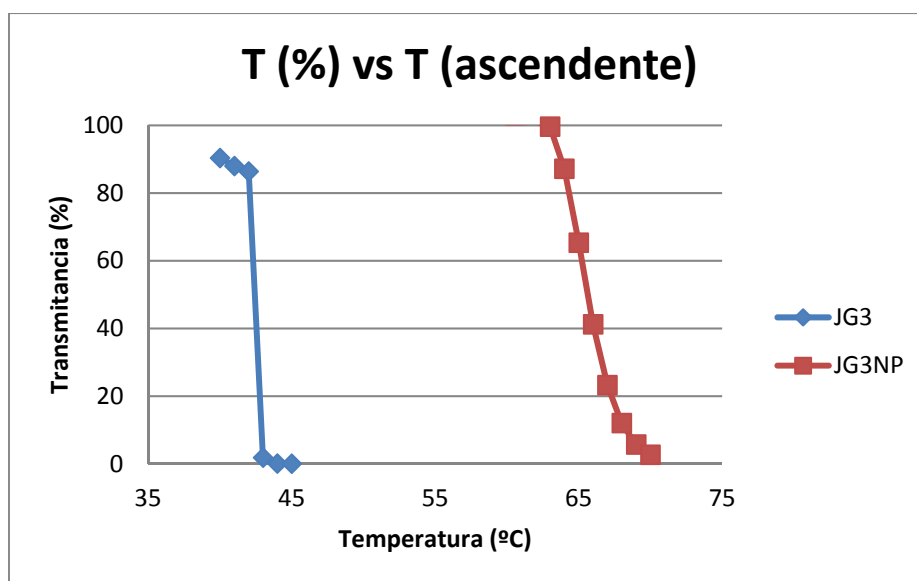


Ilustración 21. Comparación de LCST del precursor JG3 con su nanopartícula.

3.3. Caracterización de NPU con Silol-N₃ como entrecruzante

En este caso se han obtenido nanopartículas del mismo modo partiendo de JG3, salvo que en vez de usar diacidobutano como entrecruzante, se ha usado la sonda fluorescente Silol-N₃. Las nanopartículas conseguidas esta vez son dos: JG3NP3, utilizando una décima parte de la cantidad estequiométrica de cobre; y JG3NP5, utilizando la cantidad estequiométrica.

Cromatogramas de GPC:

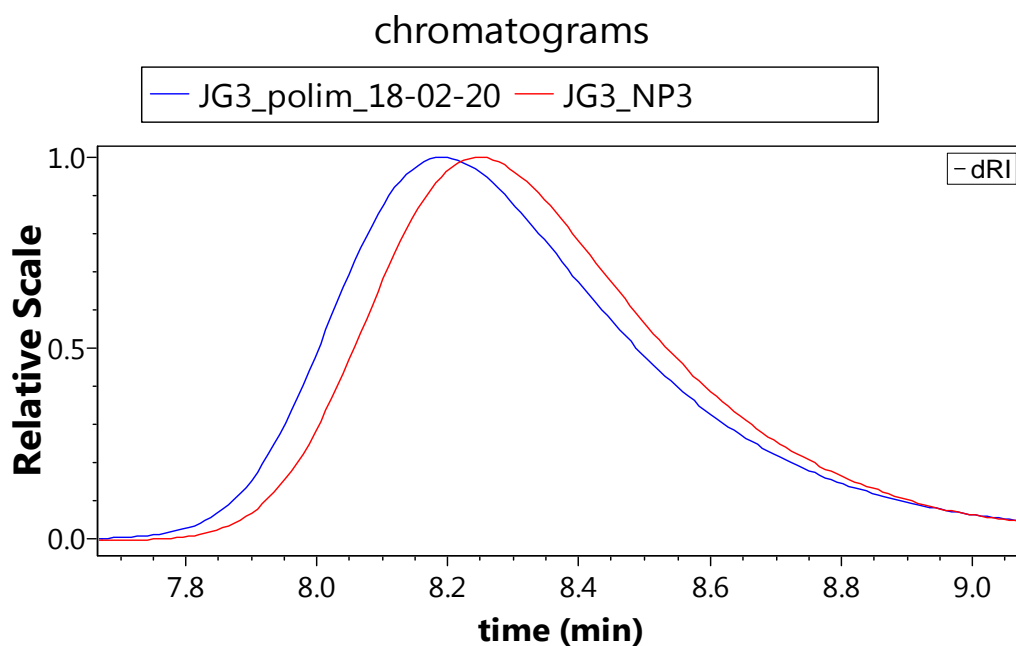


Ilustración 22. Cromatograma de comparación del precursor JG3 con la nanopartícula sintetizada con sonda fluorescente.

El producto no ha tenido un desplazamiento notable respecto a la señal inicial. JG3NP_3 ha sido sintetizada utilizando un décimo de la cantidad estequiométrica de cobre, tras comprobar que la cantidad de catalizador dentro de un rango no era tan determinante.

chromatograms

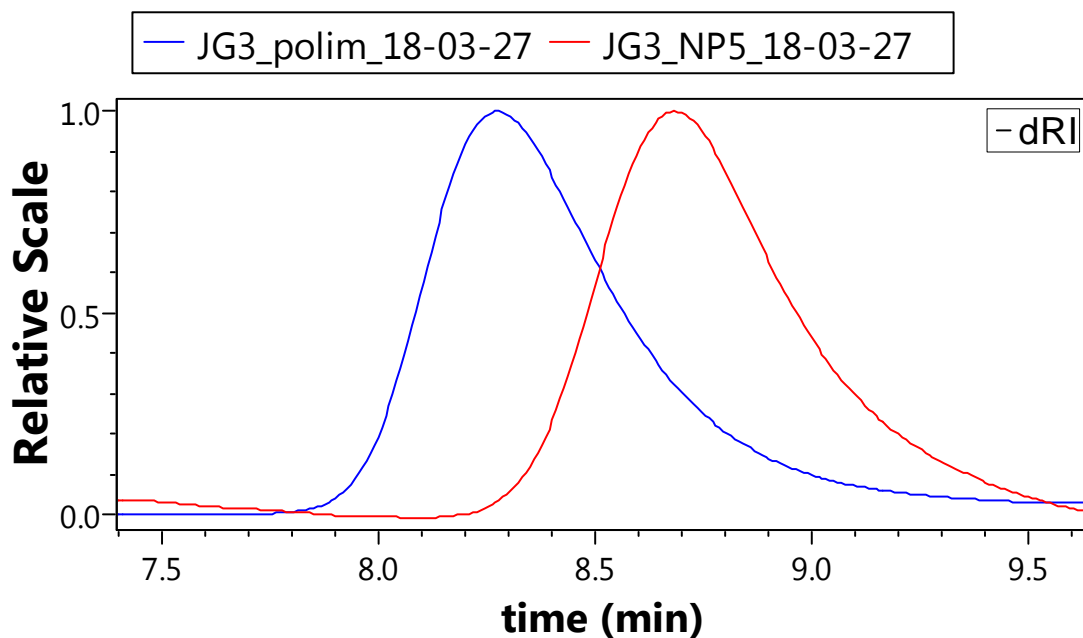


Ilustración 23. Cromatograma de comparación del precursor JG3 con la segunda nanopartícula sintetizada con sonda fluorescente.

En el caso de JG3NP_5 que fue sintetizada con la cantidad estequiométrica de cobre, se ha conseguido desplazamiento, lo que indica que esta vez parece que sí se ha podido conseguir el producto deseado.

Tabla 5. Comparación de radios hidrodinámicos del precursor JG3 con las dos nanopartículas sintetizadas con sonda fluorescente obtenidos por GPC.

		Rh (nm)
Polímero precursor	JG3	5,5 ($\pm 0,3$ %)
	JG3NP_3	5,7 ($\pm 0,2$ %)
Nanopartícula	JG3NP_5	3,6 ($\pm 1,4$ %)

Como revelan los datos de la tabla 5, en el caso de JG3NP_3 el radio hidrodinámico del precursor y el producto son parecidos, y por tanto no se ha obtenido el resultado deseado. JG3NP_5 por el contrario, sí muestra una reducción.

RMN:

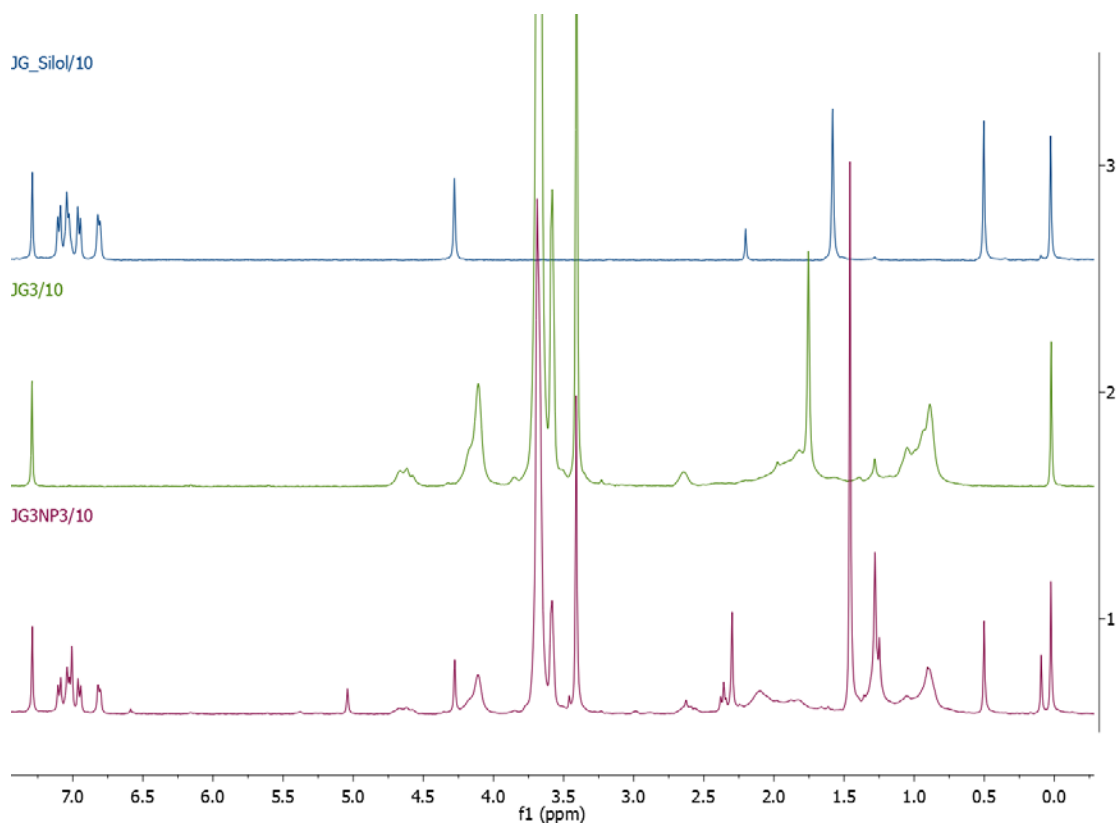


Ilustración 24. Comparación de espectros RMN del precursor JG3 (verde), la nanopartícula JG3NP3 (rojo) y la sonda fluorescente (azul).

En la ilustración 24 se muestra la comparación de los RMN de la nanopartícula JG3NP_3, del entrecruzante silol y el precursor JG3. Su función es la de comprobar si hemos conseguido el producto que queríamos. El resultado resulta ser negativo, puesto que se mantiene la señal del protón propargílico del precursor alrededor de 2,5-2,75 ppm y todas las señales del silol se mantienen casi intactas.

Fluorescencia:

Se ha realizado la prueba de fluorescencia en THF para afirmar si nuestro producto se ha formado y si ha asimilado el silol-N₃, pues de ser así, debería mostrar una fluorescencia mayor a la inicial.

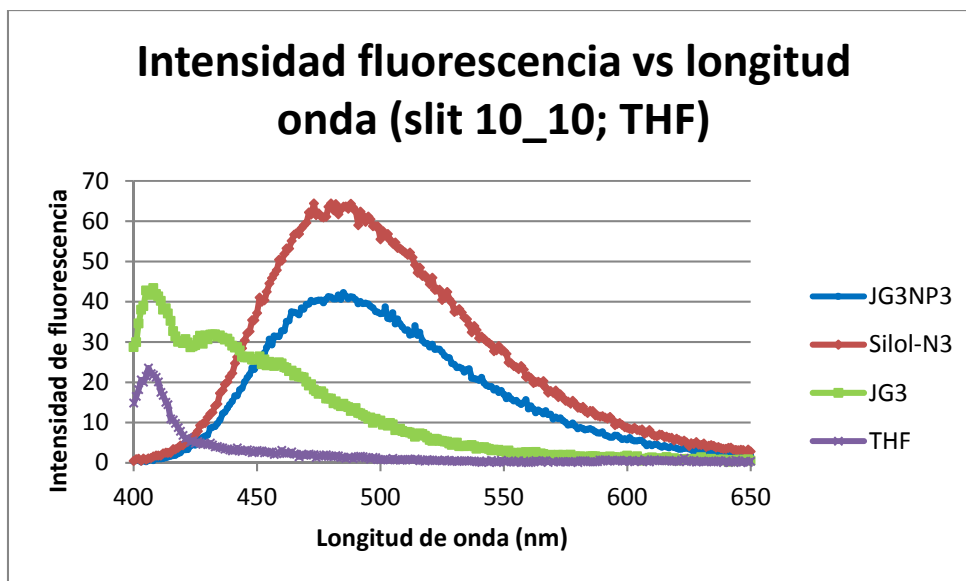


Ilustración 25. Comparación de espectro de fluorescencia de la nanopartícula JG3NP_3 y los reactivos con slits de entrada y salida 10 nm en THF.

Efectivamente, no se ha conseguido la nanopartícula en el caso de JG3NP_3, ya que no presenta una fluorescencia mayor a cualquiera de los otros compuestos.

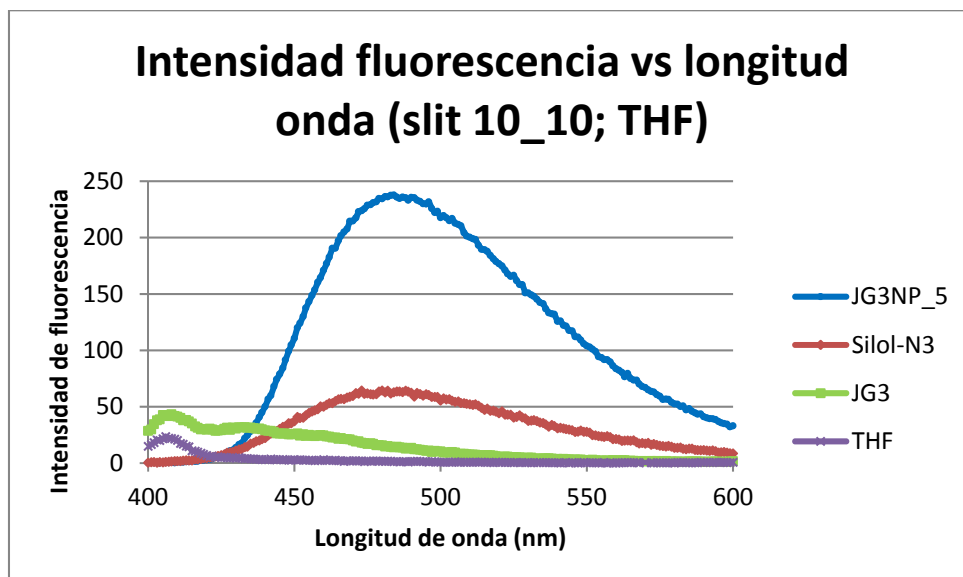


Ilustración 26. Comparación de espectro de fluorescencia de la nanopartícula JG3NP_5 y los reactivos con slits de entrada y salida 10 nm en THF.

En el caso de JG3NP_5, el producto emite una fluorescencia mucho mayor al resto, con 10 nm de *slits* se puede apreciar perfectamente, y así confirmar totalmente que el producto ha resultado exitoso. Se presenta una comparativa con la fluorescencia de cada reactivo medida de forma individual, en THF, a la misma concentración que durante el proceso de reacción. Puede comprobarse que estos compuestos tienen una intensidad de fluorescencia menor que cuando se forman las nanopartículas. La inmovilización de la sonda fluorescente con la formación de las nanopartículas genera mayor intensidad que la sonda por sí misma.

Finalmente, tras añadir agua y después de dejar evaporar el THF se ha medido la fluorescencia en disolvente acuoso en tres diferentes condiciones: a temperatura ambiente, alrededor de 90 °C (por encima del LCST) y después de dejar 2 min a que la celda se enfríe. Esta vez, en lugar de hacer con los slit de entrada y salida de 10 nm, puesto que la muestra satura, se ha medido en 5 y 2,5 nm.

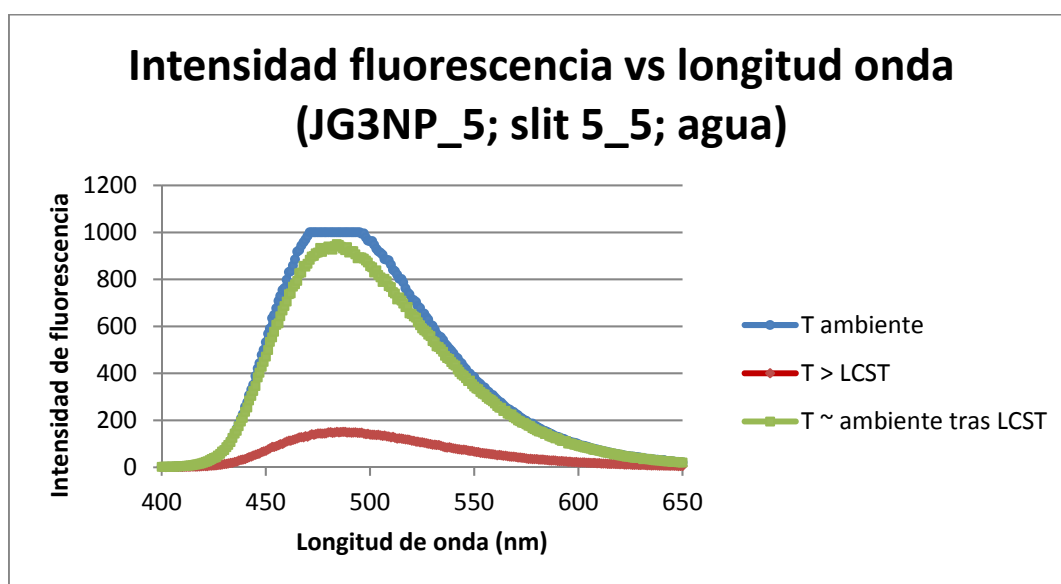


Ilustración 27. Comparación de espectro de fluorescencia de JG3NP_5 en agua a diferentes temperaturas con slits de entrada y salida de 5 nm.

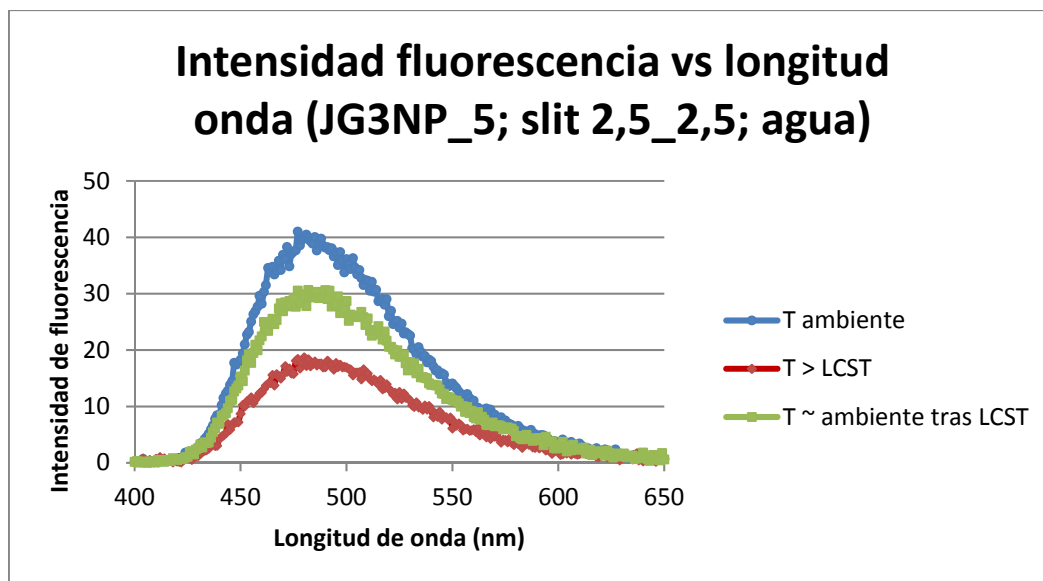


Ilustración 28. Comparación de espectro de fluorescencia de JG3NP_5 en agua a diferentes temperaturas con slits de entrada y salida de 2,5 nm.

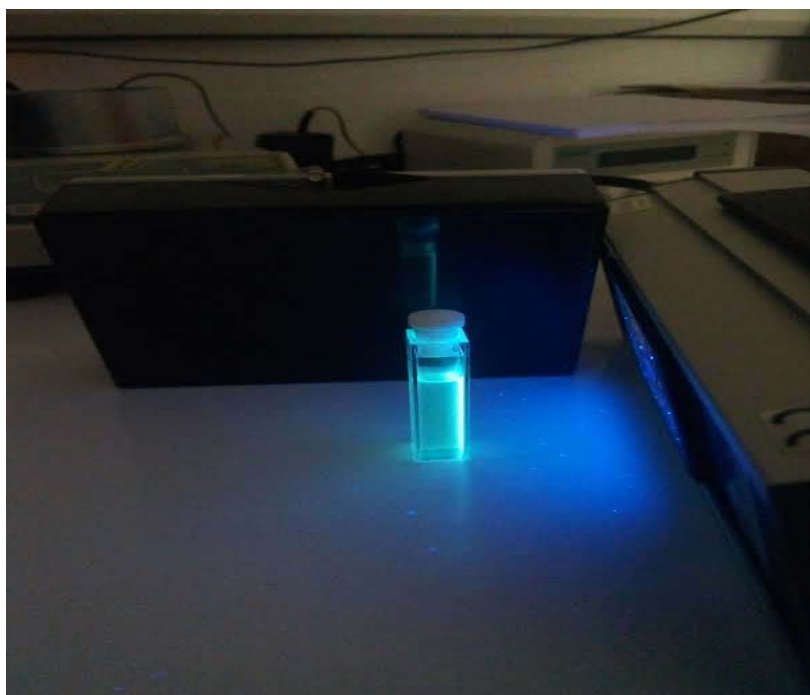


Ilustración 29. Nanopartícula JG3NP_5 en lámpara ultravioleta con irradiación a 365 nm de Spectroline.

Los resultados obtenidos indican que la fluorescencia disminuye cuando la muestra se calienta por encima de su LCST, y que poco a poco recupera la fluorescencia inicial cuando se va enfriando. Una posible explicación a este fenómeno podría ser que la temperatura puede

favorecer un cierto movimiento de los anillos aromáticos que posee la sonda, y por ello la intensidad de fluorescencia disminuye. Para terminar, también se puede concluir que la nanopartícula en agua emite mucha mayor fluorescencia que en THF, lo que es de interés para el empleo de las NPUs en aplicaciones biológicas.

4.1. Conclusions

Gathering the information and the results obtained in this project we can underline some points.

First of all, we have synthesized a random copolymer on the basis of two monomers (OEGMA and PA) with a monomer percentage of 17 % of PA, using RAFT polymerization.

We have synthesized some nanoparticles on the basis of this copolymer and two other copolymers of P(OEGMA-co-PA) containing different molecular mass (these two previously synthesized), by click chemistry. CuAAC type, more precisely. For this purpose, different crosslinkers have been used: on one hand, dyazide butane, and on the other hand, the probe of induced emission by aggregation silole-N₃.

Different characterization techniques have been used to verify that the copolymers and SCNPs (Single-Chain Nanoparticles) have been obtained. The information obtained is the following: molecular mass and Rh (by GPC), composition (NMR), LCST (UV/vis and DLS) and fluorescence (fluorimeter).

The fluorescent SCNPs show greater fluorescence in water than in THF and the intensity decreases at temperatures higher than LCST, thus being a subject of interest for possible future applications of these SCNPs in biological systems.

4.2. Conclusiones

Recopilando la información y resultados obtenidos en este trabajo se pueden subrayar varios puntos.

Para empezar, se ha sintetizado un copolímero aleatorio a partir de dos monómeros (OEGMA y PA) con proporción en monómeros de PA del 17 % mediante polimerización RAFT.

De éste y otros dos copolímeros precursores de P(OEGMA-co-PA) de masa molecular diferente ya preparados anteriormente, se han sintetizado varias nanopartículas mediante química click

de tipo CuAAC. Para ello, se han utilizado diferentes moléculas entrecruzantes: por una parte, la molécula diazidobutano, y por otra, la sonda de emisión inducida por agregación silol-N₃.

Se han utilizado diferentes técnicas de caracterización para verificar que se han obtenido los copolímeros y las NPU. La información obtenida es la siguiente: masa molecular y Rh (mediante GPC), composición (RMN), LCST (UV/vis y DLS) y fluorescencia (fluorímetro).

Las NPU fluorescentes presentan mayor fluorescencia en agua frente al THF y disminuye su intensidad a temperaturas superiores a la LCST, por lo que resulta de interés para las posibles futuras aplicaciones de estas NPs en sistemas biológicos.

5. Bibliografía

1. Cowie, J.M.G. "Polymers: Chemistry and Physics of Modern Materials" (2nd edn, Blackie **1991**) 174–177.
2. Moad, G.; Chiefari, J.; Mayadunne, R. T. A.; Moad, C. L.; Postma, A.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. **2002**, *Macromol. Symp.*, **182**, 65.
3. Moad, G.; Chiefari, J.; Chong, Y. K.; Krstina, J.; Mayadunne, R. T. A.; Postma, A.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. **2000**, *Polym., Intern.*, **49**, 993.
4. Pomposo, J. A.; Perez-Baena, I.; Lo Verso, F.; Moreno, A. J.; Arbe, A.; Colmenero, J., *ACS Macro Letters* **2014**, **3** (8), 767-772.
5. Moreno, A. J.; Lo Verso, F.; Arbe, A.; Pomposo, J. A.; Colmenero, J., *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2016**, **7** (5), 838-844.
6. Sanchez-Sanchez, A.; Arbe, A.; Kohlbrecher, J.; Colmenero, J.; Pomposo, J. A., *Macromolecular Rapid Communications* **2015**, **36** (17), 1592-1597.
7. Stockert, J. C.; Blázquez-Castro A.; **2017.**, "Chapter 3 Dyes and Fluorochromes". *Fluorescence Microscopy in Life Sciences*, Bentham Science Publishers, 61–95.
8. Zhang, X.; Wang, K.; Liu, M.; Tao, L.; Chen, Y.; Wei, Y., *Nanoscale* **2015**, **7** (27), 11486-11508.
9. Chen, X.; Wang, F.; Hyun, J. Y.; Wei, T.; Qiang, J.; Ren, X.; Shin, I.; Yoon, J., *Chemical Society Reviews* **2016**, **45** (10), 2976-3016.
10. Patton, G. C., *Development and Applications of Click Chemistry*, **2004**.
11. Barth, H. G.; Boyes, B. E.; Jackson, C., *Analytical Chemistry* **1998**, **70** (12), 251-278.
12. Trathnigg, B., Size-exclusion Chromatography of Polymers. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Meyers, R. A., Ed. John Wiley & Sons: **2000**.
13. Wang, X; Qiu, X; Wu, C., *Macromolecules* **1998**, **31** (9), 2972-2976.
14. Atkins P. W.; de Paula J., *Atkins' Physical Chemistry* (8th edn, W. H. Freeman **2006**) 186-7.
15. White M. A., *Properties of Materials* (Oxford University Press **1999**) 175.
16. Carter S.; Hunt B.; Rimmer S., *Macromolecules* **38** 4595 (**2005**), Rimmer S.; Carter S.; Rutkaite R.; Haycock J. W.; Swanson L., *Soft Matter*, **3** 971 (**2007**).

17. Ward M. A.; Georgiou T. K., *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 48 775 (2010).
18. Sanchez I. C.; Stone, M. T., "Statistical Thermodynamics of Polymer Solutions and Blends" in *Polymer Blends Volume 1: Formulation*. Edited by Paul D. R. and Bucknall C. B., 2000 John Wiley & Sons, Inc.

6. Anexos

Otros RMN:

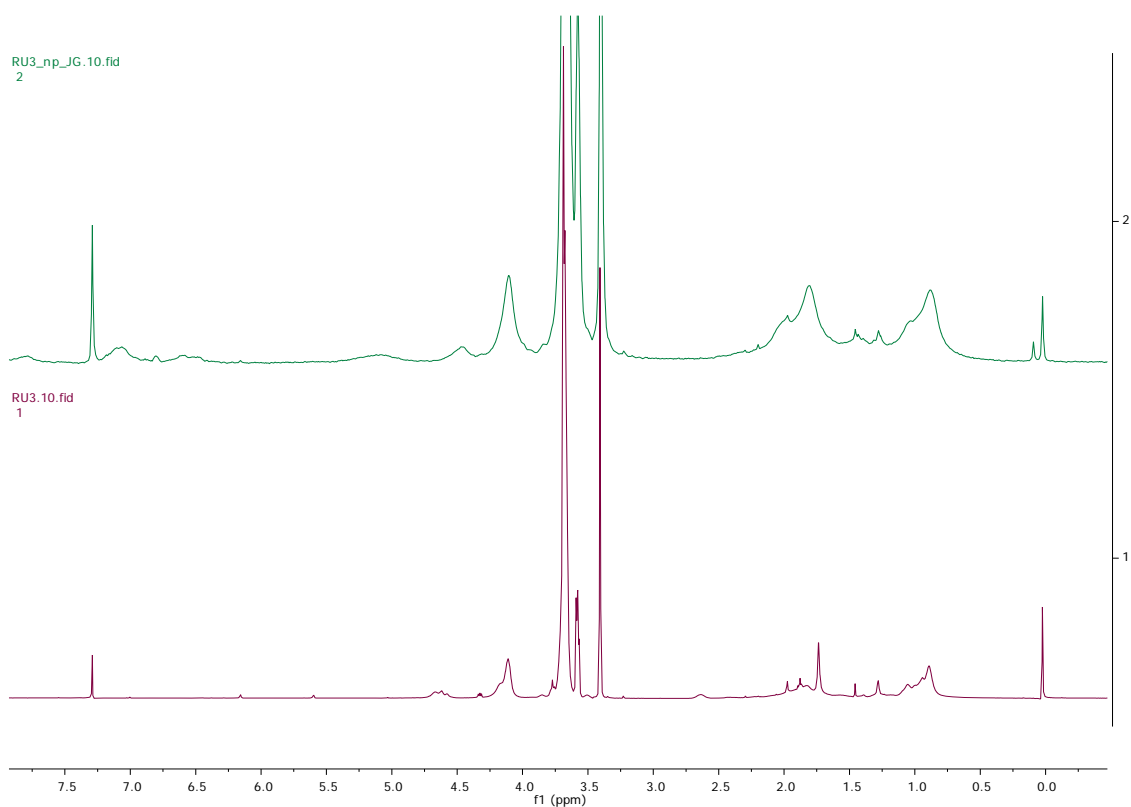


Ilustración 30. Comparación de espectros del precursor RU3 y su nanopartícula.

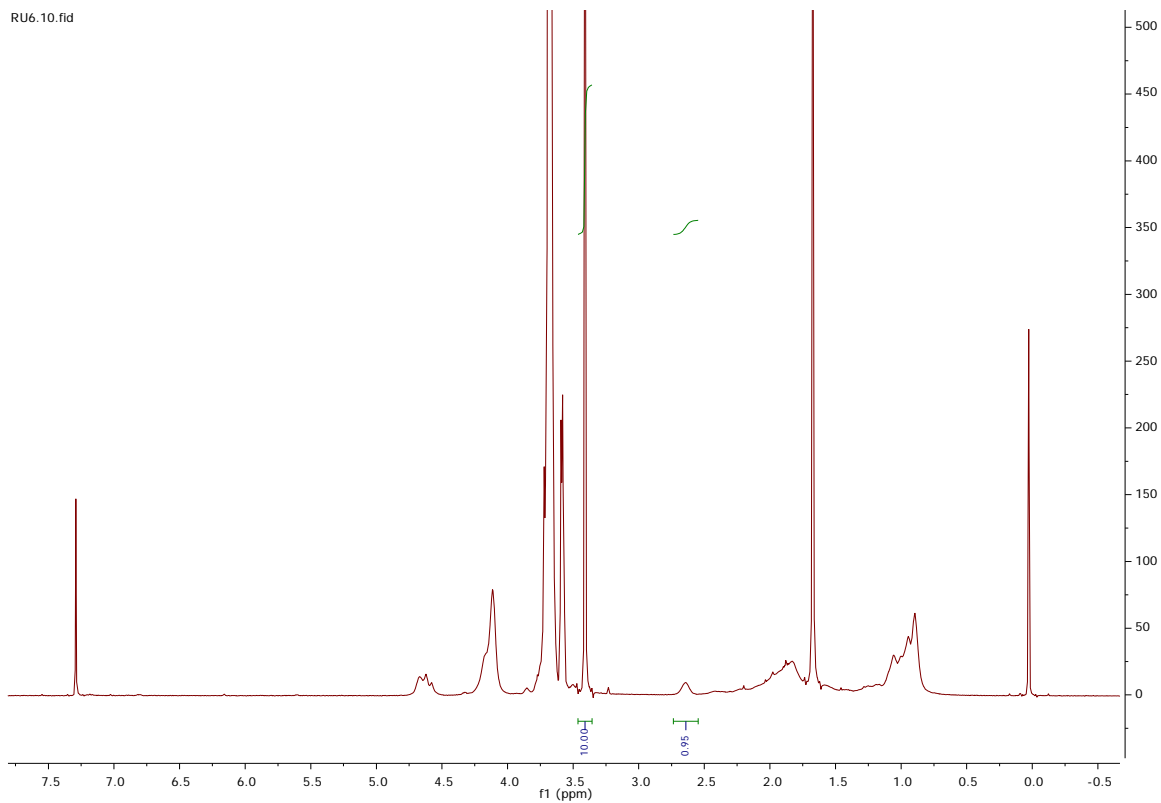


Ilustración 31. Espectro del polímero RU6.

***El espectro de la nanopartícula RU6NP no ha salido con muy buena resolución.**