

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

Grado en Química

**SÍNTESIS DE
NANOPARTICULAS
POLIMERICAS
UNIMOLECULARES A
PARTIR DE PRECURSORES
ANFIFILICOS DE
POLI(OEGMA-CO-AEMA)**

**Autora: Senda Basasoro
Dirigido por: Josetxo Pomposo**

San Sebastián, Febrero de 2016

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero darle las gracias a mi director del proyecto Josexo Pomposo, por haberme aceptado y dejar que tome parte en este proyecto, por la orientación, el seguimiento y la supervisión del mismo.

Gracias también a Isabel Asenjo y Marina González por enseñarme las técnicas necesarias para manejar en el Laboratorio, por tener tanta paciencia y ayudarme en todo lo que he necesitado.

También me gustaría agradecer toda la ayuda que me han prestado los profesores, doctores/as, técnicos e investigadores del centro de física y materiales: Arantxa Arbe, Amaia Iturrospe, Ángel Moreno, Federica Lo Verso, Alex Latorre, etc.

A todos ellos, muchas gracias.

ÍNDICE:

AGRADECIMIENTOS.....	3
RESUMEN	6
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
GENERALIDADES DE LOS POLÍMEROS:.....	7
REACCIONES DE POLIMERIZACIÓN:	9
Polimerización por etapas.....	9
Polimerización por crecimiento de cadena.....	9
POLIMERIZACIÓN RADICALARIA:.....	10
El efecto gel	11
Ventajas y desventajas de la polimerización radicalaria.....	11
POLIMERIZACIÓN RADICALARIA CONTROLADA (CRP):	12
Polimerización radicalaria por transferencia de átomo (ATRP).....	12
Polimerización radicalaria por adición, fragmentación y transferencia reversible (RAFT) .	13
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS UNIMOLECULARES (SCNPs):.....	14
Nanopartículas poliméricas unimoleculares con enlaces covalentes	15
Nanopartículas poliméricas unimoleculares con enlaces no covalentes.....	15
RUTAS PARA OBTENER SCNPs GLOBULARES:	16
OBJETIVOS DEL TRABAJO	19
PARTE EXPERIMENTAL	20
MATERIALES:	20
MÉTODOS:.....	20
Síntesis de copolímeros Poli(OEGMA-co-AEMA)	20
Síntesis de nanopartículas poliméricas unimoleculares metalo-plegadas a partir de copolímeros Poli(OEGMA-co-AEMA)	20
Protocolo 1: Síntesis en agua	21
Protocolo 2: Síntesis en tetrahidrofurano (THF)	21
TÉCNICAS EXPERIMENTALES:	21
Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).....	21
Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)	23
Termogravimetría (TGA)	24
Análisis elemental (AE).....	25

Dispersión de rayos-X a bajo ángulo (SAXS).....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
Síntesis de copolímeros Poli(OEGMA-co-AEMA)	28
Protocolo 1: Síntesis en agua de nanopartículas poliméricas unimoleculares metalo-plegadas basadas en copolímeros Poli(OEGMA-co-AEMA)	31
Efecto del contenido en AEMA	33
Efecto del peso molecular.....	34
Efecto de la concentración de precursor	35
Protocolo 2: Síntesis en THF de nanopartículas poliméricas unimoleculares metalo-plegadas basadas en copolímeros Poli(OEGMA-co-AEMA)	36
Comparación de resultados y medidas adicionales	37
Resultados de RMN	37
Resultados de SEC	38
.....	39
.....	39
Resultados de TGA	40
Resultados de AE.....	41
Resultados de SAXS	42
Simulaciones por ordenador	43
CONCLUSIONES	46
CONCLUSIONS	47
BIBLIOGRAFÍA.....	48
FIGURAS:	50
ANEXOS:	51

RESUMEN

Las nanopartículas poliméricas unimoleculares (SCNPs, del inglés "single-chain nanoparticles"), son nano-objetos blandos que consisten en cadenas poliméricas colapsadas/plegadas mediante uniones intramoleculares. En los últimos años se han descrito una gran variedad de procesos de síntesis de estos nano-objetos, ya que son muy interesantes para aplicaciones potenciales en biomedicina, catálisis, etc. La mayoría de los métodos de síntesis dan lugar a nanopartículas poliméricas unimoleculares poco compactas ("sparse SCNPs"), siendo muy escasos los métodos que dan lugar a nanopartículas poliméricas unimoleculares globulares ("globular SCNPs"). En este trabajo, se han preparado SCNPs a partir de copolímeros al azar anfifílicos compuestos por dos monómeros: oligoetilenglicol metil éter metacrilato (OEGMA), monómero hidrofílico, y 2-acetoacetoxi etil metacrilato (AEMA), monómero hidrofóbico. Las SCNPs se han preparado por complejación intramolecular de las unidades AEMA de los copolímeros Poli(OEGMA-co-AEMA) con iones Cu(II), dando lugar a SCNPs metalo-plegadas. Además del efecto del contenido en AEMA, el peso molecular y la concentración de precursor durante la síntesis de las SCNPs, se han investigado dos protocolos de síntesis y cómo afectan éstos a la estructura de las nanopartículas: 1) síntesis de las SCNPs en un disolvente selectivo (agua) seguido por transferencia a un buen disolvente de ambos monómeros (tetrahidrofurano-THF) y 2) síntesis de las SCNPs en un buen disolvente de ambos monómeros (THF). Para ello se ha utilizado una combinación de técnicas experimentales que incluyen: resonancia magnética nuclear de protón (^1H RMN), cromatografía por exclusión de tamaño (SEC), análisis termogravimétrico (TGA), análisis elemental (EA) y dispersión de rayos-X a bajos ángulos (SAXS). Los resultados obtenidos se han analizado a la luz de recientes simulaciones por ordenador.

ABSTRACT

Single-chain nanoparticles (SCNPs) are soft nano-objects consisting in folded/collapsed polymer chains *via* intramolecular bonds. In recent years, a variety of synthesis processes of these nano-objects have been described, due to their potential uses in biomedicine, catalysis, and so on. Most synthesis routes result in SCNPs with a low degree of compaction ("sparse SCNPs") and only a few number of methods give rise actually to "globular SCNPs". In this work, SCNPs have been prepared from amphiphilic random copolymers of two monomers: oligoethylene glycol methyl ether methacrylate (OEGMA), hydrophilic monomer, and 2-acetoacetoxy ethyl methacrylate (AEMA), hydrophobic monomer. The SCNPs were obtained by intramolecular complexation of AEMA units with Cu(II), resulting in metallo-folded poly(OEGMA-co-AEMA)-based SCNPs. Besides the effect of AEMA content, molecular weight and concentration of precursor, two synthesis protocols have been investigated to determine how they affect the structure of the resulting nanoparticles: 1) synthesis in a selective solvent such as water (good solvent for OEGMA, bad solvent for AEMA) followed by transfer to a good solvent for both monomers such as tetrahydrofuran (THF), and 2) synthesis in THF, a good solvent for both monomers. The size, morphology and internal distribution of catalytic sites in both kinds of SCNPs have been investigated by employing a combination of experimental techniques: nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H NMR), size exclusion chromatography (SEC), thermogravimetric analysis (TGA), elemental analysis (EA) and small-angle X-ray scattering (SAXS). Finally, the results obtained are analyzed to the light of recent computer simulations.

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES DE LOS POLÍMEROS:

Los polímeros son macromoléculas (sintéticas o naturales) compuestas por una o varias unidades químicas (monómeros) que se repiten a lo largo de toda una cadena.

De acuerdo con la estructura de la cadena, los polímeros se pueden clasificar en diferentes tipos como se muestra en la Figura 1: lineales, ramificados (que incluyen cadenas laterales llamadas ramas) y entrecruzados (o reticulados).

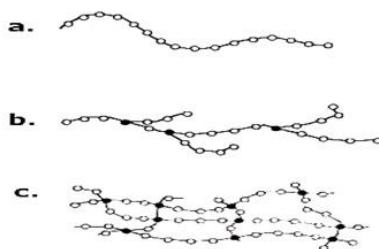


Figura 1. Tipos de polímeros según su estructura: a) polímero lineal; b) polímero ramificado; c) polímero entrecruzado.

Los polímeros también pueden ser clasificados de acuerdo con el número de monómeros diferentes presentes en la cadena; homopolímeros (un solo tipo de monómero) y copolímeros (pueden contener dos, tres (terpolímeros) o incluso más monómeros diferentes). En los copolímeros la distribución de los monómeros puede ser aleatoria (al azar) o bien seguir algún patrón; como en los casos de copolímeros de bloque, alternantes e injertados (Figura 2).

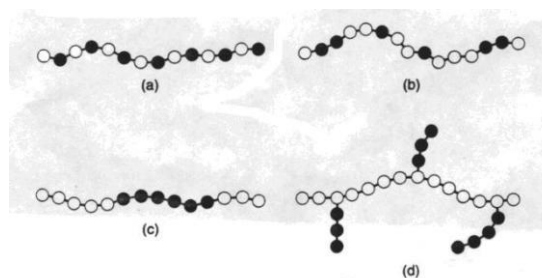


Figura 2. Tipos de copolímeros: a) copolímero alternante; b) copolímero al azar (estadístico); c) copolímero de bloque; d) copolímero injertado.

Los polímeros están formados por cadenas de diferente longitud, son mezclas de especies, cada una con un peso molecular determinado (M_i) y por lo tanto, al caracterizar una muestra de polímero no podemos determinar un peso molecular único, sino una distribución de pesos moleculares, la cual tendrá un peso molecular promedio en número (M_N) y un peso molecular promedio en peso (M_W) (ver Figura 3).

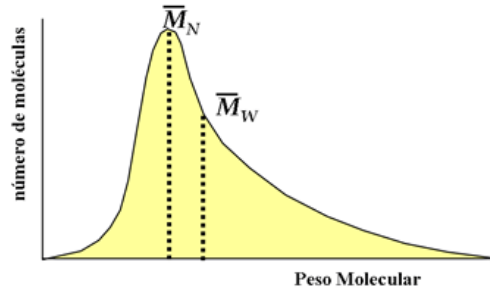


Figura 3. Representación esquemática de una distribución de pesos moleculares de un polímero y los correspondientes pesos moleculares promedio en número (M_N) y promedio en peso (M_W).

El peso molecular promedio en número (M_N) es la media aritmética de la masa, donde M_i es la masa de la cadena y N_i el número de cadenas (eq. 1):

$$M_N = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i} \quad (1)$$

El peso molecular promedio en peso (M_W) representa el promedio de peso de cada cadena (eq. 2):

$$M_W = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i} \quad (2)$$

La relación entre M_W y M_N se conoce como el índice de polidispersidad, PDI (eq. 3). Valores altos de PDI corresponden a una distribución de tamaño ancha:

$$PDI = \frac{M_W}{M_N} \geq 1 \quad (3)$$

En cuanto al tamaño de los polímeros, hay dos parámetros de especial relevancia: el radio de giro (R_g) y el radio hidrodinámico (R_h) (ver Figura 4). El radio de giro se define como la raíz cuadrada de la distancia entre los constituyentes y el centro de masa. El radio hidrodinámico es el radio de una esfera hipotética que difunde en un medio viscoso a la misma velocidad que el polímero. Los valores de R_g y R_h dependen del peso molecular, la arquitectura de cadena y la calidad del disolvente: los buenos disolventes promueven el hinchamiento del polímero, mientras que los malos causan contracción (ver Figura 5),^{1,2} en los conocidos como disolventes Theta (Θ), las cadenas pueden considerarse como aisladas, sin influencias externas que modifiquen su estado conformacional intrínseco. El exponente de Flory (ν), se utiliza para conocer la interacción entre el polímero y el disolvente; valores cercanos a $\nu = 3/5$ para un buen disolvente; $\nu = 1/3$ para un mal disolvente y $\nu = 1/2$ para un disolvente theta.³

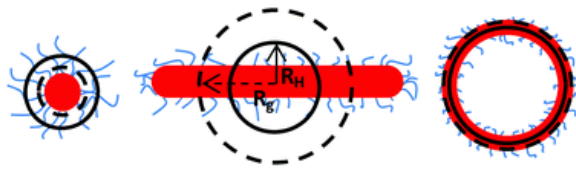


Figura 4. Representación esquemática del radio de giro (R_g) y del radio hidrodinámico (R_h).

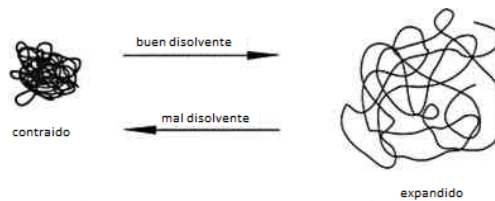


Figura 5. Representación esquemática de la forma de los polímeros en disolución: cadena contraída para mal disolvente y cadena expandida para buen disolvente.

REACCIONES DE POLIMERIZACIÓN:

La polimerización es una reacción química por la cual los reactivos, monómeros forman enlaces químicos entre sí, para dar lugar a una molécula de gran peso molecular denominada polímero.

Las reacciones de polimerización se clasifican de acuerdo con el mecanismo de reacción: polimerización por crecimiento de cadena y polimerización en etapas.

Polimerización por etapas

En la polimerización por etapas, la reacción se da entre grupos funcionales, formando adicionalmente moléculas de bajo peso molecular como agua o amoníaco. Este tipo de polimerización emplea o bien dos monómeros bifuncionales o bien un monómero con dos grupos reactivos distintos que reaccionan entre sí. El uso de un iniciador no es necesario.

Polimerización por crecimiento de cadena

En la polimerización por crecimiento de cadena, monómeros con doble ($C = C$) o monómeros cíclicos se van adicionando progresivamente a una cadena en crecimiento. Hay tres tipos de polimerización por crecimiento de cadena: por vía radicalaria, por vía catiónica y por vía aniónica dependiendo de los efectos inductivos y de resonancia de los sustituyentes, que modifican la densidad electrónica del doble enlace.

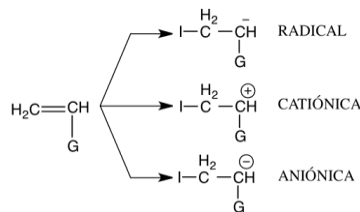


Figura 6. Representación de posibles especies activas en la polimerización por crecimiento de cadena: radical, catión y anión.

Aunque muchos monómeros pueden empezar la reacción de polimerización por crecimiento de cadena por sí solos, normalmente se emplean iniciadores; los más empleados son los de descomposición térmica (como el AIBN), rédox o fotoquímicos.²

POLIMERIZACIÓN RADICALARIA:

La polimerización radicalaria es uno de los procesos químicos más estudiados. El proceso puede subdividirse en diferentes pasos: iniciación, propagación, transferencia y terminación, estos pasos se encuentran representados en la Figura 7.

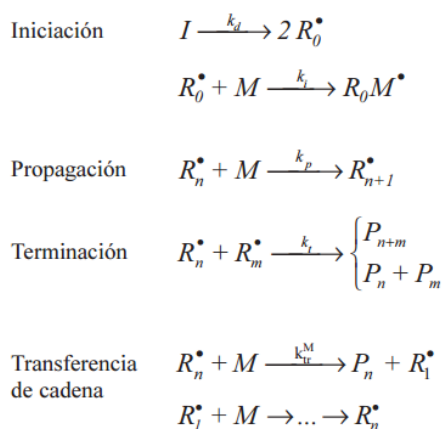


Figura 7. Fases de la polimerización radicalaria.⁶

La polimerización radicalaria empieza cuando el iniciador (I) se descompone formando radicales (R_0^*). El radical se adiciona al monómero (M), estabilizando por resonancia la molécula (R_0M^*), iniciando así el crecimiento de la cadena polimérica. En cada paso de propagación se irá añadiendo otra molécula del monómero a la cadena en crecimiento. La longitud de una cadena polimérica depende del número de adiciones de monómero que se produzcan antes de que la etapa de terminación detenga el proceso. La terminación puede ocurrir por combinación de dos radicales, formando la especie P_{m+n} , o por desproporción,

donde se dá una transferencia de hidrógeno de una especie activa a otra, desactivándose ambas y crea en la donadora del hidrogeno un doble enlace, formando las especies P_n y P_m .^{4,5}

Las reacciones de transferencia juegan un papel importante en el mecanismo, desactivan los radicales de cadena y crean nuevos radicales en moléculas de monómero, iniciador, impurezas o en el propio disolvente. La transferencia de cadena al monómero y al polímero, en general, no tiene gran importancia; en cambio, la transferencia al disolvente es importante en algunos sistemas, ya que trae consigo una disminución del peso molecular.³

El efecto gel

La autoaceleración, también llamado efecto gel, efecto Trommsdorff o efecto Trommsdorff-Norrish, es un comportamiento peligroso de ciertos sistemas de polimerización por radicales libres. Un sistema se hace más viscoso a medida que avanza la reacción de polimerización, es decir, cuando aumenta el grado de conversión, con lo que aparece un gradiente de temperatura a causa de la dificultad para la agitación y se hace más difícil la difusión de las cadenas en crecimiento. La velocidad de terminación empieza a disminuir, ya que las moléculas grandes no pueden moverse libremente y cada vez será más difícil que un radical creciente se encuentre otro para terminar la reacción. Los monómeros al ser más pequeños todavía tienen movilidad para continuar la propagación. El monómero tiene una difusión bastante rápida lo que ocasiona la formación de macro-radicales de alto peso molecular como resultado de una propagación sin terminación. Los macro-radicales se acumulan por lo que la reacción se acelera y se produce más calor, lo que hace que aumente más la velocidad de reacción, dando lugar a una reacción fuera de control y a la posible alteración de las características de los polímeros obtenidos (formación de polímeros de peso molecular anormalmente alto)⁴. Este efecto es común cuando la polimerización radicalaria se lleva a cabo en masa, es decir, en un medio de reacción sin disolvente o altamente concentrada con un polímero soluble en su monómero. Para evitar este efecto es necesario disipar el calor de reacción, pudiéndose usar sistemas refrigerantes o disolvente (polimerización en disolución, emulsión o suspensión).⁵

Ventajas y desventajas de la polimerización radicalaria

La polimerización radicalaria es uno de los métodos más extendidos para sintetizar polímeros. Las ventajas de la polimerización radicalaria son la relativa insensibilidad a impurezas, baja temperatura de reacción, gran variedad de procesos disponibles, incluyendo la posibilidad de llevar a cabo la polimerización en emulsión. Algunos de los inconvenientes relacionados con el mecanismo de polimerización por radicales libres son: pobre control sobre el peso molecular, falta de control sobre la distribución de peso molecular y la dificultad (o incluso imposibilidad) de hacer polímeros bien definidos o copolímeros con una funcionalidad de grupos terminales predeterminados. Con el fin de superar estas dificultades se han desarrollado nuevos métodos, métodos de polimerización radicalaria controlada (CRP).³

POLIMERIZACIÓN RADICALARIA CONTROLADA (CRP):

Los progresos en nanotecnología y biomedicina requieren, cada vez más, materiales poliméricos con estructuras cada vez más complejas y perfectamente definidas. En las últimas décadas se han desarrollado técnicas para conseguir estas estructuras a través de la polimerización radical controlada (CRP, del inglés “controlled radical polymerization”). Las técnicas que han adquirido mayor importancia en los últimos años son:

- Polimerización radicalaria por transferencia de átomo (ATRP)
- Polimerización radicalaria por adición, fragmentación y transferencia reversible (RAFT)

Estas técnicas ofrecen alto grado de control sobre el peso molecular, una clara disminución del índice de polidispersidad (ver Figura 8) y la posibilidad de emplear monómeros con diversos grupos funcionales.^{5,6}

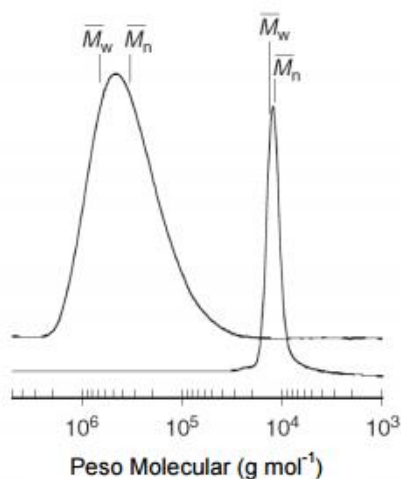


Figura 8. Distribución de pesos moleculares en una polimerización radicalaria convencional (izquierda) y en una polimerización radicalaria controlada, CRP (derecha).

Polimerización radicalaria por transferencia de átomo (ATRP)

En esta técnica se utilizan complejos de metales de transición para conseguir polímeros con distribución estrecha de pesos moleculares. En esencia, en la polimerización ATRP las especies activas se forman en un proceso catalizado por un complejo de un metal de transición ($Mt^{n+}-Y$, donde Y es un ligando), el cual sufre la pérdida de 1 electrón, dando lugar a un complejo metálico oxidado ($X-Mt^{n+1}-Y$) y formando así especies radicalarias activas (R^*). La propagación ocurre por la adición rápida del monómero a las especies activas (R^*). El crecimiento de cadena continúa hasta que el radical reduce las especies oxidadas metálicas ($X-Mt^{n+1}-Y$). El complejo metálico oxidado actúa como un radical persistente, reduciendo la concentración de

los radicales y minimizando la terminación, gracias al tiempo de vida corto de los radicales propagadores.

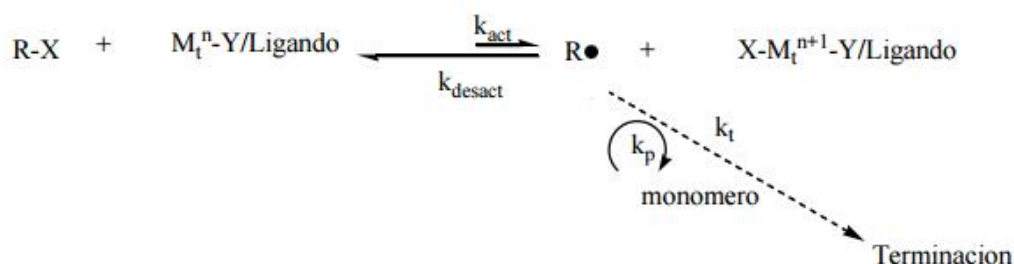


Figura 9. Mecanismo de la polimerización ATRP. ⁶

La técnica ATRP permite el crecimiento homogéneo y uniforme de las cadenas y por consiguiente la obtención de distribuciones moleculares muy estrechas. ⁶

Polimerización radicalaria por adición, fragmentación y transferencia reversible (RAFT)

La polimerización por adición, fragmentación y transferencia reversible, RAFT, se considera como la técnica de polimerización más versátil frente a otras técnicas de polimerización controladas. La polimerización RAFT se puede llevar a cabo bajo las mismas condiciones de reacción que una polimerización radicalaria convencional si se usa un agente de transferencia de cadena (CTA) adecuado. Estos agentes, por lo general, son compuestos orgánicos que contienen azufre, como ditiocarbonatos y tritiocarbonatos, y se usan en muy baja proporción. ⁶

La clave de la polimerización RAFT es la secuencia de equilibrios de adición, fragmentación y transferencia reversible mostrados en la Figura 10. La iniciación y la terminación (ésta última reacción secundaria) ocurren del mismo modo que en la polimerización por radicales libres convencional. El iniciador, que se pone en baja proporción con respecto al agente de transferencia de cadena (CTA) se descompone formando dos radicales (I^*), que reaccionan con moléculas de monómero (M) formando especies propagantes (P_n^*), a las que se adiciona el agente de transferencia de cadena (compuesto ditiocarbonilo ($RSC(Z)=S$)) y se desprende un nuevo radical primario proveniente del CTA (R^*), formándose así un nuevo compuesto ditiotricarbonilo ($P_nS(Z)C=S$). El nuevo radical formado (R^*) forma una nueva especie activa (P_m^*). Al existir un rápido equilibrio de transferencia entre los radicales poliméricos (P_n^* y P_m^*) y el compuesto durmiente ditiocarbonilo polimérico ($P_nS(Z)C=S$), todas las cadenas tienen la misma probabilidad de crecer de manera controlada, dando lugar a un índice de polidispersidad bajo ($PDI \approx 1$). ⁶ Cuando se consume todo el monómero, el grupo ditiocarbonilo queda presente en la mayoría de los extremos de las cadenas. ⁷

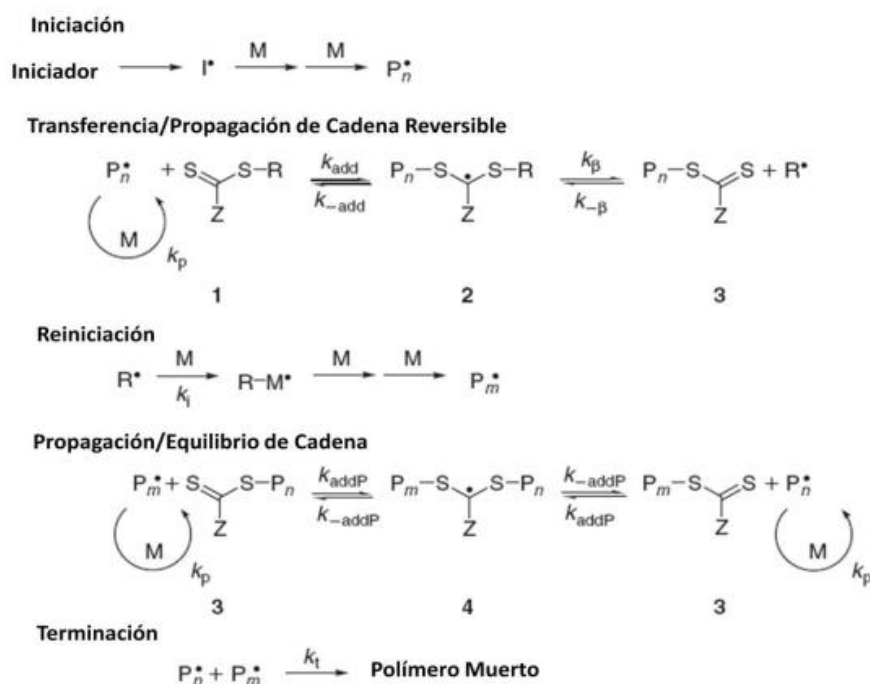


Figura 10. Mecanismo de la polimerización RAFT. ⁶

NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS UNIMOLECULARES (SCNPs):

En los últimos años, se han logrado grandes avances en la síntesis de nano-objetos poliméricos blandos de una sola cadena, nanopartículas poliméricas unimoleculares (SCNPs, del inglés “single-chain nanoparticles”). Estos nano-objetos tienen una amplia variedad de aplicaciones potenciales en nanomedicina (administración de fármacos...), catálisis, detección y otros usos.⁸ El método de obtención consiste en plegar una cadena polimérica (precursor) mediante interacciones intramoleculares (covalentes, supramoleculares) para formar un nano-objeto. A veces es necesaria la funcionalización de los precursores, para la introducción del grupo funcional que causará el colapso de la cadena en el polímero.⁹

Para la construcción de las SCNPs, es muy importante el control de las condiciones de síntesis de los polímeros precursores (uso de técnicas de polimerización controlada RAFT o ATRP), para garantizar tanto como sea posible la uniformidad de las nanopartículas.¹⁰ Una vez formada la nanopartícula, como consecuencia de la compactación se observan cambios en muchas propiedades como por ejemplo la viscosidad intrínseca, la temperatura de transición vítrea, el radio hidrodinámico y el radio de giro, por mencionar solo algunas.^{10,11}

La compactación de los polímeros sintéticos para formar nanopartículas poliméricas unimoleculares tiene una cierta similitud con el plegado de las proteínas globulares a su estado funcional (nativo), aunque no presenta la perfección que se observa en el caso de las macromoléculas naturales de tipo globular.^{12,14} En la actualidad, se está intentando dotar a las SCNPs con funciones biológicas propias de los polipéptidos naturales, tales como las enzimas,¹³

y se están utilizando metales para plegar las SCNPs, imitando a las metalo-enzimas.¹⁵ Igualmente, el control de la morfología de las SCNPs es un tema de mucho interés en la actualidad.

Para inducir el plegado de las cadenas se pueden emplear diferentes interacciones: covalentes (tanto irreversibles, como reversibles) y no covalentes.¹⁶

Nanopartículas poliméricas unimoleculares con enlaces covalentes

Las SCNPs pueden formarse por reacción de los grupos funcionales presentes en una cadena polimérica. Algunas de las reacciones más típicas son: adición de grupos tiol a dobles o triples enlaces (“thiol-ene / thiol-yne click chemistry”), reacciones de Diels-Alder, cicloadición alquino azida catalizada por cobre (“CuAAC click chemistry”) o adición de Michael (Figura 11).¹⁷

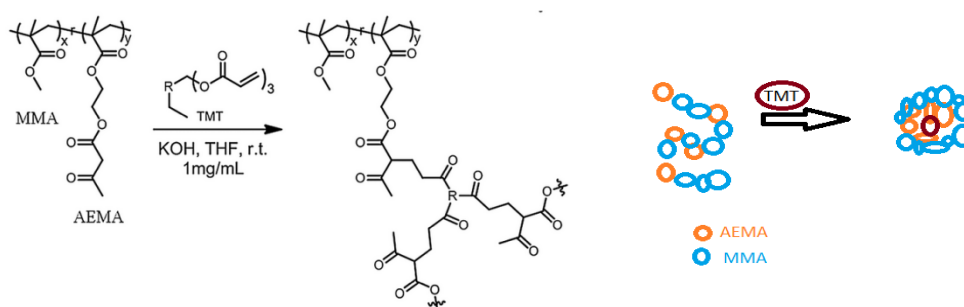


Figura 11. Reacción de síntesis (izquierda) de nanopartículas poliméricas unimoleculares de poli(MMA-co-AEMA) con enlace covalente por adición de Michael y representación esquemática del proceso (derecha).⁹

Nanopartículas poliméricas unimoleculares con enlaces no covalentes

Las nanopartículas SCNPs también se pueden formar mediante interacciones intramoleculares, tales como enlaces de hidrógeno o interacciones iónicas. Estas interacciones son más débiles que los enlaces covalentes y suelen ser reversibles con un cambio en las condiciones del sistema (pH, temperatura, fuerza iónica).

Las interacciones no covalentes se pueden clasificar de acuerdo a su fuerza como: i) interacciones débiles, cubren las fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno individuales, efectos hidrofóbicos e interacciones π - π ; ii) interacciones medianas, incluyen enlaces de hidrógeno múltiples y complejos metálicos de coordinación; y iii) interacciones fuertes, del tipo enlaces iónicos, interacciones “host-guest” y quelatos.¹⁷

RUTAS PARA OBTENER SCNPs GLOBULARES:

Actualmente, se están desarrollando numerosos estudios para dotar a las nanopartículas con funciones biológicas¹³; para ello, se están estudiando vías de obtención de SCNPs globulares que se asemejen más a las macromoléculas biológicas.

El grupo de *Polymers and Soft Matter*, sobre la base de simulaciones MD, ha propuesto dos nuevas rutas (Figura 12, modelo I y modelo II) para sintetizar SCNPs globulares, ajustando la calidad del disolvente. En estas nuevas técnicas no se precisa el control de la secuencia específica.¹⁸

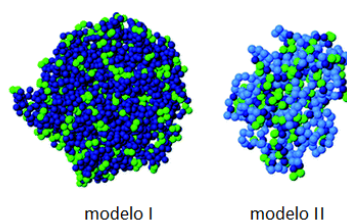


Figura 12. Resultados de simulaciones por ordenador de la morfología de SCNPs preparadas por dos nuevas rutas que permiten ajustar la calidad del disolvente.¹⁸

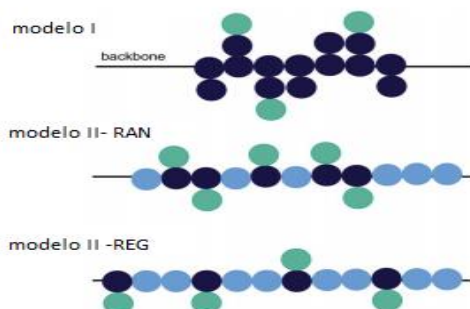


Figura 13. Representación esquemática de los precursores utilizados en las simulaciones por ordenador, para las dos nuevas rutas investigadas. Las bolas verdes representan los grupos funcionales que reaccionan (hidrofóbicos). Las bolas de color azul oscuro y azul claro representan grupos no reactivos (hidrofóbicos e hidrofílicos, respectivamente). En el modelo II-RAN los precursores tienen una secuencia aleatoria, mientras que en modelo II-REG la secuencia es regular.¹⁸

En la primera ruta (modelo I) el plegado se realiza bajo condiciones de mal disolvente con los precursores anclados a una superficie, a una densidad suficientemente baja como para evitar el contacto entre las cadenas. Después de completar la reacción de entrecruzamiento intramolecular, las nanopartículas se separan de la superficie.

En la segunda ruta (método II), se utiliza un copolímero al azar con un monómero hidrofílico no reactivo y monómeros reactivos hidrofóbicos, para obtener SCNPs tipo “core-shell” con una parte hidrofílica externa y una parte hidrofóbica interna (ver Figura 14). La cáscara solvofílica

externa impedirá la agregación intermolecular, permitiendo el entrecruzamiento de las unidades solvofóbicas en el núcleo interno. En este segundo modelo, se simuló un copolímero con estructura regular (REG) y otro con estructura al azar (RAN); observándose que los precursores anfifílicos con una secuencia regular no son útiles para la producción de nanopartículas globulares, a diferencia de los de secuencia aleatoria.

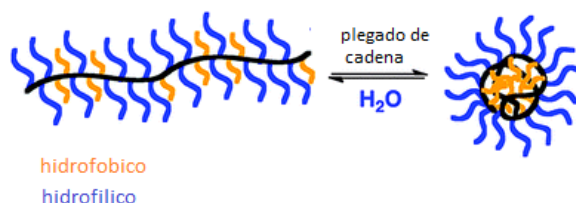


Figura 14. Representación de la construcción de SCNPs a través de un solo plegado de la cadena del copolímero aleatorio anfifílico (modelo II RAN) en agua.¹⁸

En ambas rutas, después de completar el entrecruzamiento y la restauración de las buenas condiciones de disolvente, las nanopartículas unimoleculares obtenidas son objetos globulares siempre que el contenido de grupos reactivos sea lo suficientemente elevado (ver Figura 12).¹⁸

Recientemente, se han reportado varios artículos que muestran datos experimentales de nanopartículas con morfología casi globular en solución, basados en copolímeros anfifílicos. A modo de ejemplo, Akashi y colaboradores⁹ prepararon nanopartículas unimoleculares en solución acuosa basadas en un copolímero al azar anfifílico, compuesto por unidades de ácido γ -glutámico como segmento hidrófilo y L-fenilalanina (Phe) como el segmento hidrófobo. Se obtuvieron estructuras globulares, de pesos moleculares superiores a 140 kDa a contenidos de Phe de entre el 27 y el 42%, que fueron investigados por SANS y técnicas de fluorescencia. Más recientemente, Ana Sánchez-Sánchez y colaboradores¹⁵ han sintetizado SCNPs globulares en base a un copolímero aleatorio anfifílico (de relativamente bajo peso molecular) compuesto por unidades de oligoetilenglicol metil éter metacrilato (OEGMA) y 2-acetoacetoxi etil metacrilato (AEMA) (Figura 15). Estos nanoglóbulos bioinspirados imitan las características de las metaloenzimas.

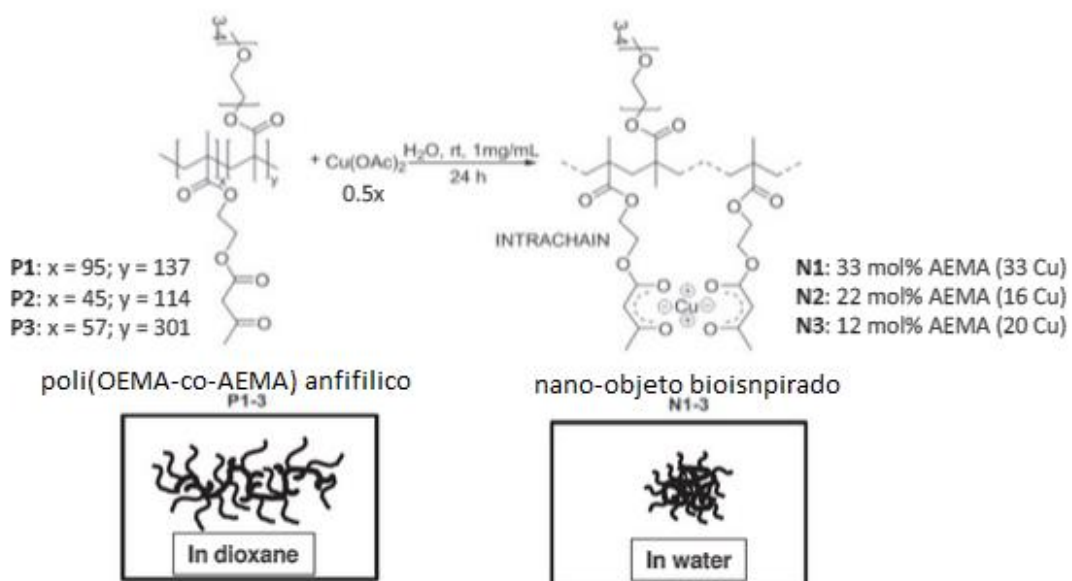


Figura 15. Imitando a las metalo-enzimas: síntesis de nanopartículas unimoleculares metalo-plegadas de estructura globular que contienen átomos de cobre. ¹⁵

OBJETIVOS DEL TRABAJO

El objetivo de este trabajo es sintetizar y caracterizar nanopartículas poliméricas de una sola cadena (SCNPs) formadas a partir de copolímeros al azar anfifílicos Poli(OEGMA-co-AEMA), compuestos por dos monómeros: oligoetilenglicol metil éter metacrilato (OEGMA), monómero hidrofílico, y 2-acetoacetoxi etil metacrilato (AEMA), monómero hidrofóbico; por complejación intramolecular de las unidades AEMA de los copolímeros con iones Cu(II), dando lugar a SCNPs metalo-plegadas. Específicamente, con este trabajo se quiere investigar cómo afectan a la estructura de las SCNPs:

- El peso molecular del copolímero al azar Poli(OEGMA-co-AEMA) sintetizado por polimerización radicalaria controlada tipo RAFT.
- La cantidad de monómero hidrofóbico (AEMA) incorporada al copolímero precursor.
- El aumento progresivo de la concentración de precursor al sintetizar las nanopartículas en agua (1 mg/mL, 10 mg/mL y 100 mg/mL).
- Dos protocolos específicos de síntesis:
 - 1) Síntesis de las SCNPs en un disolvente selectivo (agua) seguido por transferencia a un buen disolvente de ambos monómeros (tetrahidrofurano-THF).
 - 2) Síntesis de las SCNPs en un buen disolvente de ambos monómeros (THF).

Para ello se ha utilizado una combinación de técnicas experimentales de caracterización que incluyen: resonancia magnética nuclear de protón (^1H RMN), cromatografía por exclusión de tamaño (SEC), análisis termogravimétrico (TGA), análisis elemental (EA) y dispersión de rayos X a bajos ángulos (SAXS).

Los resultados obtenidos se han analizado a la luz de recientes simulaciones por ordenador.

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIALES:

Los monómeros empleados, oligoetilenglicol metil éter metacrilato (OEGMA) (Aldrich, $M_n = 300$ Da) y 2-acetoacetoxi etil metacrilato (AEMA) (Aldrich, 95%), fueron purificados pasándolos por alumina básica. El iniciador 2,2-azobis(2-metilpropionitrilo) (AIBN) (Aldrich, 98%) fue purificado por recristalización. Acetato de cobre(II) ($\text{Cu}(\text{OAc})_2$) (98%), 1,4-dioxano (anhidro 99,8%), hexano (anhidro 95%) y cloroformo deuterado (99,96 % de átomos D) fueron comprados en Aldrich y utilizados tal cual. Ácido cianopentanoico ditiobenzoato (CPADB) fue comprado en Strem Chemicals y tetrahidrofurano anhidro (THF) en Scharlab. El agua desionizada fue obtenida del aparato Barnstead TII Pure Water System.

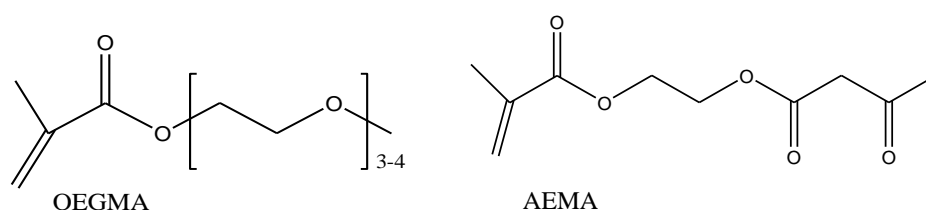


Figura 16. Estructura química de los monómeros utilizados en este trabajo: OEGMA = Oligoetilenglicol metil éter metacrilato ($M_n = 300$ Da) y AEMA = 2-acetoacetoxi etil metacrilato.

MÉTODOS:

Síntesis de copolímeros Poli(OEGMA-co-AEMA)

Se han sintetizado copolímeros con pesos moleculares elevados y distintas proporciones de los monómeros: desde OEGMA / AEMA = 93 mol % / 7 mol % hasta OEGMA / AEMA = 56 mol % / 44 mol %. Una reacción típica de síntesis sería (para **P1**, OEGMA / AEMA = 75 mol % / 25 mol %): En un pequeño reactor con agitación (un vial de 15 mL tapado con septum), se disolvieron 1.54 mL de OEGMA (5.4 mmol), 0.34 mL de AEMA (1.8 mmol), 2.35 mg de AIBN (1.4×10^{-2} mmol) y 20 mg de CPADB (7×10^{-2} mmol) en 3 mL de 1,4-dioxano. La mezcla se purgó durante 15 minutos con Argón, para quitar el oxígeno, que actúa como inhibidor. La reacción de copolimerización se llevó a cabo a 70 °C durante 24h. Transcurrido este tiempo, la reacción se paró dejando el reactor sumergido en nitrógeno líquido durante 2 minutos. El copolímero se disolvió en THF (la mínima cantidad posible) y se precipitó en 150 mL de hexano, realizando esta operación 2 veces para eliminar posibles restos de monómero sin reaccionar. Finalmente, para aislar el copolímero se decantó el líquido y se dejó secando en una estufa de vacío a temperatura ambiente.

Síntesis de nanopartículas poliméricas unimoleculares metalo-plegadas a partir de copolímeros Poli(OEGMA-co-AEMA)

Se evaluaron dos protocolos específicos de síntesis: Protocolo 1 - Síntesis de las SCNPs en un disolvente selectivo (agua) seguido por transferencia a un buen disolvente de ambos

monómeros (tetrahidrofurano-THF), y Protocolo 2 - Síntesis de las SCNPs en un buen disolvente de ambos monómeros (THF).

La síntesis de las nanopartículas se hizo típicamente a 1 mg/mL en los dos disolventes. Para las sintetizadas en agua se investigó el efecto de la concentración de precursor (1, 10 y 100 mg/mL) en las características finales de las SCNPs.

Protocolo 1: Síntesis en agua

En una reacción típica de síntesis, 100 mg del copolímero Poli(OEGMA-AEMA) (0.36 mmol para **P1**) se disuelven en agua desionizada (90 mL) a temperatura ambiente, y se añade poco a poco una disolución de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ de (8,34 mg (0.045 mmol) de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ disueltos en 10 mL de agua desionizada), obteniendo así una concentración final de copolímero de 1 mg/mL. La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Para aislar las nanopartículas poliméricas unimoleculares se procede a su liofilización (equipo empleado: TELSTAR, CRYODOS-80).

Protocolo 2: Síntesis en tetrahidrofurano (THF)

La síntesis en THF se realizó de la misma manera que en agua, pero reemplazando el agua desionizada por THF. Para aislar las SCNPs se concentra la disolución obtenida en la línea de vacío, y se precipita en hexano. Por último se decanta el líquido y se deja secando en estufa de vacío a temperatura ambiente.

TÉCNICAS EXPERIMENTALES:

Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) 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 (rf).

Esta técnica espectroscópica puede utilizarse sólo para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones (o de ambos). Esta situación se da en los átomos de ^1H , ^{13}C , ^{19}F y ^{31}P . Este tipo de núcleos son magnéticamente activos, es decir poseen espín. En ausencia de campo magnético, los espines nucleares se orientan al azar. Sin embargo cuando una muestra se coloca en un campo magnético, los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo, en un estado de mínima energía denominado estado de espín α , mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía denominado estado de espín β .

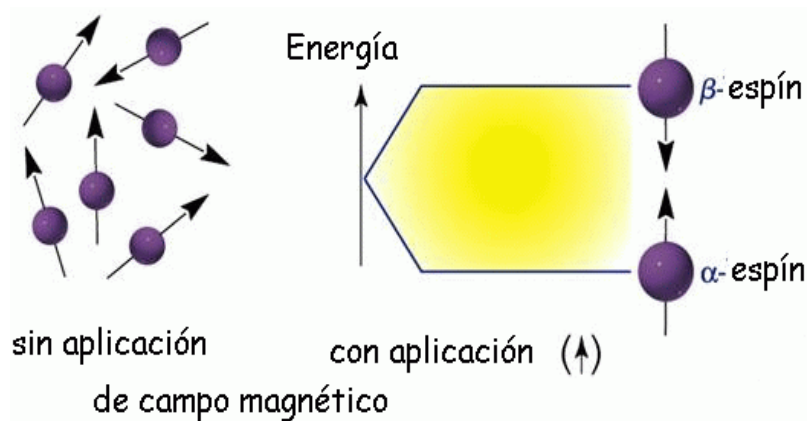


Figura 17. Representación de la orientación de los espines de núcleos magnéticamente activos: sin campo magnético no están orientados (izquierda); con la aplicación de un campo magnético están orientados, dependiendo de su signo, como α -espín y β -espín.

Cuando una muestra que contiene un compuesto orgánico es irradiada brevemente por un pulso intenso de radiación, los núcleos en el estado de espín α son promovidos al estado de espín β . Cuando los núcleos vuelven a su estado inicial emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía (ΔE) entre los estados de espín α y β . El espectrómetro de RMN detecta estas señales y las registra como una gráfica de frecuencias (eje x) frente a intensidad (eje y), que es el llamado espectro de RMN. El término resonancia magnética nuclear procede del hecho de que los núcleos están en resonancia con la radiofrecuencia.

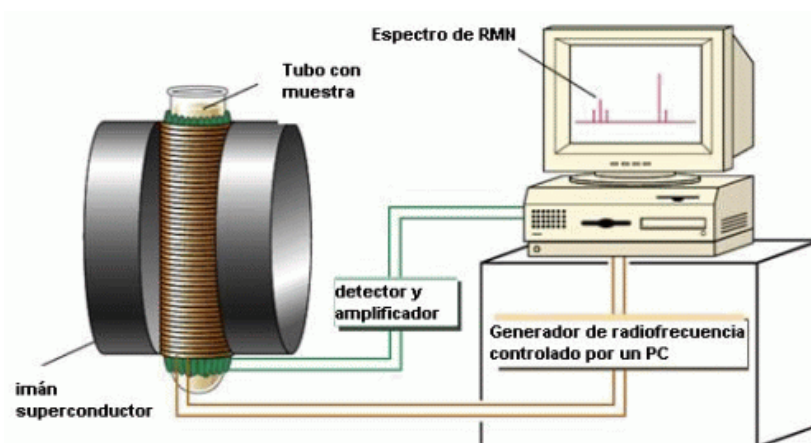


Figura 18. Representación esquemática de un equipo de RMN.

La Resonancia Magnética Nuclear es una de las técnicas espectroscópicas más utilizadas en la actualidad que permite entre otras: determinar la composición química de los polímeros, determinar la cantidad relativa de monómeros presente en un copolímero, etc.¹⁹ En cuanto a la información que dan sobre la formación de las nanopartículas, cuando estas se forman se crean nuevos enlaces que inducen cambios en el espectro. Igualmente, parte de los átomos

que dan señal tienen menos movilidad lo que suele traducirse en un ensanchamiento de los picos y una pérdida de intensidad de los mismos en comparación con los del precursor.¹⁵

En este trabajo, las medidas de ¹H RMN se llevaron a cabo a temperatura ambiente en un equipo BRUKER 400 MHz, usando cloroformo deuterado (CDCl₃) como disolvente.

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

Las técnicas cromatográficas están basadas en la separación de los componentes de una mezcla, aprovechando la distribución de estos entre dos fases: una fase móvil y otra fase estacionaria. Generalmente, mediante el empleo de una columna que contiene la fase estacionaria, los compuestos a separar son arrastrados por la fase móvil y son analizados a su paso por el detector. La cromatografía de exclusión es un tipo de cromatografía líquida en la cual la fase estacionaria es sólida y la fase móvil es líquida. Se utiliza el término de “Cromatografía de exclusión por tamaño” (SEC) o bien “cromatografía de permeabilidad sobre gel” (GPC) o de permeación en gel. Su principal aplicación es la separación de las moléculas en función de su tamaño con la finalidad de estudiar el peso molecular y su distribución en polímeros.

El relleno de columna se comporta como un tamiz donde se distinguen y separan las moléculas: las moléculas pequeñas entran en el interior del relleno poroso, pasan lentamente y quedan retenidas en el poro (tiempo de retención largo), mientras que las moléculas de tamaño superior al poro del relleno, no entran y pasan rápidamente por él (tiempo de retención corto).

Una vez que los componentes se separan, se pueden emplear varios métodos de detección para caracterizar la muestra; detectores MALS (multi-angle light scattering) “detectores de detección de luz”, detectores del índice de refracción (IR) o detectores viscosimétricos.¹⁹

La cromatografía de exclusión por tamaño además de ser una técnica sencilla para estudiar los pesos moleculares y su distribución en polímeros, permite estudiar y hacer un seguimiento de la formación de nanopartículas poliméricas unimoleculares ya que las nanopartículas tienen un radio hidrodinámico (R_h) menor que los polímeros con los que se sintetizan. De esta forma, el progresivo plegado/colapso de las cadenas de precursor a nanopartículas se observa por SEC mediante el progresivo aumento en los tiempos de retención, como se observa en la Figura 18.⁹

En este trabajo, las medidas de SEC se llevaron a cabo en un equipo SEC Agilent 1200, mediante inyección manual a 30 °C, equipado con columnas PLgel 5 μm Guard y PLgel 5 μm MIXED-C (relleno de poliestireno y divinilbenceno altamente reticulado) y triple detección: 1) detector de índice de refracción (RI) (Optilab Rex, Wyatt), 2) detector multi-ángulo de dispersión de luz (MALS) (MiniDraw Treos, Wyatt) y 3) detector viscosimétrico (ViscoStar-II, Wyatt). El eluyente fue THF y la velocidad de flujo 1mL/min. El software usado fue ASTRA 6.1. Se empleó un valor $dn/dc = 0.115$ tanto para los precursores como las nanopartículas.¹⁵

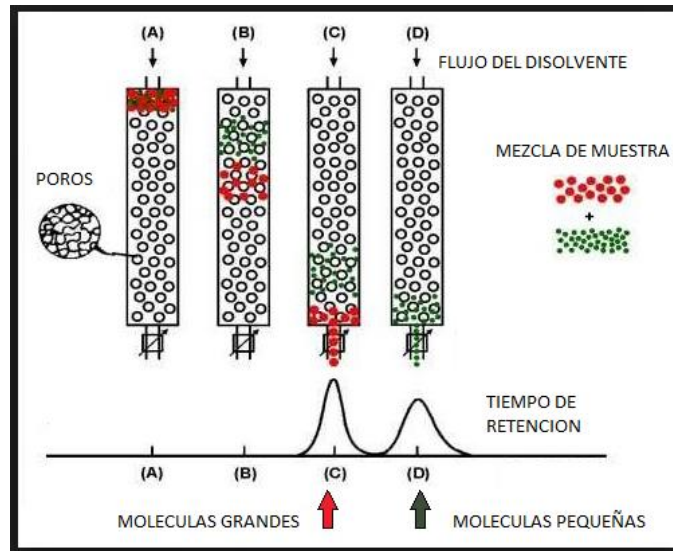


Figura 19. Representación esquemática de una columna SEC y de los cromatogramas respectivos para moléculas con diferentes tamaños, donde se observan tiempos de retención cortos para las moléculas grandes y tiempos de retención largos para las pequeñas.

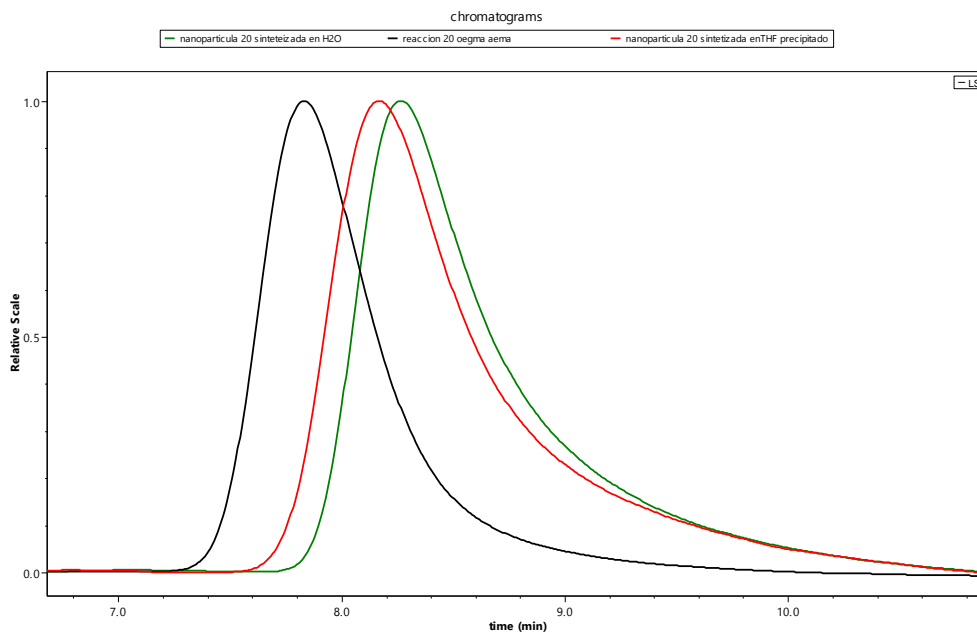


Figura 20. Cromatogramas de SEC para un copolímero Poli(OEGMA-AEMA) (línea negra) y nanopartículas poliméricas unimoleculares formadas a partir de él en THF (línea roja) y en agua (línea verde).

Termogravimetría (TGA)

La termogravimetría (TGA) es una técnica en la que las muestras se someten a un programa de temperatura en una atmosfera específica (inerte, oxidativa...) y se mide la variación de masa de la muestra frente a la temperatura (a velocidad de calentamiento o enfriamiento)

constante) o frente al tiempo a temperatura constante (termogravimetría estática o isotérmica).

El equipo consta de una termo-balanza, donde se coloca la muestra a analizar y se procede a su calentamiento, con lo que el equipo mide la variación del peso de la muestra con la temperatura (termograma).

Se usa para estudiar procesos que lleven asociada una pérdida de peso al aumentar la temperatura (o con el tiempo a una temperatura determinada) tales como: descomposición, sublimación, oxidación, reducción, desorción, absorción, etc. y para evaluar la estabilidad térmica de diversos materiales: polímeros, alimentos, productos farmacéuticos, etc.¹⁹

La técnica de TGA es útil para ver los cambios que hay entre el precursor y las nanopartículas, si la estabilidad térmica es la misma o no, y para determinar el contenido de metal en las muestras, etc.¹⁵

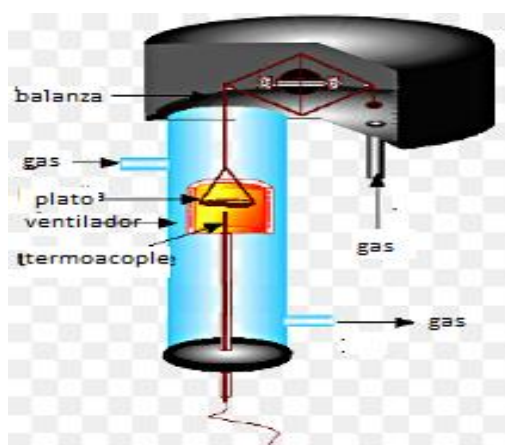


Figura 21. Representación esquemática de equipo TGA

El análisis de TGA se llevó a cabo en Q500-TA a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, desde temperatura ambiente hasta 800 °C y en atmosfera de nitrógeno.

Analisis elemental (AE)

La técnica de análisis elemental (AE) es una técnica que permite determinar el contenido total de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre presentes en las muestras orgánicas e inorgánicas, tanto sólidas como líquidas. Esta técnica es muy usada en amplias áreas, polímeros, fármacos, suelos, sedimentos, industria alimenticia, control ambiental, materiales agrícolas, productos naturales, aceites, etc., generalmente como técnica complementaria de otras de análisis estructural para la confirmación de la fórmula molecular.¹⁹

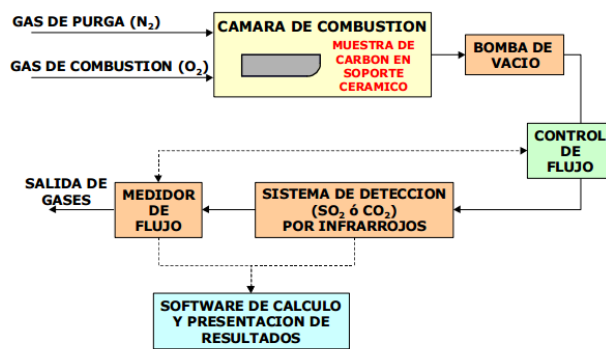


Figura 22. Representación esquemática de los componentes de un equipo de análisis elemental (AE).

Generalmente en la ciencia de los polímeros y de la química orgánica el tipo de análisis elemental más usado es el de combustión. En esta técnica la muestra a analizar se quema, con lo que se crean productos de combustión (CO₂, H₂O, NO) que se recogen, se pesan, y con las masas de cada producto se calcula la composición (porcentaje de cada átomo presente en la muestra).¹⁹ En este estudio, las medidas de análisis elemental se realizaron en un equipo Euro EA3000.

Dispersión de rayos-X a bajo ángulo (SAXS)

La dispersión de rayos-X a bajo ángulo (SAXS, del inglés “small angle X-ray scattering”) es una técnica analítica no destructiva empleada para la caracterización estructural de materiales en el rango de los nanómetros, de entre 1 nm y 150 nm. Es una técnica basada en analizar la dispersión de rayos X producida por un material al paso de un haz de rayos X monocromáticos, a ángulos muy bajos (normalmente 0.1 - 10 °).

En el caso de polímeros, el haz de rayos X interactúa con los electrones de todos los átomos en la macromolécula, dando como resultado el denominado “patrón de dispersión”, en el cual se puede obtener las diferentes intensidades de rayos X en diferentes ángulos de dispersión, lo que permite caracterizar su estructura. Gracias a este método se pueden deducir parámetros de muestras nanoestructuradas como: Forma, tamaño, estructura interna, cristalinidad, porosidad y superficie por volumen. Esta técnica se emplea en materiales tales como: cristales líquidos, películas de polímeros, micro emulsiones, catalizadores, proteínas, nanopartículas, virus, etc.¹⁹

La técnica permite la determinación del tamaño y forma tanto de las nanopartículas, como de los precursores. Del ajuste de los datos de SAXS a modelos apropiados es posible deducir tanto el valor del radio de giro (R_g), como del exponente de Flory (ν). Se espera valores cercanos a 0.59 para estructuras expandidas en buen disolvente. De hecho, los precursores lineales muestran valores cercanos a 0.59, mientras que las SCNPs en disolución muestran valores comprendidos entre 0,48 y 0,51. Por su parte, un valor de 0.33 es típico de glóbulos compactos.¹²

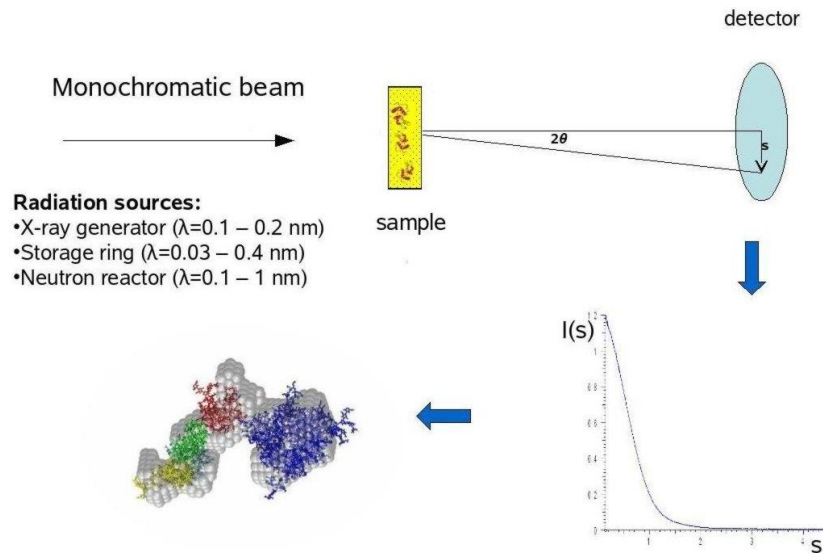


Figura 23. Representación esquemática del equipo SAXS.

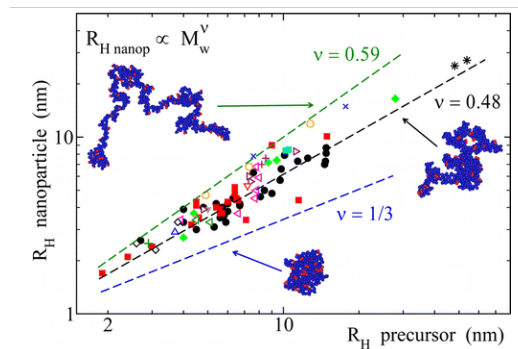


Figura 24. Representación del valor del exponente de Flory (ν) para precursores ($\nu = 0.59$), SCNPs en disolución ($\nu = 0.48$) y glóbulos compactos ($\nu = 0.33$).¹²

Las mediciones de SAXS se realizaron en un equipo Rigaku 3-pinhole PSAXS-L que funciona a 45 kV y 0,88 mA. El MicroMax-002 y el sistema generador de rayos-X están compuestos por un módulo de fuente de tubo sellado y un micro foco generador de rayos-X integrado, que produce fotones de transmisión $\text{CuK}\alpha$ con una longitud de onda $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$. Los rayos-X dispersados son detectados en un detector de rayos-X de dos dimensiones (Gabriel, 2D- 200X). Este detector ofrece un área activa de 200 mm con 200 micras de resolución. Todas las muestras analizadas se filtraron con un filtro de 0.2μ .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis de copolímeros Poli(OEGMA-co-AEMA)

El objetivo de la primera parte del trabajo fue sintetizar copolímeros al azar del tipo Poli(OEGMA-co-AEMA), de alto peso molecular (M_w), bajo índice de polidispersidad (PDI) y distintos porcentajes de AEMA, a partir del trabajo previo de Ana Sánchez.¹⁵ La reacción de copolimerización RAFT del OEGMA y AEMA se muestra en la Figura 25:

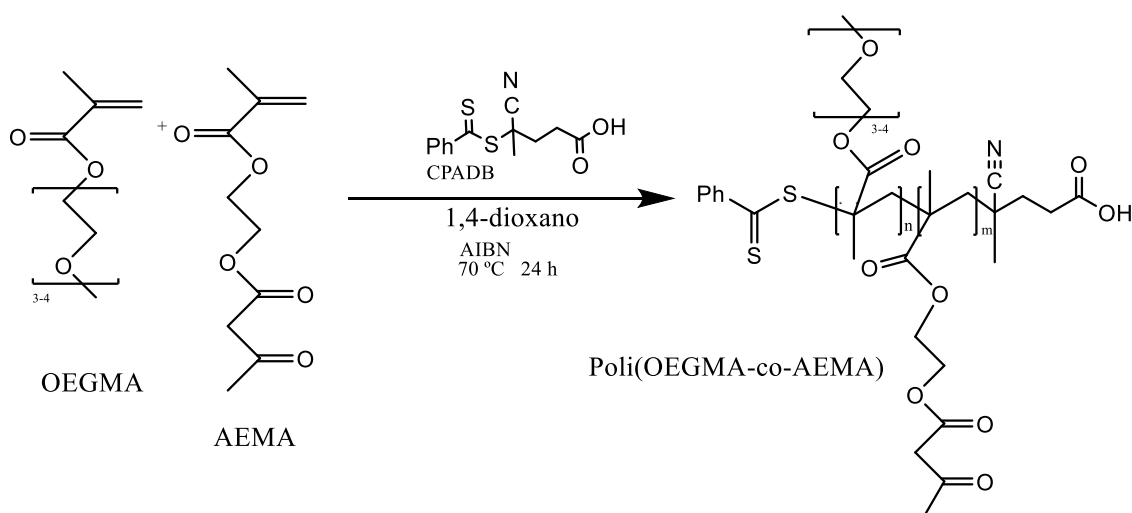


Figura 25. Reacción de copolimerización de OEGMA y AEMA en dioxano a 70 °C durante 24 horas, utilizando AIBN como iniciador y CPADB como agente RAFT.

Los copolímeros obtenidos en condiciones de síntesis controladas presentaron el aspecto de aceites rosas (ver Figura 26 y Tabla 1), con un porcentaje de AEMA comprendido entre el 7 y el 43 mol % determinado mediante ^1H RMN (ver Figura 27) utilizando el área integrada de las señales de "i" (AEMA, 3H) y "e" (OEGMA, 3H). El peso molecular de los copolímeros se determinó mediante SEC (ver Tabla 1, $M_w = 43 - 213.5$ kDa, $PDI = 1.05 - 1.23$).



Figura 26. Aspecto típico de un copolímero Poli(OEGMA-co-AEMA) soluble (izquierda). En condiciones de síntesis no controladas, se obtuvieron geles insolubles (derecha).

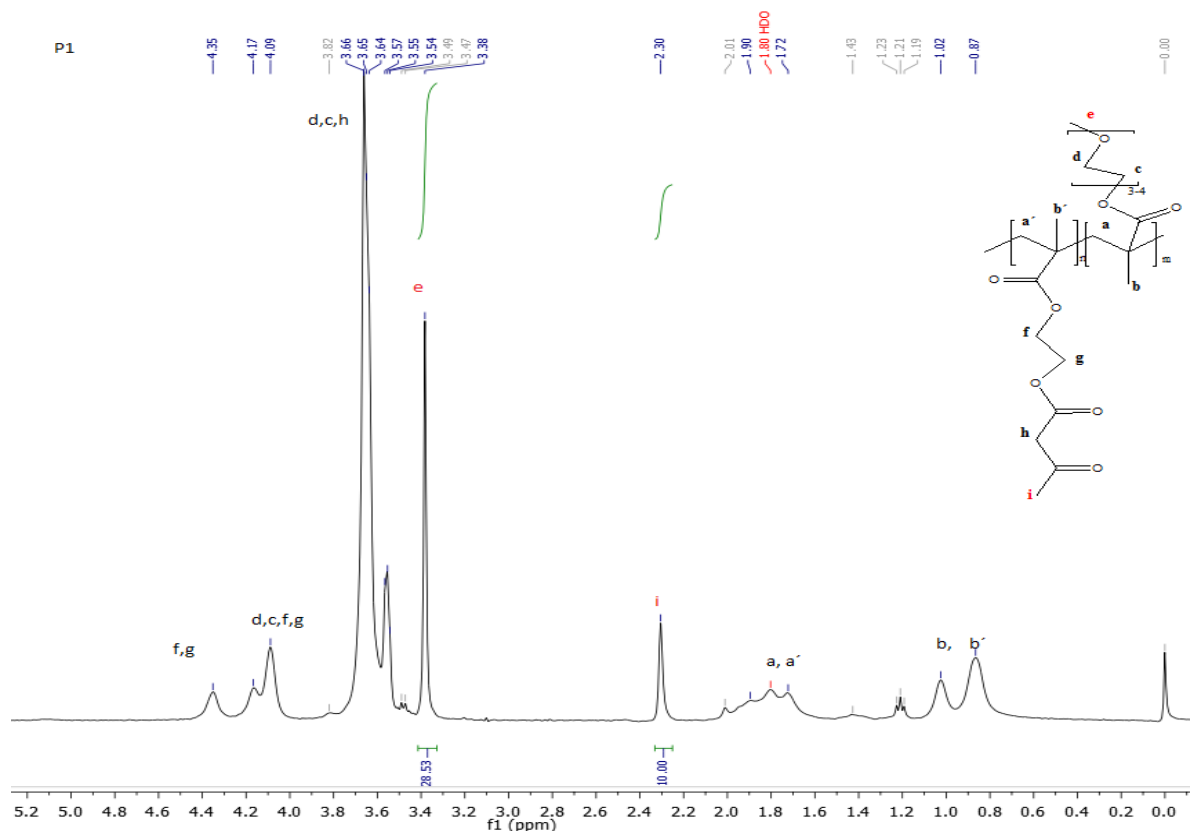


Figura 27. Espectro ^1H RMN para el precursor P1 en cloroformo deuterado con la correspondiente asignación de las bandas.

Se investigaron diversas condiciones para obtener precursores de alto peso molecular (M_w), bajo índice de polidispersidad (PDI) y contenido de AEMA a medida. Para lograrlo se variaron las cantidades de monómeros, iniciador, CTA, disolvente y el tiempo de reacción para entender cómo afectan estos parámetros al sistema estudiado.

Como era de esperar, al aumentar la cantidad de iniciador, el peso molecular disminuye. Esto ocurre porque hay más radicales en el sistema, con lo que hay más cadenas en crecimiento, y a cada cadena (en promedio) se le adiciona(n) menos monómero(s), por lo que se obtienen pesos moleculares más bajos. Con el disolvente ocurre lo mismo: cuando se aumenta la cantidad de disolvente se obtienen pesos moleculares más bajos, probablemente, debido a reacciones de transferencia al disolvente que bajan considerablemente el peso molecular. En cuanto al tiempo de reacción, a tiempos más largos pesos moleculares más altos como es de esperar en una polimerización controlada tipo RAFT.

Algunas de las reacciones no funcionaron (ver Tabla 1), ya que las condiciones utilizadas no fueron buenas para obtener un copolímero útil. Así, en los casos P5 y P8 (repetición del P5) se utilizó una cantidad de iniciador muy pequeña, y en P7 muy poco disolvente, por lo que no se obtuvo el polímero esperado, sino un gel insoluble tanto en disolventes orgánicos (THF) como en agua (Figura 26). Esto se puede atribuir al efecto gel, por la alta viscosidad del medio la

terminación de las cadenas está impedida con lo que siguen propagando, dando lugar a cadenas de altísimo peso molecular y a reacciones secundarias que producen el entrecruzamiento de las mismas. Para poder obtener copolímeros útiles, se alteraron estas reacciones cambiando las condiciones de polimerización (reacciones P9, P10, P11, P12 y P13).

Tabla 1. Condiciones y resultados de la síntesis de copolímeros Poli(OEGMA-co-AEMA).

Precursor	Relación inicial OEGMA/AEMA (mol %)	CTA (mg)	AIBN (mg)	Dioxano (mL)	t (h)	^a AEMA (mol %)	^b M _w (KDa)	^c PDI = M _w / M _n	^d Rendimiento (%)
P1	75/25	20	2.35	3	24	26	49.1	1.05	53
P2	70/30	20.9	2.45	3	24	21	47.3	1.06	62
P3	66.6/33.3	21.96	2.58	3	24	28	43.0	1.07	56
P4	66.6/33.3	11.29	1.33	3	24	31	121.7	1.08	55
P5*	60/40	12.54	1.07	3	24	---	---	---	---
P6	60/40	12.54	1.22	3	24	37	133.2	1.10	74
P7*	60/40	12.54	1.47	1.5	24	---	---	---	---
P8*	60/40	12.54	1.07	3	24	---	---	---	---
P9	60/40	12.54	1.47	1.5	5,3	36	158.3	1.14	68
P10	60/40	12.54	1.47	4	24	34	103.4	1.23	84
P11	60/40	12.54	1.47	5	24	35	76.1	1.23	96
P12	60/40	12.54	1.47	3	20	35	194.0	1.06	79
P13	60/40	13.91	1.64	3	24	35	175.0	1.08	79
P14	55/45	15.15	1.78	3	24	40	208.0	1.05	76
P15	55/45	15.15	1.78	3.8	24	41	120.4	1.16	83
P16	75/25	11.14	1.31	3	24	20	90.4	1.10	74
P17	80/20	9.87	1.16	3	24	11	110.1	1.04	55
P18	70/30	9.29	1.09	3	24	7	67.2	1.08	61
P19	65/35	12.87	1.51	3	24	31	136.0	1.12	72
P20	50/50	16.71	1.96	3	24	44	293.6	1.19	85
P21	50/50	25.09	2.95	3	24	43	94.3	1.32	87

^a El contenido de AEMA en el copolímero se ha determinado mediante ¹H RMN. ^b El peso molecular ha sido determinado mediante SEC/MALS en THF (dn/dc = 0.115). ^c El rendimiento (%) = (gramos obtenidos de copolímero / gramos de monómeros en la alimentación) x 100. * Geles insolubles.

En el caso de P9 (equivalente a P7) para evitar el efecto gel se bajó el tiempo de reacción a 5.3 h; de esta manera las cadenas no crecieron durante tanto tiempo, evitando el incremento de la viscosidad que lleva al efecto de autoaceleración y las posteriores reacciones de reticulación. De esta forma, se obtuvo un copolímero de peso molecular considerable M_w = 158.3 KDa y polidispersidad controlada (PDI = 1.14).

Para P10, P11, P12 y P13 se probó a cambiar diversas condiciones: en P10 y P11 se usó más disolvente; 4 y 5 mL, respectivamente. A mayor cantidad de disolvente la viscosidad del medio se reduce y el calor se disipa más efectivamente, con lo que se evitó el efecto gel, pero el peso molecular obtenido fue muy bajo: 88.1 y 76.4 KDa. Un problema observado fue que cuanto más disolvente se empleaba más reacciones de transferencia a éste se producían, obteniéndose pesos moleculares más bajos. Además, las reacciones de transferencia hacen que las cadenas no crezcan tan uniformemente, con lo que la polidispersidad aumentó notablemente ($PDI = 1.23$). En P12 el tiempo de reacción se bajó a 20 h, y el resultado fue bueno: peso molecular bastante alto 211.3 KDa y muy baja polidispersidad ($PDI = 1.07$). En el último caso, P13, se aumentó la cantidad de iniciador (bajando la relación molar monómeros/CTA), con lo que también se obtuvo un buen resultado: $M_w = 161.7$ KDa y $PDI = 1,08$. Al aumentar la cantidad de iniciador hay más radicales que propagan, con lo que a cada cadena se le adiciona(n), en promedio, menos monómero(s) y la viscosidad no es tan grande.

Los valores de índice de polidispersidad para las reacciones descritas en la Tabla 1 son buenos, entre 1.03 – 1.32, una polidispersidad bastante controlada. En la mayoría de las reacciones, ésta es menor de $PDI = 1.14$; sobrepasan ese valor las reacciones en las que se ha utilizado más disolvente (P10, P11 y P15) y en las que la proporción de AEMA en la alimentación es de un 50 mol % (P20 y P21). Por lo tanto, se puede concluir que las condiciones de síntesis son buenas, y que el agente RAFT (CPADB) es muy efectivo para este sistema.

Protocolo 1: Síntesis en agua de nanopartículas poliméricas unimoleculares metalo-plegadas basadas en copolímeros Poli(OEGMA-co-AEMA)

Se han seleccionado los precursores que se ha considerado más útiles para hacer comparaciones, y con ellos se han sintetizado las nanopartículas unimoleculares metalo-plegadas en agua, a través de la siguiente reacción: ¹⁵

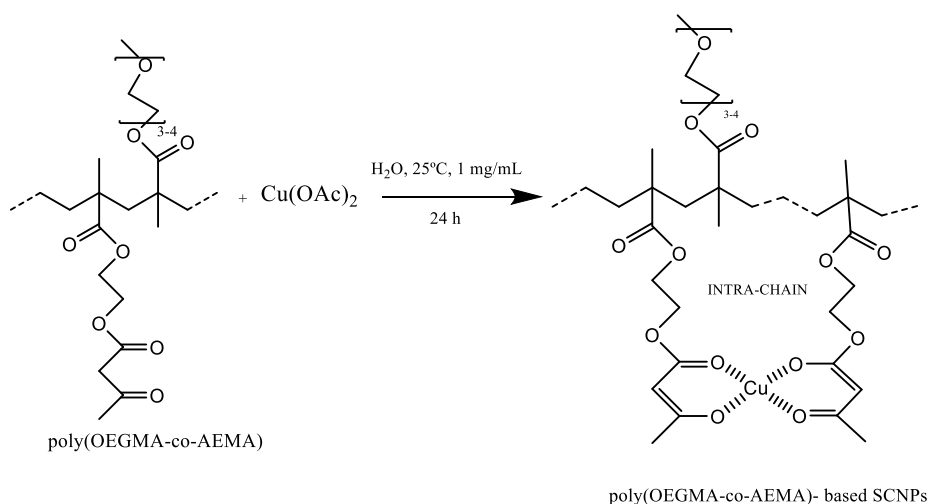


Figura 28. Síntesis en agua de nanopartículas poliméricas unimoleculares metalo-plegada basadas en Poli(OEGMA-co-AEMA) empleando 0.5 equivalentes de Cu(OAc)_2 con respecto a los equivalentes de AEMA.

Las nanopartículas sintetizadas fueron analizadas mediante RMN para comprobar que se han formado nuevos enlaces que inducen cambios en el espectro (ver como ejemplo la Figura 29). El espectro RMN de las SCNPs muestra un ensanchamiento significativo de las bandas, que se atribuye a la movilidad reducida de los protones una vez formadas las nanopartículas, así como a la presencia de los átomos de cobre paramagnéticos. Este efecto se ha observado en todos los espectros ^1H RMN de las nanopartículas sintetizadas (ver Anexo).

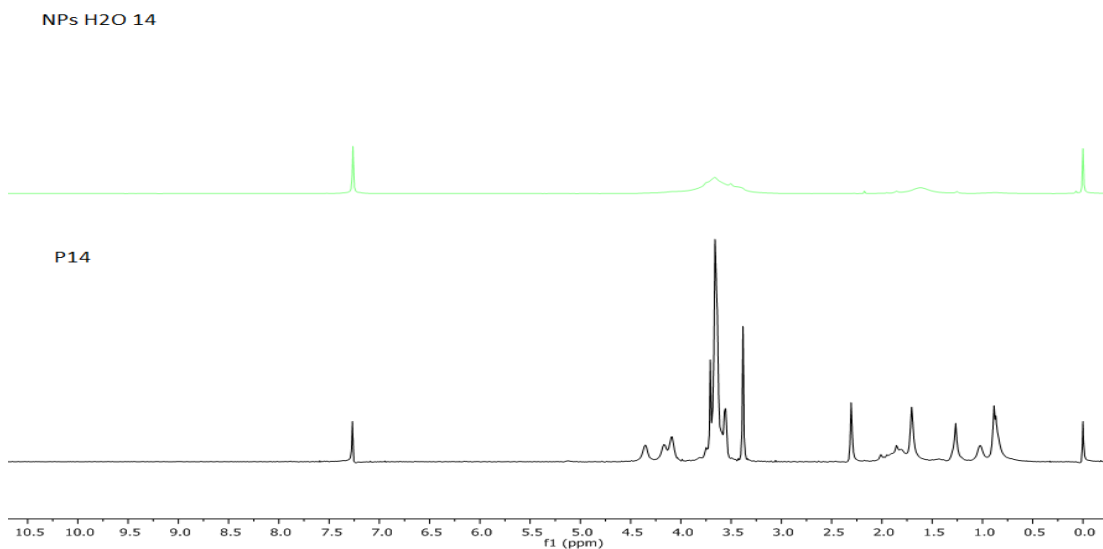


Figura 29. Espectros de ^1H RMN en cloroformo del precursor 14 con un contenido de AEMA del 39 mol% (en negro) y las nanopartículas correspondientes sintetizadas en agua (en verde).

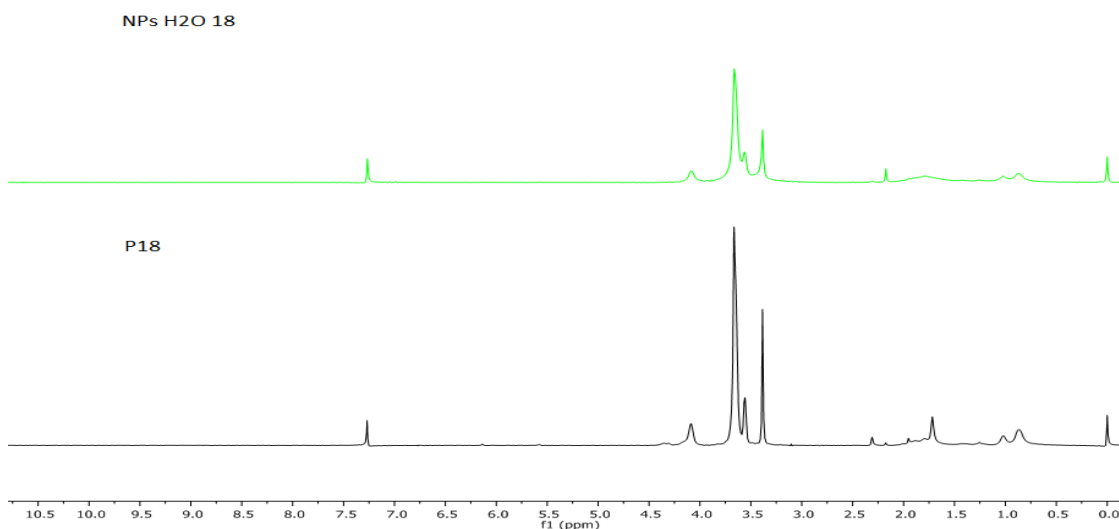


Figura 30. Espectros de ^1H RMN en cloroformo del precursor 18 con un contenido de AEMA del 7 mol% (en negro) y las nanopartículas correspondientes sintetizadas en agua (en verde).

En el caso de las nanopartículas con bajo contenido de AEMA (NPs 17 y NPs 18) el espectro RMN cambia, pero los cambios son menos acusados (Figura 30). Esto se debe a que cuando el

contenido en AEMA es bajo, hay muy pocos grupos con los que pueda formar enlace el Cu(II); si hay pocos enlaces intramoleculares los protones tienen mayor movilidad, además la cantidad de cobre es baja con lo que la presencia de iones paramagnéticos es menor. Aunque estos espectros no demuestran que las SCNPs se hayan formado, el incremento en el tiempo de retención en las medidas de SEC sí lo confirmó, como se muestra en el siguiente apartado.

Efecto del contenido en AEMA

Para ver que es lo que ocurre cuando se aumenta la cantidad de AEMA (el monómero con el grupo funcional reactivo) se han elegido diversos precursores que tienen un peso molecular cercano (entre 67.2 y 110.1 KDa). Los resultados de SEC con triple detección se muestran a continuación en la siguiente Tabla:

Tabla 2. Resumen de los resultados de SEC para determinar el efecto del contenido en AEMA. Precursores (P) en gris, y nanopartículas sintetizadas en agua (NPs H₂O) en verde.

Muestra	^a AEMA (mol %)	^b t_R (min)	^b M_w (KDa)	^b $PDI = (M_w/M_n)$	^b R_g (nm)	^b R_h (nm)	^c $ \Delta R_g $ (%)	^d $ \Delta R_h $ (%)
P18	7	8.13	67.2	1.08	9.2	6.5		
NPs H ₂ O 18		8.29	66.8	1.14	8.9	6.2	3	5
P17	11	8.10	110.1	1.04	12.6	7.9		
NPs H ₂ O 17		8.37	94.2	1.12	11	7	13	11
P16	20	8.18	90.4	1.10	9.5	7.1		
NPs H ₂ O 16		8.28	88.1	1.07	8.2	6.3	14	11
P10	34	7.99	103.4	1.23	12.1	8		
NPs H ₂ O 10		8,14	102.9	1.10	9.7	6.8	20	15
P21	43	8.05	94.3	1.32	8.5	7		
NPs H ₂ O 21		8.62	81.2	1.09	(4)*	5	(53)*	29

^a El contenido de AEMA se ha determinado mediante ¹H RMN. ^b El tiempo de retención (t_R), peso molecular promedio en peso (M_w), índice de polidispersidad, radio de giro (R_g) y radio hidrodinámico (R_h) han sido determinados mediante SEC con triple detección en THF ($dn/dc = 0.115$). ^c $|\Delta R_g| = |(R_g(\text{SCNPs H}_2\text{O}) - R_g(\text{precursor})) / R_g(\text{precursor})| \times 100$. ^d $|\Delta R_h| = |(R_h(\text{SCNPs H}_2\text{O}) - R_h(\text{precursor})) / R_h(\text{precursor})| \times 100$. * Valor fuera del límite de detección del detector MALS.

Al aumentar la cantidad de AEMA hay mayor reducción del radio hidrodinámico y del radio de giro. Cuando el porcentaje de AEMA es muy bajo (ver P18, 7 mol% de AEMA) la reducción es muy pequeña, prácticamente no hay grupos funcionales reactivos que induzcan el colapso del precursor y la nanopartícula que se obtiene es prácticamente del mismo tamaño que el precursor (radio hidrodinámico un 5 % más pequeño y radio de giro un 3 % más pequeño). A medida que se aumenta la cantidad de AEMA, hay más grupos reactivos que forman enlaces con el cobre, con lo que se consigue un grado de compactación mayor. A partir del 40 % de AEMA la reducción es mucho mayor, si bien deja de ser posible una determinación fiable del valor de radio de giro ya que queda claramente fuera del límite de detección del detector MALS (no así el radio hidrodinámico, cuyo valor sí es fiable).

Efecto del peso molecular

Viendo que cuando el porcentaje de AEMA es grande el grado de compactación en las SCNPs es mayor, para ver cómo afecta el peso molecular se han sintetizado nanopartículas de alrededor de 35 % de AEMA y de 43 % de AEMA con diferentes pesos moleculares. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 3 y 4.

Tabla 3. Resumen de los resultados de SEC para determinar el efecto del peso molecular para precursores con un contenido en AEMA del 35 mol%. Precursores (P) en gris, y nanopartículas sintetizadas en agua (NPs H₂O) en verde.

Muestra	^a AEMA (mol %)	^b t_R (min)	^b M_w (KDa)	^b $PDI = (M_w/M_n)$	^b R_g (nm)	^b R_h (nm)	^c $ \Delta R_g $ (%)	^d $ \Delta R_h $ (%)
P10	34	7.99	103.4	1.23	12.1	8		
NPs H ₂ O 10		8.16	102.9	1.10	9.7	6.8	20	15
P13	35	7.96	175.0	1.08	15.6	9.8		
NPs H ₂ O 13		8.16	174.6	1.04	11.3	8	28	18
P12	35	7.98	194.0	1.06	16.3	11		
NPs H ₂ O 12		8.14	194.8	1.06	12.4	9.5	24	14

^a El contenido de AEMA se ha determinado mediante ¹H RMN. ^b El tiempo de retención (t_R), peso molecular promedio en peso (M_w), índice de polidispersidad, radio de giro (R_g) y radio hidrodinámico (R_h) han sido determinados mediante SEC con triple detección en THF ($dn/dc = 0.115$). ^c $|\Delta R_g| = |(R_g(\text{SCNPs H}_2\text{O}) - R_g(\text{precursor})) / R_g(\text{precursor})| \times 100$. ^d $|\Delta R_h| = |(R_h(\text{SCNPs H}_2\text{O}) - R_h(\text{precursor})) / R_h(\text{precursor})| \times 100$.

Tabla 4. Resumen de los resultados de SEC para determinar el efecto del peso molecular para precursores con un contenido en AEMA del 43 mol%. Precursores (P) en gris, y nanopartículas sintetizadas en agua (NPs H₂O) en verde.

Muestra	^a AEMA (mol %)	^b t_R (min)	^b M_w (KDa)	^b $PDI = (M_w/M_n)$	^b R_g (nm)	^b R_h (nm)	^c $ \Delta R_g $ (%)	^d $ \Delta R_h $ (%)
P21	43	8.05	94.3	1.32	8.5	7		
NPs H ₂ O 21		8.43	81.2	1.09	(4)*	5	(53)*	29
P20	43	7.83	293.6	1.19	18.4	10.5		
NPs H ₂ O 20		8.29	186.2	1.03	7.9	8.5	57	19

^a El contenido de AEMA se ha determinado mediante ¹H RMN. ^b El tiempo de retención (t_R), peso molecular promedio en peso (M_w), índice de polidispersidad, radio de giro (R_g) y radio hidrodinámico (R_h) han sido determinados mediante SEC con triple detección en THF ($dn/dc = 0.115$). ^c $|\Delta R_g| = |(R_g(\text{SCNPs H}_2\text{O}) - R_g(\text{precursor})) / R_g(\text{precursor})| \times 100$. ^d $|\Delta R_h| = |(R_h(\text{SCNPs H}_2\text{O}) - R_h(\text{precursor})) / R_h(\text{precursor})| \times 100$. * Valor fuera del límite de detección del detector MALS.

Los resultados muestran que aumentar el peso molecular no afecta mucho en la reducción del radio hidrodinámico y del radio de giro. En la comparación de las muestras con 35 mol% de AEMA, las tres muestras analizadas dan una reducción de alrededor de 16 % en R_h y 24 % en

R_g . Por su parte, las muestras con 43 mol % de AEMA muestran una reducción de alrededor de 24 % en R_h y > 50 % en R_g .

Efecto de la concentración de precursor

La Tabla 5 y la Figura 31 muestran los resultados obtenidos al aumentar hasta 2 órdenes de magnitud la concentración del precursor con 40 mol% de AEMA durante la síntesis de las nanopartículas en agua: 1 mg/mL, 10 mg/mL, y 100 mg/mL.

Tabla 5. Resumen de los resultados de SEC para determinar el efecto de la concentración de precursor. Precursores (P) en gris, y nanopartículas sintetizadas en agua (NPs H₂O) en verde.

Muestra	^a Concentración (mg/mL)	^b t_R (min)	^b M_w (KDa)	^b $PDI = (M_w/M_n)$	^b R_g (nm)	^b R_h (nm)	^c $ \Delta R_g $ (%)	^d $ \Delta R_h $ (%)
P14		7.95	208.0	1.05	16.4	11		
NPs H ₂ O 14-1	1	8.14	206.5	1.05	9.1	8	45	27
NPs H ₂ O 14-10	10	8.22	137.2	1.10	8.9	6.8	45	38
NPs H ₂ O 14-100	100	8.38	71.3	1.04	(5.6)*	5	(66)*	55

^a Concentración de precursor durante la síntesis de las SCNPs. ^b El tiempo de retención (t_R), peso molecular promedio en peso (M_w), índice de polidispersidad, radio de giro (R_g) y radio hidrodinámico (R_h) han sido determinados mediante SEC con triple detección en THF ($dn/dc = 0.115$). ^c $|\Delta R_g| = |(R_g(\text{SCNPs H}_2\text{O}) - R_g(\text{precursor})) / R_g(\text{precursor})| \times 100$. ^d $|\Delta R_h| = |(R_h(\text{SCNPs H}_2\text{O}) - R_h(\text{precursor})) / R_h(\text{precursor})| \times 100$. * Valor fuera del límite de detección del detector MALS.

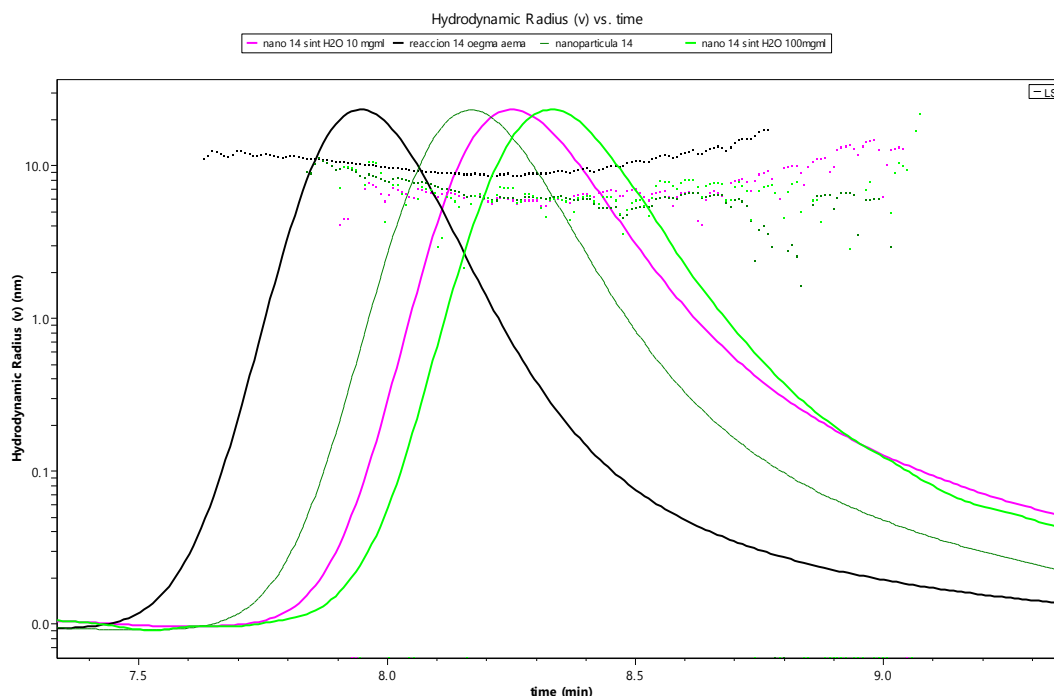


Figura 31. Cromatogramas de SEC obtenidos para el precursor 14 (línea negra), nanopartículas sintetizadas en H₂O a 1 mg/mL (línea verde oscuro), nanopartículas sintetizadas en H₂O a 10 mg/mL (línea rosa) y nanopartículas sintetizadas en H₂O a 100 mg/mL (línea verde claro).

En general, concentrar el sistema durante la síntesis produce SCNPs más compactas como se aprecia a la vista de los resultados de la Tabla 1. Como se ve en la Figura 31, la síntesis puede llevarse a cabo hasta una concentración de 100 mg/mL sin apreciarse problemas de agregación. Esto es debido, presumiblemente, al efecto estérico estabilizante que introducen las ramas de oligoetilenglicol sobre la estructura “core-shell” de las nanopartículas poliméricas unimoleculares y es muy interesante de cara al escalado de la producción de SCNPs para potenciales aplicaciones.

Protocolo 2: Síntesis en THF de nanopartículas poliméricas unimoleculares metalo-plegadas basadas en copolímeros Poli(OEGMA-co-AEMA)

Se han seleccionado algunos de los precursores anteriores para sintetizar las nanopartículas en THF, y compararlas con las sintetizadas en agua (protocolo 1). En el caso de la síntesis en THF la reacción es la siguiente:

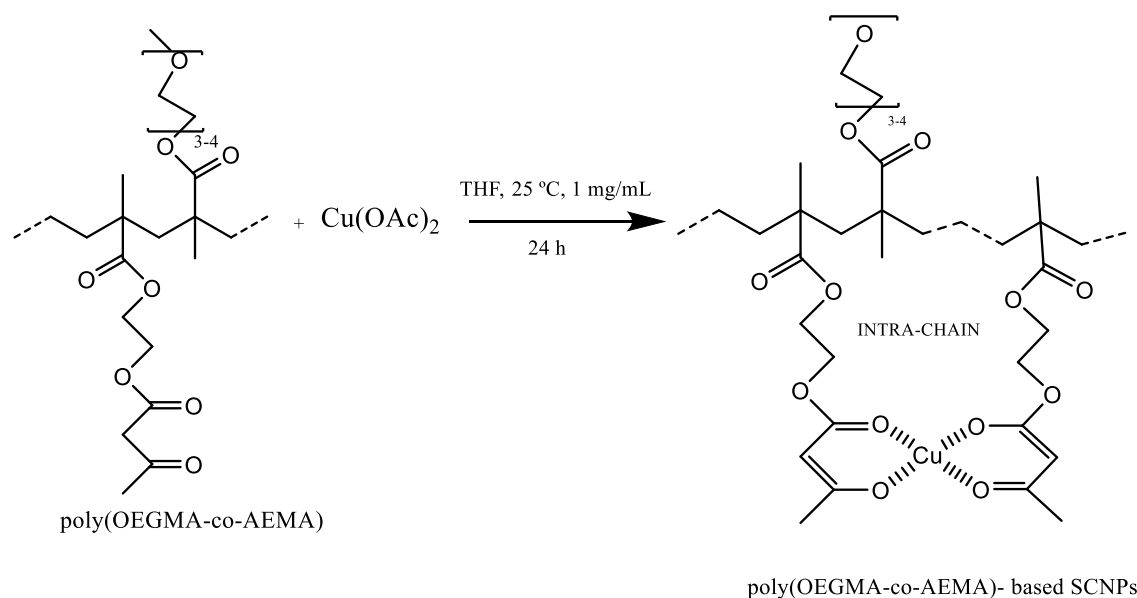


Figura 32. Síntesis en THF de nanopartículas poliméricas unimoleculares metalo-plegada basadas en Poli(OEGMA-co-AEMA) empleando 0.5 equivalentes de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ con respecto a los equivalentes de AEMA.

Comparación de resultados y medidas adicionales

Resultados de RMN

Todas las nanopartículas sintetizadas en THF, fueron analizadas mediante ^1H RMN, para comprobar la formación de los nuevos enlaces con el cobre y poder ver si hay alguna diferencia con los espectros de las SCNPs sintetizadas en agua (ver Figuras 33 y 34).

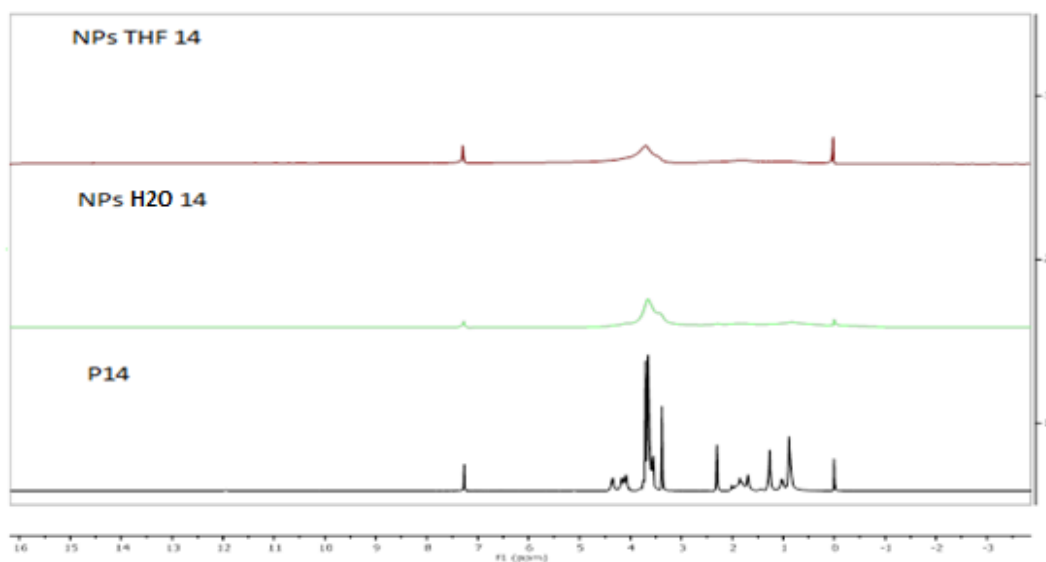


Figura 33. Espectros de ^1H RMN en cloroformo del precursor 14 con un contenido de AEMA del 39 mol% (en negro) y las nanopartículas correspondientes sintetizadas en agua (en verde) y en THF (en rojo).

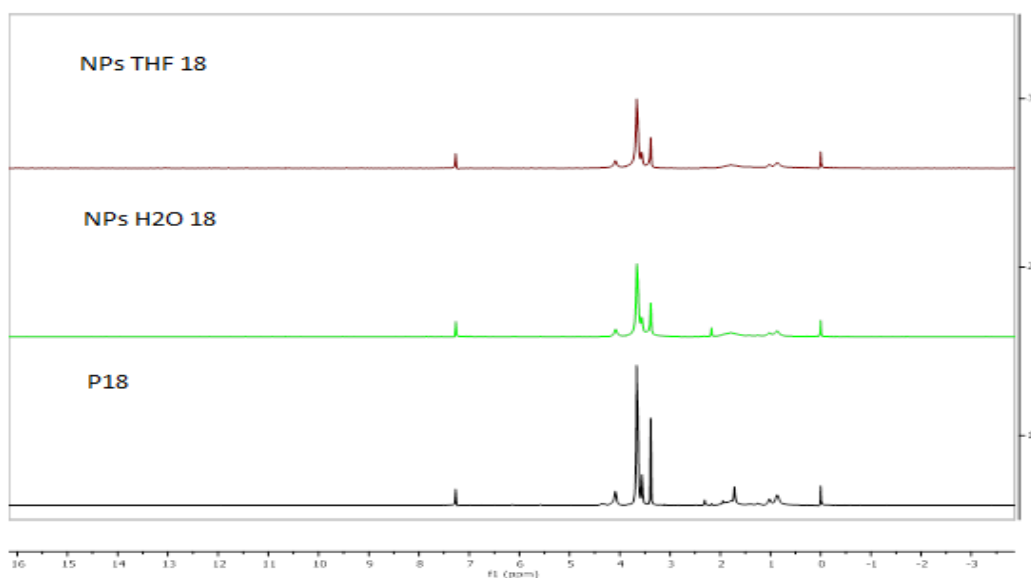


Figura 34. Espectros de ^1H RMN en cloroformo del precursor 18 con un contenido de AEMA del 7 mol% (en negro) y las nanopartículas correspondientes sintetizadas en agua (en verde) y en THF (en rojo).

En las SCNPs sintetizadas en THF, al igual que el de las sintetizadas en agua, los espectros muestran un significativo ensanchamiento de las bandas, lo que atribuimos a la formación de las nanopartículas. Tanto cuando es baja la cantidad de AEMA como cuando es alta, los espectros de RMN de las nanopartículas sintetizadas en H₂O y THF son muy parecidos (ver Anexo).

Resultados de SEC

Los resultados comparativos de SEC para los Protocolos 1 (síntesis en H₂O) y 2 (síntesis en THF) se recogen en la siguiente Tabla:

Tabla 6. Resultados comparativos de la síntesis con Cu(OAc)₂ de nanopartículas basadas en Poli(OEGMA-co-AEMA) en H₂O y en THF. Precursores (Px) en gris, nanopartículas sintetizadas en agua (NPs H₂O x) en verde y nanopartículas sintetizadas en THF (NPs THF x) en rojo.

Muestra	^a AEMA (mol %)	^b t_R (min)	^b M_w (KDa)	^b $PDI = (M_w/M_n)$	^b R_g (nm)	^b R_h (nm)	^c $ \Delta R_g $ (%)	^d $ \Delta R_h $ (%)
P17	11	8.10	110.1	1.04	12.6	7.9		
NPs H ₂ O 17		8.37	94.2	1.12	11	7	13	11
NPs THF 17		8.15	100.3	1.16	11.1	7	12	11
P16	20	8.18	90.4	1.10	9.5	7.1		
NPs H ₂ O 16		8.28	88.1	1.07	8.2	6.3	14	11
NPs THF 16		8.24	103.4	1.09	8.3	6.6	13	7
P13	35	7.96	175.0	1.08	15.6	9.8		
NPs H ₂ O 13		8.16	174.6	1.04	11.3	8	28	18
NPs THF 13		8.03	172.2	1.13	11.8	8.1	24	17
P14	40	7.95	208.0	1.05	16.4	11		
NPs H ₂ O 14		8.14	206.5	1.05	9.1	8.2	45	26
NPS THF 14		8.04	200.3	1.07	13.4	8.4	18	24
P20	43	7.83	293.6	1.19	18.4	10.5		
NPs H ₂ O 20		8.29	186.2	1.03	7.9	8.5	57	19
NPs THF 20		8.16	287.1	1.04	9	9.4	51	11

^a El contenido de AEMA se ha determinado mediante ¹H RMN. ^b El tiempo de retención (t_R), peso molecular promedio en peso (M_w), índice de polidispersidad, radio de giro (R_g) y radio hidrodinámico (R_h) han sido determinados mediante SEC con triple detección en THF ($dn/dc = 0.115$). ^c $|\Delta R_g| = |(R_g(\text{SCNPs H}_2\text{O}) - R_g(\text{precursor})) / R_g(\text{precursor})| \times 100$. ^d $|\Delta R_h| = |(R_h(\text{SCNPs H}_2\text{O}) - R_h(\text{precursor})) / R_h(\text{precursor})| \times 100$.

Cuando el porcentaje de AEMA es bajo, las nanopartículas sintetizadas en agua y las sintetizadas en THF son prácticamente del mismo tamaño (ver Figura 35). A medida que aumenta la cantidad de AEMA hay diferencias más significativas entre ellas y a partir de un 40 mol % de AEMA las nanopartículas sintetizadas en agua presentan tiempos de retención más

largos a consecuencia de su mayor compactación (en general, R_g y R_h más pequeños) (ver Figura 36), (ver anexo).

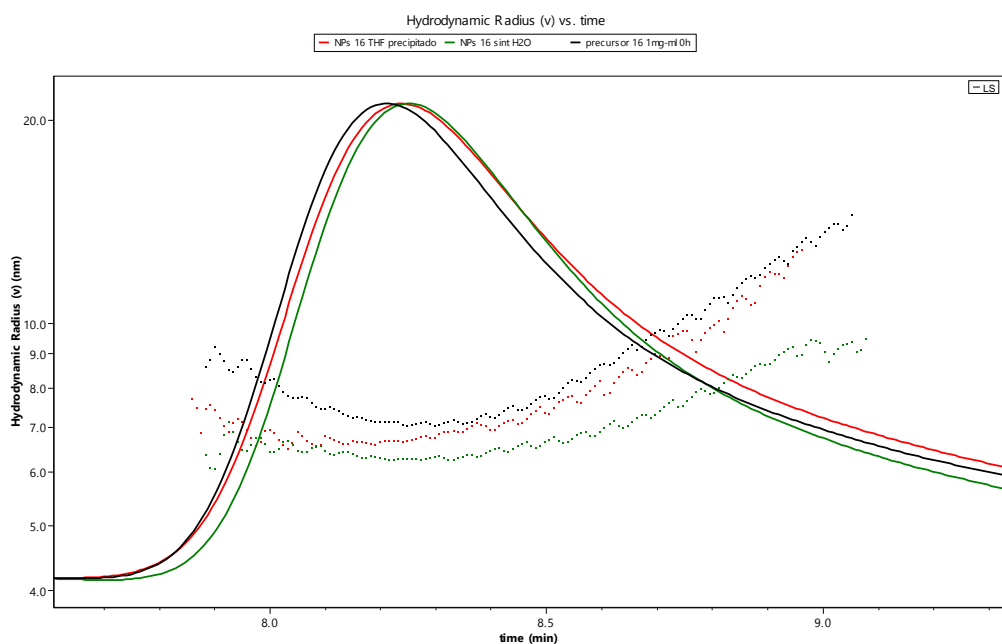


Figura 35. Cromatograma SEC (línea continua) y radio hidrodinámico (R_h) (línea discontinua) para el precursor P16 (línea negra), nanopartículas sintetizadas en THF (línea roja) y nanopartículas sintetizadas en H_2O (línea verde).

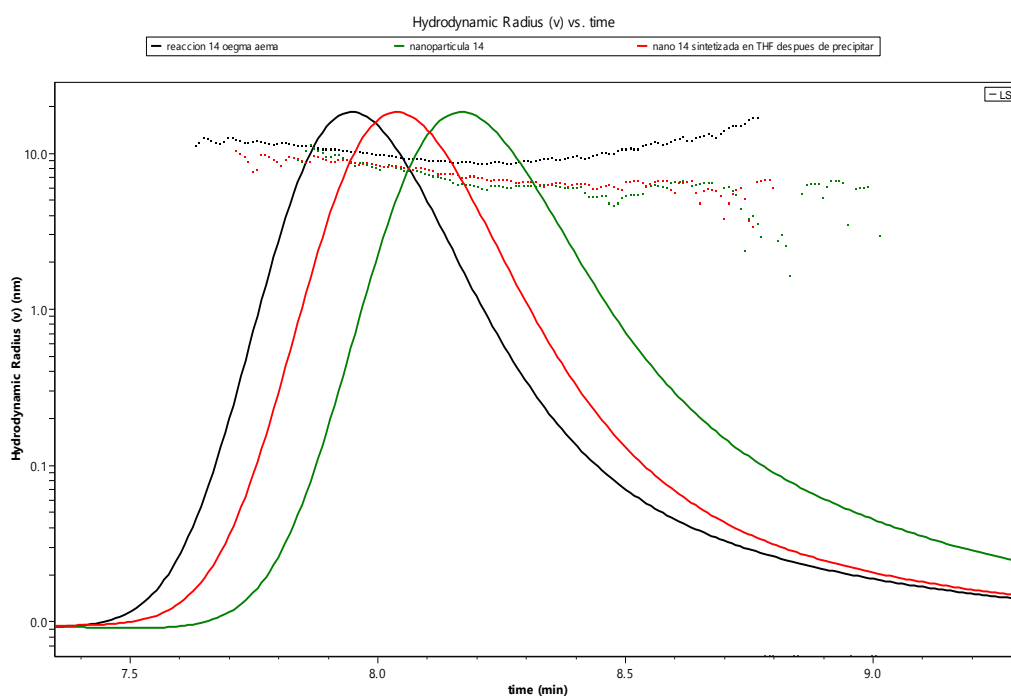


Figura 36. Cromatograma SEC (línea continua) y radio hidrodinámico (R_h) (línea discontinua) para el precursor P14 (línea negra), nanopartículas sintetizadas en THF (línea roja) y nanopartículas sintetizadas en H_2O (línea verde).

Se ha seleccionado el precursor P14, con sus respectivas nanopartículas, para su estudio completo por TGA, AE y SAXS, complementando los resultados obtenidos con los de simulaciones por ordenador.

Resultados de TGA

Se realizaron medidas de TGA para el precursor P14 y las correspondientes SCNPs sintetizadas mediante los Protocolos 1 y 2, como se ilustra en la Figura 37.

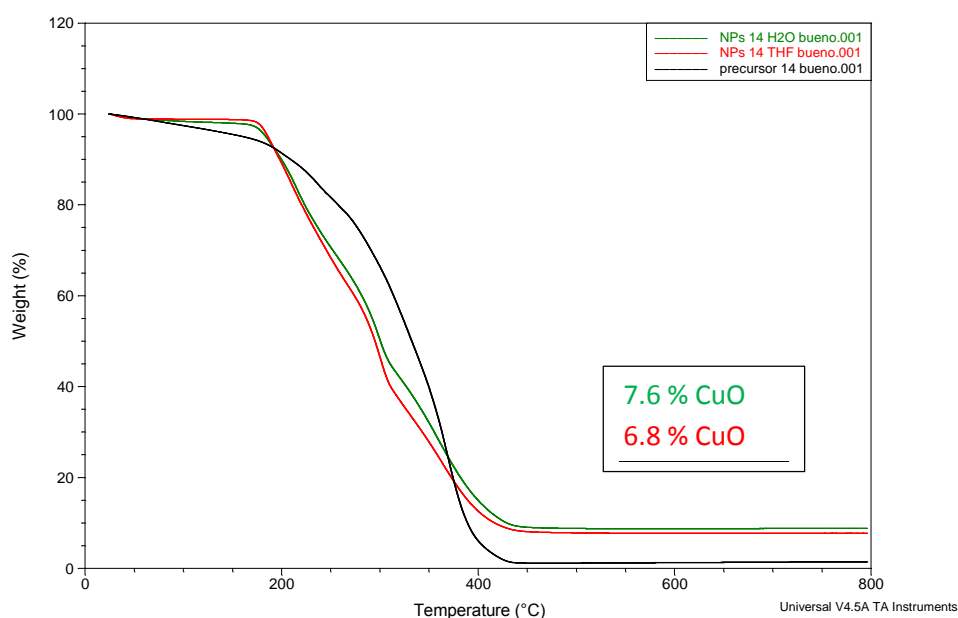


Figura 37. Curvas de TGA para el precursor P14 (línea negra) y para las nanopartículas sintetizadas en agua (línea verde) y en THF (línea roja). El residuo de color negro tras la calcinación de la muestra corresponde a óxido de cobre (II) en ambos casos.

Por lo que a la estabilidad térmica se refiere, las dos nanopartículas se descomponen a la misma temperatura y la curva TGA tiene la misma forma.

El contenido de CuO de la nanopartícula sintetizada en agua (NPs H₂O 14) fue del 7.6 % y el de la sintetizada en THF (NPs THF 14) fue de 6.8 %; así, el porcentaje de cobre (Cu) de la muestra NPs H₂O 14 es del 6.1 % y el de la muestra NPs THF 14 del 5.5 % (ver Tabla 7).

Tabla 7. Resultados del TGA para la determinación del contenido de cobre de las SCNPs. Precursor (P) en gris, nanopartículas sintetizadas en agua (NPs H₂O) en verde y nanopartículas sintetizadas en THF (NPs THF) en rojo. (Peso molecular del CuO: 79.55 g/mol, Porcentaje de Cu: 80.0 %)

Muestra	Masa (mg)	Residuo a 600 °C (%)	Residuo (CuO) (%)	Cu (mg)	Cu (%)
P14	5.68	-	-	-	-
NPsH ₂ O	3.75	8.84	7.6	0.23	6.1
NPs THF	4.64	8.05	6.8	0.25	5.5

Resultados de AE

Se realizó una prueba de análisis elemental, para verificar la composición atómica del precursor y las nanopartículas. Los resultados se muestran en las Tablas 8 y 9.

Tabla 8. Porcentajes atómicos teóricos para las muestras P14, NPs H₂O 14, y NPs THF 14. Como la composición exacta del OEGMA no es conocida (el suministrador indica que el número de unidades repetitivas de óxido de etileno en el monómero está comprendido entre n=3 y n=4), los porcentajes atómicos teóricos se han calculado asumiendo n=3, n=4 y la media de los dos.

Porcentaje atómico teórico				
Muestra	C %	H %	O %	Cu %
P14 (n=3)	57.44	7.61	34.95	0.00
P14 (n=4)	58.44	7.95	33.10	0.00
Media P14	57.94	7.78	34.03	0.00
NPs H ₂ O 14 (n=3)	54.66	7.14	33.07	5.13
NPs H ₂ O 14 (n=4)	56.13	7.46	31.28	5.13
media NPs H ₂ O 14	55.40	7.30	32.18	5.13
NPs THF 14 (n=3)	54.66	7.14	33.07	5.13
NPs THF 14 (n=4)	56.13	7.46	31.28	5.13
media NPs THF 14	55.40	7.30	32.18	5.13

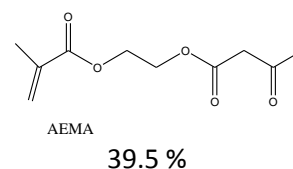
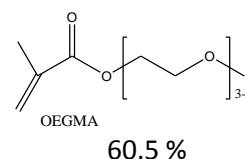


Tabla 9. Comparación entre la composición atómica teórica y la experimental para las muestras P14, NPs H₂O 14 y NPs THF 14.

Muestra	Composición atómica teórica						Composición atómica experimental					
	C %	H %	N %	S %	O %	^a Cu %	C %	H %	N %	S %	O %	^b Cu %
P14	57.9	7.8	-	-	34.3	-	54.6	7.7	0.1	0.2	37.4	-
NPs H ₂ O 14	55.4	7.3	-	-	32.2	5.1	52.4	7.3	0.1	0.3	33.8	6.1
NPs THF 14	55.4	7.3	-	-	32.2	5.1	52.5	7.3	0.1	0.1	34.6	5.4

^a Contenido de cobre calculado asumiendo que cada átomo de Cu está complejado por 2 unidades AEMA. ^b Contenido de Cu determinado experimentalmente por TGA (Tabla 7).

Teniendo en cuenta que la fórmula química del OEGMA no es exacta, así como el error inherente a la técnica de AE, los resultados experimentales muestran bastante buena concordancia con los valores teóricos. Se deduce que la incorporación de Cu a las nanopartículas es cuantitativa. El pequeño contenido en nitrógeno y el azufre de las muestras viene del CPADB y del AIBN. Como se ha indicado anteriormente al discutir la reacción de síntesis del precursor (ver Figura 25), los grupos funcionales de estos compuestos se quedan en las terminaciones de las cadenas, por lo que era de esperar encontrar trazas de estos compuestos en las medidas de AE.

Resultados de SAXS

Se llevaron a cabo medidas complementarias de SAXS, para determinar el tamaño y el grado de compactación en THF del precursor P14 y las SCNPs sintetizadas a través de los Protocolos 1 (síntesis en agua) y 2 (síntesis en THF). Las medidas fueron llevadas a cabo por **Arantxa Arbe** y **Amaia Iturrospe**. Las correspondientes curvas de SAXS se muestran en la Figura 38 y los datos de R_g y ν (exponente de Flory) obtenidos del ajuste de las curvas en la Tabla 10.

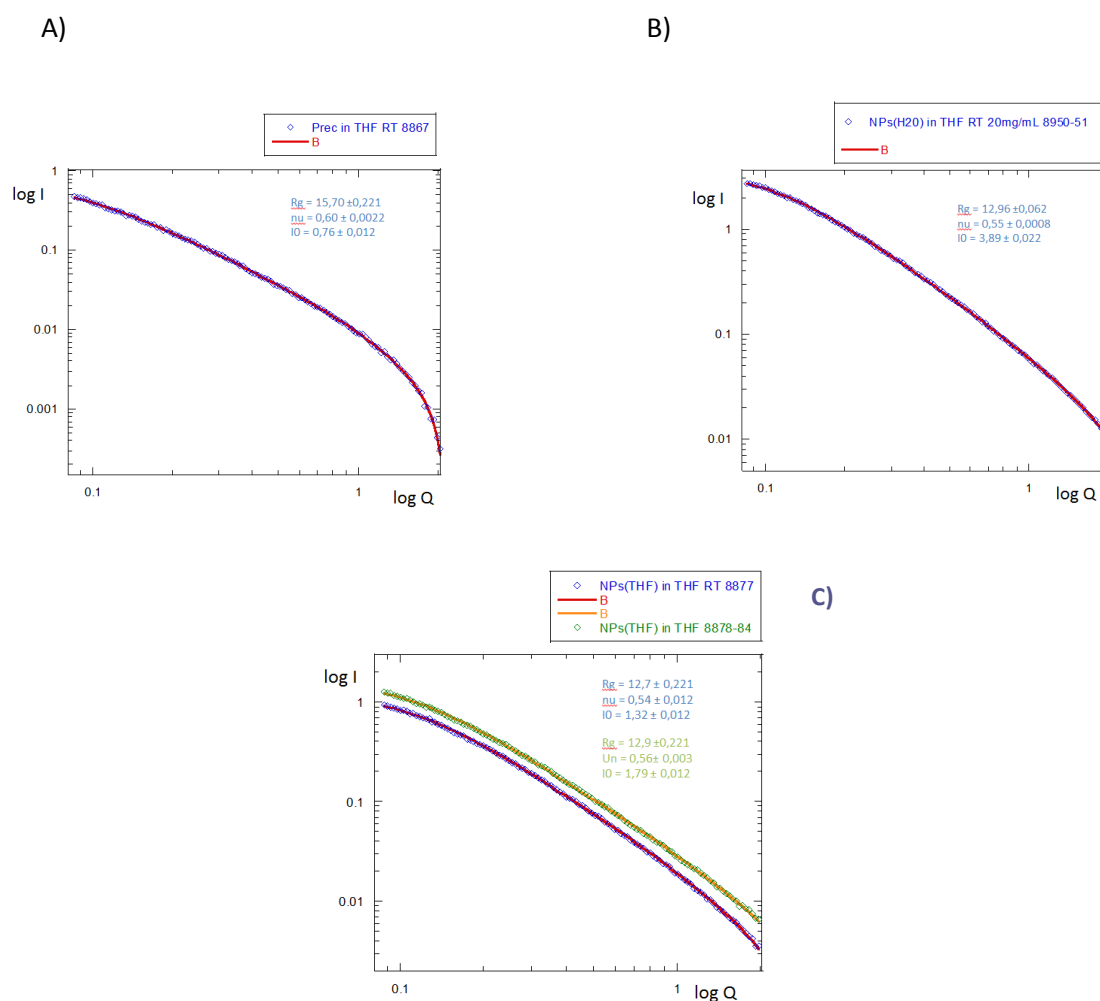


Figura 38. Curvas de SAXS: A) Precursor P14 en THF a 25 °C. B) Nanopartículas NPs H₂O 14 en THF a 25 °C. C) Nanopartículas NPs THF 14 en THF a 25 °C (puntos azules) y a 50 °C (puntos verdes).

Tabla 10. Resultados de SAXS para las muestras P14, NPs H₂O 14, y NPs THF 14.

Muestra	T (°C)	^a R _g (SAXS) (nm)	^a v (Exponente de Flory)	^b R _g (SEC) (nm)	^b R _h (SEC) (nm)
P14	25	15.7	0.60	16.4	11
NPs H ₂ O 14	25	12.9	0.55	9.1	8.2
NPs THF 14	25	12.7	0.54	13.4	8.4

^a Datos obtenidos mediante SAXS. ^b Datos obtenidos mediante GPC.

El precursor P14 en THF, a la vista del exponente de Flory obtenido, tiene una conformación de cadena extendida en buen disolvente. El valor de R_g determinado por SAXS a 25 °C (15.7 nm) está en buen acuerdo con el obtenido por SEC a 30 °C (16.4 nm).

Por su parte, las SCNPs obtenidas tanto por el Protocolo 1, como por el Protocolo 2 muestran valores de v inferiores a 0.6 que reflejan su nivel de compactación con respecto al precursor, si bien los valores de v están lejos del valor esperado para objetos globulares ($v = 0.33$), siendo más próximos al de cadenas en un disolvente θ ($v = 0.5$). A diferencia de lo observado por SEC, no se aprecian grandes diferencias en los valores de R_g determinados por SAXS a 25 °C para las SCNPs sintetizadas mediante el Protocolo 1 y el Protocolo 2.

Simulaciones por ordenador

Se realizaron simulaciones por ordenador para investigar si aun no habiendo grandes diferencias en el tamaño de las nanopartículas sintetizadas mediante el Protocolo 1 y el Protocolo 2, su estructura interna (distribución de los átomos de Cu) era diferente o no. Estas simulaciones fueron llevadas a cabo por **Angel Moreno** y **Federica Lo Verso**. Este estudio es de especial relevancia para posibles aplicaciones de dichas SCNPs en catálisis.

Se simuló un modelo simple en el que los precursores consistieron en cadenas de bolas y muelles con grupos laterales reactivos. Las SCNPs se generaron por entrecruzamiento intramolecular de dichas cadenas de precursor. Partiendo de distintas configuraciones de las cadenas de precursor, se generaron cientos de SCNPs que fueron empleadas para obtener los promedios estadísticos de las propiedades conformacionales. Las referencias 18 y 20 contienen una descripción más detallada del modelo y de los procedimientos de simulación empleados.

Se simularon 2 Protocolos equivalentes a los estudiados experimentalmente:

- Protocolo 1: Se empleó un precursor anfifílico, con una cadena solvofílica y grupos laterales solvofóbicos. Se impusieron condiciones de mal disolvente para dichos grupos solvofóbicos de forma que el precursor adoptaba una estructura alargada tipo “core-shell”, con los grupos reactivos solvofóbicos colapsado en el interior del “core”. Tras realizar el entrecruzamiento intramolecular de la SCNPs colapsadas, se reestablecieron condiciones de buen disolvente para determinar las propiedades conformacionales resultantes.

- Protocolo 2: El entrecruzamiento intramolecular se llevó a cabo en condiciones de buen disolvente.

Los resultados obtenidos se ilustran en las Figuras 39 y 40.

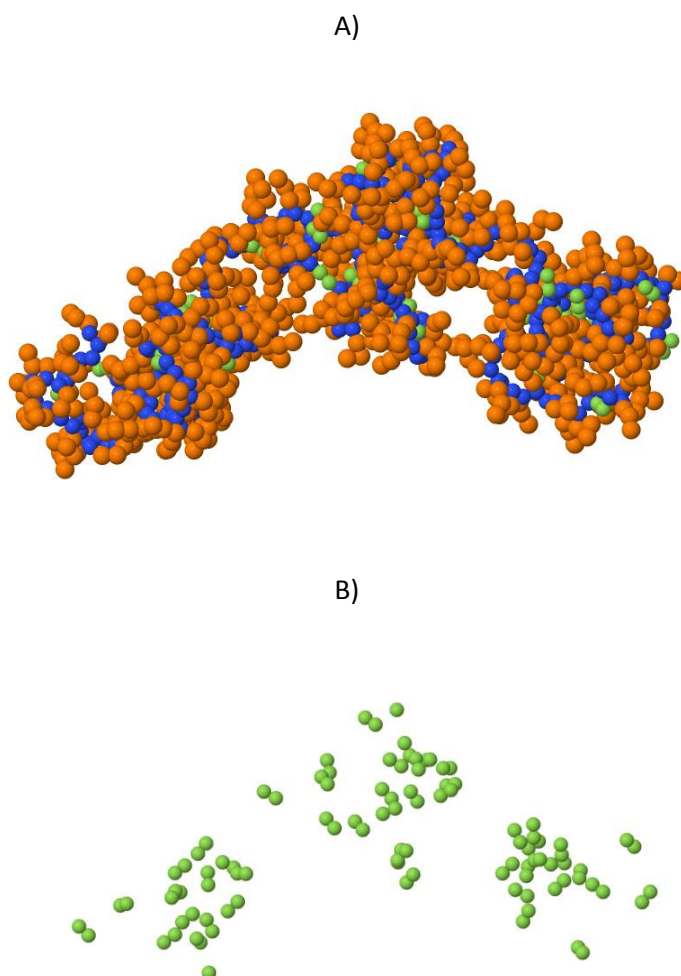
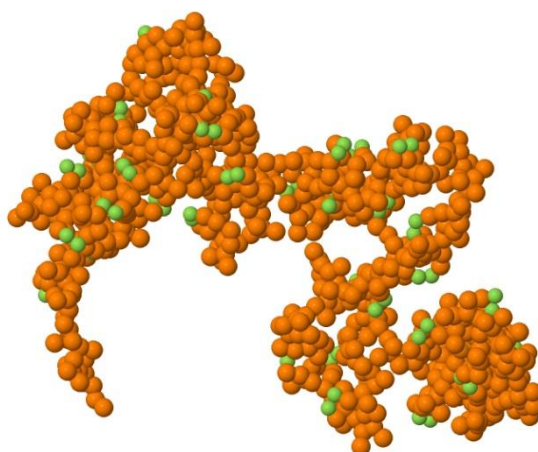


Figura 39. A) Morfología típica de una nanopartícula polimérica unimolecular en condiciones de buen disolvente, preparada mediante simulaciones por ordenador siguiendo el Protocolo 1. Las bolas verdes y azules representan grupos solvofóbicos reactivos e inertes del monómero AEMA. Las bolas naranjas representan grupos solvofílicos inertes del monómero OEGMA. B) Distribución de sitios catalíticos en la nanopartícula de acuerdo con las simulaciones por ordenador, donde cada pareja de bolas verdes está enlazada por 1 átomo de Cu.

A)



B)

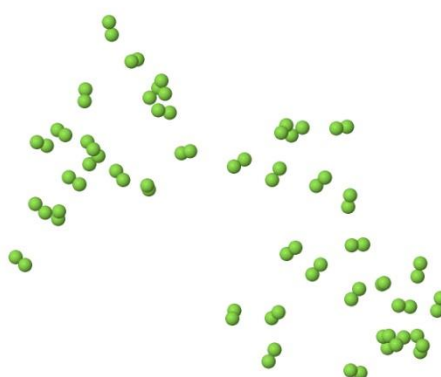


Figura 40. A) Morfología típica de una nanopartícula polimérica unimolecular en condiciones de buen disolvente, preparada mediante simulaciones por ordenador siguiendo el Protocolo 2. Las bolas verdes representan grupos solvofóbicos reactivos del monómero AEMA. Las bolas naranjas representan grupos solvofílicos inertes de los monómeros OEGMA y AEMA. B) Distribución de sitios catalíticos en la nanopartícula de acuerdo con las simulaciones por ordenador, donde cada pareja de bolas verdes está enlazada por 1 átomo de Cu.

Como puede apreciarse claramente al comparar las Figuras 39B y 40B, la distribución de sitios catalíticos (átomos de Cu) es muy diferente para las nanopartículas obtenidas por el Protocolo 1 y 2. En el primer caso, se observan agrupaciones (“clusters”) de sitios catalíticos, mientras que en el segundo hay una distribución espacial mucho más homogénea a lo largo de la nanopartícula. Estos resultados son muy prometedores ya que permitirían modular las propiedades catalíticas de las SCNPs, en función de su protocolo de síntesis.

CONCLUSIONES

En este trabajo se han sintetizado de forma eficiente toda una serie de nanopartículas poliméricas unimoleculares, SCNPs, metalo-plegadas basadas en copolímeros anfífilos de Poli(OEGMA-co-AEMA) de alto peso molecular, bajo índice de polidispersidad y diferentes contenidos de AEMA. Se han investigado 2 protocolos específicos de síntesis: Síntesis de las SCNPs en un disolvente selectivo (agua) seguido por transferencia a un buen disolvente de ambos monómeros (THF), denominado Protocolo 1, y síntesis de las SCNPs en un buen disolvente de ambos monómeros (THF), Protocolo 2.

Se ha observado por medidas de SEC con triple detección que el contenido de AEMA en el precursor tiene un efecto muy significativo en el grado de compactación de las SCNPs tanto para el caso del Protocolo 1, como para el caso del Protocolo 2. A bajos contenidos de AEMA el grado de compactación es bajo y sólo a contenidos de AEMA cercanos o superiores al 40 mol % la reducción en radio de giro y radio hidrodinámico es apreciable. Con respecto al Protocolo 1, para un contenido de AEMA dado no hay un efecto significativo del peso molecular en el nivel de compactación, al menos en el intervalo de pesos moleculares investigado en este trabajo. Hay que resaltar que en agua es posible obtener nanopartículas poliméricas individuales incluso a una concentración de precursor durante la síntesis de 100 mg/mL. Esto es debido al efecto estérico estabilizante que introducen las ramas de oligoetilenglicol sobre la estructura “core-shell” de las nanopartículas poliméricas unimoleculares, siendo esto muy interesante de cara al escalado de la producción de SCNPs para potenciales aplicaciones.

De acuerdo con los resultados de SEC, las SCNPs sintetizadas mediante el Protocolo 1 tienden a ser ligeramente más compactas en THF que las sintetizadas mediante el Protocolo 2, aunque a la vista de los resultados de SAXS estas diferencias serían mínimas. La presencia de cobre en las nanopartículas tiene un efecto significativo sobre el espectro de ^1H RMN, induciendo un notable ensanchamiento de las bandas. El contenido de cobre en las nanopartículas ha sido cuantificado por TGA y la composición atómica elemental por EA, siendo éste cuantitativo respecto al valor esperado y no habiendo diferencias apreciables entre las SCNPs preparadas por el Protocolo 1 o el 2. De acuerdo con los resultados de SAXS, los precursores se comportan como cadenas en buen disolvente, mientras que las SCNPs en THF tienen un comportamiento más parecido a cadenas en disolvente θ .

Aun teniendo las nanopartículas obtenidas por el Protocolo 1 y 2 grados de compactación similares, los resultados de simulaciones por ordenador revelan que la distribución de sitios catalíticos (átomos de Cu) es muy diferente en ambos casos. En el primero, se observan agrupaciones (o “clusters”) de sitios catalíticos, mientras que en el segundo hay una distribución espacial mucho más homogénea a lo largo de la nanopartícula. Estos resultados son de especial relevancia para posibles aplicaciones de dichas SCNPs en catálisis, ya que permitirían modular las propiedades catalíticas de las SCNPs, en función de su protocolo de síntesis.

CONCLUSIONS

In this work we have synthesized efficiently a variety of unimolecular polymeric nanoparticles, SCNPs, metallo-folded amphiphilic poly(OEGMA-co-AEMA) copolymers with high molecular weight, low polydispersity and different AEMA contents. We have investigated two specific synthetic protocols: Synthesis of SCNPs in a selective solvent (water) followed by transfer to a good solvent for both monomers (THF), so-called Protocol 1, and synthesis of SCNPs in a good solvent for both monomers (THF), so-called Protocol 2.

SEC measurements with triple detection showed that the AEMA content in the precursor has a significant effect on the degree of compaction of the SCNPs, for both the case of Protocol 1 and Protocol 2. When the AEMA content is low, the degree of compaction is low and only when the AEMA content is close to, or above, 40 mol% the reduction in radius of gyration and hydrodynamic radius is appreciable. With reference to Protocol 1, for a given AEMA content there is no significant effect of molecular weight on the level of compaction, at least in the molecular weight range investigated in this work. It should be noted that in water it is possible to obtain individual polymeric nanoparticles even at a concentration of precursor during the synthesis of 100 mg/mL. This is due to the steric stabilizer branches that introduced the OEGMA monomer on the "core-shell" structure of the unimolecular polymeric nanoparticles. This could be very interesting for the scaling of the SCNPs production for potential applications.

According to the SEC results, the SCNPs synthesized by Protocol 1 tend to be slightly more compact in THF than those synthesized by Protocol 2, but in view of the results from SAXS these differences would be minimal. The presence of copper in the nanoparticles has a significant effect on the ^1H NMR spectrum, inducing a remarkable band broadening. The copper content in the nanoparticles was quantified by TGA and EA, this quantity being the expected value with no significant differences between SCNPs prepared by Protocol 1 or 2. According to the SAXS results, the precursors behave as chains in a good solvent, while the SCNPs in THF have a similar behavior of a chain in θ solvent.

Even if the nanoparticles obtained by Protocol 1 and 2 show similar compaction degree, the results from computer simulations reveal that the distribution of catalytic sites (atoms of Cu) is very different in both kinds of SCNPs. In the first, clusters of catalytic sites are observed, while in the second the spatial distribution is a much more homogeneous throughout the nanoparticle. These results are particularly relevant for potential applications of these SCNPs in catalysis, allowing the tuning of the SCNP catalytic properties depending on their synthesis protocol.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) **Introducción a la ciencia de los materiales poliméricos, síntesis y caracterización.**
I. Katime, O. Katime y D. Katime. ISBN: 978-84-9860-356-9 (2010).
- 2) **Fundamentals of Polymer Science: An Introductory Text.**
P. Painter y M. Coleman. ISBN: 1-56676-559-5 (1997).
- 3) **Introducción a la química de los polímeros.**
R. B. Seymour y C. E. Carraher. ISBN-13: 978-8429179262 (1995).
- 4) **Diseño macromolecular por transferencia de cadena.**
J. P. A. Heuts y A. Muñoz-Bonilla. *Anales de Química* 2010, 106, 30-36.
- 5) **Handbook of Radical Polymerization.**
C. Matyjaszewski y T. P. Davis. ISBN: 9780471392743 (2002).
- 6) **Polimerización por adición, fragmentación y transferencia reversible, RAFT: Una revisión del mecanismo y el alcance de la técnica.**
C. D. Grande y F. Zuluaga. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 2010, 11, 339-359.
- 7) **Naked and Self-Clickable Propargylic-Decorated Single-Chain Nanoparticle Precursors via Redox-Initiated RAFT Polymerization.**
A. Sanchez-Sanchez, I. Asenjo-Sanz, L. Buruaga y J. A. Pomposo. *Macromolecular Rapid Communications* 2012, 33, 1262-1267.
- 8) **Building Nanostructures using RAFT Polymerization.**
C. Boyer, M. H. Stenzel y T. P. Davis. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 2011, 49, 551-595.
- 9) **Advances in Single Chain Technology.**
M. Gonzalez-Burgos, A. Latorre-Sanchez y J. A. Pomposo. *Chemical Society Reviews* 2015, 44, 6122-6142.
- 10) **Bioinspired single-chain polymer nanoparticles.**
J. A. Pomposo. *Polymer International* 2014, 63, 589-592.
- 11) **Advances in Click Chemistry for Single-Chain Nanoparticle Construction.**
A. Sanchez-Sanchez, I. Perez-Baena y J. A. Pomposo. *Molecules* 2013, 18, 3339-3355.
- 12) **How Far Are Single-Chain Polymer Nanoparticles in Solution from the Globular State?**
J. A. Pomposo, I. Perez-Baena, F. Lo Verso, A. J. Moreno, A. Arbe y J. Colmenero. *ACS Macro Letters* 2014, 3, 767-772.

- 13) **Endowing Single-Chain Polymer Nanoparticles with Enzyme-Mimetic Activity.**
I. Perez-Baena, F. Barroso-Bujans, U. Gasser, A. Arbe, A. J. Moreno, J. Colmenero y J. A. Pomposo. *ACS Macro Letters* 2013, 2, 775-779.
- 14) **"Michael" Nanocarriers Mimicking Transient-Binding Disordered Proteins.**
A. Sanchez-Sanchez, S. Akbari, A. Etxeberria, A. Arbe, U. Gasser, A. J. Moreno, J. Colmenero y J. A. Pomposo. *ACS Macro Letters* 2013, 2, 491-495.
- 15) **Efficient Synthesis of Single Chain Globules Mimicking the Morphology and Polymerase Activity of Metalloenzymes.**
A. Sanchez-Sanchez, A. Arbe, J. Kohlbrecher, J. Colmenero y J. A. Pomposo. *Macromolecular Rapid Communications* 2015, 36, 1592-1597.
- 16) **Efficient Synthesis of Single-Chain Polymer Nanoparticles via Amide Formation.**
A. Sanchez-Sanchez y J. A. Pomposo. *Journal of Nanomaterials* 2015, 2015, 723492.
- 17) **A brief user's guide to single-chain nanoparticles.**
C. K. Lyon, A. Prasher, A. M. Hanlon, B. T. Tuten, C. A. Tooley, P. G. Frank, E. B. Berda. *Polym. Chem.* 2015, 6, 181-197.
- 18) **Simulation Guided Design of Globular Single-Chain Nanoparticles by Tuning the Solvent Quality.**
F. Lo Verso, J. A. Pomposo, J. Colmenero y A. J. Moreno. *Soft Matter* 2015, 11, 1369-1375.
- 19) **Técnicas de caracterización de Polímeros.**
M. A. Llorate y A. Horta. ISBN: 84-362-2610-0 (1991).
- 20) **Advantages of Orthogonal Folding of Single Polymer Chains to Soft Nanoparticles.**
A.J. Moreno, F. Lo Verso, A. Sanchez-Sanchez, A. Arbe, J. Colmenero, J. A. Pomposo. *Macromolecules* 2013, 46, 9748-9759. ANEXOS:rta. ISBN: 84-362-2610-0 (1991).

FIGURAS:

Fig 1:

https://www.google.es/search?q=polimero+lineal+ramificado&biw=1600&bih=697&source=Inms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiK36Dvh_rKAhUCWRQKHb71BnwQ_AUIBigB#imgrc=9I18QbCSDzx0vM%3A

Fig 2:

https://www.google.es/search?q=polimero+de+bloque+alternante&source=Inms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjMgr6ziPrKAhXGsxQKHVTICK8Q_AUIBygB&biw=1600&bih=697#imgrc=ik4ehBY6bKdVUM%3A

Fig 3:

https://www.google.es/search?q=peso+molecular&source=Inms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjKx6XFiPrKAhVDNxQKHxthBhIQ_AUIBygB&biw=1600&bih=697#tbm=isch&q=peso+molecular+mn+mw&imgrc=mb3UaufccCdbKM%3A

Fig 4: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2014/cs/c3cs60454c>

Fig 5: http://cool.conservation-us.org/jaic/articles/jaic30-02-008_1.html

Fig 6: <http://www.jorplast.com.br/cbipep/cbip4ep.html>

Fig 8: <http://www6.uniovi.es/usr/fblanco/AP.T2.1-MPyC.Tema2.TecnicasPolimerizacion.pdf>

Fig 17: <http://www.ugr.es/~quiored/espec/rmn.htm>

Fig 18: <http://slideplayer.es/slide/1024573/>

Fig 19: <http://web.mit.edu/3.082/www/team1s/background/GPC.html>

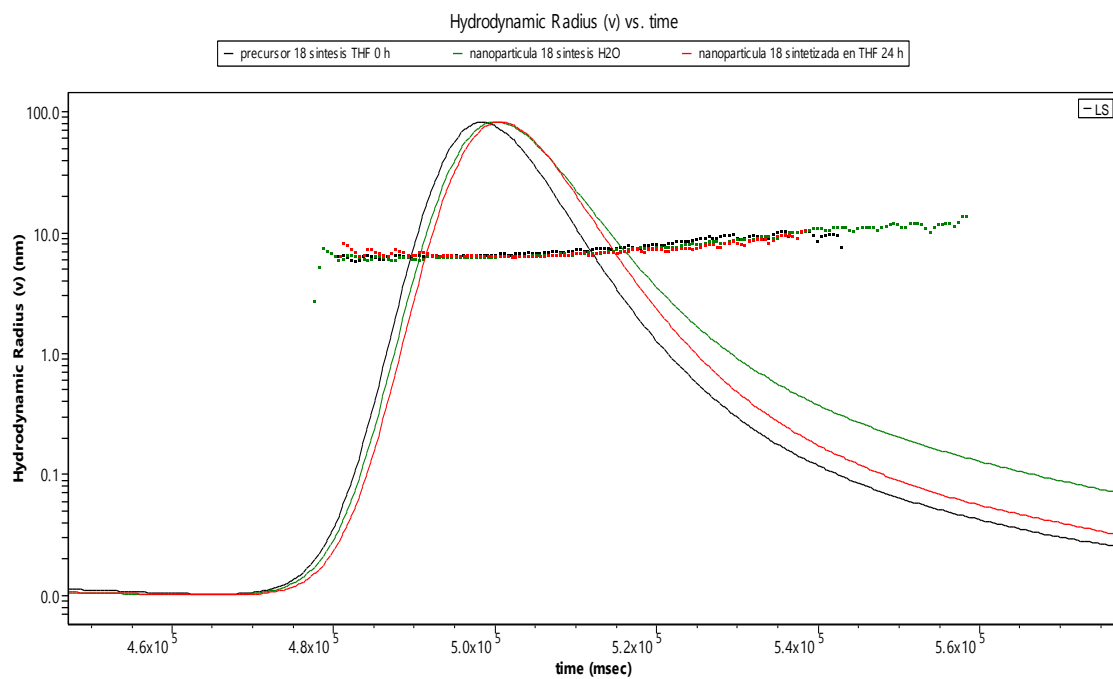
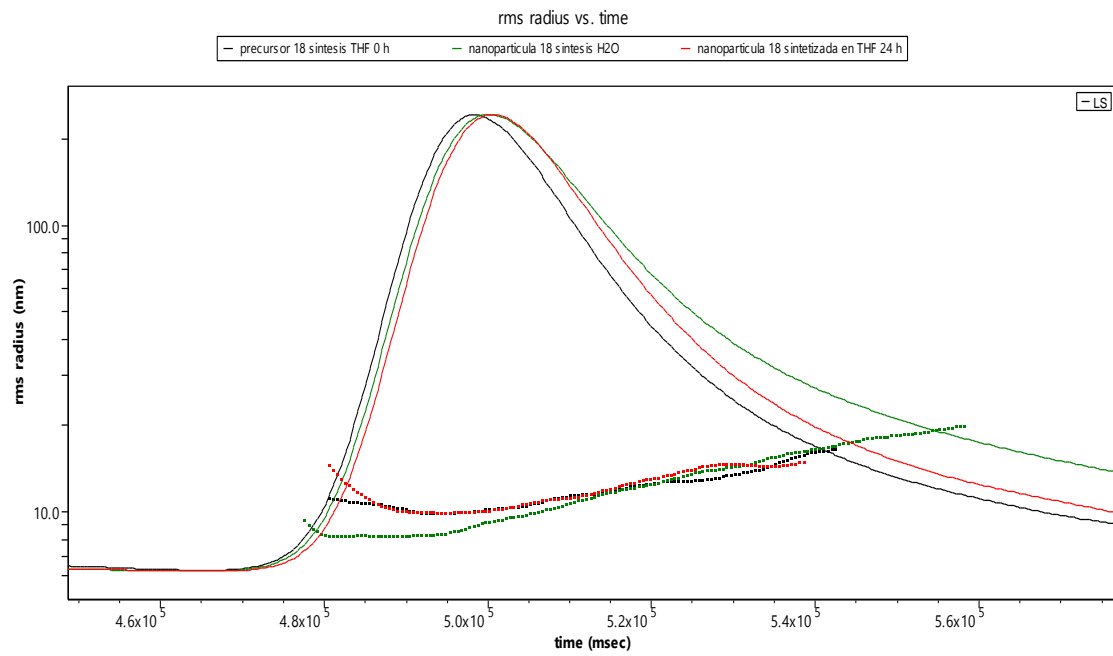
Fig 21: http://radchem.nevada.edu/classes/chem455/lecture_22_thermal_methods.htm

Fig 22: <https://investigacion.us.es/scisi/sgi/servicios/microanalisis/servicios>

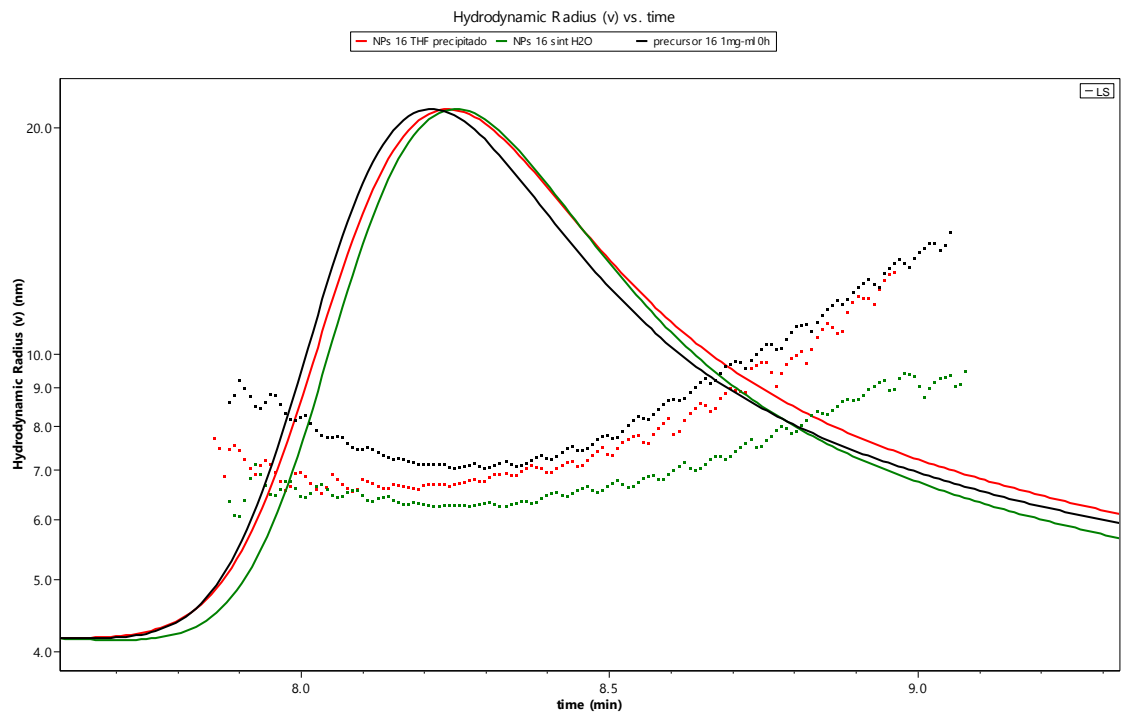
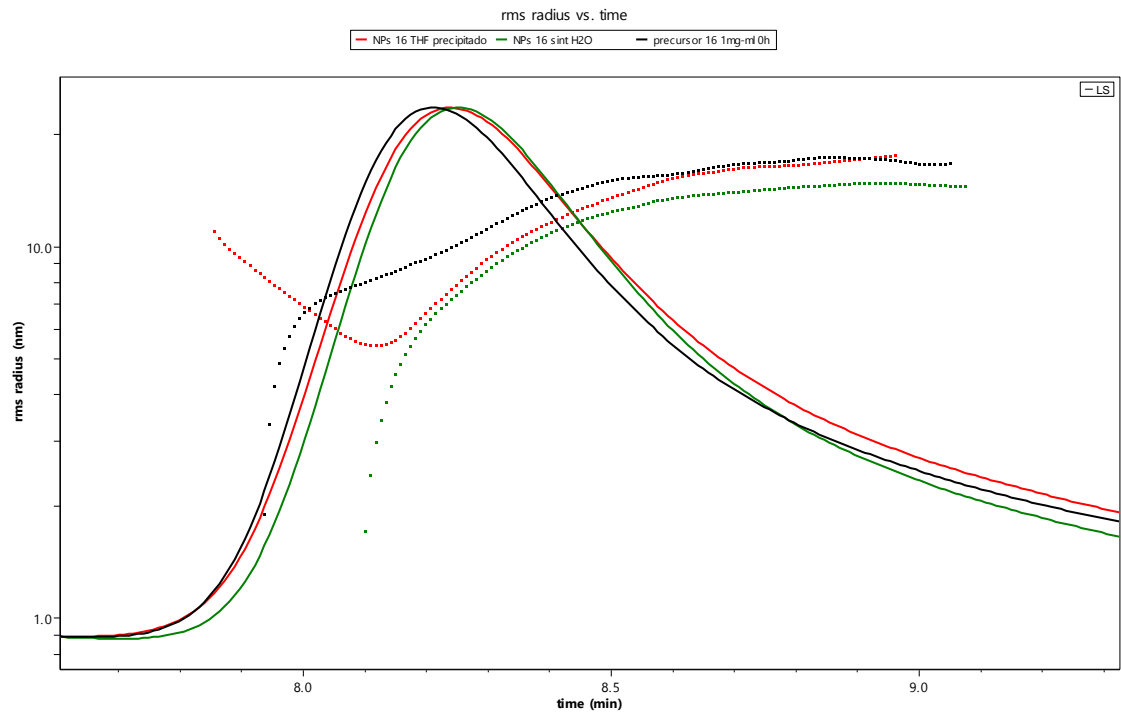
Fig 23: https://en.wikipedia.org/wiki/File:Saxs_scheme1.jpg

ANEXOS:

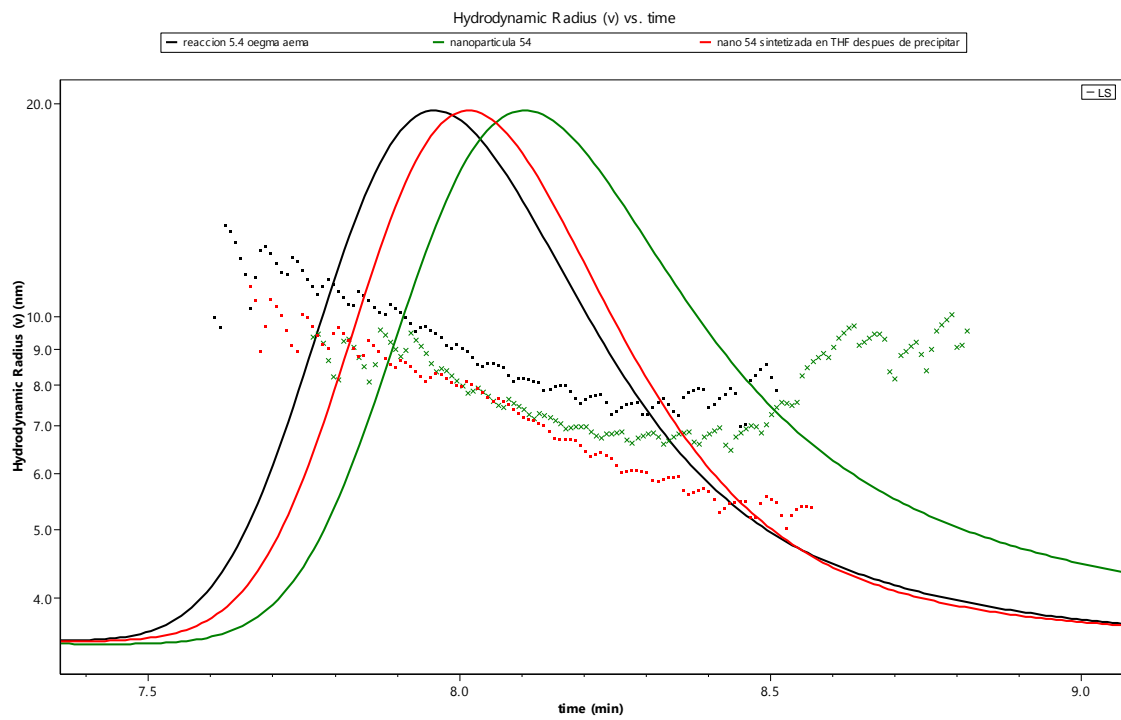
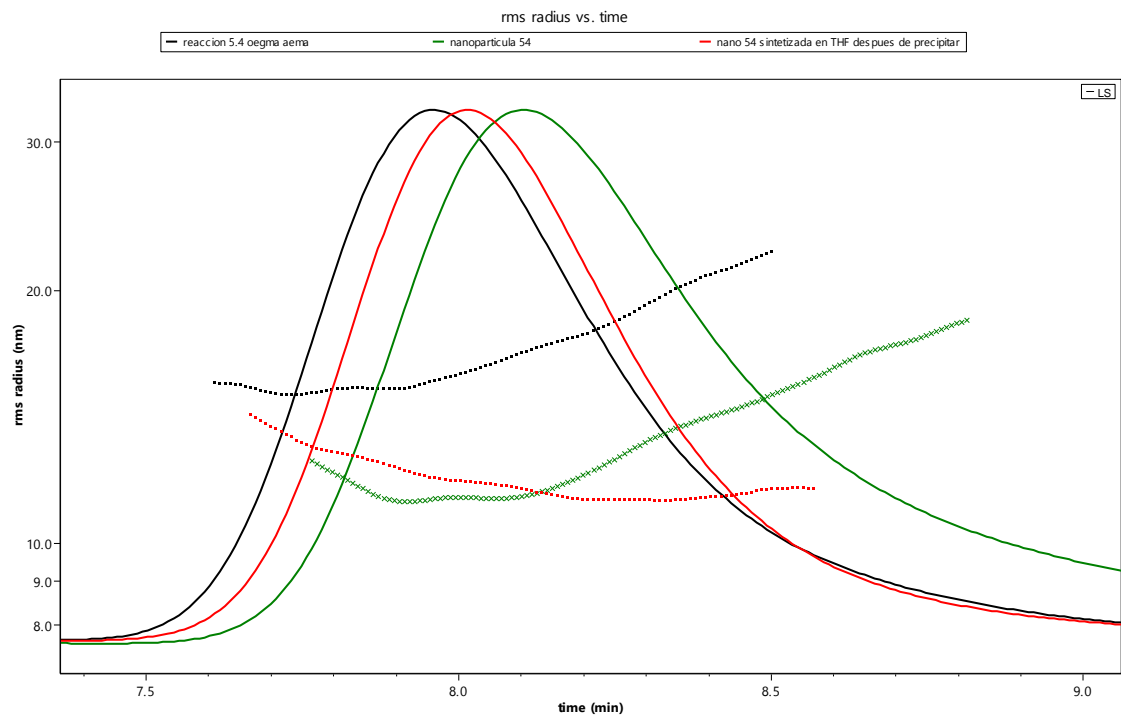
Muestra 18: 7 % AEMA



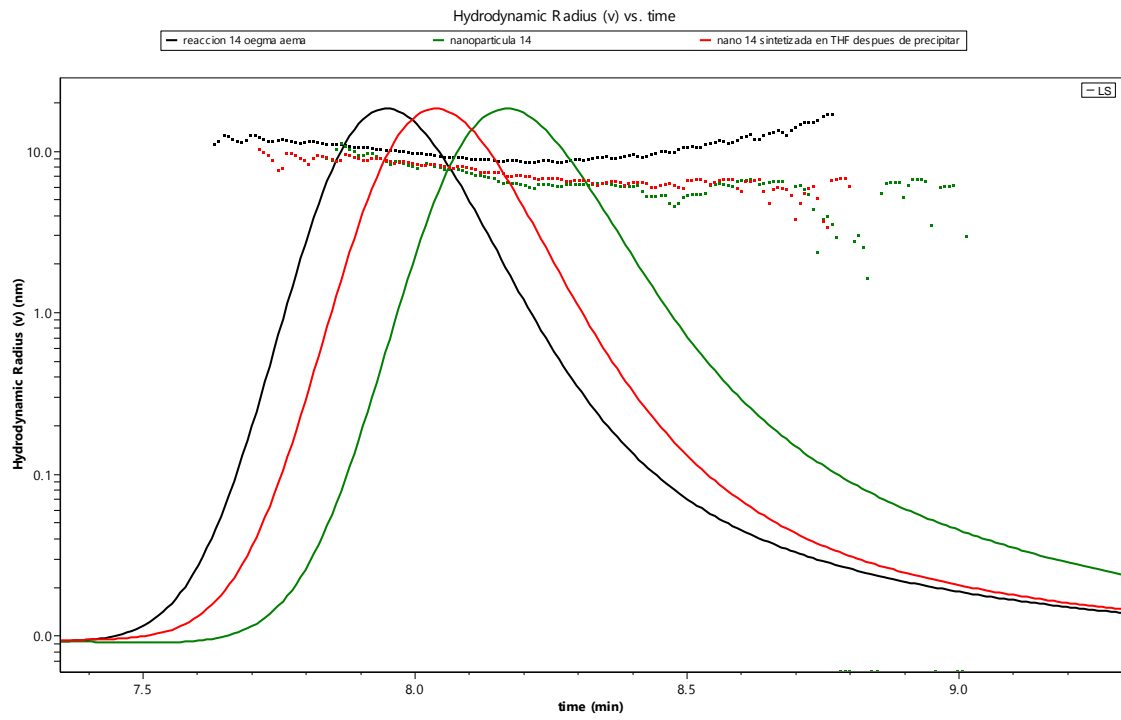
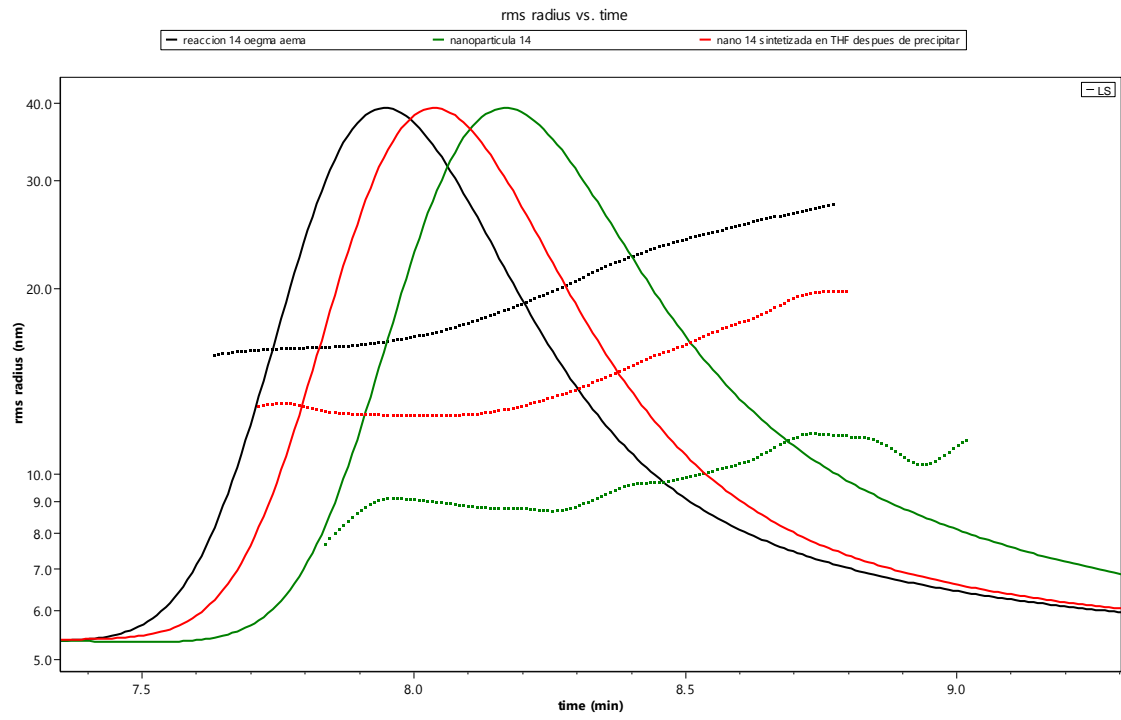
Muestra 16: 19,55 % AEMA



Muestra 54 (13): 34,5 % AEMA

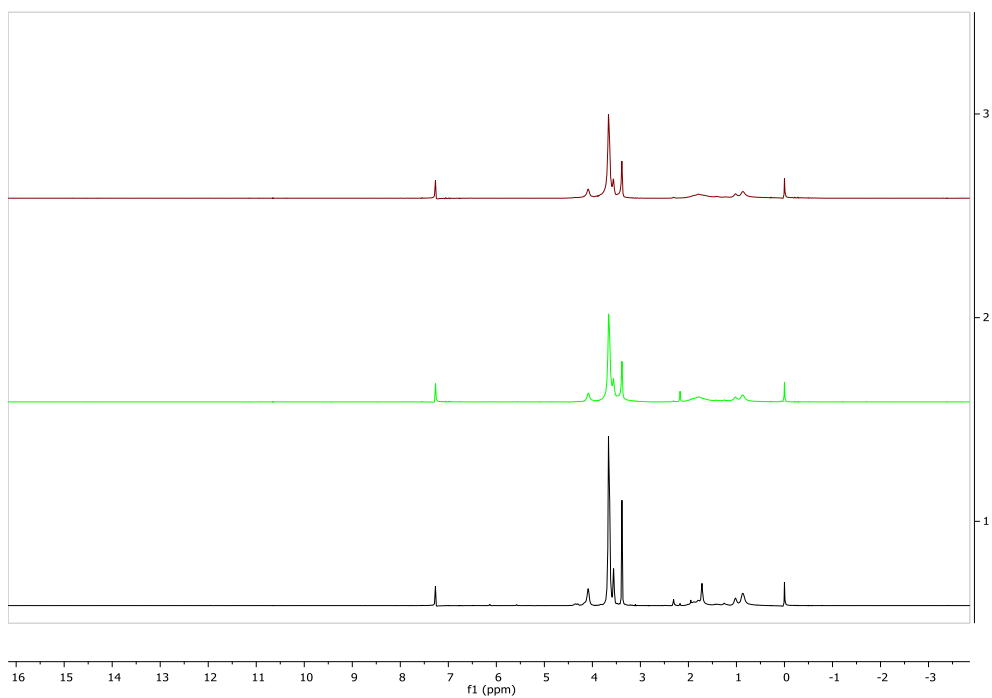


Muestra 14; 39,5 % AEMA



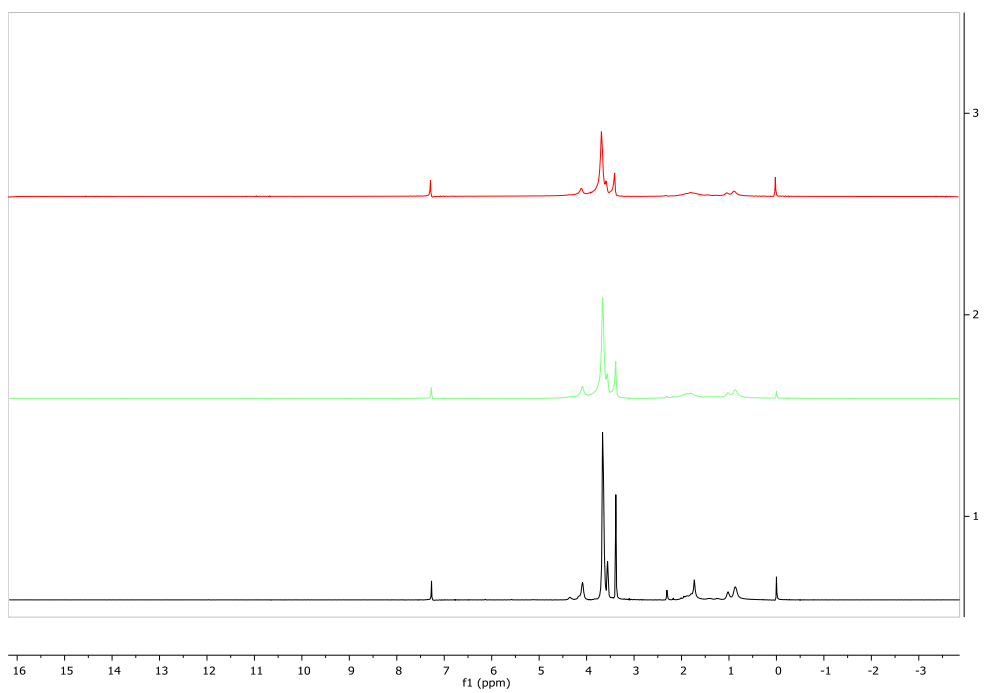
Muestra 18 (%7 AEMA Mw: 96000g/mol)

Precursor 18
NPs 18 H2O 1mg/ml
NPs 18 THF 1mg/ml



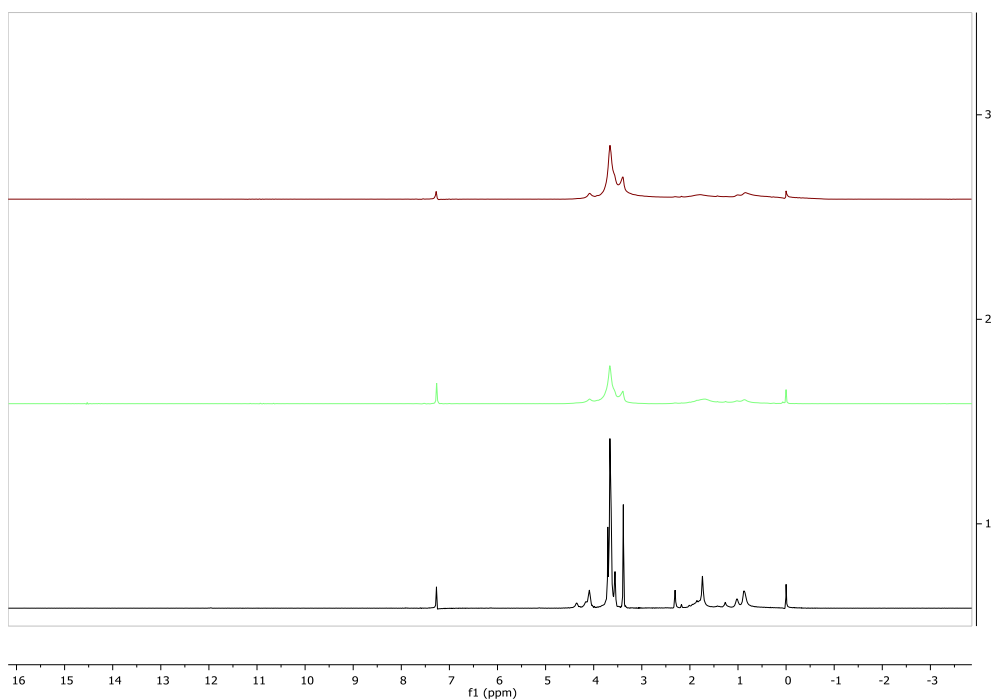
Muestra 17 (%11 AEMA Mw: 110000g/mol)

Precursor 17
NPs 17 H2O 1mg/ml
NPs 17 THF 1mg/ml



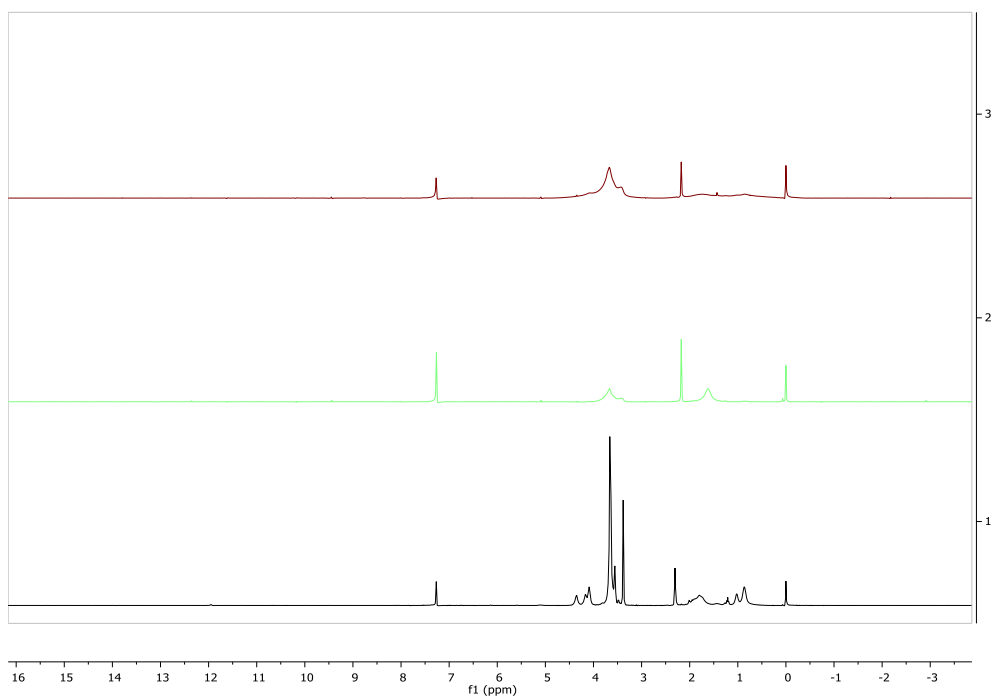
Muestra 16 (%20 AEMA Mw: 125000g/mol)

Precursor 16
NPs 16 H2O 1mg/ml
NPs 16 THF 1mg/ml



Muestra 54 (%35 AEMA Mw: 175000g/mol)

Precursor 54
NPs 54 H2O 1mg/ml
NPs 54 THF 1mg/ml



Muestra 21 (%42 AEMA Mw: 96000g/mol)

Precursor 21
NPs 21 H2O 1mg/ml
NPs 21 THF 1mg/ml

