



***UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA***  
***FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS***  
***DEPARTAMENTO DE QUÍMICA***

***Tesis Doctoral***

**“Síntesis y propiedades de Copolímeros en Bloque  
constituidos por bloques hidrofílico-hidrofóbico”**

**Licenciado Marcos E. Coustet**

**Dirección: Dra. M. Susana Cortizo**

**Co-Dirección: Dr. Omar Azzaroni**

**2014**

*Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. M. Susana Cortizo y el Dr. Omar Azzaroni, en el Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA) dependiente del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas - Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).*

## *Resumen*

El presente trabajo de tesis se enfoca en la síntesis de nuevos copolímeros en bloque caracterizados por poseer un bloque hidrofóbico y otro hidrofílico. Se ha seleccionado el metacrilato de bencilo para la construcción del bloque hidrofóbico y ácido metacrílico (por posterior hidrólisis del metacrilato de tert-butilo) o metacrilato de N, N´dimetilaminoetilo para la obtención del bloque hidrofílico. La metodología de síntesis seleccionada es un método de polimerización aniónica que requiere condiciones menos drásticas que la polimerización aniónica convencional, basada en iniciadores organometálicos. Este método de polimerización se denomina “polimerización por transferencia de grupo” (o GTP, Group Transfer Polymerization, por sus siglas en ingles) y se realiza a temperatura ambiente empleando un iniciador sililcetenacetal conjuntamente con un catalizador nucleofílico (bisbenzoato de tetrabutilamonio).

Los copolímeros mencionados han sido estudiados en combinación con otros materiales a fin de analizar sus propiedades de autoensamblado en solución (fase directa o inversa) ó aplicando la metodología “capa por capa” (o L-b-L, layer-by-layer) sobre partículas de sílica y sobre superficies planas. Se utilizaron numerosas técnicas para la caracterización y estudio de los productos obtenidos, tales como dispersión de luz dinámica (DLS), espectroscopia UV-Visible, potencial zeta, microbalanza de cristal de cuarzo, microscopías de laser confocal, de fuerza atómica, electrónica de barrido y de transmisión electrónica, entre otras.

La Tesis está organizada en 5 capítulos, en el primero de los cuales se introducen los conceptos fundamentales y se presentan los antecedentes del tema en relación a la síntesis y propiedades de los copolímeros en bloque.

El capítulo II describe la optimización de la técnica de síntesis GTP con el fin de sintetizar una familia de compuestos en su mayoría provenientes de monómeros de metacrilatos. Los productos, como posteriormente sus aplicaciones, fueron caracterizados e identificados por distintos métodos espectroscópicos, los cuales son desarrollados a lo largo de cada una de las secciones.

En los capítulos III y IV se describe la utilización de los copolímeros anfifílicos sintetizados anteriormente en el capítulo II.

El capítulo III puntualiza el estudio de las micelas. Los copolímeros anfifílicos son analizados en una mezcla de tetrahidrofurano y agua dónde presentan la propiedad de autoensamblarse en micelas. Las micelas formadas se emplearon como reactores para la síntesis de nanopartículas de plata.

El capítulo IV describe el estudio de los polimerosomas a distintos pH y con cambios en la fuerza iónica, como así también respecto a la concentración salina empleada, con el objetivo de evaluar sus potenciales aplicaciones. Estos polimerosomas fueron estudiados además en distintas entornos. Empleando la técnica de “capa a capa” y el poliestirensulfonato de sodio como contraión, se ensamblaron sobre partículas coloidales y sustratos planos de SiO<sub>2</sub> funcionalizadas y aplicando la balanza de cuarzo (QCM) se formaron films en superficies planas.

En el último capítulo, se exponen las conclusiones generales.

*A mis Padres y a mi hermano*

*Por acompañarme y ayudarme a transitar el camino que elegí.*

*A Johana y Agustín*

*Por hacer de este camino un hermoso sueño.*

## ***Agradecimientos***

*En el transcurso de la presente Tesis Doctoral he recibido la ayuda y el apoyo de muchas personas a las que quiero expresar mis más sinceros agradecimientos.*

*A mis directores Susana Cortizo y Omar Azzaroni por ayudarme en el transcurso de estos 5 largos años, con largas discusiones y críticas constructivas. Por brindarme su apoyo dentro y fuera del ámbito académico.*

*A la CIC (beca de Estudio) y al CONICET (beca Tipo II) por la subvención económica.*

*A todo el personal del Inifta, por el derroche de simpatía aunque sean las 7:30 de la mañana, los mates a las apuradas y las charlas en los pasillos.*

*Al grupo Macromoléculas (Negro, Fer, Maga, Laurita, Colo, Gime y Juanma), con los que compartí hermosos y especiales momentos en estos años.*

*A la Dra. Aránzazu del Campo y a su grupo de trabajo (Juan Pedro Fernández, Melanie Wirkner, Verónica San Miguez, Marta Alvarez, Frederik Klöwer, Simone Weis, Zahid Shafiq, Dirk Drotlef, Marcelo Salierno, etc) por la paciencia y las experiencias aprendidas.*

*Al Dr. Sergio Moya y a su grupo de trabajo (Richard Murray, Maialen Ruiz Prada, Yuanqiu, Gabriela Romero, Joseba Irigoyen Otamendi, Elena Rojas, Teodoro Alonso y David San José) dónde realicé las caracterizaciones y aplicaciones de los sistemas poliméricos*

*A Mariana Vignoni por enseñarme a ser un poco más ordenado en mis viajes.*

*A Juan Giussi y Tamara Oberti por opinar en los momentos precisos, por escucharme y sobre todas las cosas, por las risas (por cierto, muy contagiosas) que hicieron de esos momentos algo tan inolvidable.*

*Y no me gustaría terminar sin agradecer a Guillermo Nielsen, Omar y Liliana Garipe (mis queridos tíos), Elías y Alcira (más que abuelos, mis segundos padres) que me recuerdan siempre que la perseverancia tiene sus frutos, no importa el tiempo que lleve, y que me brindan de forma continúa su apoyo, aún en la distancia.*

# *Índice*

## **CAPITULO I. Estado del Arte**

<b>Introducción General.....</b>	<b>1</b>
<b>Objetivos de la Tesis.....</b>	<b>9</b>
Objetivos Específicos.....	9
<b>Referencias.....</b>	<b>10</b>

## **CAPITULO II. Síntesis de Copolímeros en Bloque**

<b>Introducción.....</b>	<b>14</b>
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>15</b>
<b>Monómeros.....</b>	<b>17</b>
<b>Polimerización por GTP.....</b>	<b>18</b>
Armado del equipo.....	18
Procedimiento de la síntesis.....	20
Aislamiento.....	22
Purificación.....	22
Obtención del MABz-b-AMA.....	23
<b>Técnicas de caracterización.....</b>	<b>23</b>
Cromatografía de Exclusión Molecular (SEC).....	23
Osmometría de Presión de Vapor (VPO).....	24

Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	25
Espectroscopia Infrarroja (IR).....	26
<b>Resultados y Discusión.....</b>	<b>26</b>
<b>Conclusiones parciales.....</b>	<b>40</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>41</b>

### **CAPITULO III. Formación de Micelas**

<b>Introducción.....</b>	<b>44</b>
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>46</b>
<b>Técnicas de caracterización.....</b>	<b>47</b>
Fluorimetría.....	47
Conductividad.....	48
Dispersión de Luz Dinámica (Dynamic Light Scattering, DLS).....	49
<b>Resultados y Discusión.....</b>	<b>52</b>
<b>Micelas en fase reversa.....</b>	<b>59</b>
<b>Estudio de las Nanopartículas de Plata (NPs de Ag).....</b>	<b>60</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>67</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>68</b>

### **CAPÍTULO IV. Ensamblados en Superficies**

<b>Introducción.....</b>	<b>72</b>
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>75</b>
<b>Técnicas de caracterización.....</b>	<b>77</b>



Potencial Zeta.....	77
Microbalanza de Cristal de Cuarzo con Disipación.....	80
Microscopía Con Focal (MCF) .....	82
Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) .....	82
<b>Resultados y Discusión.....</b>	<b>84</b>
<b>Conclusiones Parciales.....</b>	<b>102</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>103</b>

## **CAPÍTULO V. Conclusiones Generales**

<b>Conclusiones Generales.....</b>	<b>109</b>
------------------------------------	------------

## Capítulo I

# ESTADO DEL ARTE

## Capítulo II

# SÍNTESIS DE COPOLÍMEROS EN BLOQUE

## Capítulo III

# FORMACIÓN DE MICELAS

## Capítulo IV

# ENSAMBLADOS EN SUPERFICIE

## Capítulo V

# CONCLUSIONES GENERALES

## *Introducción General*

Los copolímeros en bloque son estructuras formadas por al menos dos cadenas de homopolímeros químicamente diferentes unidos entre sí por un enlace covalente. A diferencia de otros copolímeros, estos mantienen muchas de las características físicas de sus correspondientes homopolímeros. Es posible obtener una amplia variedad de copolímeros en bloque teniendo en cuenta la longitud de cada bloque, la composición química de los monómeros que forman el bloque, y la relación entre los respectivos bloques del polímero. Por lo general los diferentes bloques que lo componen son fisicoquímicamente incompatibles, debido a su diferencia en polaridad. Un tipo especial de tales copolímeros lo constituyen los denominados “copolímeros en bloque anfífilicos”, los cuales están conformados por segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos y por lo tanto presentan una estructura similar a la de los surfactantes de bajo peso molecular. Esta particularidad conduce a una separación de microfases y consecuentemente a la agregación entre bloques del mismo tipo, con diferentes morfologías. [1]

El creciente interés de estos copolímeros se debe a la amplia gama de propiedades que emergen de la combinación de diferentes bloques otorgando propiedades de cada bloque a la macromolécula formada. Entre las aplicaciones más destacadas de estos materiales pueden mencionarse su capacidad para la formación de películas ultra delgadas, con potenciales aplicaciones en áreas tales como la microelectrónica y su habilidad para autoensamblarse, lo que conduce a importantes aplicaciones como estabilizantes, floculantes, nano reservorios para liberación controlada de fármacos, terapia génica, catálisis por transferencia de fases, modificación superficial, nanopartículas metálicas, entre otras. [2,3]

La técnica más conocida para la síntesis de copolímeros en bloque es la copolimerización aniónica, conocida desde hace más de 50 años [4]. Esta técnica procede a través de un sitio organometálico (carbanión con un contraión metálico) y permite la síntesis de polímeros con una distribución angosta de pesos moleculares debido a que todos los sitios activos comienzan polimerizando el monómero casi al mismo tiempo. El carácter “living” de esta metodología es la principal característica de la polimerización aniónica. Sin embargo la misma presenta algunas desventajas desde el punto de vista experimental: i) debe trabajarse en condiciones de muy alta pureza de los reactivos, ii) usualmente a muy bajas temperaturas y iii) solo es aplicable a monómeros que no presenten sustituyentes factibles de reaccionar con el carbanión (carbonilos, carbocationes, etc.).

En las últimas décadas, las estrategias de síntesis de copolímeros en bloque se han extendido ampliamente con el advenimiento de la polimerización por transferencia de grupo y la polimerización radical controlada. Esta última se caracteriza por la ausencia de reacciones de destrucción del centro radical, a través de la introducción de estados latentes

para las especies en propagación, evitando los procesos de terminación o transferencia de cadena [5].

Estas metodologías han permitido perfeccionar la obtención de copolímeros en bloque con composiciones definidas, pesos moleculares y estructuras de arquitecturas elaboradas especialmente, las cuales amplían el campo de aplicaciones de los materiales así obtenidos.

La selección de una técnica de síntesis dada dependerá de una serie de factores entre los cuales se encuentran:

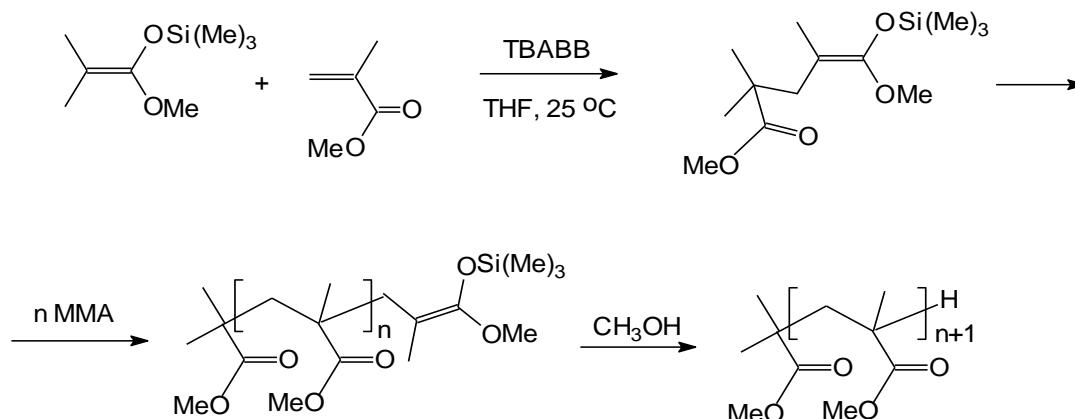
- Mecanismo de polimerización. La polimerización puede llevarse a cabo mediante radicales libres, polimerización aniónica o catiónica según sean las características estructurales de los monómeros A y / o B. El caso más adecuado será donde ambos monómeros A y B son polimerizables por el mismo mecanismo, si bien en la actualidad se han desarrollado métodos que combinan diferentes tipos de mecanismos.
- Estructura del copolímero. Esto incluye el número de bloques así como la arquitectura de copolímero final. Por ejemplo, dos bloques, múltiples bloques, en forma de estrella, etc.
- Rango de peso molecular deseado. Sabiendo que las reacciones de condensación generalmente son preferidas para la preparación de copolímeros de bloques de menor molecular peso.
- Polidispersidad requerida de cada bloque y la pureza del producto final (ausencia de homopolímeros en un di bloque o ausencia de contaminantes; por ejemplo, reactivos difíciles de eliminar que quedan retenidos en los productos).

Entre las metodologías de síntesis previamente mencionadas, una técnica muy importante, desarrollada por Webster en 1983, es la polimerización por transferencia de grupo (GTP) [6]. Este método de síntesis permitió la polimerización de monómeros (meta) acrílicos mediante una reacción aniónica "living" a temperatura ambiente, a través de la modificación de la naturaleza iónica del grupo terminal. Es particularmente aplicada a acrilatos, metacrilatos o monómeros con capacidad para formar una estructura enólica (sililénolica), sin la cual dicha metodología no procede. Por otro lado, debe destacarse que son precisamente este tipo de monómeros los que presentan mayores inconvenientes para ser polimerizados a través del mecanismo aniónico tradicional (mediante iniciadores organometálicos), debido a las reacciones ampliamente conocidas de los aniones sobre grupos carbonílicos de derivados de ácido. Fue por este motivo que la polimerización por transferencia de grupo se desarrolló tan rápidamente.

GTP procede sin interferencias significativas en los pasos de transferencia y en la terminación de la cadena y es por lo tanto un proceso "vivo". El iniciador es un sililcetena



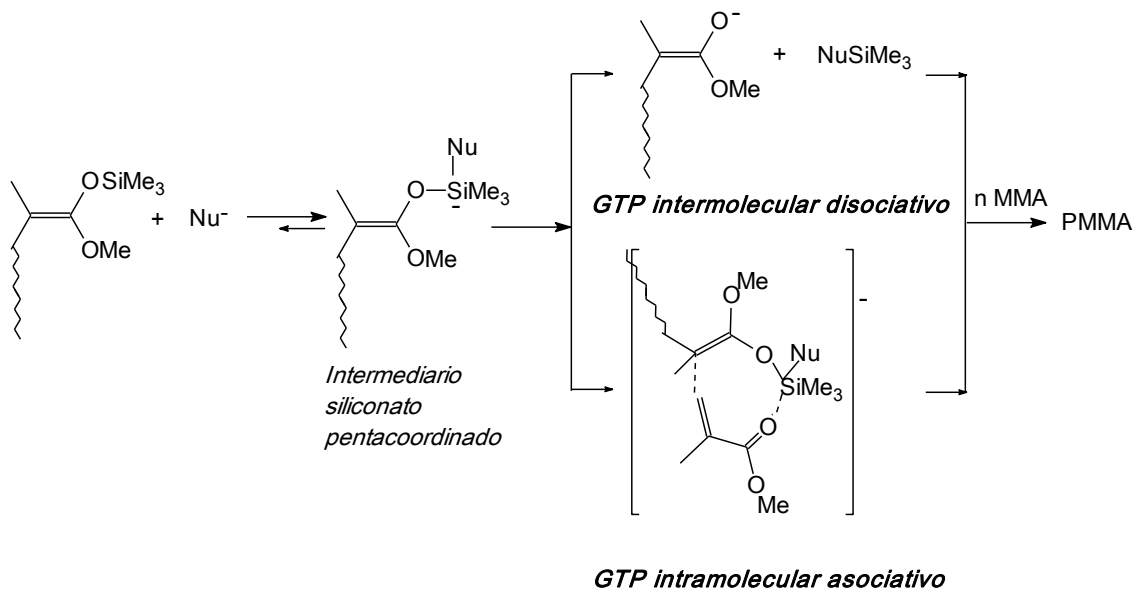
acetal, sintetizado a partir de un éster enolato (producto comercial). El siguiente esquema presenta el mecanismo de polimerización propuesto para la reacción a partir de metacrilato de metilo (MAM):



**Esquema.I.1:** Mecanismo de polimerización del monómero de metacrilato de metilo (MAM) empleando la técnica de GTP.

Es necesario un catalizador que puede ser un nucleófilo o un ácido de Lewis. Entre los primeros se utilizan fluoruros o bifluoruros ( $\text{HF}_2^-$ ),  $\text{CN}^-$ , acetatos o bisbenzoatos (bisbenzoato de tetrabutilamonio, TBABB). Como ácidos de Lewis se utilizan cloruros, bromuros, ioduros de Zn y cloruro de dialquilaluminio. Los nucleófilos se emplean en menores concentraciones (0.1 % respecto al iniciador). El requerimiento más importante de esta técnica es la ausencia total de protones ácidos, tales como los presentes en el agua o ciertos grupos funcionales transportados por el monómero (metacrilato de 2-hidroxietilo o ácido metacrílico), los cuales destruirían el centro aniónico en propagación. El oxígeno no interfiere demasiado y puede utilizarse un rango más amplio de solventes que en la polimerización aniónica tradicional, tales como THF, tolueno, DMF en GTP nucleofílica y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en GTP electrofílica.

El mecanismo de reacción es algo diferente dependiendo del tipo de catalizador. La función del catalizador es estabilizar el enolato que progresa. En el GTP nucleofílico se ha propuesto un mecanismo disociativo en el cual el centro en propagación es iónico (similar a otras polimerizaciones aniónicas), la especie en propagación se forma en bajas concentraciones por desplazamiento nucleofílicos del grupo trimetilsililo por el catalizador nucleófilo (Esquema.I.2).



**Esquema.I.2:** Mecanismos de reacción propuestos por los cuales procede la técnica de polimerización GTP.

El control de las reacciones laterales se alcanza a través de 2 factores: (1) la complejación reversible de la especie aniónica en propagación por el extremo de la cadena del polímero sililceteno acetal que mantiene la concentración de las especies aniónicas en propagación; y (2) un contraión voluminoso  $W^+$  (por ej. Tetrabutilamonio, tris dimetilamino sulfonilo) que disminuyen la reactividad del centro aniónico en propagación hacia las reacciones laterales de terminación.

Las polimerizaciones “living” de metacrilatos con distribución de tamaños moleculares angostas (o índice de polidispersidad, IPD), generalmente 1,2-1,3 o algunas veces menores, se alcanzan mediante GTP nucleofílico a temperaturas entre 0-80 °C. Sin embargo los máximos pesos moleculares que pueden obtenerse con IPD angosto son alrededor de 20.000-30.000. Dos factores limitan el peso molecular promedio en número ( $M_n$ ), la terminación por ciclación, que siempre está presente y por complejación de polímero terminado en sililceteno acetal

Una de las características más sobresalientes de esta metodología es la estabilidad de la síntesis cuando se lleva a cabo a temperatura ambiente y en presencia de oxígeno, aunque los compuestos próticos todavía deben ser excluidos. GTP se ha explotado para la síntesis de un buen número de polímeros arquitectónicamente interesantes. Existen una amplia gama de copolímeros derivados del ácido meta/acrílico con bloques hidrofílico-hidrofóbico, ó copolímeros con ambos bloques hidrofílicos que son especialmente de interés para los estudios en solución por su capacidad de autoensamblarse [7] logrando la formación por ejemplo de micelas [8-16] o vesículas [17-25].

Como se mencionó anteriormente, los copolímeros en bloque son producidos con diferentes tipos de bloques los cuales normalmente son termodinámicamente inmiscibles entre sí. Esta incompatibilidad les confiere la interesante capacidad de autoensamblarse en distintos solventes que conducen por ejemplo a sistemas micelares.

Por lo tanto, es necesario entender los fundamentos que rigen la interdependencia entre la morfología y el tamaño de los agregados obtenidos por el autoensamblado, incluyendo factores esenciales como la composición de los bloques, longitud del bloque hidrofílico, la arquitectura del copolímero y los solventes. Algunos autores [26-29] involucran a la estructura completa del copolímero en bloque para predecir la morfología; es decir, utilizan parámetros propios de cada uno de los bloques del copolímero y mediante el uso de la ecuación de CPP (por sus siglas en inglés: Critical Packing Parameter) predicen la posible configuración que pueden adoptar.

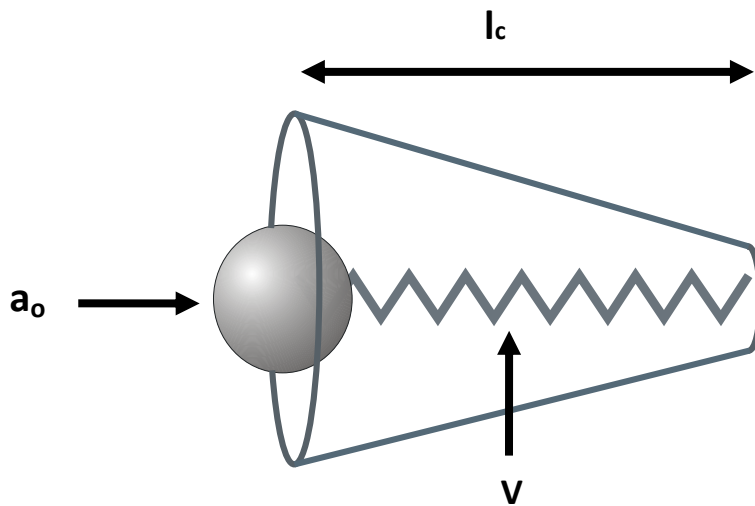
Las posibilidades al usar esta expresión son:

$$\text{CPP} = \frac{v}{a_o \times l_c} \quad \text{Ec.I.1}$$

CPP  $\geq$  1 micelas inversas

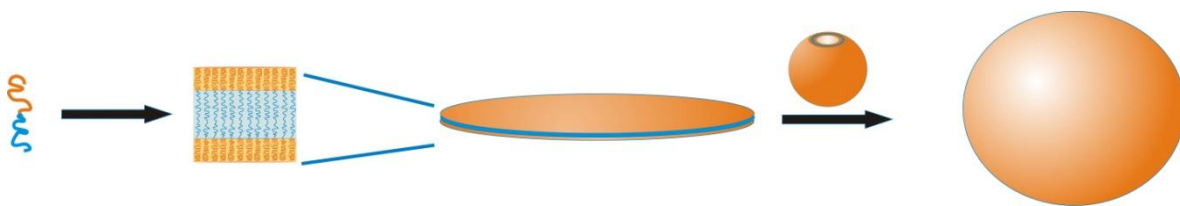
$$0.5 < \text{CPP} < 1.0$$

$$\text{CPP} \leq 0.5 \text{ micelas}$$



**Figura.I.1:** Esquema de un copolímero en bloque donde se representan las características a tener en cuenta para el cálculo de CPP. Donde  $V$  es el volumen de la cadena hidrofóbica,  $l_c$  es la longitud de la cadena hidrofóbica y  $a_0$  es el área de la cabeza del grupo hidrofílico.

Las vesículas poliméricas se consideran como un proceso de formación en dos pasos. En primer lugar, el polímero tiende a formar una membrana de tipo bicapa, que posteriormente se cierra para formar una estructura con un hueco como se muestra en la Figura I.2. Este proceso implica un cambio de curvatura interfacial, que puede corresponder a un cambio en el parámetro de empaquetamiento del polímero y por lo tanto un cambio en la morfología resultante. [20, 30, 31]

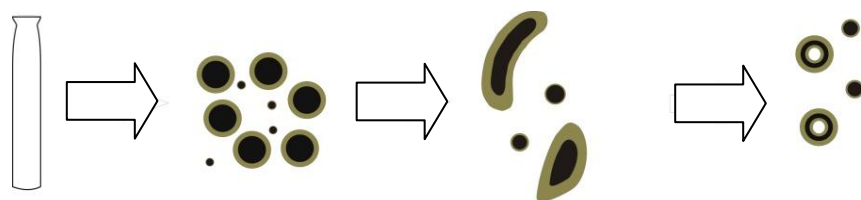


**Figura.I.2:** Esquema de la formación de vesículas en “dos pasos” empleando copolímeros en bloque anfífilicos.

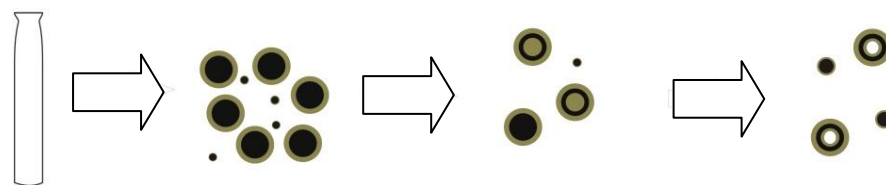
Sin embargo los cálculos teóricos revelan que algunas formaciones vesiculares transcurren mediante procesos más complicados que los procedimientos anteriormente detallados de “dos pasos”. Los resultados de estas simulaciones pueden resumirse en dos mecanismos diferentes propuestos para la formación espontánea de vesículas desde un estado homogéneo. Estos se muestran en la Figura I.3.

(a) Mecanismo I: la solución homogénea de copolímeros en bloque anfifílicos se auto-ensamblan en pequeñas micelas esféricas al agregarse en un solvente afín a uno solo de los bloques. Con el tiempo las mismas evolucionan en grandes micelas de forma cilíndrica, y otras abiertas en forma de disco por sucesivas colisiones entre ellas. Luego comienzan a cerrarse en un disco grande para formar las vesículas.

(b) Mecanismo II: transcurre mediante una etapa inicial similar a la del mecanismo I mediante el cual las micelas esféricas pequeñas se forman rápidamente, y luego crecen a grandes micelas esféricas por un proceso de evaporación-condensación. Las micelas grandes atrapan el disolvente en ellas para reducir la energía, ya que son energéticamente desfavorables.



**(a) Mecanismo I**



**(b) Mecanismo II**

**Figura.I.3:** Esquema de los mecanismos I y II involucrados en la formación de las vesículas.

Los mecanismos anteriormente presentados explican la formación de vesículas sencillas, pero no explican por completo la presencia de morfologías complejas tales como grandes vesículas y multicapas de vesículas.

El autoensamblado de las macromoléculas es un proceso mediante el cual las moléculas se organizan de manera espontánea al superar una concentración del polímero en solución. La fuerza impulsora de este fenómeno son las fuerzas intermoleculares tales como enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, ión-dipolo, hidrofóbicas, etc. [32] El proceso de autoensamblado trae como consecuencia la formación de estructuras más complejas que brindan infinitas aplicaciones tales como nanoreactores, nanomoldes, nanotransportadores, sistemas de liberación de fármacos o vesículas con membranas sintéticas. Sin embargo, una serie de investigadores han encontrado otros usos para estos copolímeros en fases de gel, películas delgadas y en el estado sólido [33-39].

El diseño y la síntesis de diversas moléculas que son capaces de autoensamblarse espontáneamente se han convertido en un campo muy activo de la química macromolecular.

Los copolímeros en bloque pueden autoensamblarse no solo por distintos cambios en la solubilidad de uno de los bloques en el medio acuoso sino también a través de modificaciones en el pH, temperatura o fuerza iónica. Por lo tanto, el comportamiento de los sistemas formados puede ser controlado de manera eficaz a través de la química y el diseño sintético de los bloques aumentando su aplicabilidad en diferentes condiciones.

Un ejemplo de tal agregación es la formación de membranas biológicas, que son ensamblados de moléculas lipídicas. Tales sistemas se han estudiado extensamente durante años, para permitir una mejor comprensión de la estructura y funciones de la membrana. En los aspectos prácticos, las estructuras de copolímeros en bloque son superiores a los liposomas (vesículas esféricas formadas por una doble capa de fosfolípidos), debido al aumento de la elasticidad y estabilidad mecánica. En su conjunto las membranas formadas por copolímeros en bloque son considerablemente más gruesas que las análogas de lípidos y sus fuerzas de cohesión son superiores a las de las bicapas lipídicas tradicionales.

Contrariamente a los lípidos, los copolímeros en bloque presentan estructuras más versátiles que pueden ser fácilmente modificadas en la superficie de la membrana con grupos reactivos, y por lo tanto los productos resultantes podrían conducir a nuevas estructuras más estables y a su vez permitirían mejorar la interacción con diferentes sustratos para futuras aplicaciones.

## *Objetivos de la Tesis*

El propósito del presente trabajo de tesis es conocer el efecto de la estructura de monómeros funcionales sobre las características macromoleculares del copolímero en bloque, sobre sus propiedades de autoensamblado y sus potenciales aplicaciones.

## *Objetivos Específicos*

1. Síntesis de una familia de copolímeros en bloque derivados de ésteres metacrílicos (ionizables o no) y comonómero hidrofóbico/hidrofílico.
2. Caracterización micro y macro estructural.
3. Estudio de las propiedades en solución en diferentes solventes a fin de evaluar su comportamiento hidrodinámico en función de las características de los bloques de construcción.
4. Estudio y caracterización de sus propiedades de autoensamblado y agregación supramolecular con el fin de desarrollar aplicaciones en los campos de ciencia de materiales y nanotecnología.
5. Estudio de sus propiedades de agregación sobre superficies sólidas con el fin de diseñar sistemas permselectivos macromoleculares autoensamblados.

## Referencias

- [1] J. Rodríguez-Hernández, F. Chécot, Y. Gnanou, S. Lecommandoux. "Toward 'smart' nano-objects by self-assembly of block copolymers in solution". *Prog. Polym. Sci.* (2005), 30, 691.
- [2] K. Binder. "Phase transition of Polymer blends and Block copolymer melts in thin films". *Advances in Polymer Science.* (1999), 138, 1.
- [3] P. Alexandridis, B. Lindman. "Amphiphilic Block Copolymers: Self-Assembly and Applications". Elsevier: Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, (2000).
- [4] N. Hadjichristidis, H. Iatrou, M. Pitsikalis, S. Pispas, A. Avgeropoulos. "Linear and non-triblock terpolymers. Synthesis, self assembly in selective solvents and in bulk". *Prog. Polym. Sci.* (2005), 30, 725.
- [5] W. A. Braunecker, K. Matyjaszewski. "Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives". *Progress in Polymer Science.* (2007), 32, 93.
- [6] O. W. Webster. "Group transfer polymerization: Mechanism and comparison with other methods for controlled polymerization of acrylic monomers". *Adv. Polym. Sci.* (2004), 167, 1.
- [7] W. T. S. Huck In. "Nanoscale Assembly: Chemical Techniques". Springer-Verlag, New York. (2005).
- [8] J. Gohy. "Block Copolymer Micelles". *Adv. Polym. Sci.* (2005), 190, 65.
- [9] G. Riess. "Micellization of block copolymer". *Prog. Polym. Sci.* (2003), 28, 1107.
- [10] K. Nakashima, P. Bahadur. "Aggregation of water-soluble block copolymers in aqueous solutions: Recent trends". *Advances in colloid and Interface Science.* (2006), 123, 75.



- [11] L. Zhang and A. Eisenberg. "Multiple Morphologies and Characteristics of "Crew-Cut" Micelles-like Aggregates of Polystyrene-*b*-poly (acrylic acid) Diblock Copolymers in Aqueous Solutions". *J. Am. Chem. Soc.* (1996), 118, 3168.
- [12] M. Moffitt, K. Khougaz and A. Eisenberg. "Micellization of Ionic Block Copolymers". *Acc. Chem. Res.* (1996), 29, 95.
- [13] K. Sakai, E. G. Smith, G. B. Webber, E.J. Wanless, V. Bütün, S. P. Armes, S. Biggs. "Effects of copolymer concentration and chain length on the pH-responsive behavior of diblock copolymer micelar films". *Journal of Colloids and Interface Science.* (2006), 303, 372.
- [14] G. B. Webber, E. J. Wanless, V. Btn, S. P. Armes and S. Biggs. "Self-Organized Monolayer Films of Stimulus-Responsive Micelles". *Nanoletters.* (2002), 2, 1307.
- [15] T. Rager, W. H. Meyer, G. Wegner. "Micelle formation of poly (acrylic acid) block-poly (methyl methacrylate) block. Copolymers in mixtures of water with organic solvents". *Macromol. Chem. Phys.* (1999), 200, 1672.
- [16] V. Bütün, S.P. Armes, N.C. Billingham. "Synthesis and aqueous solution properties of near-monodisperse tertiary amine methacrylate homopolymers and diblock copolymers". *Polymer.* (2001), 42, 5993.
- [17] K. Kito-Tokarczyk, J. Grumerlard, T. Haepele, W. Meier. "Block copolymer vesicles-using concepts from polymer chemistry to mimic biomembranes". *Polymer.* (2005), 46, 3540.
- [18] X. He and F. Schmid. "Dynamics of Spontaneous Vesicles Formation in Dilute Solutions of Amphiphilic Diblock Copolymers". *Macromolecules.* (2006), 39, 2654.
- [19] W. Mueller, K. Kaynov, K. Fischer, S. Hartmann, S. Pierrat, T. Basché and M. Maskos. "Hydrophobic Shell Loading of PB-*b*-PEO vesicles". *Macromolecules.* (2009), 42, 357.
- [20] J. Du and R. K. O'Reilly. "Advances and challenges in smart and functional polymer vesicles". *Soft Matter.* (2009), 5, 3544.

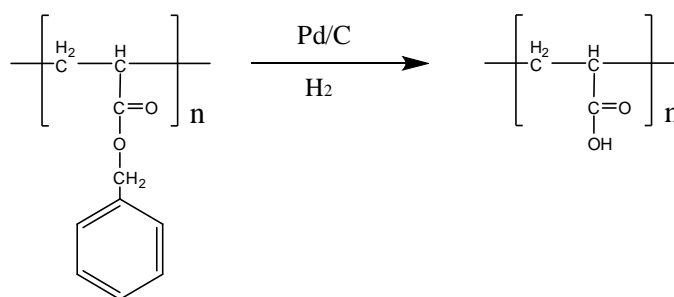
- [21] J. A. Opteen, J. J. L. M. Cornelissen and J. C. M. van Hest. "Block copolymer vesicles". *Pure Appl. Chem.* (2004), 76, 1309.
- [22] L. Ma and A. Eisenberg. "Relationship between Wall Thickness and Size in Block Copolymer Vesicles". *Langmuir.* (2009), 25, 13730.
- [23] L. Luo and A. Eisenberg. "Thermodynamic Size Control of Block Copolymer Vesicles in Solution". *Langmuir.* (2001), 17, 6804.
- [24] R. P. Brinkhuis, F. P. J. T. Rutjes and J. C. M. van Hest. "Polymeric vesicles in biomedical applications". *Polym. Chem.* (2011), 2, 1449.
- [25] M. E. Yildiz, R. K. Prud'homme, I. Robb and D. H. Adamson. "Formation and characterization of polymersomes made by solvent injection method". *Polym. Adv. Technol.* (2007), 18, 427.
- [26] D. A. Balazs and W. T. Godbey. "Liposomes for Use in Gene Delivery". *J. Drug Deliv.* (2011), 2011, 1.
- [27] O. G. Mouritsen. "Lipids, curvature, and nano-medicine". *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* (2011), 113(10), 1174.
- [28] L. Wasungu, D. Hoekstra. "Cationic lipids, lipoflexes and intracellular delivery of genes". *Journal of Controlled Release.* (2006), 116 (2), 255.
- [29] L. Sagalowicz, M. E. Leser. "Delivery systems for liquid food products". *Current Opinion in Colloid y Interface Science.* (2010), 15 (1-2), 61.
- [30] J. Leng, S.U. Egelhaaf, M. E. Cates."Kinetic pathways of spontaneous vesicle formation". *Europhys. Lett.* (2002), 59 (2), 311.
- [31] B. D. Olsen, R. A. Seydman. "Self-assembly of rod-coil block copolymers". *Materials Science and Engineering:R: Reports.* (2008), 62 (2), 37.
- [32] D. Myers. "Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications, Second Edition". John Wiley & Sons, Inc. New York. (1999).

- [33] R. A. Segalman. "Patterning with block copolymer thin films". *Materials Science and Engineering Reports: A Review Journal*. (2005), 48, 191.
- [34] A. Ghosh, C. Wang and P. Kofinas. "Block Copolymer Solid Battery Electrolyte with High Li-Ion Transference Number". *Journal of The Electrochemical Society*. (2010), 157 (7), 846.
- [35] W. S. Shun, J. S. Yoo, Y. H. Bae, D. S. Lee. "Novel injectable pH and temperature sensitive block copolymer hydrogel". *Biomacromolecules*. (2005), 6 (6), 2930.
- [36] S. Chaterji, H. Kwon and K. Park. "Smart Polymeric Gels: Redefining The Limits of Biomedical Devices". *Prog. Polym. Sci.* (2007), 32 (8-9), 1083.
- [37] A. Kumar, A. Srivastava, I. Y. Galaev, B. Mattiasson. "Smart polymers: Physical forms and bioengineering applications". *Prog. Polym. Sci.* (2007), 32, 1205.
- [38] D. F. Miranda. "Interaction and Morphology of Triblock Copolymer-Ionic Liquid Mixtures and Applications for Gel Polymer Electrolytes". *Thesis doctoral* (2012). University of Massachusetts-Amherst.
- [39] K. Kuroda. "Thermally Responsive Polymer and their Applications". *Thesis doctoral* (2003). Institute of Technology. Massachusetts.

## Introducción

La polimerización por transferencia de grupo (Group Transfer Polymerization, GTP) fue desarrollada alrededor de 1970 por Webster y su grupo de trabajo [1]. A pesar de las controversias respecto del mecanismo mediante el cual procede la reacción se ha reconocido a esta técnica como un método excelente para la síntesis de copolímeros en bloque con estructura controlada. Utilizando monómeros (meta) acrílicos, los productos que se obtienen por GTP poseen una distribución de peso molecular muy angosta, típica de las polimerizaciones tipo “living” [2].

Este método de síntesis es conveniente y muy fácil de realizar, permitiendo la selección adecuada de una gran variedad de monómeros para la preparación de los bloques funcionalizados. Estudios previos señalan que la función ácida de algunos grupos funcionales (aquellos grupos que posean protones lábiles, como por ejemplo: ácido carboxílico, aminas y alcoholes, entre otros) causan una terminación abrupta de la reacción de polimerización por ésta técnica. Por este motivo, como medida preventiva para alcanzar altos rendimientos es necesario utilizar ésteres que “enmascaren” los grupos cortadores de cadena y trabajar en una atmósfera de gases nobles o nitrógeno a fin de evitar problemas durante la reacción (la reacción es tan sensible a los protones ácidos que la humedad misma del medio ambiente impide que se lleve a cabo). Bajo tales condiciones, los productos que se obtienen pueden convertirse de manera sencilla por reacciones de desprotección en los grupos funcionales deseados. Las más utilizadas son reacciones de hidrogenólisis catalítica e hidrólisis en medio ácido (Figura. II.1).



**Figura. II.1:** Esquema de una reacción de desprotección. El grupo funcional es liberado al reaccionar en condiciones adecuadas, formando el ácido carboxílico.

Existen tres monómeros que se utilizan de forma habitual como grupos protectores o precursores del ácido metacrílico (AMA) además del mostrado en la figura anterior. Entre ellos se encuentran el metacrilato de tert-butilo, metacrilato de trimetilsililo y metacrilato de tetrahidropiraniolo [3].

En el presente capítulo se reporta la síntesis de una serie de copolímeros en bloque de la familia de metacrilatos mediante la técnica de GTP, así como la obtención de copolímeros en bloque anfifílicos mediante posterior desprotección.

Los productos obtenidos fueron caracterizados e identificados por distintas técnicas. Entre ellas se encuentran: cromatografía de exclusión molecular (SEC), espectroscopías de resonancia magnética nuclear (RMN), infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) y osmometría de presión de vapor (VPO).

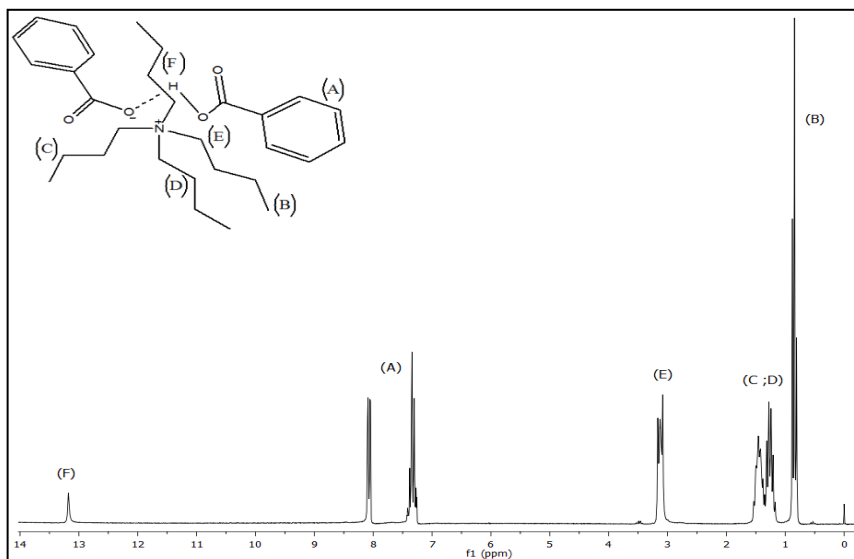
## ***Materiales y Métodos***

- El tetrahidrofurano (THF) (Carlos Erba, PA) se purificó en reflujo con sodio metálico (Riedel de Haën para análisis 99.5%) y benzofenona (Merck, PA) durante varias horas la coloración de la solución de la mezcla cambia con el transcurso del tiempo, de amarillo a un color azul-violáceo. Cuando se alcanza la coloración azul-violáceo se destila el solvente, colectando el destilado en un balón con “molecular sieve” (3Å). El balón colector se tapa con un Septum (el mismo permite extraer alícuotas del solvente sin entrar en contacto con humedad del ambiente) para evitar una posible impurificación. El solvente purificado se dejó en el freezer.
- Cloroformo (Anedra, 98 %)
- Tolueno, donación Repsol-YPF: se secó sobre cloruro de calcio anhidro, se filtró el desecante y se purificó por destilación fraccionada (Peb: 110-111 °C).
- Hexano, donación Repsol-YPF: se secó sobre cloruro de calcio anhidro, se filtró el desecante y se purificó por destilación fraccionada (Peb: 68-69 °C).
- Metanol (Merck, 99.8%).

- El iniciador es un trimetilsilil ceteno acetal (1-methoxy-1-trimethylsiloxy-2-methyl-1-propane, MTS). Se adquirió de Sigma Aldrich y fue usado sin purificar debido al pequeño volumen utilizado (5 ml). El reactivo se comercializa en atmósfera inerte y viene provisto con un septum con el fin de facilitar su manipulación en ausencia de la humedad ambiente.
- Catalizador. Para llevar a cabo este tipo de polimerización se utilizan diferentes tipos de catalizadores nucleofílicos. En el presente trabajo se ha seleccionado el bisbenzoato de tetrabutilamonio (tetrabutyl ammonium bibenzoate, TBABB). La síntesis del mismo se realizó de la siguiente manera [4,5]: Se mezcló un gramo de ácido benzoico (Fluka, PA) y 8 ml de una solución acuosa de hidróxido de tetrabutilamonio (TBA, Fluka, 40 % P/V) y se calentó hasta homogenizar la solución. La mezcla se disolvió con una leve agitación.

Se realizaron extracciones con cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ). Las fracciones orgánicas se juntaron en un balón y se agregó un gramo más de ácido benzoico. Se eliminó el solvente utilizando un rotavapor.

El sólido obtenido es lavado varias veces con alícuotas de 5ml de n-hexano y purificado por recristalización utilizando como solvente el dietil éter. El sólido obtenido es filtrado y secado en vacío hasta peso constante. El rendimiento de la reacción es del 87%. El producto se caracterizó mediante la determinación del punto de fusión (Pf) y se identificó por  $^1\text{H-RMN}$  (Figura.II.2). Pf: 100-102 °C. Estos datos son coincidentes con la bibliografía previamente publicada.



**Figura.II.2:** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del catalizador sintetizado. En el mismo se puede ver la correspondencia de la estructura química con los picos obtenidos.

## Monómeros

Los monómeros utilizados son comerciales y fueron adquiridos de Sigma Aldrich. Los mismos fueron purificados antes de ser usados, eliminando las trazas de inhibidor presentes que impiden que polimericen.

El metacrilato de bencilo (MABz) y el metacrilato de metilo (MAM) fueron purificados por 3 lavados con una solución de NaOH (2% p/v). Las fases acuosas se descartaron. Luego la fase orgánica fue lavada con agua destilada hasta alcanzar un pH igual a 7. De la misma manera las fases acuosas son descartadas y la fase orgánica se secó con CaCl<sub>2</sub> y posteriormente se destiló a presión reducida.

Puntos de ebullición:

MABz: 82-83 °C a 5 mm de Hg de presión.

MAM: 52-54 °C a 80 mm de Hg de presión.

Debido a su solubilidad parcial en agua los monómeros de metacrilato de tert-Butilo (MA<sub>tert</sub>-Bu) y metacrilato de N, N´dimetilaminoetilo (MADMAE) fueron purificados mediante una metodología distinta a la descrita anteriormente [6-8].

La purificación se llevó a cabo en un balón de 100 ml en el que se agregaron 50 ml del monómero a purificar y sodio metálico. El sodio y el monómero se mezclaron por agitación magnética. Los gases desprendidos (se forma hidrógeno gaseoso durante la reacción) son liberados mediante una aguja ubicada en un septum que cierra la boca del balón. La reacción transcurre por 5 horas, luego se retira la aguja del septum y se destila a presión reducida el monómero.

**Nota:** Antes de realizar la destilación, se procedió a filtrar la solución, separando el sodio sin reaccionar y posterior destrucción del mismo antes de su eliminación.

Puntos de ebullición:

MA<sub>tert</sub>-Bu: 65-70 °C a 75 mm de Hg de presión.

MADMAE: 72-72.5 °C a 9 mm de Hg de presión.

El fumarato de diisopropilo (FDIP) empleado en algunos ensayos fue previamente preparado en el laboratorio y solo se procedió a secarlo sobre “molecular sieve” [9].

## ***Polimerización por GTP***

### *Armado del equipo*

El material de vidrio, las agujas de acero, buzo magnético y una trampa con “molecular sieve” (3 Å) se dejan en estufa a 130 °C por 24 horas antes de realizar la reacción, con el objetivo de asegurar la eliminación de restos de humedad del material para la reacción.

Para realizar la síntesis de los copolímeros se utilizó una línea Schlenk (Figura.II.3). La misma cuenta con dos salidas hacia el balón (una de gases y otra de vacío) permitiendo llevar a cabo la reacción bajo atmósfera de un gas inerte de nuestra elección ó realizar la

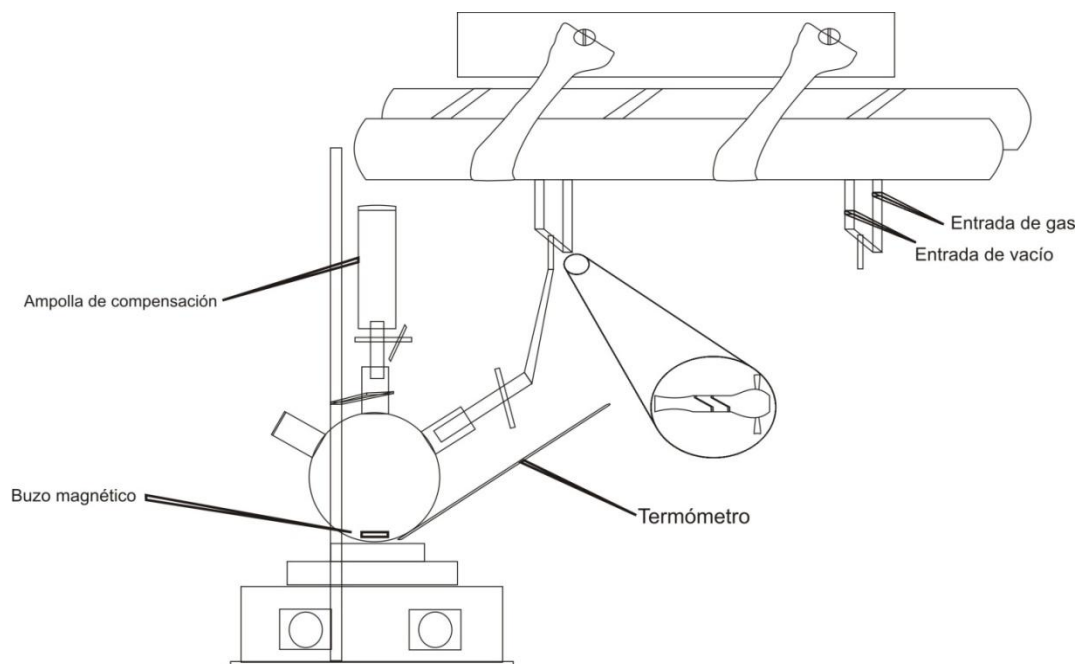


reacción en vacío, evacuando todo el gas que se encuentre en el sistema. Utilizando una llave de doble vía el balón se comunica por una sola de sus entradas (o bocas), dejando las otras entradas para otros usos.

Para llevar a cabo la reacción, la línea de vacío se evacuó durante 1 hora y la línea del gas inerte se purgó con el pasaje de nitrógeno gaseoso durante 45 minutos antes de ser utilizadas (este procedimiento asegura trabajar en condiciones libres de humedad que interfieren en la reacción). El material de vidrio se retira de la estufa y se comienza con el armado del equipo en caliente.

El reactor consistió en un balón de tres bocas. Al mismo se adaptó una ampolla de compensación por medio de la cual se agregó gota a gota el monómero, la segunda de las bocas fue utilizada para la comunicación con la línea Schlenk (entrada de gases o vacío), y a la última se adaptó un septum (Figura. II.3). El mismo permitió agregar el solvente, el catalizador, el iniciador y la toma de muestra del primer bloque (la muestra del primer bloque permite calcular la composición final del copolímero sintetizado).

Una vez armado el equipo, se conectó a la línea de vacío. Se dejó evacuar unos minutos el sistema y se expuso el balón a la llama para eliminar las trazas de humedad. La conexión con el vacío no se cerró durante el calentamiento. El sistema se encuentra cerrado en las bocas restantes por tapones de vidrio que luego fueron reemplazados rápidamente por septum de goma antes de comenzar la reacción.



**Figura.II.3:** Esquema de una Línea Schlenk ensamblada.

La corriente de nitrógeno se hizo pasar a través de un tren de secado (trampa de ácido sulfúrico seguida de una trampa de “molecular sieve” (3Å)) manteniendo seco el nitrógeno que entra al sistema de reacción. Transcurridos unos minutos del calentamiento, el mismo se suspendió y el sistema pasa de vacío a nitrógeno utilizando la línea Schlenk. El sistema se saturó de éste gas por unos minutos. Luego se volvió a conectar el vacío y se procedió a flamear con llama directa el balón. Este proceso cíclico se repitió tres veces, terminando con el balón en atmósfera de nitrógeno para realizar la reacción.

### *Procedimiento de la síntesis*

El nucleófilo TBABB seco y previamente pesado (se deja 24 horas antes de la reacción en un tambor de vacío) se disolvió en un ml de THF. Se agregaron al balón 9 ml de THF, 0.20 ml del iniciador MTS y la solución del catalizador disuelto en una concentración de 10.0 mg/ml. La mezcla de reactivos se agitó de forma magnética. Se cargó la ampolla de compensación con 2.5 ml del monómero que formará el primer bloque.

El mismo se agregó a una velocidad de 0.5 ml/min al balón de reacción bajo agitación suave, evitando que una parte del material quede en las paredes, imposibilitando que entre en contacto para reaccionar.

Los cambios en la temperatura del sistema al agregarse el monómero se midieron empleando un termómetro en contacto con la base del balón donde transcurre la síntesis. Inicialmente al agregar el monómero debido al carácter exotérmico de la reacción la temperatura de la solución aumenta. Luego al transcurrir la polimerización la temperatura comienza a descender.

En estas condiciones se tomó una muestra para su análisis por cromatografía de exclusión por geles (SEC) con el objetivo de estimar el peso molecular promedio del primer bloque.

Se lavó la ampolla de compensación con 2 ml de THF evitando que queden restos del monómero inicial y luego se junta el solvente de limpieza con la solución del balón. Se carga la ampolla con 2.5 ml del monómero que formará el segundo bloque.

Se esperó que el incremento de temperatura producido por la formación del polímero descienda hasta la temperatura inicial de partida antes de agregar el siguiente monómero. La reacción de formación del segundo bloque también está acompañada de un aumento de la temperatura, pero éste es mucho menos pronunciado, y por lo tanto menos visible que el anterior, como ha sido observado por otros investigadores [6,10].

La velocidad del goteo del segundo monómero debe permanecer dentro del rango anterior 0.5 ml/min.

La reacción se dió por finalizada 30 minutos después de la última gota agregada. En este caso, el salto de temperatura correspondiente al agregado del segundo bloque no es de ayuda para detectar el final de la reacción, eso se debe a las dificultades para la realización de la medida así como a las bajas concentraciones de los monómeros utilizadas para síntesis.

### *Aislamiento*

Se trasvasó la solución de THF a un matraz y se agregaron 10 ml de hexano (o metanol, según los monómeros utilizados en la composición de los bloques) dando por finalizada la reacción. Se puede visualizar un precipitado blanco y la sucesiva disolución del mismo. Se elimina el solvente empleando un rotavapor, hasta sequedad. Este procedimiento se comenzó sin temperatura y luego se prosiguió subiendo la temperatura del baño a 50°C. Cuando la muestra estuvo casi seca o presentó un aumento en la viscosidad de la solución se dió por finalizado el secado.

### *Purificación*

Se disolvió el sólido en tolueno en una concentración de 25% P/V y se lo precipitó en hexano (o en metanol) empleando un volumen de 10 veces del tolueno utilizado.

El precipitado se centrifugó en un tubo de plástico, previamente tarado, para determinar la cantidad de masa obtenida y a partir de ella estimar la conversión de polimerización. Se enfrió en el freezer durante unas horas antes de centrifugar el sobrenadante.

Se separó el sólido por decantación. El mismo fue secado hasta peso constante en el tambor de vacío.

Los productos de las reacciones se caracterizaron por espectroscopía infrarroja y cromatografía de exclusión molecular (SEC, por sus siglas en inglés) con el objetivo de evaluar los pesos moleculares promedios y la polidispersidad de las muestras obtenidas.

Para la identificación de los productos y el cálculo de las unidades monoméricas en los distintos bloques se empleó  $^1\text{H}$ -RMN. Esta información permitió calcular la composición y la relación entre los bloques hidrofóbico/hidrofílico.

### *Obtención del MABz-b-AMA*

La síntesis del copolímero MABz-b-AMA se llevó a cabo partiendo de un copolímero en bloque previamente sintetizado, MABz-b-MAtert-Bu.

La reacción para desproteger y obtener el grupo funcional ácido carboxílico, consiste en una hidrólisis en medio ácido del grupo funcional éster, utilizando para tal fin ácido clorhídrico [7, 11,12]. En un erlenmeyer de 50 ml se agregó dioxano (Merck, PA), solvente de reacción, ácido clorhídrico (Aldrich 36%. Reactivo ACS) y el polímero que se deseó desproteger. El sistema se llevó a la temperatura de 110°C, por encima del punto de ebullición del solvente. Se dejó la solución en reflujo durante 8 horas. Transcurrido este tiempo se eliminó el solvente utilizando un rotavapor. El sólido obtenido se seca en el tambor de vacío hasta peso constante.

El producto se analizó por espectroscopia infrarroja para caracterizarlo y <sup>1</sup>H-RMN para identificarlo.

### *Técnicas de caracterización*

#### *Cromatografía de exclusión molecular (SEC)*

La cromatografía de exclusión molecular es una técnica de cromatografía líquida en columna que separa las moléculas de acuerdo a su tamaño molecular en solución. En dicha columna se introduce una solución que contiene la muestra, la columna está rellena con partículas porosas de estructura rígida y la muestra es transportada por el solvente (fase móvil) a través de la columna. La separación por tamaños tiene lugar por repetidos intercambios de las moléculas del soluto entre la masa del solvente de la fase móvil y la fase líquida estanca entre los poros del empaque. El tamaño del poro del relleno es el que determina el rango de tamaños moleculares dentro del cual ocurrirá la separación.

El mecanismo de retención en SEC es muy diferente del de otras técnicas de cromatografía líquidas por el hecho de que la distribución de solutos entre las fases se establece por efectos entrópicos en lugar de ser por diferencias entálpicas.

A la salida de la columna se sitúa un detector que permite medir la concentración en función del volumen de elución y si esta concentración se transforma en fracción en peso, se obtiene el perfil cromatográfico de SEC. Dicho cromatograma da información cualitativa de la distribución; si se desea obtener valores de pesos moleculares hay que realizar una calibración previa midiendo los volúmenes de elución de muestras de polímeros de pesos moleculares conocidos, permitiendo transformar los volúmenes de elución en pesos moleculares. La calibración permite obtener la curva de distribución de pesos moleculares de la que se pueden calcular los pesos moleculares promedios.

Los copolímeros sintetizados fueron caracterizados por Cromatografía de Exclusión Molecular (SEC) con un equipo de cromatografía líquida LKB-2249 con una serie de cuatro columnas de exclusión molecular  $\mu$ -Styragel ( $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  y  $100$  Å de tamaño de poro). Esta técnica permitió establecer las medidas de los pesos moleculares promedio de los polímeros y las distribuciones de los mismos. Las corridas cromatográficas se realizaron a  $25^\circ\text{C}$  y como solvente de elución se utilizó cloroformo. Las concentraciones de los polímeros inyectados oscilaron entre 4-5 mg/ml. La velocidad de elución fue de 0.5 ml/min. Los elugramas fueron analizados por doble detección, tal como describieron Cortizo y colaboradores [13] mediante un detector Uv- visible de longitud de onda variable, seleccionada a 254 nm, longitud de onda correspondiente al máximo de absorción de los anillos aromáticos, presentes en el monómero de MABz. En serie al anterior se colocó un detector de infrarrojo (Miram 1A), seleccionado a  $5.75 \mu\text{m}$  ( $1710 \text{ cm}^{-1}$ ) correspondiente a la frecuencia de absorción del grupo carbonilo presente en ambos monómeros. Se utilizó una calibración basada en estándares de poliestireno de distintos pesos moleculares.

### *Osmometría de presión de vapor (VPO)*

La osmometría de presión de vapor permite obtener el peso molecular promedio en número o  $M_n$  con un error cercano al 5 % en muestras polidispersas de pesos moleculares menores a 20.000 g/mol. En la osmometría de presión de vapor se determina el peso molecular de una sustancia por las diferencias en los potenciales químicos entre un solvente y una solución conteniendo la muestra de interés en el mismo solvente. Las medidas se realizaron con un equipo Knauer a  $37^\circ\text{C}$ , empleando cloroformo como solvente. Los

valores de  $M_n$  se obtuvieron empleando una función de calibración del tipo  $(\Delta V/c)_{c=0} = KM_n^\alpha$ , donde  $\Delta V$  es el cambio en el voltaje del termistor y  $c$  es la concentración [14]. Las constantes de calibración  $K$  y  $\alpha$  se obtuvieron a partir de lignoserato de metilo, tripalmitato de glicerilo y muestras de PS estándar que cubren el siguiente rango de pesos moleculares  $383 < M_n < 9000$ .

### *Resonancia Magnética Nuclear (RMN)*

Esta técnica fue empleada para identificar los copolímeros sintetizados y determinar la composición de los mismos en función del número de unidades repetitivas de cada monómero que conforma cada bloque.

Para las medidas se utilizó un equipo Varian-200 MHz (Mercury 200).

Las muestras fueron disueltas en cloroformo deuterado (10% P/V) y se utilizó tetrametil silano (TMS) como estándar interno. Las medidas se llevaron a cabo a 20°C.

La composición de los copolímeros se estimó mediante la relación de las integraciones entre los hidrógenos aromáticos I (Ar) del MABz y los hidrógenos alifáticos característicos de los otros monómeros que componen al copolímero, I(Al) en los espectros  $^1\text{H}$ -RMN, estando la señal aromática comprendida entre  $\delta = 6.5$  y  $7.75$  ppm y la señal alifática entre  $\delta = 1.0$  y  $4.8$  ppm. La ecuación empleada para esto es la siguiente:

$$F_{MABz} = \frac{xI(Ar)}{xI(Ar) + 5I(Al)} \quad \text{Ec.II.1}$$

Donde  $x$  toma los siguientes valores: 3 para MAM (-OCH<sub>3</sub>);

9 para MA<sub>tert</sub>-Bu (-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 2 para DMAEMA (-CH<sub>2</sub>-) y 6 para FDIP ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

### *Espectroscopia Infrarroja (IR)*

Este método espectroscópico fue utilizado para caracterizar los copolímeros sintetizados a lo largo de este trabajo. El equipo utilizado es un espectrómetro Varian FT-IR 600 Series.

Las medidas se realizaron utilizando una película del polímero obtenida por el método de “casting” sobre una pastilla de cloruro de sodio. Para cada muestra se preparó una solución al 7 % P/V en cloroformo y se agregó gota a gota sobre la pastilla de cloruro de sodio. Se evaporó el solvente a temperatura ambiente. Luego se agregaron más gotas sobre la película formada y se dejó secar. Este procedimiento se repitió hasta conseguir el espesor necesario de la película que permita obtener una buena medida en el equipo. La película final obtenida se secó en tambor de vacío a peso constante, para asegurar la total eliminación del solvente.

### *Resultados y Discusión*

La Tabla.II.1 presenta los resultados obtenidos a partir de las diferentes síntesis realizadas. En todos los casos la relación iniciador/catalizador fue de 25, mientras que la relación monómero/iniciador fue de 10.

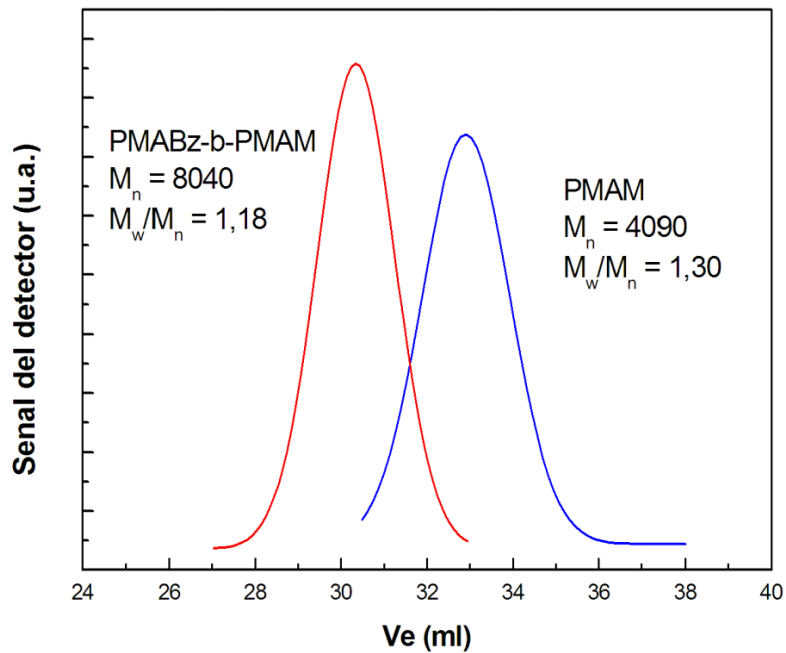


Muestra	Copolímero	Composición B1:B2	M <sub>n</sub> (SEC) (g/mol)	M <sub>n</sub> (VPO) (g/mol)	% de Conversión	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>
1	PMAM-b-PMABz	65:35	8040		60	1.2
2	PMABz-b-PMAM	70:30	4610		40	1.3
3	PMABz-b-PFDIP	99:1	3544		38	1.1
4	PMABz-b-PFDIP	97:3	8205	7103	38	1.3
5	PMABz-b-PFDIP	98:2	2930		68	1.2
6	PMABz-b-PMA <sub>tert</sub> -Bu	83:17	6590		40	1.3
7	PMABz-b-PMA <sub>tert</sub> -Bu	91:9	2120	2971	39	1.1
8	PMABz-b-PMA <sub>tert</sub> -Bu	97:3	2960		59	1.1
9	PMABz-b-PMA <sub>tert</sub> -Bu	99:1	2990	3619	58	1.2
10	PMABz-b-P MADMAE	80:20	5100 *		36	1.3
11	PMABz-b-P MADMAE	56:44	2640 *		94	1.2

\* Corresponde al M<sub>n</sub> del 1er bloque

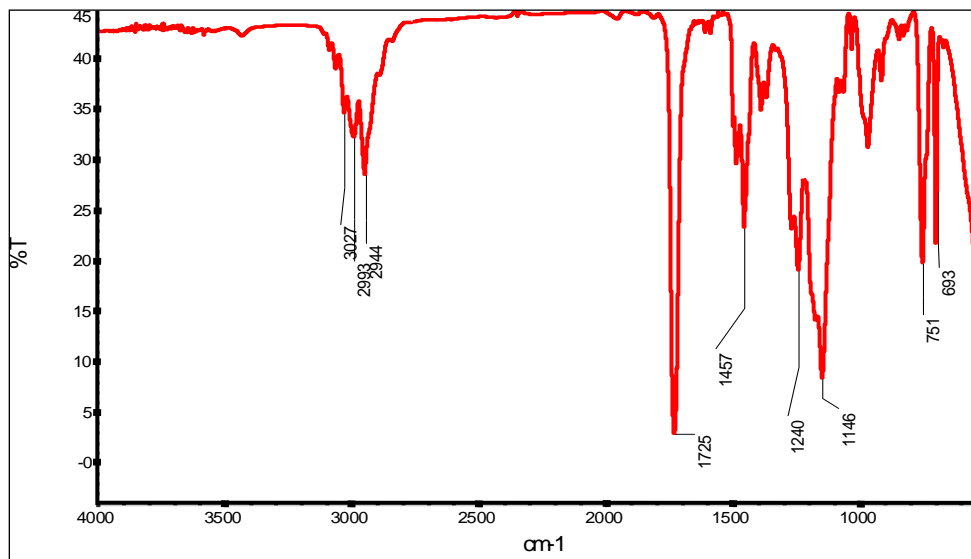
**Tabla.II.1:** Datos de conversión, M<sub>n</sub>, M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub> y composición de los copolímeros sintetizados

El primer copolímero sintetizado fue el PMAM-b-PMABz. En la Figura.II.4 se muestran los perfiles cromatográficos del 1er bloque correspondiente al PMAM (traza en color azul de menor peso molecular) y el copolímero final PMAM-b-PMABz (en color rojo de mayor peso molecular). Dichos elugramas ponen de manifiesto la eficiencia en la reacción de propagación del macroanión que da lugar a la formación del copolímero en bloque. Además, la ausencia de una cola hacia pesos moleculares bajos en la traza del copolímero en bloque indica que no existe contaminación con el homopolímero.



**Figura.II.4:** Perfiles Cromatográficos del 1er bloque de MAM y del copolímero PMAM-b-PMABz.

En la Figura.II.5 se presenta el espectro FTIR junto con la asignación de las bandas que caracterizan al copolímero indicado. Las bandas más importantes asignadas son: ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3027 ( $\nu_{\text{C-H}}$  aromáticos); 2993 y 2944 ( $\nu_{\text{C-H}}$  alifáticos); 1725 ( $\nu_{\text{C=O}}$  esteres); 1457 ( $\delta_{\text{C-H}}$  alifáticos) 1240 y 1146 ( $\nu_{\text{C-O}}$  simétrico y asimétrico, esteres); 751 y 693 ( $\delta_{\text{C-H}}$  fuera del plano, aromático monosustituido).

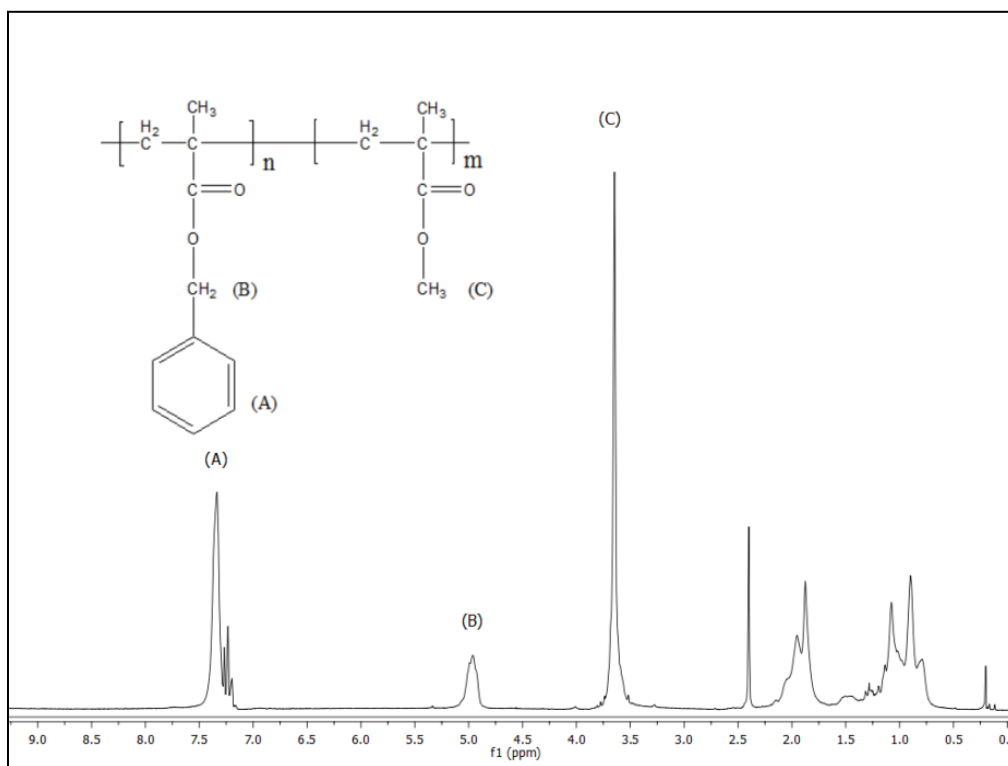


**Figura.II.5:** Espectro IR del copolímero MABz-b-MAM

Una vez adquirido el espectro de IR, que permitió caracterizar al compuesto sintetizado, se realizó un <sup>1</sup>H-RMN para su identificación (Figura.II.6) y poder determinar la composición de cada uno de los monómeros del copolímero. Para calcular las composiciones se tiene en cuenta el área del pico correspondiente al grupo funcional característico del monómero utilizado (C). En éste caso, el área del pico (C) corresponde al metilo del éster y el área del pico (A) fue asignada a los hidrógenos aromáticos, empleando la Ecuación.II.2 obtenemos la composición del copolímero sintetizado

$$F_{MABz} = \frac{3I(Ar)}{3I(Ar) + 5I(Al)} \quad \text{Ec.II.2}$$

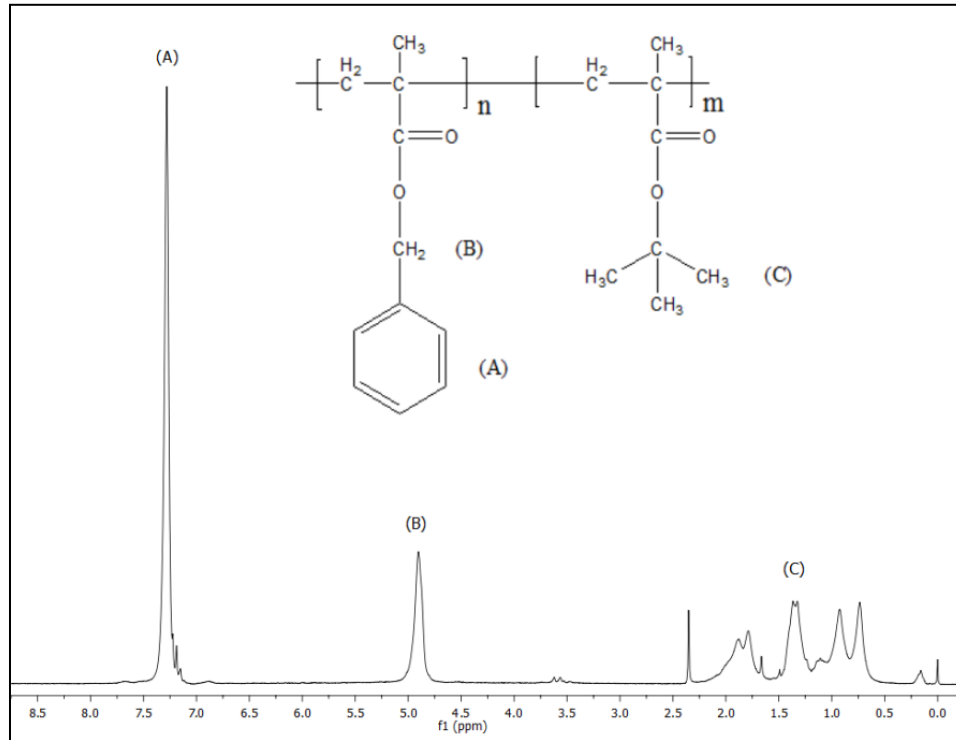
El valor que se obtiene al realizar los cálculos es de 65:35 para los respectivos bloques correspondiente a la muestra VI de la Tabla.II.1



**Figura.II.6:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del copolímero MABz-b-MAM.

Los copolímeros obtenidos a partir del monómero MA<sub>tert</sub>-Bu en su mayoría son de bajo peso molecular y aunque las polidispersidades son bajas, no se incorporaron muchas unidades monoméricas al bloque. Aunque se sabe que éstos monómeros reaccionan de forma eficiente por ésta técnica, éste comportamiento puede ser consecuencia de diversos factores, tales como la incorporación de trazas de humedad o la pureza del monómero. El  $M_n$  de algunas de estas muestras fue analizado mediante VPO con el objetivo de verificar el valor obtenido por SEC. Como se observa en la Tabla.II.1, los resultados concuerdan bastante bien (dentro del error experimental), como se ha verificado para otros sistemas [15, 16].

El copolímero en bloque obtenido fue identificado por  $^1\text{H}$ -RMN (Figura.II.7), a partir de cuyo espectro se determinó también la composición.



**Figura.II.7:** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del copolímero MABz-b-MAtert-Bu

Este copolímero fue sometido a la reacción de desprotección para obtener como producto final el grupo funcional del ácido carboxílico en la cadena polimérica, permitiendo obtener un copolímero cuya estructura posee un bloque hidrofóbico y otro hidrofílico. El mismo fue analizado mediante <sup>1</sup>H-RMN y FTIR, Figura.II.8 y Figura.II.9, respectivamente.

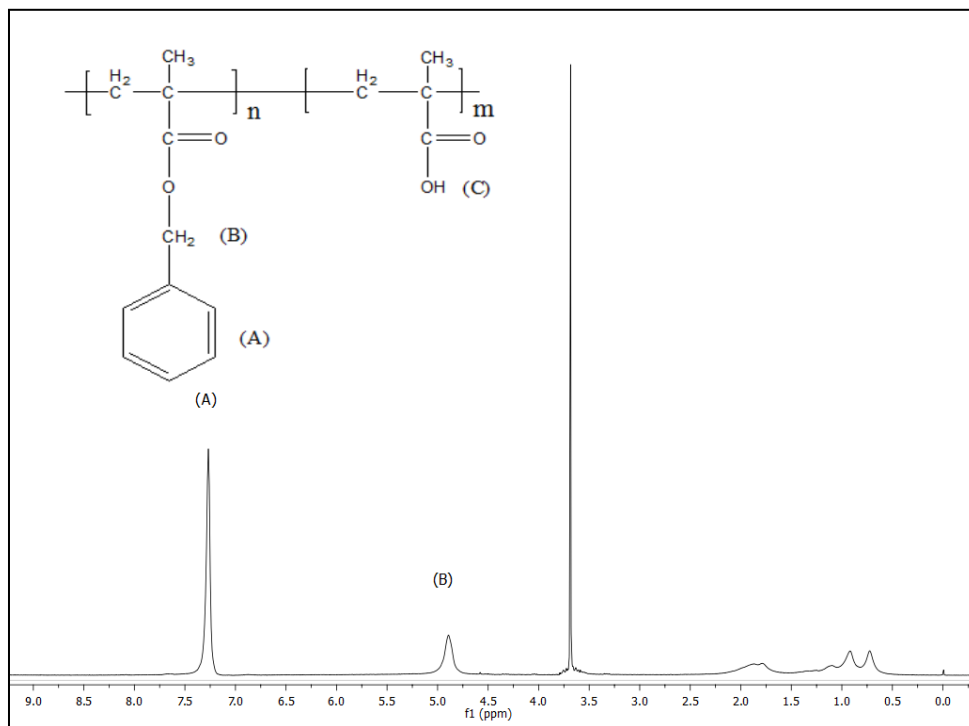


Figura.II.8: Espectro de  $^1\text{H-RMN}$  del copolímero MABz-b-AMA

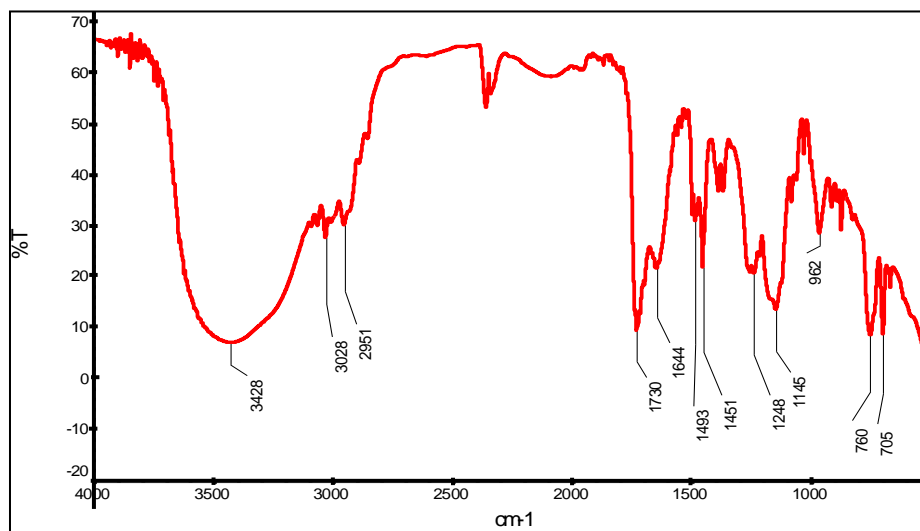


Figura.II.9: Espectro IR del copolímero MABz-b-AMA

En la Figura.II.9 se muestran las bandas del espectro FTIR que caracterizan al copolímero MABz-b-AMA. Las bandas más importantes asignadas son: (cm-1) 3428 ( $\nu_{\text{O-H}}$  -COOH, ácidos); 3028 ( $\nu_{\text{C-H}}$  aromáticos); 2951 ( $\nu_{\text{C-H}}$  alifáticos); 1730 ( $\nu_{\text{C=O}}$  esteres); 1644 ( $\nu_{\text{C=O}}$  asociaciones intramoleculares, ácidos); 1248 y 1145 ( $\nu_{\text{C=O}}$  simétrico y asimétrico, esteres); 760 y 705 ( $\delta_{\text{C-H}}$  fuera del plano, aromático monosustituido).

Los copolímeros formados a partir del éster metacrílico con grupo amino tienen baja polidispersidad y en algunos casos se han podido llegar a conversiones altas, alcanzando casi la formación del 100 % del producto esperado. Estos copolímeros fueron los primeros en alcanzar una relación de casi el 50/50 en composición. Ambos monómeros son muy reactivos y de fácil identificación en el espectro de  $^1\text{H-RMN}$  por sus picos característicos.

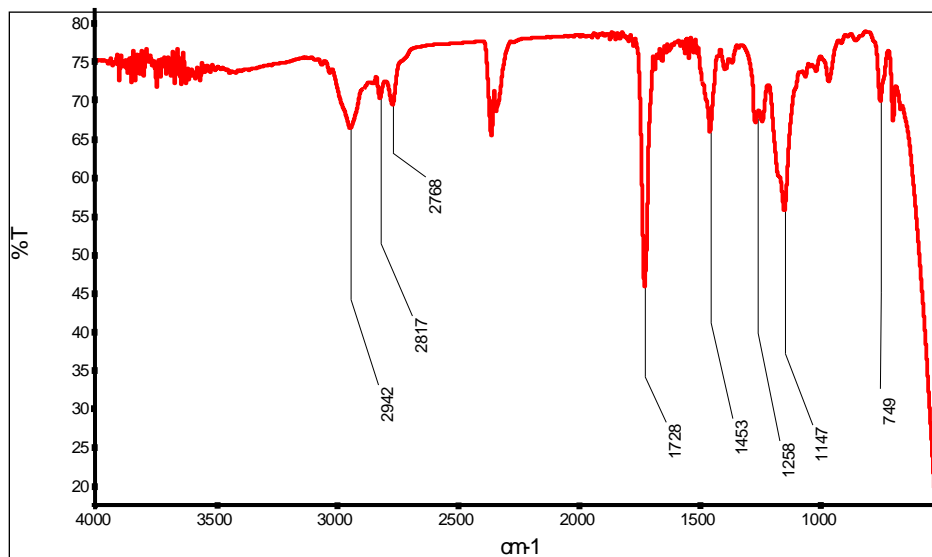
Respecto a la evaluación del peso molecular promedio de estos copolímeros mediante SEC, prácticamente no se observaron diferencias entre el  $M_n$  del 1er y 2do bloque. Por ejemplo, para el copolímero PMABz-b-PMADMAE (**10**), los valores determinados fueron 5100 y 5280, para el 1er y 2do bloque, respectivamente. Esta diferencia ha sido atribuida a posibles interacciones intracatenarias del polímero en el solvente seleccionado para las medidas realizadas por SEC y/o con el relleno de las columnas. El cromatograma resultante es un reflejo de la distribución de los tamaños moleculares evaluados a partir de una calibración basada en un estándar de poliestireno (PS) lo que significa que se trata de valores aparentes. Si el comportamiento en solución del polímero analizado difiere del de dicho estándar, pueden surgir diferencias entre los valores calculados y los reales. La relación entre el tamaño molecular y el peso molecular depende de la conformación del polímero en solución. Si las interacciones polímero-solvente, son pobres, la macromolécula adoptará una conformación más compacta, su volumen hidrodinámico será menor y por ello el valor del  $M_n$  determinado experimentalmente diferirá del real [17].

Es posible que las interacciones entre el bloque MADMAE en  $\text{Cl}_3\text{CH}$  (solvente de dilución y de fase móvil) originen un volumen hidrodinámico menor al tamaño de la macromolécula en una conformación de ovillo estadístico. Al ser un solvente poco polar dificulta las interacciones con los grupos funcionales polares del bloque evitando que se solvate adecuadamente, es decir se comporta como un solvente pobre.

Ante esta dificultad, los pesos moleculares de los bloques correspondientes a los copolímeros con bloques MADMAE se evaluaron empleando el peso molecular del primer bloque obtenido por SEC y la relación de composición de los bloques en el copolímero dada por el  $^1\text{H}$ -RMN (Figura.II.11). Por ejemplo, el 1er bloque del copolímero PMABz-b-PMADMAE (**11**) en la Tabla.II.1 tiene un  $M_n$  de 2640 g/mol. Este valor corresponde a una cadena formada por 15 unidades repetitivas de MABz. La composición obtenida por  $^1\text{H}$ -RMN (Tabla.II.1) del copolímero es de 56:44. Haciendo uso del valor de la composición se puede calcular el  $M_n$  correspondiente a las unidades repetitivas del monómero MADMAE. Así, el 2do bloque está formado por 12 unidades monoméricas de MADMAE, dando un valor del  $M_n$  para este bloque de 1852 g/mol. Por lo tanto, el valor final del  $M_n$  para el copolímero PMABz-b-PMADMAE (**11**) es de 4500 g/mol.

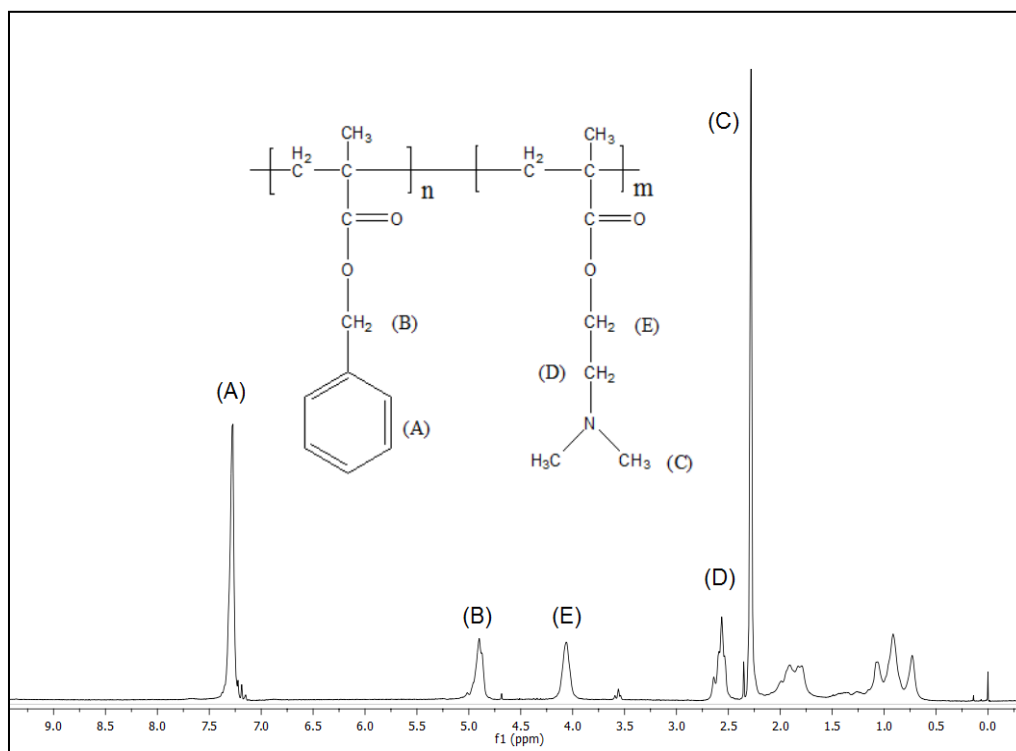
Similarmente se ha estimado que el  $M_n$  de la muestra PMABz-b-PMADMAE (**10**) es de 6200 g/mol.





**Figura.II.10:** Espectro IR del copolímero PMABz-b- PMADMAE

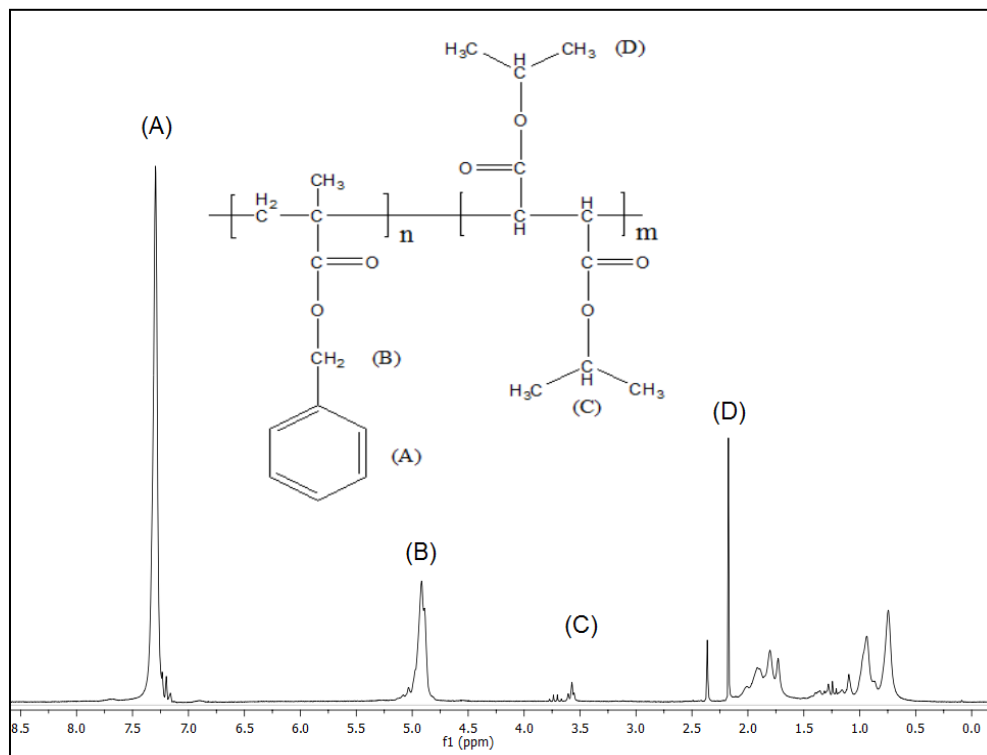
En la Figura.II.10 se muestran las bandas del espectro IR que caracterizan al copolímero PMABz-b-PMADMAE. Las bandas más importantes asignadas son: ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) 2942 y 2817 ( $\nu_{\text{C-H}}$  alifáticos); 1728 ( $\nu_{\text{C=O}}$  esteres); 1453 ( $\delta_{\text{C-H}}$  alifáticos) 1258 y 1147 ( $\nu_{\text{C-O}}$  simétrico y asimétrico, esteres); 749 ( $\delta_{\text{C-H}}$  fuera del plano, aromático monosustituido).



**Figura.II.11:** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del copolímero MABz-b-MADMAE

Finalmente, la reactividad de los fumaratos por GTP no es conocida y este ha sido el origen del interés en intentar la obtención de copolímeros en bloques con este monómero. Los fumaratos presentan una estructura química muy diferente de los monómeros metacrílicos. Se tratan de monómeros etilénicos 1,2-disustituídos, cuya reactividad en polimerización radical ha sido previamente estudiada [18]. La principal característica de este tipo de monómeros es su lenta cinética de polimerización, en comparación a la mayoría de los monómeros vinílicos y acrílicos conocidos, la cual se atribuyó inicialmente al impedimento estérico entre sus sustituyentes vecinos [19]. Posteriormente se demostró que la baja reactividad de estos monómeros puede ser mejorada empleando condiciones de calentamiento por microondas, lo que pone de manifiesto el efecto de las condiciones de reacción sobre la reactividad de los mismos [9]. Por otro lado,

existen escasos estudios en los que se mencione la polimerización aniónica de fumaratos, a pesar de que por sus características estructurales (grupos atractores de electrones y estabilizadores del macroanión en propagación) serían buenos candidatos para llevar a cabo tal tipo de polimerizaciones [20].



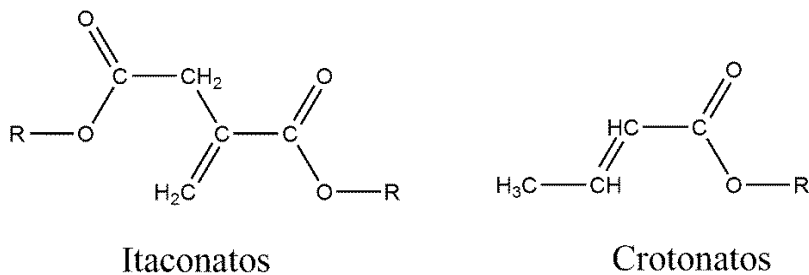
**Figura.II.12:** Espectro de  $^1H$ -RMN del copolímero MABz-b-FDIP.

En la Tabla.II.1 se puede observar la baja incorporación de las unidades repetitivas típicas del monómero fumárico en el copolímero en bloque, lo que indica su poca o escasa reactividad empleando este método de síntesis. El bloque está conformado como máximo por 3 unidades monoméricas. La Figura.II.12 presenta el espectro  $^1H$ -RMN del copolímero PMABz-b-PFDIP (**3**) junto con la asignación de las señales, de cuya integración se ha determinado la composición. Si bien en los 3 casos las reacciones se llevaron a cabo

empleando las mismas relaciones de iniciador, catalizador y monómero ( $[I]: [C]: [M]$ ), se observan diferencias en la conversión y los pesos molecular promedio obtenidos, aunque en todos los casos las muestras presentan un bajo índice de polidispersidad, típico de las polimerizaciones “living”. Estas diferencias pueden ser atribuidas a la pureza o contenido de humedad del monómero, como se ha señalado en otros estudios [20].

Una de las muestras PMABz-b-PFDIP (**4**) fue analizada por VPO, con el objetivo de verificar el valor de  $M_n$  determinado por SEC, el cual se halló dentro del mismo orden de magnitud. Como se señaló anteriormente, los fumaratos no han sido muy estudiados respecto a su comportamiento o reactividad en polimerizaciones aniónicas. Por lo cual se hace una analogía con otras familias de monómeros etilénicos 1,1 o 1,2-disustituídos para tratar de interpretar los resultados obtenidos.

Los monómeros elegidos para la comparación son los crotonatos y los itaconatos. La estructura general de cada una de las familias de éstos compuestos se muestran en la Figura.II.13. Los crotonatos han sido estudiados por Hatada y colaboradores [21] donde argumentan que la resistencia de estos monómeros a polimerizar por GTP se debe a las condiciones de trabajo que se emplean de forma típica (las mismas condiciones descriptas en “Procedimiento de la síntesis”). Sus estudios, empleando solventes no polares como  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , y un sistema de catalizador no nucleofílico ( $\text{I}_2\text{Hg}/\text{ISiEt}_3$ ) dieron como resultado polímeros con valores de  $M_n$  entre 56000 y 90000, confirmando que no todos los monómeros tienen la misma reactividad bajo las mismas condiciones.



**Figura.II.13:** Estructuras de los ésteres de los ácidos crotonico y itacónico, donde R representa una cadena de carbonos alifáticos

Por otra parte los itaconatos pueden polimerizar vía radicalaria alcanzando altas conversiones [22], pero la síntesis por GTP no dio buenos resultados, conduciendo a la incorporación de pocas unidades a la cadena en crecimiento [23].

Con todo lo expuesto, los resultados obtenidos en este trabajo al emplear fumaratos como bloque final, son los esperados en base a otras investigaciones sobre sistemas similares. Probablemente un cambio en las condiciones de iniciación permitiría obtener bloques de mayor tamaño molecular, empleando GTP como técnica de polimerización. A pesar de la baja reactividad observada para FDIP bajo las condiciones empleadas, este monómero puede utilizarse como un eficiente funcionalizador final del copolímero, confiriéndole a dicho extremo de cadena particularidades hidrofóbicas y altamente resistentes a las condiciones de hidrólisis (desprotección), en comparación con monómeros del tipo metacrilato.

### *Conclusiones parciales*

- En particular se han obtenido copolímeros, de la familia de los metacrilatos, con distintos bloques funcionalizados empleando la técnica de GTP.
- Los productos de estas síntesis fueron caracterizados e identificados y todos presentan una baja polidispersidad.
- La síntesis de copolímeros con FDIP utilizando las mismas condiciones que los restantes copolímeros, dieron resultados similares a los de bibliografía consultada.
- Las aplicabilidades de estos copolímeros serán estudiadas en los siguientes capítulos de la tesis.

## Referencias

- [1] O. W. Webster, W.R. Hertler, D.Y. Sogah, W.B. Farnham, RajanBabu T.V. "Group Transfer Polymerization. I. A New Concept for Addition Polymerization with Organosilicon Initiators" *J. Am. Chem. Soc.* (1983), 105, 5706.
- [2] O. W. Webster. "Group Transfer Polymerization: Mechanism and Comparison with Other Methods for Controlled Polymerization of Acrylic Monomers". *Adv. Polym. Sci.* (2004), 167, 1.
- [3] C. S. Patrickios. "Acrylic polyampholyte solution for protein separations" Thesis doctoral (1994). Massachusetts Institute of Technology.
- [4] V. G. Puranik, S.S. Tavale, W.S. Iyer, J.C. Sehra and S. Sivaram. "Tetrabutylammonium Hydrogen Bisbenzoate: Crystal Structure and Study of Short Hydrogen Bonds in Hydrogen Bisbenzoate Anion System". *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* (1993), 8, 1517.
- [5] T. A. Dyakonov, B. Huang, A. Hamoudi, D. H. Burns, Y. Liu, W.T.K. Stevenson. "Poly (benzyloxy ethyl methacrylate): preparation by free radical polymerization and by group transfer polymerization; with subsequent debenzoylation to form poly (2-hydroxyethyl methacrylate)". *European Polymer Journal.* (2000), 36, 1779.
- [6] J. I. Amalvy, G.-F. Unali, Y. Li, S. Granger-Bevan, and S. P. Armes. "Synthesis of Sterically Stabilized Polystyrene Latex Particles Using Cationic Block Copolymers and Macromonomers and Their Application as Stimulus-Responsive Particulate Emulsifiers for Oil-in-Water Emulsions". *Langmuir.* (2004), 20, 4345.
- [7] M. Vamvakaki, N. C. Billingham and S.P. Armes. "Synthesis of novel block and statistical methacrylate-based ionomers containing acidic, basic or betaine residues". *Polymer.* (1998), 39, 2331.

[8] W. Mormann, J. Ferbitz. "Copolymers from tert-butyl methacrylate and itaconic anhydride–reactivity ratios and polymer analogous reactions". *European Polymer Journal*. (2003), 39, 489.

[9] M. S. Cortizo. "Polymerization of diisopropyl fumarate under microwave irradiation". *J. Appl. Polym. Sci.* (2007), 103, 3785.

[10] V. Büttin, S.P. Armes, N.C. Billingham. "Synthesis and aqueous solution properties of near-monodisperse tertiary amine methacrylate homopolymers and diblock copolymers". *Polymer*. (2001), 42, 5993.

[11] H. Mori, A. H.E. Müller. "New polymeric architectures with (meth) acrylic acid segments". *Prog. Polym. Sci.* (2003), 28, 1403.

[12] E. Kaditi, G. Mountrichas, S. Pispas. "Amphiphilic block copolymers by a combination of anionic polymerization and selective post-polymerization functionalization". *European Polymer Journal*. (2011), 47, 415.

[13] M. S. Cortizo, H. A. Andreetta, R. V. Figini" Molecular characterization of poly (diisopropyl fumarate) by the absolute calibration method in molecular exclusion chromatography (GPC)". *Journal of High Resolution Chromatography*. (1989), 12, 372.

[14] R. Figini "On the molecular weight determination by vapor pressure osmometry (VPO), 2. Molecular weight average obtained by VPO". *Die Makromol. Chem.* (1980), 181, 2409.

[15] J. Allgaier, A. Poppe, L. Willner and D. Richter "Synthesis and Characterization of Poly[1,4-isoprene-b-(ethyleneoxide)] and Poly[ethylene-co-propylene-b-(ethylene oxide)] Block Copolymers". *Macromolecules*. (1997), 30, 1582.

[16] M. Miyamoto, Y. Itoh, C. W. Lee, Y. Kimura, R. Kanayama, K. Horii "Cationic Ring-Opening Polymerization of (S)-2-Ethoxy-4-isopropyl-5(4H)-oxazolone To Yield Poly(N-ethoxycarbonyl-L-valine)". *Macromolecules*. (1997), 30, 1863.

[17] Seymour/Carraher's. *Polymer Chemistry. Seven Editions* (2006). Charles E. Carraher, Jr. Florida Atlantic University, Boca Raton, Florida, U.S.A.



- [18] M. S. Cortizo. “*Síntesis y Caracterización de Homo- y Copolímeros de Fumarato de Diisopropilo*”. Tesis doctoral (1992). Universidad Nacional de La Plata, Argentina,
- [19] G. Odian. “*Principles of Polymerization*”. John Wiley & Sons, Inc. Fourth edition. (2004), 3, 277.
- [20] T. Kitano, A. Ishigaki, G-I. Uematsu, S. Kawaguchi and K. Ito. “*Preparation of poly (fumaric acid) from poly (di-t-butyl fumarate) and poly (di-trimethylsilyl fumarate)*”. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. (1987), 25, 979.
- [21] K. Ute, T. Tarao and K. Hatada. “*Group Transfer Polymerization of Methyl Crotonate*”. *Polymer Journal*. (1997), 29, 957.
- [22] L. J. Rojas Rojas, O. García Sánchez, F. López Carrasquero. “*Estudio preliminar de la polimerización del metacrilato de octadecilo con el itaconato de dimetoxietilo*”. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. (2011), 12, 23.
- [23] E. Kassi, M. S. Constantinou, C. S. Patrickios. “*Group transfer polymerization of biobased monomers*”. *European Polymer Journal*. (2013), 49, 761.

## *Introducción*

Los copolímeros en bloque anfifílicos, son una clase particular de copolímeros en bloque que presentan la particularidad de contener en su estructura tanto un segmento hidrofóbico como uno hidrofílico. Esta característica estructural les confiere propiedades muy particulares e interesantes desde el punto de vista de sus aplicaciones.

De forma semejante a las macromoléculas biológicas, tales como las proteínas, pueden plegarse en hélices o láminas y agregarse en grandes estructuras tales como los ribosomas [1]. Así, una de las propiedades más relevantes de estos copolímeros se pone de manifiesto en su comportamiento en solución.

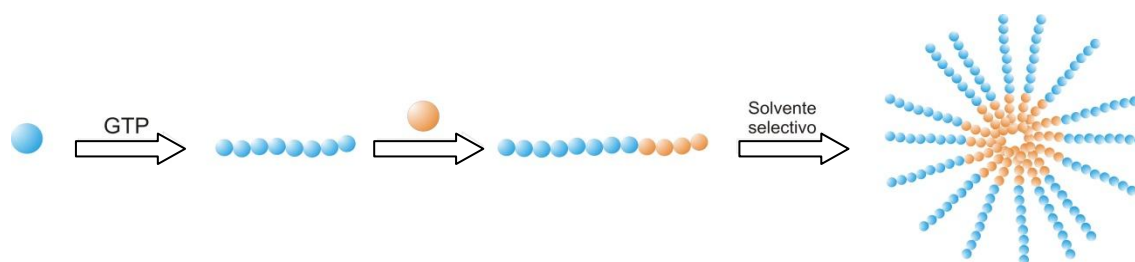
Si un copolímero en bloque anfifílico se disuelve en un solvente que disuelve preferencialmente uno solo de los bloques, denominado “solvente selectivo”, sus moléculas tienden a organizarse de manera de formar agregados similares a los obtenidos con tensioactivos de bajo peso molecular, tales como las micelas. Por ejemplo, en un solvente no polar, el segmento hidrofóbico del copolímero estará altamente solvatado, mientras que los segmentos hidrofílicos tenderán a agregarse entre sí creando su propio ambiente hidrofílico y viceversa. La autoorganización de los copolímeros en bloque anfifílicos puede dar lugar a diferentes morfologías, incluyendo micelas, varillas, lamelas y vesículas [2]. Entre ellas la formación de micelas es el tipo de organización más común. Generalmente son nanoscópicas, esféricas y con una estrecha distribución de tamaños.

La formación de las mismas se produce a una concentración determinada designada como la concentración micelar crítica (CMC). Por encima de la CMC las moléculas anfifílicas se asocian en ensamblados supramoleculares llamados micelas que están en equilibrio con las moléculas no asociadas (unímeros). El proceso de micelización es el resultado de un balance entre fuerzas repulsivas y atractivas, cuyo inicio trae consigo cambios significativos en el valor de algunas propiedades macroscópicas del sistema. Entre ellas se pueden mencionar: tensión superficial, conductividad, densidad, presión osmótica y dispersión de luz. Al analizar el comportamiento de estas propiedades en función de la concentración del copolímero en bloque anfifílico, se observa un claro quiebre en la gráfica que representa la propiedad evaluada, a partir del cual es posible la determinación directa y

relativamente sencilla de la concentración micelar crítica. Cabe señalar que los valores de la CMC de un copolímero obtenido por diferentes métodos muchas veces presentan diferencias apreciables debido a que puede variar la sensibilidad de cada una de las técnicas en la cuantificación de las cantidades de material presente en la solución.

La formación de sistemas anfifílicos ensamblados reversiblemente en solución despertó un gran interés en la industria por sus usos para la recuperación de aceites y petróleo, como portadores de drogas, en catálisis química, como modelo de reacciones enzimáticas, para la obtención de pequeñas partículas coloidales o para la solubilización de sustancias insolubles en líquidos [3-5].

Estudios previos señalan la posibilidad de utilizar estos sistemas como posibles sitios de generación de nanopartículas. El uso de copolímeros en bloque anfifílicos para tal fin, presenta algunas ventajas respecto a los surfactantes de bajo peso molecular. Entre ellas se destaca el control preciso de la arquitectura de cada uno de los bloques que lo constituyen, a partir de la síntesis empleando técnicas de polimerización “living”, lo que permite controlar el tamaño del corazón y la corona de la micela (Esquema.III.1). Es también posible mediante estas metodologías seleccionar la estructura química de cada bloque, en base al ambiente preseleccionado (polar/no polar, pH, etc.). Asimismo esto posibilita la obtención de estructuras adecuadas para unirse al soluto de interés (metales, iones, drogas) mediante interacciones específicas, tales como uniones por puente de hidrógeno, covalentes o por complejación [6]. Otra ventaja del uso de copolímeros en bloque anfifílicos es la baja CMC ( $10^{-5}$ - $10^{-8}$  mol/l) que presentan tales sistemas, debido al alto grado de incompatibilidad entre los bloques soluble e insoluble, en comparación con la CMC observada para surfactantes de bajo peso molecular ( $CMC_{SDS} = 7.6 \cdot 10^{-3}$  mol/l a 23 °C) [7-9]. De este modo, la estructura de la micela y la estabilidad de la partícula no se ven comprometidas por dilución [10].



**Esquema.III.1.** Formación de micelas a partir de la síntesis de un copolímero en bloque anfifílico.

Las micelas son utilizadas como nanoreactores para sintetizar nanopartículas en condiciones de fase inversa o directa. Las primeras han sido las menos estudiadas y por lo tanto se sabe muy poco de ellas.

Los métodos utilizados para la caracterización de los sistemas micelares han sido tratados de forma extensiva por varios autores, entre ellos Riees, Gohy y Bahadur, brindando información acerca de sus características estructurales, como la forma y el tamaño, por ejemplo [11-13].

En el presente capítulo se evalúa la CMC de algunos de los copolímeros sintetizados (PMABz-b-PAMA (**6** hidrolizado) y PMABz-b-PMADMAE (**11**)) y se caracterizan los sistemas por Microscopía Electrónica de Transmisión (Transmission electron microscopy, TEM), DLS, Conductimetría y Fluorimetría. Además se describe la síntesis de las Nanopartículas de Plata (NPs de Ag) y el estudio de la evaluación del tamaño de dichas NPs en función de la temperatura.

## ***Materiales y métodos***

Los copolímeros con bloques hidrofóbico-hidrofílico, empleados en este capítulo, son:

Copolímero PMABz-b-PAMA (**6** hidrolizado),  $M_n = 6590$  y  $M_w/M_n = 1.3$ .

Copolímero PMABz-b-PMADMAE (**11**),  $M_n = 4500$  y  $M_w/M_n = 1.2$ .

## *Técnicas de caracterización*

### *Fluorimetría*

En todas las metodologías de fluorescencia es necesario incorporar al sistema un compuesto capaz de emitir luz, conocido como sonda. Las más adecuadas son aquellas cuya fotofísica se ve fuertemente influenciada por la naturaleza del medio en el que se encuentran. Esta dependencia posibilita la caracterización del entorno de la sonda, haciendo de este tipo de técnicas una herramienta ampliamente utilizada en el estudio de sistemas que presentan más de una fase o microfase.

En disolventes polares como el agua o el metanol, el pireno (Figura.III.1) muestra una alta intensidad de la fluorescencia de emisión de los picos designados como  $I_I$  e  $I_{III}$  correspondientes a 373 y 384 nm, respectivamente (Figura.III.2 y Figura.III.3). En ausencia de micelas (por debajo de la CMC) la relación de intensidades de emisión de fluorescencia correspondientes a los picos anteriores,  $I_I / I_{III}$  es alta. En presencia de micelas, es decir, a concentraciones de surfactante superiores a la CMC, el pireno se solubiliza, mayoritariamente, cerca o en el núcleo de las micelas (que presenta las características de un disolvente hidrocarbonado). Por lo tanto el microentorno que rodea ahora a las moléculas de pireno es menos polar que en el medio acuoso y la relación  $I_I / I_{III}$  disminuye.

El valor experimentalmente determinado para esta relación entre  $I_I$  e  $I_{III}$  dependerá de una serie de características propias del tensioactivo, tales como la longitud de la cadena hidrocarbonada, la naturaleza del contraión en el caso de detergentes iónicos y principalmente de la naturaleza del grupo polar.

En términos generales la magnitud  $I_I / I_{III}$  obtenida a diferentes concentraciones de tensioactivo presenta un cambio brusco a una determinada concentración de tensioactivo como consecuencia de la formación de micelas. Este valor de concentración se corresponde con la CMC.

En el presente trabajo, se realizaron espectros de emisión de fluorescencia utilizando muestras de copolímero PMABz-b-PAMA (**6** hidrolizado) y copolímero PMABz-b-PMADMAE (**11**), a diversas concentraciones, en presencia de pireno a una concentración fija de  $10^{-6}$  M en medio acuoso. Las medidas se realizaron a temperatura ambiente utilizando un equipo Fluorolog Horiba JOVIN-YBON.

### *Conductividad*

El cambio brusco que se aprecia en la medida de la conductividad específica de una disolución acuosa de un surfactante iónico al variar la concentración de dicho surfactante, es debido al diferente grado de ionización del surfactante por debajo y por encima de la CMC [21]. A concentraciones inferiores a la CMC, existen monómeros libres del surfactante que se comportan como electrolitos fuertes, mientras que por encima de la CMC se forman micelas que se encuentran parcialmente ionizadas.

Utilizando el método de las pendientes [22] podemos determinar el grado de ionización micelar como el cociente de las pendientes de las representaciones lineales de la conductividad específica en función de la concentración de surfactante total obtenidas por encima y por debajo de la CMC, correspondiendo el punto de corte con el valor de la CMC.

Las mediciones de conductividad fueron realizadas utilizando soluciones madre de 10 mg/ml de cada polímero. La solución se preparó diluyendo en primer lugar en la cantidad mínima de THF requerido (aproximadamente 500  $\mu$ l). Al igual que con las mediciones de fluorimetría, se usaron soluciones de polímero en medio acuoso (agua, a pH 2 y pH 13 para los copolímeros PMABz-b-PMADMAE (**11**) y PMABz-b-PAMA (**6** hidrolizado), respectivamente, realizadas en diferentes concentraciones de polímero. Se

prepararon soluciones en el rango de 2 a 10 mg/ml. El equipo que se utilizó para realizar las medidas es el CyberScan CON 1500.

### *Dispersión de Luz Dinámica (Dynamic Light Scattering, DLS)*

La luz dispersada por un solvente muestra fluctuaciones temporales de intensidad debidas a las fluctuaciones térmicas de la densidad. En una solución con partículas disueltas, estas fluctuaciones producen el movimiento Browniano de esas partículas (polímeros, nanopartículas, etc.) y la luz dispersada por el soluto manifiesta también fluctuaciones de intensidad, más lentas que las del solvente puro.

De todas maneras, el movimiento Browniano modifica las distancias que existen entre el detector y las partículas dispersantes, que son ahora una función del tiempo. En consecuencia, la luz dispersada puede interferir constructiva o destructivamente dependiendo de la distancia que viaja hasta el detector, sobre la que se superponen una serie de fluctuaciones.

Los tiempos de relajación de las fluctuaciones están relacionados con las constantes de difusión, y en consecuencia, con los tamaños de las partículas. Las partículas pequeñas, que se mueven más rápidamente presentan tiempos de relajación más cortos que las partículas grandes, que se mueven de manera más lenta. Los tiempos de relajación de las fluctuaciones se pueden determinar tanto en el dominio de las frecuencias (usando un analizador espectral) o en el dominio del tiempo (empleando un correlador). A este fenómeno se le conoce como dispersión de luz cuasielástico y su estudio se ha convertido en el método clásico de determinación de coeficientes de difusión translacional de macromoléculas en disolución.

Para analizar de forma cuantitativa la movilidad de partículas disueltas mediante dispersión dinámica de luz, es útil expresar las fluctuaciones de la intensidad dispersada en término de funciones de correlación temporal.

Como el concepto de correlación no es muy empleado podemos decir, que si dos variables o dos señales están correlacionadas, significa que el cambio de una de ellas se

puede utilizar para predecir, con certeza, el cambio que se ha asignado en la otra. La autocorrelación es justamente la medida del producto de una variable  $A(\tau)$  por su valor  $A(t+\tau)$  tras un cierto tiempo de retardo  $\tau$ . De manera que la función de autocorrelación de la propiedad  $A$  medida durante un tiempo total  $T$  viene dada por:

$$\langle A(0)A(\tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T A(\tau)A(t + \tau) dt \quad \text{Ec. III. 1}$$

Lo realmente interesante es conocer cómo varía la función de autocorrelación con el tiempo, lo que llamaremos  $C(\tau)$ , siendo  $\tau$  el período de relajación. Si denominamos  $B$  al valor medio de la señal de dispersión, conforme mayor sea  $\tau$  hemos visto que la correlación se va perdiendo y el valor de  $C(\tau)$  se haría igual a  $B$ . Por el contrario, para valores de  $\tau$  pequeños la correlación sería alta. Entre estos dos límites, para una suspensión de partículas globulares monodispersas la función de correlación decae exponencialmente y viene dada por:

$$C(\hat{\theta}) = Ae^{-2\Gamma\tau} + B \quad \text{Ec. III. 2}$$

Expresión en la que  $A$  es una constante óptica que depende del diseño del instrumento y  $\Gamma$  está relacionada con la relajación de las fluctuaciones mediante

$$\Gamma = D \left[ \frac{2\pi n}{\lambda_0} 2 \sin \frac{\theta}{2} \right]^2 \quad \text{Ec. III. 3}$$



Donde  $D$  es el coeficiente de difusión translacional de la partícula,  $\theta$  es el ángulo de observación,  $\lambda_0$  la longitud de onda de la radiación incidente y  $n$  el índice de refracción del líquido en el que se encuentran las partículas. El coeficiente de difusión  $D$  está relacionado de una manera sencilla con el tamaño de la partícula para las geometrías más simples como esferas, elipsoides, cilindros u ovillos estadísticos. En la mayor parte de los casos, se asume que la forma de las partículas es de tipo esférico, con lo que

$$D = \frac{K_B T}{3\pi\eta d} \quad \text{Ec. III. 4}$$

Siendo  $K_B$  la constante de Boltzmann,  $T$  la temperatura y  $\eta$  la viscosidad del medio y  $d$  es el diámetro hidrodinámico de la partícula. Esta ecuación asume que las partículas se mueven independientemente unas de otras.

En definitiva, la determinación del tamaño de partícula en un experimento de dispersión de luz cuasielástica consiste en:

- Medir la función de autocorrelación
- Ajustar la función medida a la ecuación (Ec.III.2) para determinar  $\Gamma$
- Calcular  $D$  a partir de la ecuación (Ec.III.3), conocidos  $n$ ,  $\theta$  y  $\Gamma$
- Calcular el diámetro de partícula,  $d$ , a partir de la ecuación (Ec.III.4), conocidos  $T$  y  $\eta$ .

Hasta aquí se ha tratado el problema de la dispersión cuasielástica de partículas monodispersas. Este es un caso muy particular, dado que en la mayor parte de las muestras poliméricas se va a presentar una distribución de tamaños que contribuye con su propio exponencial, de forma que la función de correlación debe expresarse como sumatoria de todos ellos:

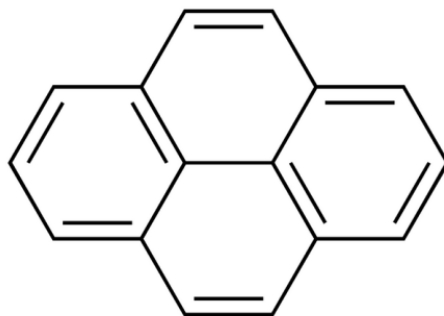
$$g(\tau) = \int_0^{\infty} G(\tilde{A}) e^{-\tilde{A}\tau} d\tilde{A} \quad \text{Ec. III. 5}$$

Donde  $G(\Gamma)$  es la función de distribución de los tiempos de relajación. El principal problema ahora es la caracterización de  $G(\Gamma)$  en sistemas polidispersos, para ello se recurre a varios métodos matemáticos de tratamientos de datos, que permiten obtener dicha función de distribución y, a partir de ella, la función de distribución de tamaños de partículas. Los 2 métodos más empleados con este fin son el método de cumulante y el método NNLS (Non Negativity constrained Least Squares).

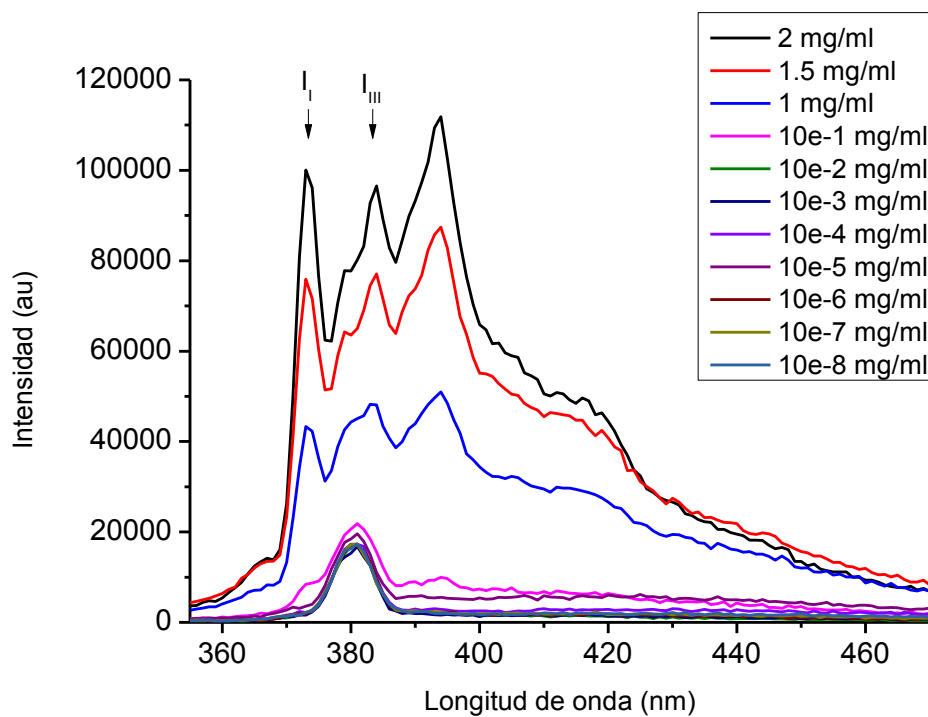
## ***Resultados y Discusión***

A bajas concentraciones se observaron cambios pequeños en la intensidad de emisión y poco o ningún cambio en la emisión (Figura.III.2 y Figura.III.3). A medida que la concentración del polímero aumenta, se observa un aumento en la intensidad de emisión de fluorescencia de pireno además de un ligero cambio del color rojo de la emisión.

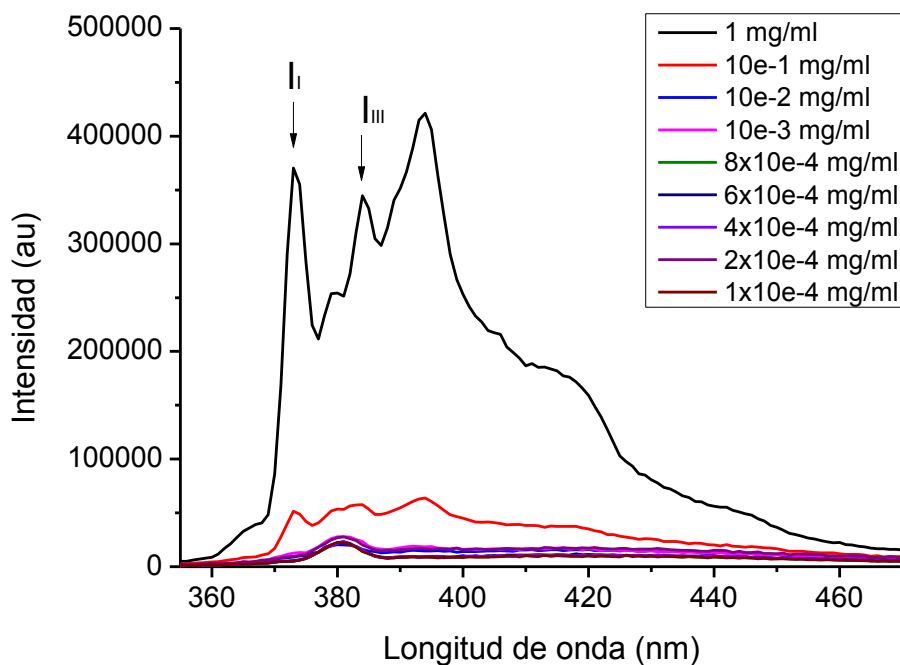
En un entorno polar, el pireno presenta una intensidad de emisión débil. Por lo tanto, los aumentos en la intensidad de emisión de fluorescencia pueden ser atribuidos a pireno encapsulado por la formación de micelas en un ambiente apolar [14]. La longitud de onda empleada para excitar el pireno fue de 337 nm y las de emisión entre 345 nm y 470 nm. La CMC se determinó a partir del cambio en la relación de intensidad entre las bandas de emisión a 373 nm y 384 nm o  $I_I$  e  $I_{III}$ , respectivamente. Se representa la relación de intensidad ( $I_I/I_{III}$ ) en función del log de la concentración (Figura.III.4 y Figura.III.5). A bajas concentraciones dicha relación de intensidad describe una correspondencia lineal con la concentración de copolímero, similar a la del pireno en agua. Una vez que la CMC ha sido alcanzada, se observa un fuerte aumento de la relación de intensidades, pero el comportamiento lineal se mantiene a lo largo del intervalo de concentraciones. La CMC se define entonces como el punto de intersección entre las dos líneas rectas ajustadas para cada segmento lineal [15].



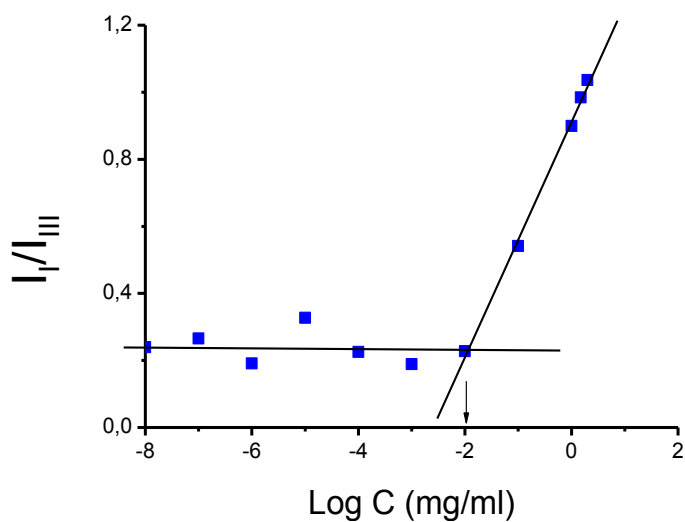
**Figura.III.1:** Estructura del fluoróforo pireno.



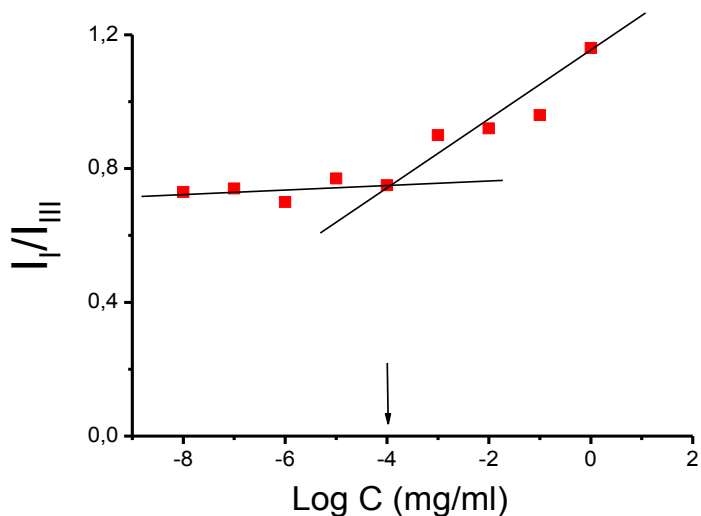
**Figura.III.2:** Espectro de emisión de fluorescencia del polímero PMABz-b-PMADMAE (**11**) en presencia de pireno en solución acuosa a pH = 2.



**Figura.III.3:** Espectro de emisión de fluorescencia del polímero PMABz-b-PAMA (6 hidrolizado) en presencia de pireno en solución acuosa a pH = 13.



**Figura.III.4:** Determinación de la CMC del copolímero PMABz-b-PMADMAE (11).



**Figura.III.5:** Determinación de la CMC del copolímero PMABz-b-PAMA (6 hidrolizado).

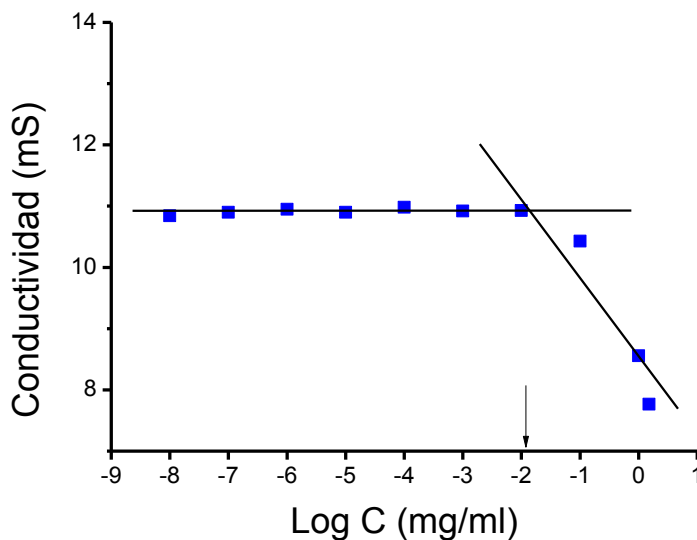
Los valores de las CMC, encontradas a partir de las intersecciones de las rectas, fueron  $10^{-2}$  mg/ml ( $3,8 \times 10^{-6}$  M) para el copolímero PMABz-b-PMADMAE (11) y  $10^{-4}$  mg/ml ( $1,5 \times 10^{-8}$  M) para el copolímero PMABz-b-PAMA (6 hidrolizado).

El valor de la CMC se ve influenciada por la fracción en volumen relativa del bloque que forma el núcleo de la micela [16]. En general, una reducción en el contenido hidrofóbico conduce a un aumento en la CMC. Teniendo en cuenta este efecto es interesante comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo con el observado en sistemas similares.

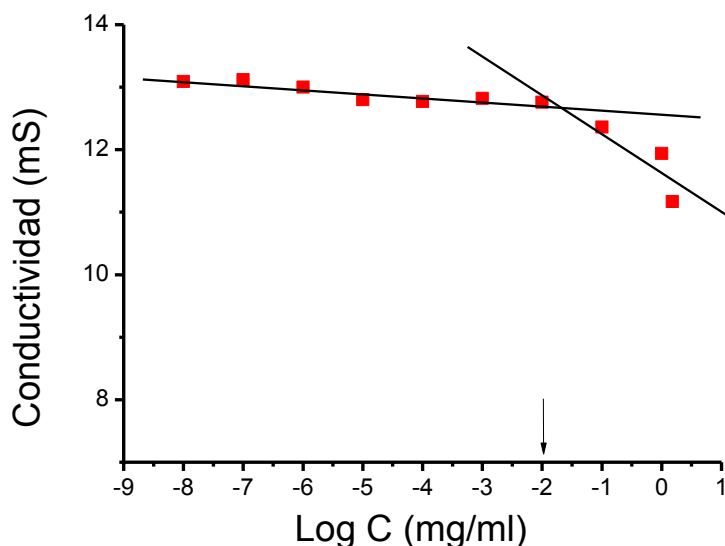
Schmitz estudió el comportamiento de micelización de copolímeros PMAA-b-PMABu (52:48) en medio acuoso, encontrando un valor de  $\text{CMC} = 9,8 \times 10^{-4}$  mg/ml ( $2,5 \times 10^{-8}$  M) [17], mientras que el grupo de Eisenberg determinó valores de CMC entre  $8\text{-}15 \times 10^{-8}$  M para copolímeros PS-b-PAA, según la composición de los bloques [18]. Por otro lado, en el caso de copolímeros con un bloque hidrofílico catiónico, tal como PS-b-P4VP, con igual composición de bloques, el valor hallado para la CMC fue de  $4,6 \times 10^{-7}$  M [19]. Para un copolímeros PDMAMAE-b-PCL (52:48) y PDMAMAE-b-PMAM (67:33) se

determinaron valores de CMC de  $2 \times 10^{-6}$  M y  $9,8 \times 10^{-5}$  M, respectivamente [16,20]. Así, nuestros resultados se encuentran dentro del mismo orden de magnitud que los reportados para sistemas estructuralmente relacionados.

Respecto a las medidas de conductividad se encontró una similitud en los valores hallados para el copolímero PMABz-b-PMADMAE (**11**), pero difirió en los resultados obtenidos para PMABz-b-PAMA (**6** hidrolizado) en 2 órdenes de magnitud. Es necesario aclarar que aunque las diferencias entre las medidas obtenidas son evidentes, esto puede ser explicado teniendo en cuenta las técnicas y el comportamiento de las mismas frente a las variaciones que presentan las condiciones del sistema de trabajo.



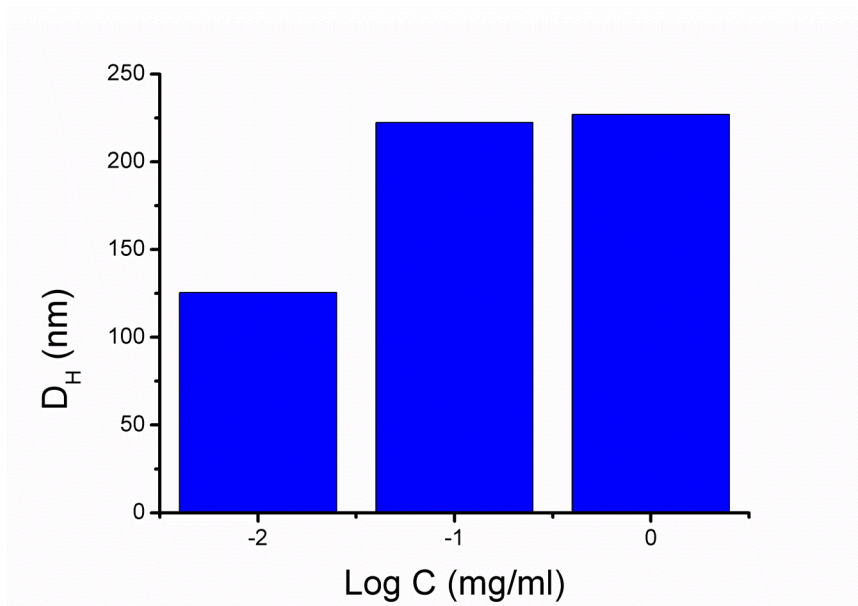
**Figura.III.6:** Medidas de conductividad del copolímero PMABz-b-PMADMAE (**11**) en solución acuosa a pH=13.



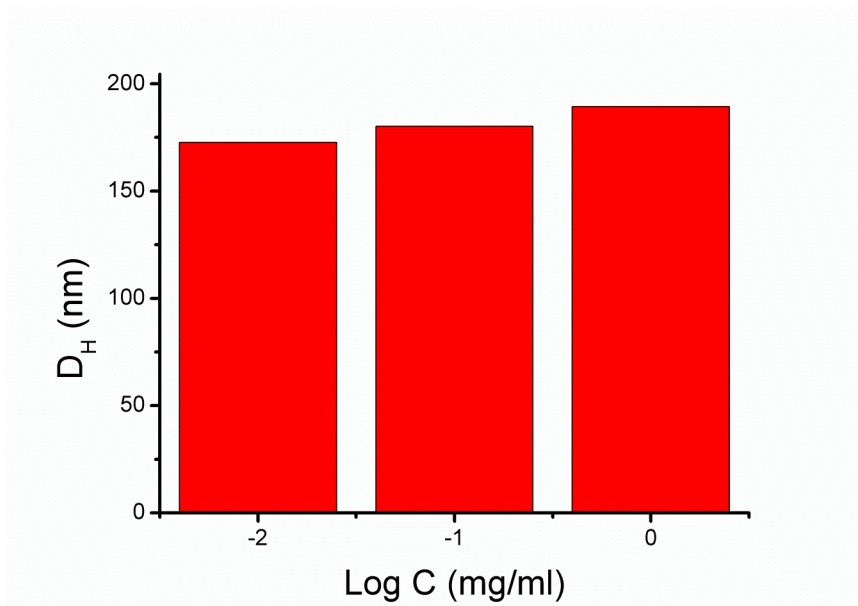
**Figura.III.7:** Medidas de conductividad del copolímero PMABz-b-PAMA (**6** hidrolizado) en solución acuosa a pH=2.

Usando DLS es posible medir el tamaño de las micelas, complejos formados con una concentración creciente de polímero [23-25]. Las mediciones fueron realizadas usando soluciones de los copolímeros PMABz-b-PMADMAE (**11**) y PMABz-b-PAMA (**6** hidrolizado) que cubren un cierto intervalo de concentraciones ( $10^{-5}$  mg/ml a 1mg/ml en medio acuoso a pH 2 y pH 13 para PMABz-b-PAMA (**6** hidrolizado) y PMABz-b-PMADMAE (**11**), respectivamente). Todas las muestras se filtraron 3 veces utilizando un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$ .

Las mediciones se realizaron a un ángulo de dispersión de  $90^\circ$  a  $25^\circ\text{C}$  usando un equipo Brookhaven Ltd. (Holtsville, NY) 522 canal BI-200 SM digital de correlador y un Lexel 300 mW láser He-Ne 632 nm. La función de correlación de la intensidad de luz dispersada se analizó utilizando un paquete de software denominado CONTIN para obtener el tamaño de las partículas, fijando primero la viscosidad del disolvente a la temperatura de trabajo. El valor considerado para dicho análisis a  $23^\circ\text{C}$  es  $\eta_{\text{H}_2\text{O}} = 0.9310$ .



**Figura.III.8:** Medidas de DLS a pH = 2 del copolímero PMABz-b-PMADMAE (**11**) en fase directa.



**Figura.III.9:** Medidas de DLS a pH = 13 del copolímero PMABz-b-PAMA (**6** hidrolizado) en fase directa.



Las medidas de DLS demuestran mediante las gráficas de las Figura.III.8 y Figura.III.9 un crecimiento del tamaño micelar en solución en función de la concentración del polímero.

A partir del momento que se supera el valor mínimo de la CMC la tensión superficial es constante, aunque se aumente la concentración del mismo, las moléculas en exceso van a seguir formando agregados en el volumen del sistema sin producir cambios en la interface liquido/aire que se encuentra saturada desde que se llega a la CMC.

Por lo tanto, el aumento de la concentración de polímero en la solución conlleva a la formación de las estructuras conocidas como micelas.

En las Figuras.III.8y Figura.III.9 correspondientes a las medidas de DLS se puede ver un crecimiento del tamaño micelar en función de la concentración del polímero.

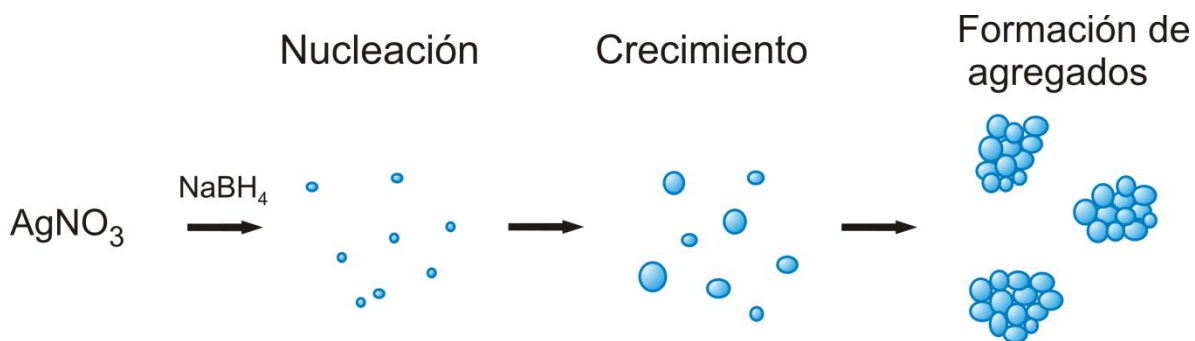
Además, los valores de la CMC de un copolímero obtenidos por métodos distintos, muchas veces presentan diferencias apreciables debido a que puede variar la sensibilidad de cada una de las técnicas en la cuantificación de las cantidades de los unímeros (cadenas individuales del copolímero en bloque) presentes en la solución. Estas disparidades también se atribuyen a un control insuficiente de la temperatura.

### ***Micelas en Fase Reversa***

Las micelas en fase reversa (o inversa) son conocidas por tener pequeñas cantidades de solución acuosa en fase orgánica (fase dispersante), de esta manera los bloques hidrofóbicos formarán parte de la corona (o “shell”) de la micela y los bloques hidrofílicos se dispondrán hacia el centro (o “core”) solvatados por las moléculas de agua.

Por colisiones entre micelas se pueden producir intercambios de sus contenidos en el núcleo y posteriormente la formación de dos estructuras independientes. Este proceso es utilizado para la síntesis de nanopartículas (NPs) permitiendo la interacción de los reactivos encapsulados para elaborar materiales a escala nanométrica.

El mecanismo propuesto para la formación de las NPs puede describirse de la siguiente manera [26,27]:



**Esquema III.2.** Mecanismo de formación de las NPs de Ag mediante la reducción de iones plata (I).

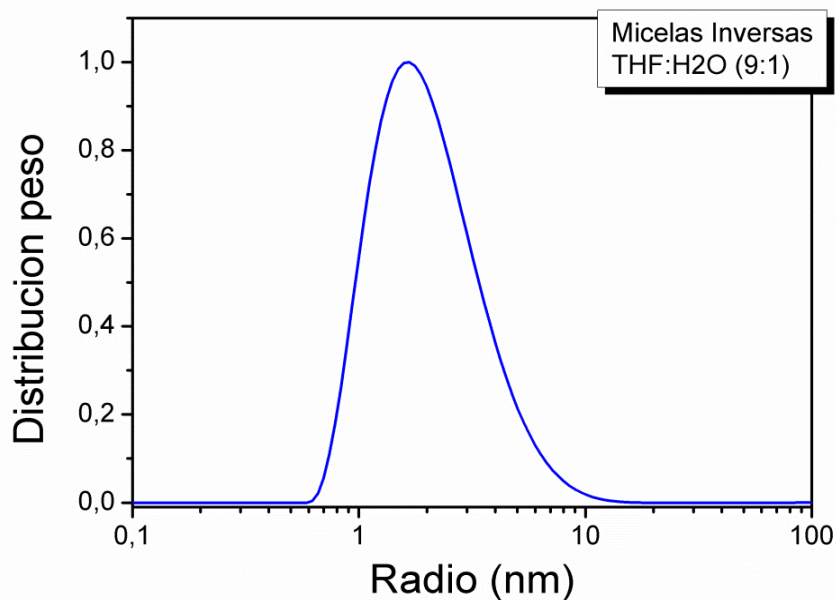
El mecanismo de formación de nanopartículas empleando la reducción de iones  $\text{Ag}^+$  en solución se realiza en dos etapas bien definidas: nucleación y crecimiento.

La nucleación corresponde a pequeños agregados de átomos de Ag que constituyen los núcleos. La estabilidad de éstos depende del volumen del núcleo alcanzado, si es inferior al volumen crítico,  $r < r_c$  su disolución será energéticamente favorable. En cambio, si el núcleo alcanza un volumen mayor que el volumen crítico  $r > r_c$  éste tenderá a crecer espontáneamente e irreversiblemente por incorporación de los precursores solubles en contacto con la superficie del núcleo.

Uno de los procesos más comunes que ocurren con las nanopartículas al transcurrir el tiempo es la agregación, donde la interacción de varias nanopartículas forma una partícula de mayor tamaño.

### *Estudio de las Nanopartículas de Plata (NPs de Ag).*

Se preparó una solución del copolímero PMABz-b-PAMA (**6** hidrolizado) en THF ( $C = 2$  mg/ml) en la cual se agregó agua en una relación de 9:1 (THF: H<sub>2</sub>O). Dicha solución se analizó por DLS, con el objetivo de evaluar la dimensión de la micela como se muestra en la Figura.III.10. La intensidad de luz dispersada se midió en un ángulo de dispersión  $\theta = 90^\circ$ . Las medidas se realizaron empleando un goniómetro ALV/CGS-5022F con un correlador digital múltiple tau ALV-5000/EPP que cubre un rango amplio de tiempos ( $10^{-6} - 10^3$  s). La fuente de luz empleada fue un láser helio/neón ( $\lambda = 632,8$  nm) que opera a 22 mW. Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente.



**Figura.III.10:** Medidas de DLS de las micelas formadas en fase reversa en THF/Agua (9:1) del copolímero PMABz-b-PAMA (**6** hidrolizado).

El valor del radio micelar medido por DLS muestra que las micelas obtenidas son monodispersas y poseen un valor promedio de 1,57 nm (Figura.III.10).

Las NPs de Ag se sintetizaron a partir de las micelas previamente obtenidas, por agregado de  $\text{AgNO}_3$  y luego añadiendo  $\text{NaBH}_4$  para obtener así las NPs Ag. Ambas soluciones de reactivos fueron preparadas disolviendo el material sólido, previamente pesado, en agua.

Se preparó una solución madre del copolímero 20 mg en 9 ml de THF. La solución es agitada hasta su homogenización por 24 horas. La misma se divide en 3 alícuotas (I, II y III) de 3 ml cada una. Además, se prepararon soluciones de  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{NaBH}_4$  con una concentración de 25 mM y 100 mM respectivamente.

Las soluciones designadas I, II y III, se llevaron cada una a una temperatura específica antes de realizar la reacción ( $-15^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$  y  $40^\circ\text{C}$  respectivamente).

Una vez alcanzada la temperatura de trabajo se agitó la solución y se procedió al agregado de un volumen de  $90\mu\text{l}$  de  $\text{AgNO}_3$  a la solución sin detener la agitación. El agregado fue gota a gota, obteniendo una solución transparente e incolora. Transcurridos 20 minutos se procedió al agregado rápido de  $10\mu\text{l}$  de la solución de  $\text{NaBH}_4$  preparada previamente. Bajo estas condiciones la plata que estaba en forma de catión en la solución acuosa encapsulada en las micelas se redujo a  $\text{Ag}^0$ .

La solución se deja agitando por 30 minutos y luego se retira, dejando que alcance la temperatura ambiente. Se observó un cambio de coloración de la solución a rosa, lo que pone en evidencia la reacción de reducción.

Dichas muestras fueron analizadas por espectroscopia UV- vis, DLS y TEM.

En la Tabla.III.1 se muestran los valores de los tamaños de las NPs Ag en función de las temperaturas correspondientes, analizadas por DLS. Se detectó la presencia de dos poblaciones, una mayoritaria (de menor tamaño) y otra minoritaria (de mayor tamaño). La población minoritaria podría adjudicarse a la presencia de NPs agregadas, mientras que la población mayoritaria podría adjudicarse a la presencia de NPs de  $\text{Ag}^0$  dentro de las micelas reversas. Se aprecia una correlación entre el aumento de la temperatura de la reacción y el tamaño de las partículas, si bien las diferencias no son muy grandes. A pesar de la existencia de más de una población de partículas, la mayoría de ellas son de pequeño

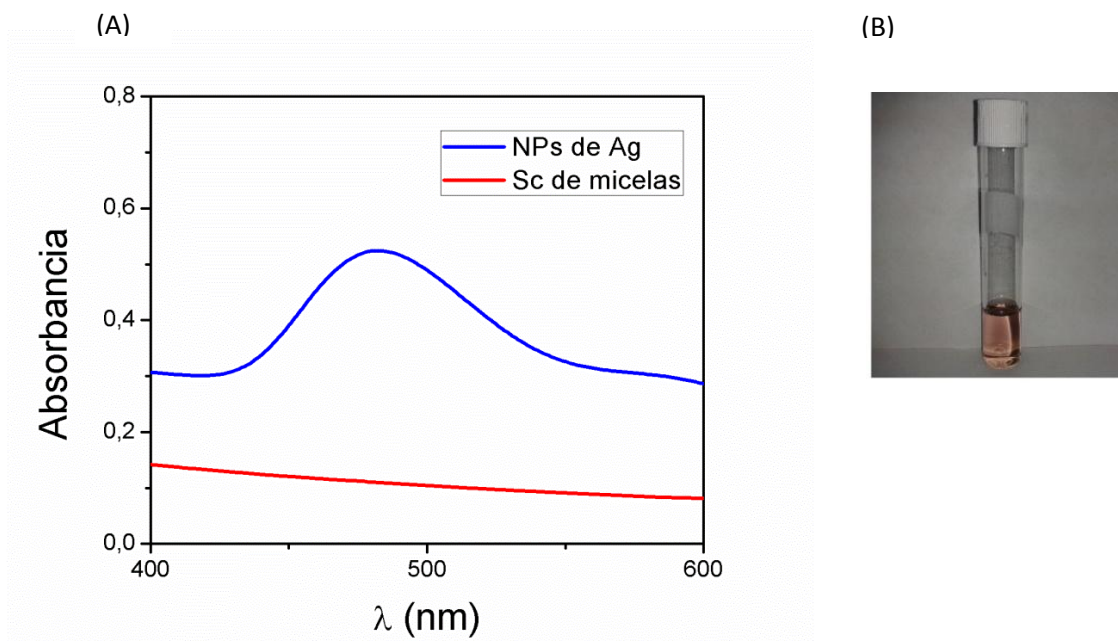
tamaño, como se evidencia por los porcentajes expresados (entre paréntesis en las columnas R1 y R2).

En todos los casos se observa que la temperatura de reacción tiene un efecto poco significativo sobre el tamaño de las NPs.

Muestra	Temp. (°C)	Distribución	R1 (%)	R2 (%)
I	-15	Peso	2.25 (90)	10.7 (10)
		Número	2.16 (99.9)	10.1 (0.1)
II	22	Peso	2.68 (82)	15.2 (18)
		Número	2.65 (99.9)	14.8 (0.1)
III	40	Peso	2.97 (92)	11.0 (8)
		Número	2.86 (99.8)	10.6 (0.2)

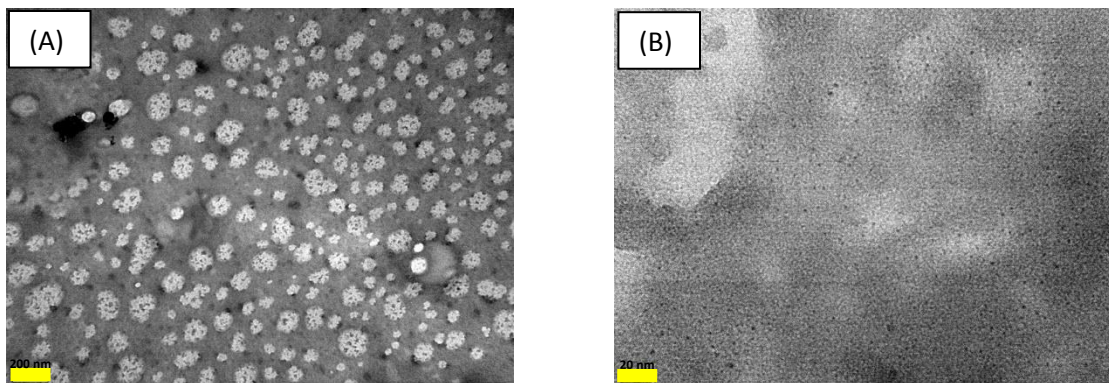
**Tabla.III.1:** Medidas de DLS de las muestras I, II y III, en función del peso y el número de las poblaciones de los productos.

En la Figura.III.11 (a) se muestra un gráfico del espectro de UV- vis de la solución con las micelas y de las micelas con las NPs de Ag. Se puede apreciar de forma clara la absorción del plasmón a 480 nm y la ausencia de señal en la solución de las micelas sin Ag<sup>+</sup>. Dicha evidencia demuestra la formación de las NPs de Ag. La Figura.III.11 (b) corresponde a la solución de la muestra II, donde se puede apreciar la coloración de dicha solución, la cual es característica del sistema y se relaciona con los índices de refracción del solvente y del material en solución, como ha sido discutido por Chatre y col [28].



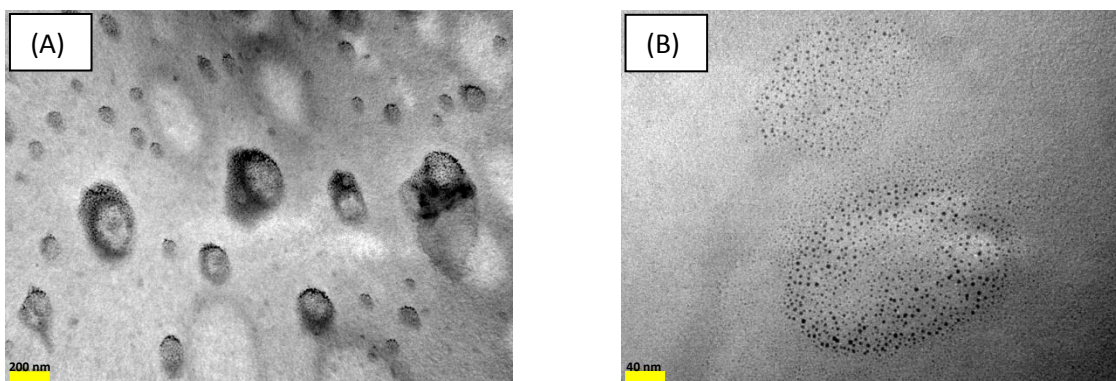
**Figura.III.11:** (A) Espectro UV-vis de la solución con micelas y de micelas conteniendo NPs de Ag y (B) Imagen de la solución de nanopartículas sintetizadas a 22 °C (muestra II).

En la Figura.III.12 (A), correspondiente a la muestra I, se observan NPs presentes en forma de asociaciones uniformes en todo el campo de observación (escala de 200 nm). Una ampliación de esta imagen (B) permite determinar el tamaño de las nanopartículas de  $\text{Ag}^0$  del orden de los 2 nm, distribuidas homogéneamente [28]. La población de las NPs pequeñas supera ampliamente a los agregados formados, coincidiendo con los datos de la Tabla.III.1 obtenidos mediante DLS



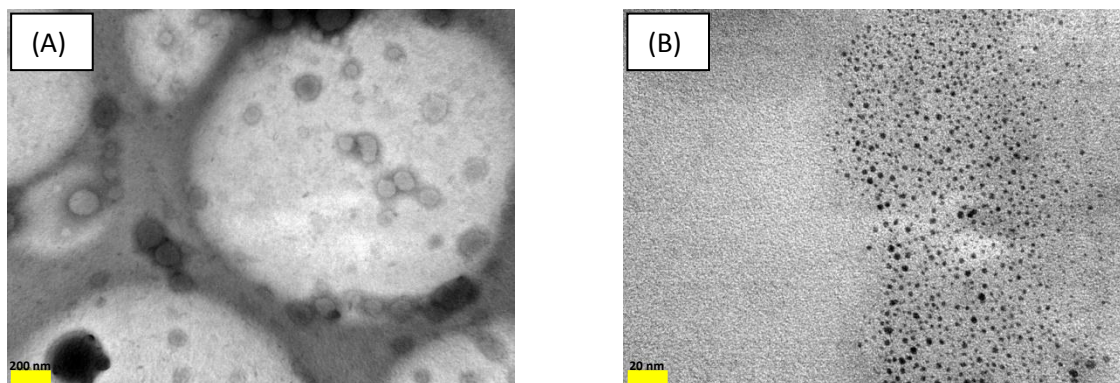
**Figura.III.12:** La imagen de TEM de la muestra I (Temperatura de preparación:  $-15^{\circ}\text{C}$ ). Escala: (A) 200 nm, (B) 20 nm

La Figura.III.13 (A) de la muestra II, presenta las NPs concentradas en una zona bien delimitada, donde se encuentran bien dispersa en el campo de observación, con menor resolución. Ampliando la imagen (40 nm) es posible determinar que el tamaño de las nanopartículas es similar al de la muestra obtenida a  $-15^{\circ}\text{C}$ , presentando zonas de nucleación y la formación de agregados en una menor proporción (B).



**Figura.III.13:** Fotos de TEM de la muestra II (Temperatura de preparación:  $22^{\circ}\text{C}$ ). Escala: (A) 200 nm, (B) 40 nm

La Figura.III.14 (A) corresponde a una imagen general y bastante heterogénea de la muestra III. Una ampliación de esta imagen (B) muestra que existen más zonas de nucleación que en las muestras anteriores.



**Figura.III.14:** Fotos de TEM de la muestra III (Temperatura de preparación: 40°C). Escala: (A) 200 nm, (B) 20 nm.

Las interacciones entre los bloques que conforman la corona delimitan las distancias entre las micelas, y a su vez establecen una distribución de las partículas metálicas sintetizadas en la solución. Este comportamiento se corresponde con las figuras de TEM de todas las muestras de menor aumento (200 nm), donde existen estructuras semejantes a una circunferencia delimitando una zona de la muestra. En las figuras de TEM a mayor aumento (20 nm), se pueden observar distribuidas las NPs de Ag de pequeños tamaños. Estudios realizados por Meyer señalan que las NPs obtenidas pueden ser modificadas teniendo en cuenta la estructura de los bloques del copolímero que forma la micela y la velocidad de agregado del agente reductor la cual determina el tamaño de las partículas metálicas, produciendo tamaños más grandes cuando los agregados son más lentos (envejecimiento de Ostwald) y tamaños pequeños para tiempos más cortos.

Los bloques con los grupos funcionales carboxílicos que conforman el núcleo de la micela estabilizan al ion  $\text{Ag}^+$  electrostáticamente generando una distribución dependiente



de estas interacciones entre las cadenas del sistema. Esto se ve reflejado en mayor medida en la Figura.III.13.

Por lo tanto, la síntesis de NPs metálicas usando micelas inversas resulta ser una técnica viable y atractiva, debido a la facilidad de obtener NPs con una distribución de tamaño estrecha, la cual puede ser controlada teniendo en cuenta la composición de los bloques del copolímero [29,30].

Al aumentar la temperatura del sistema se produce un proceso de nucleación-crecimiento adecuado para la formación de una población de nanopartículas más homogénea. Por lo tanto, podemos decir que la variación de temperaturas generan una gran cantidad de núcleos de crecimiento de partículas de plata (nanoclusters) que concuerdan con lo visto en la muestra (B) [31].

### *Conclusiones parciales*

- Estos resultados demuestran que los copolímeros sintetizados por GTP pueden autoensamblarse mediante el uso de solventes selectivos, ya sea en fase reversa como directa.
- El valor de la CMC determinado para estos copolímeros es del mismo orden de magnitud y acorde a lo observado para sistemas estructuralmente relacionados.
- Las NPs de plata se lograron sintetizar utilizando como nanoreactor las micelas formadas por los copolímeros en fase reversa.
- Los tamaños obtenidos de las NPs formadas son monodispersos y existe una estrecha relación entre los tamaños y la temperatura de la reacción de síntesis. Se observó que al aumentar la temperatura tanto las NPs como los agregados crecen. No obstante, la dependencia del tamaño con la temperatura no es muy marcada.

## Referencias

- [1] G. M. Whitesides, J. P. Mathias, C. T. Seto. "Molecular self-assembly and nanochemistry: a chemical strategy for the synthesis of nanostructures". *Science*. (1991), 254, 1312.
- [2] L. Zhang, A. Eisenberg. "Multiple Morphologies of "Crew-Cut". Aggregates of Polystyrene-*b*-poly (acrylic acid) Block Copolymers". *Science*. (1995), 268, 1728.
- [3] A. Rösler, G.W.M. Vandermeulen, H-A. Klok. "Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers". *Advanced Drug Delivery Reviews*. (2001), 53, 95.
- [4] H. D. Koh, N.G. Kang, J.S. Lee. "Fabrication of an Open Au/Nanoporous Film by Water-in-Oil Emulsion-Induced Block Copolymer Micelles". *Langmuir*. (2007), 23, 12817.
- [5] P. Alexandridis, M. Tsianou. "Block copolymer-directed metal nanoparticle morphogenesis and organization". *European Polymer Journal*. (2011), 47,569.
- [6] S. Forster, M. Antonietti. "Amphiphilic block copolymers in structure controlled nanomaterial hybrids". *Adv. Mater.* (1998), 10,195.
- [7] A. Malliaris, N. Boens, H. Luo, M. Van der Auweraer, F.C. De Schryver, S. Reekmans. "The micelle-water monomer exchange process in solutions of ionic surfactants measured by transient fluorescence quenching". *Chemical Physics Letters*. (1989), 155,587.
- [8] M. Wilhelm, C.L. Zhao, Y. Wang, R. Xu, M.A. Winnik. "Poly (styrene-ethylene oxide) block copolymer micelle formation in water: a fluorescence probe study". *Macromolecules*. (1991), 24, 1033.
- [9] J. R. Quintana, M. Villacampa, I.A. Katime. "Micellization of a polystyrene-*b*-poly (ethylene/propylene) block copolymer in *n*-dodecane/1, 4-dioxane mixtures. 2. Structure and dimensions of micelles". *Macromolecules*. (1993), 26,606.

- [10] V. P. Torchilin. "Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems". *Journal of Controlled Release*. (2001), 73,137.
- [11] G. Riess "Micellization of block copolymers". *Prog. Polym. Sci.* (2003), 28, 1107.
- [12] K. Nakashima, P. Bahadur. "Aggregation of water-soluble block copolymers in aqueous solutions: Recent trends". *Advances in Colloid and Interface Science*. (2006), 75,123.
- [13] J. F. Gohy. "Block Copolymers Micelles". *Adv Polym Sci.* (2005), 190, 65.
- [14] K. Y. Lee, W. H. Jo, I. C. Kwon, Y. H. Kim, and S. Y. Jeong. "Structural Determination and Interior Polarity of Self-Aggregates Prepared from Deoxycholic Acid-Modified Chitosan in water". *Macromolecules*. (1998),31,378.
- [15] K. Y. Lee, W. H. Jo, I. C. Kwon, Y. H. Kim, and S. Y. Jeong. "Physicochemical Characteristics of Self-Aggregates of Hydrophobically Modified Chitosans". *Langmuir*. (1998),14,2329.
- [16] F. Bougard, C. Giacomelli, L. Mespouille, R. Borsali, Ph. Dubois, R. Lazzaroni. "Influence of the Macromolecular Architecture on the Self-Assembly of Amphiphilic Copolymers based on Poly (N,N-dimethylamino-2-ethylmethacrylate) and Poly ( $\epsilon$ -caprolactone)". *Langmuir*. (2008),24,8272.
- [17] C. J. W. Schmitz. "Synthesis, Micellar Properties and Application of Amphiphilic Linear Block Copolymers with Different Microstructure but Same Molecular Weight". *Thesis doctoral* (2009). *Institut für Technische und Makromolekulare Chemie der RWTH Aachen*.
- [18] I. Astafieva, X. Zhong, A. Eisenberg. "Critical micellization phenomena in block polyelectrolyte solutions". *Macromolecules*. (1993), 26, 7339.
- [19] E. A. Lysenko, T.K. Bronich, E.V. Slonkina, A. Eisenberg, V.A. Kabanov, A.V. Kabanov. "Block Ionomer Complexes with Polystyrene Core-Forming Block in Selective Solvents of Various Polarities. I. Solution Behavior and Self-Assembly in Aqueous Media". *Macromolecules*. (2002),35,6351.

- [20] F. L. Baines, S.P. Armes, N.C. Billingham, Z. Tuzar. "Micellization of Poly (2-(dimethylamino) ethylmethacrylate-block-methyl methacrylate) Copolymers in Aqueous Solution". *Macromolecules*. (1996), 29, 8151.
- [21] T. Inoue, H. Ebina, B. Dong, and L. Zheng. "Electrical conductivity study on micelle formation of long-chain imidazolium ionic liquids in aqueous solution". *Journal of colloid and interface science*. (2007),314,236.
- [22] R. Zana."On the use of dyes for the kinetic study of micelar equilibria". *J. Colloid Interface Sci*. (1974), 46,372.
- [23] H. Sifaoui, K. Lugowska, U. Domanska, A. Modaressi, and M. Rogalski. "Ammonium ionic liquid as modulator of the critical micelle concentration of ammonium surfactant at aqueous solution: conductimetric and dynamic light scattering (DLS) studies". *Journal of colloid and interface science*. (2007),314,643.
- [24] R. Xu and M.A. Winnik. "Light-Scattering Study of the Association Behavior of Styrene-Ethylene Oxide Block Copolymers in Aqueous Solution". *Macromolecules*. (1991), 24, 87.
- [25] N. Karanikolopoulos, M. Pitsikalis, N. Hadjichristidis. "pH-Responsive Aggregates from Double Hydrophilic Block Copolymers Carrying Zwitterionic Groups. Encapsulation of Ant parasitic Compounds for the Treatment of Leishmaniasis". *Langmuir*. (2007), 23, 4214.
- [26] J. L. Rodriguez Ardila. "Estudio del efecto antimicrobiano de nanopartículas de Fe@Ag funcionalizadas con lectinas sobre *Escherichia coli* O157: H7 y *Staphylococcus aureus*". *Tesis doctoral* (2012). Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga. Colombia.
- [27] M. Téllez Juárez. "Síntesis de micro/nano estructuras de óxidos de cobre I y II en dispersión coloidal". *Tesis doctoral* (2009). Instituto Politécnico Nacional. México, D. F.

[28] A. Chhatre, P. Solasa, S. Sakle, R. Thaokar, A. Mehra. "Color and surface plasmon effects in nanoparticle systems: Case of silvernanoparticles prepared by microemulsion route". *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. (2012), 404, 83.

[29] Y. D. Yin, Z. Y. Zhong, B. Gtaes, Y. N. Xia. "Synthesis and Characterization of Stable Aqueous Dispersions of Silver Nanoparticles through the Tollens Process". *J. Mater. Chem.* (2002), 12, 522.

[30] P. S. Mdluli. "Synthesis and growth dynamics study of silver nanoparticles". *Thesis doctoral* (2009). *University of Zululand. South Africa*.

[31] J. Cruz Laitón. "Síntesis de nanopartículas de plata funcionalizadas con péptidos análogos de lactoferrampina con potencial antibiótico contra *Escherichia coli* O 157:H7." *Tesis doctoral* (2012). *Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga. Colombia*.

## *Introducción*

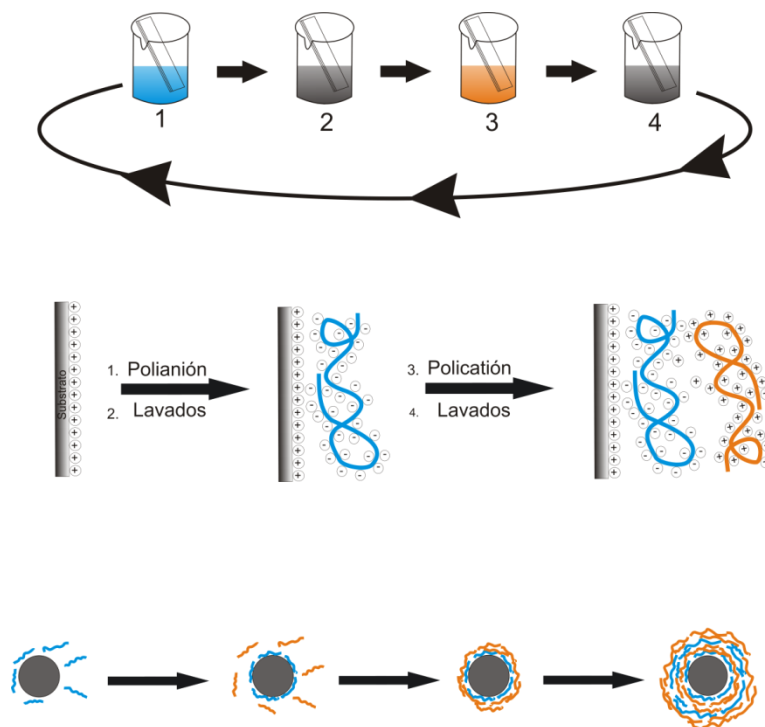
La técnica de ensamblado “capa por capa” del inglés “layer by layer” (LbL) consiste en la adsorción alternada de especies poliméricas con múltiples cargas catiónicas o aniónicas sobre superficies macroscópicas cargadas (planas o coloidales), observándose que cada paso de adsorción conduce a la inversión de la carga superficial, y que una serie de deposiciones consecutivas conducen a un complejo estructurado en capas [1]. El espesor de una bicapa de polielectrolitos y las propiedades fisicoquímicas de la película se ven influenciados por parámetros como el pH, fuerza iónica, temperatura, polaridad del solvente, los cuales pueden controlarse ajustando las condiciones experimentales. Las propiedades de las multicapas van a estar definidas por las propiedades físicas y químicas de los policationes y polianiones que las componen.

Las ventajas de esta técnica con respecto a otras metodologías conocidas para la preparación de películas delgadas, como el ensamblado Langmuir – Blodgett [2], son su versatilidad y simplicidad; de forma muy sencilla es posible crear estructuras complejas, con una gran estabilidad y de manera reproducible.

En el año 1991, Decher y Hong [3-5] demostraron que los polielectrolitos podían ser ensamblados sobre superficies sólidas de forma secuencial, estableciendo las bases para un rápido desarrollo de la técnica. El método de ensamblado LbL se ha transformado en una de las herramientas más importantes para la modificación de superficies. Numerosos estudios han demostrado que las biomoléculas y otras especies biológicamente importantes pueden ser incorporados dentro de las multicapas y siguen manteniendo o mejorando sus funciones biológicas. De esta manera, la amplia lista de materiales ensamblables incluye enzimas, virus, nanopartículas, macro iones inorgánicos y prácticamente cualquier macromolécula [6-10].

La presencia de cargas electrostáticas en los bloques de construcción ha dejado de ser un requerimiento, ya que se han preparado autoensamblados basados en la formación de uniones de hidrógeno, interacciones donador-aceptor, uniones covalentes, etc.

En la Figura.IV.1 se muestra el proceso de ensamblado en forma esquemática. Se comienza con un sustrato cargado (en este caso positivamente), de forma, tamaño y material preseleccionados. Mientras ciertos sustratos presentan una carga superficial en forma natural (por ejemplo los óxidos metálicos en general), otros requieren un tratamiento químico. Por ejemplo, pueden emplearse tioles cargados para modificar metales nobles, silanos para superficies de silicio, y sales de diazonio para superficies de carbón y nanotubos de carbono. El sustrato cargado se introduce posteriormente en una solución de un polielectrolito de carga opuesta (Paso 1) durante aproximadamente 10-15 minutos. En ese lapso de tiempo el polímero se adsorbe sobre la superficie, invirtiendo la carga electrostática superficial. El sustrato (que en esta instancia se encuentra cargado positivamente) se lava (Paso 2 y Paso 4) y se sumerge en una solución de polielectrolito de carga opuesta al anterior (Paso 3) observándose nuevamente la adsorción e inversión de la carga superficial. El proceso se repite en forma secuencial hasta obtener una película del espesor deseado.



**Figura.IV.1:** Proceso de ensamblado en superficie plana y en partícula coloidal. Los números del 1 al 4 corresponden al polianión (azul) (Paso 1), lavados, polianión (naranja) (Paso 3) y lavados (Pasos 2 y 4).



Experimentalmente, el proceso de adsorción de los polielectrolitos en disolución acuosa sobre partículas coloidales se lleva a cabo con el mismo procedimiento aplicado a sustratos planos tal como se explicó anteriormente [11-14].

Para partículas coloidales aparecen algunas dificultades adicionales después de la adsorción de la primera capa de polielectrolito sobre la partícula. Una de las complicaciones que se presentan es eliminar el exceso de polielectrolitos que no fue depositado sobre las partículas y queda como sobrenadante en la solución. Por todo lo anteriormente mencionado, es necesario lavar repetidas veces y centrifugar durante los lavados, descartando el sobrenadante tras la adsorción de las diferentes capas.

En la actualidad, la técnica LbL ha sido aplicada con éxito a la formación de capas con polielectrolitos en los que se combinan las interacciones electrostáticas y las reacciones químicas entre las cadenas de los polielectrolitos. Así la formación de las capas puede seguir un modelo más controlable aumentando de este modo las aplicaciones de esta técnica en mayor número de campos tales como en medicina y en diversas industrias.

Además, existe un creciente interés en los polielectrolitos sintéticos biocompatibles con cadenas funcionalizadas. La industria busca polielectrolitos que permitan la formación de capas con una estructura más organizada y controlada. Para conseguir este objetivo se suele introducir en los polielectrolitos un número controlado de cadenas modificadas con grupos funcionales. Con este tipo de polielectrolitos se combina la sobrecompensación de cargas y la formación de enlaces entre los grupos químicos de las cadenas dando lugar a recubrimientos con mayor estabilidad [15].

En el presente capítulo se estudian los ensamblados de una muestra comercial de Poliestirensulfonato de sodio (PSS) y el copolímero PMABz-b-PMADMAE anteriormente descrito en el capítulo de Síntesis, tanto en superficies planas como en partículas coloidales con el fin de evaluar las propiedades de estos sistemas ante los cambios de pH y fuerza iónica. El copolímero PMABz-b-PMADMAE tiene la propiedad de autoensamblarse formando un polimerosoma (vesícula) en una mezcla de THF/Agua en una relación 1:9 (fase directa). Esta estructura permite encapsular distintos materiales en distintos compartimientos, facilitando el transporte de sustancias incompatibles con el sistema

circundante lo que confiere un alto valor agregado al desarrollo de materiales con dichas propiedades. Las características de estos sistemas fueron desarrolladas anteriormente en el capítulo del estado del arte.

Los sistemas obtenidos se caracterizaron mediante SEM, TEM, microscopía de fuerza atómica (AFM), microscopía confocal (MCF), potencial zeta y microbalanza de cristal de cuarzo con Disipación (QCM-D). Estos estudios se realizaron en el Laboratorio de Biointerfaces de CIC biomaGUNE, San Sebastián, España.

## ***Materiales y métodos***

Las partículas de sílica utilizadas son de 500 nm de tamaño promedio (Kisker) funcionalizadas con grupos aminos en la superficie. Debido a la incertidumbre de lo que pasaría con los grupos funcionales unidos a la superficie no se lavaron empleando una solución de piraña (ácida o básica) como se encuentra explicado en la bibliografía consultada. Por esta razón, se lavaron con agua MilliQ y se sonicaron durante 15 minutos. Luego se descartó el sobrenadante y se volvió a repetir el proceso 2 veces más antes de ser empleadas.

Las partículas se caracterizaron utilizando TEM y Potencial zeta.

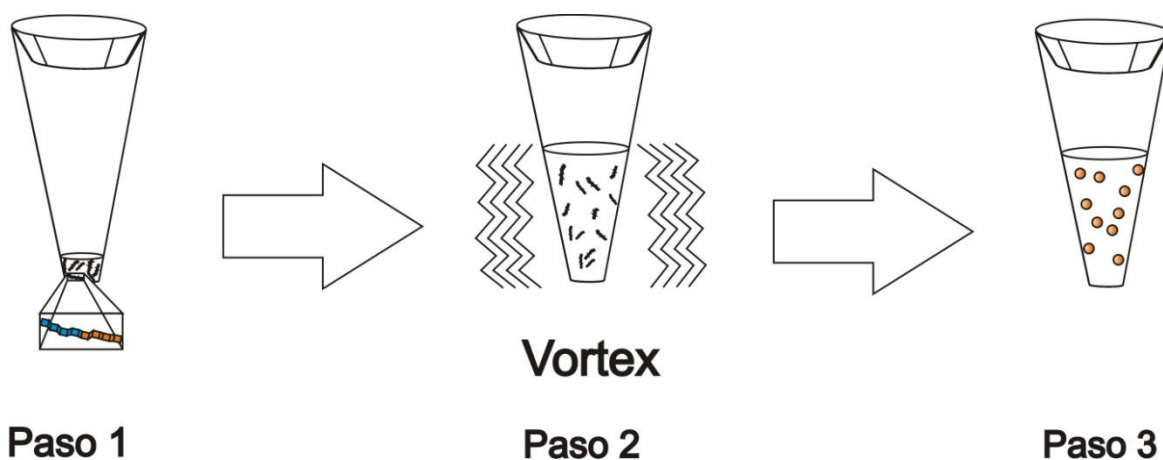
El Poliestirensulfonato de sodio (PSS) es un polielectrolito aniónico fuerte, altamente soluble en agua de PM: 70.000 g/mol. (Sigma Aldrich). El PSS se disolvió en agua MilliQ a pH 2 en una concentración de 1.0 mg/ml. La solución así preparada fue utilizada en todos los ensamblados que se realizaron.

El PMABz<sub>60</sub>-b-PMADMAE<sub>40</sub> utilizado fue sintetizado acorde a lo explicado en el capítulo II. El copolímero utilizado en este estudio tiene M<sub>n</sub>: 4600 y IP: 1.2.

### *Preparación de las vesículas poliméricas*

Las vesículas (o polimerosomas) fueron preparadas por el método de inyección de solvente [16]. Para lo cual se disolvieron 10 mg del copolímero en 1 ml de THF en agitación continua por 2 horas. Transcurrido este tiempo, se deja en reposo 24 horas antes de su uso. Una vez obtenida la solución se inyectan 9 ml de agua MilliQ a pH 2 y se agita de forma vigorosa empleando un vórtex a temperatura ambiente por 2 horas. Luego se deja reposar. La mezcla resultante se utiliza al día siguiente.

Para encapsular el marcador (Rodamina 6G, Dye content ~95 %), seleccionado como droga modelo, una vez disuelto el polímero, se agregan 20  $\mu\text{l}$  del marcador de una concentración  $10^{-6}$  M. La solución es agitada en un vórtex por 5 minutos. Los pasos siguiente se desarrollaron casi de igual manera al protocolo anterior, excepto por el hecho de que los recipientes utilizados con el marcador deben permanecer protegidos de la luz.



**Figura IV.2:** Esquema del procedimiento experimental para la formación de las vesículas.

Las vesículas formadas se caracterizaron utilizando el SEM y DLS. Los “sembrados” para su visualización se realizaron en grilla de carbono depositando 2 gotas de

solución diluida. Una vez que se evaporó el solvente, se forma una fina capa de polímero en el soporte.

Para el estudio por SEM se realizó una deposición de una película muy fina de oro sobre el material en la grilla recubriendo en su totalidad éstos elementos. Esta deposición permite visualizar con mayor detalle la superficie a estudiar.

El comportamiento en solución frente a los cambios de fuerza iónica y pH fue seguido por medidas de potencial zeta y fluorimetría.

## ***Técnicas de caracterización***

### *Potencial zeta*

La formación de multicapas requiere que los polielectrolitos empleados estén cargados a un pH determinado.

El desarrollo de una carga neta en la superficie de la partícula afecta a la distribución de los iones en la región circundante interfacial, resultando en un aumento de la concentración de contraiones (iones de carga opuesta a la de la partícula) cerca de la superficie. Así, existe una doble capa eléctrica alrededor de cada partícula.

El modelo de la doble capa está formado por la capa de Stern y la capa difusa (Figura.IV.3) [17].

La capa de Stern está constituida por los iones positivos y el coloide negativo, formando una capa rígida adyacente alrededor de la superficie del coloide.

La capa difusa está constituida por contraiones. Los iones positivos adicionales son atraídos por el coloide negativo, pero ahora son rechazados por la capa de Stern, así como otros iones positivos que intentan acercarse al coloide. Estos iones positivos tienen una alta concentración cerca de la superficie, la cual disminuye gradualmente con la distancia, hasta

que se logra un equilibrio con la concentración de los contraiones en el seno de la disolución.

A cualquier distancia de la superficie, la densidad de carga esta correlacionada con la diferencia de concentraciones entre cargas positivas y negativas. La densidad de carga es mucho mayor cerca del coloide y gradualmente disminuye a cero cuando las concentraciones de iones positivos y negativos se asemejan. El espesor de esta doble capa depende del tipo y concentración de los iones de la solución.

El potencial zeta ( $\xi$ ) está relacionado con la movilidad electroforética y se puede calcular en función del tamaño de la partícula utilizando la aproximación de Smoluchowski [17].

$$\xi = \frac{\eta}{\epsilon_0 \epsilon_r} \mu_e \quad \text{Ec.IV.1}$$

Donde  $\eta$  es la viscosidad del disolvente y  $\epsilon_0$  y  $\epsilon_r$  son las permitividades del vacío y del disolvente respectivamente.

El potencial zeta depende del pH, de la fuerza iónica (concentración de iones presentes en la disolución) y de la concentración de las moléculas cargadas en el dispersante. El cambio en alguna de estas propiedades brinda información sobre la estabilidad del sistema [18].

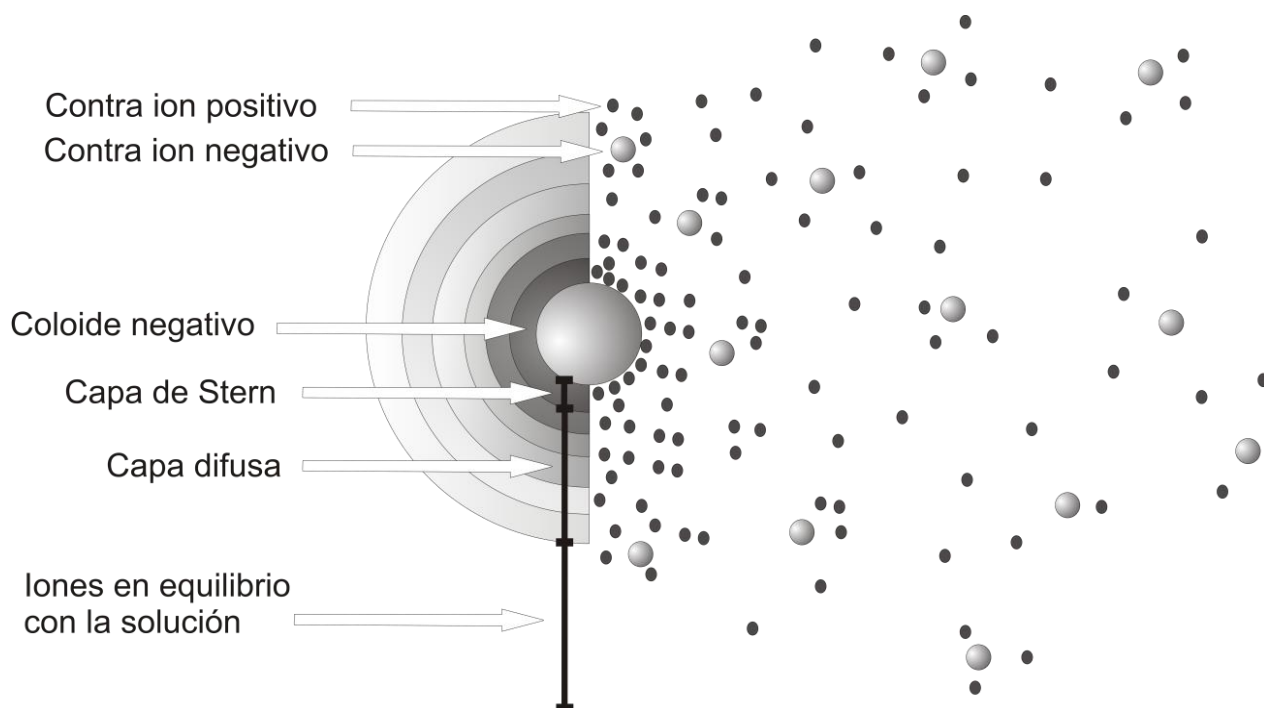
#### *Preparación de las muestras*

Se extrajeron 20  $\mu\text{l}$  de la solución problema (nanopartículas funcionalizadas, polimerosomas, PSS y capas ensambladas) y se depositaron en un tubo épendorf. Luego se agregó agua MilliQ para llevar la solución a un volumen final de 1.5 ml.

Las soluciones se evaluaron a distintas condiciones de pH y en distintos electrolitos, NaCl y  $\text{LiClO}_4$ .

Las mediciones se realizaron usando un NanoSizer (MALVERN Nano-ZS, U.K.) a 25°C. Los polímeros se evaluaron, de forma individual, en agua MilliQ a pH 2 antes de ser utilizados, al igual que cada una de las respectivas capas ensambladas en los coloides después de los lavados correspondientes. Los valores de potencial zeta para el PSS, polimerosoma y las nanopartículas (funcionalizadas con grupos aminos en la superficie de las partículas) fueron  $-36.5 \text{ mV} \pm 2.6 \text{ mV}$ ,  $34.8 \text{ mV} \pm 2.4 \text{ mV}$ ,  $5.2 \text{ mV} \pm 0.3 \text{ mV}$  respectivamente.

A pH 2, las nanopartículas funcionalizadas con grupos aminos en la superficie adoptan una estructura de amina cuaternaria, lo que explica el valor y sobre todo la carga positiva medida por el método.



**Figura.IV.3:** Modelo de la doble capa. A la izquierda se muestra el cambio en la densidad de carga alrededor del coloide, y los alcances de las capas de Stern y la difusa. A la derecha se muestra la distribución de iones positivos y negativos alrededor del coloide cargado.

*Microbalanza de cristal de cuarzo con Disipación (QCM-D)*

La Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM, por sus siglas en ingles) permite medir la masa adsorbida con elevada sensibilidad (del orden de ng/cm<sup>2</sup>) en tiempo real, de procesos de autoensamblado en superficies, de forma simple y directa.

Este método está basado en el efecto piezoeléctrico que presentan algunos materiales y que involucra la deformación de los mismos al aplicarles una diferencia de potencial [19]. En QCM se emplea un cristal delgado de cuarzo con un electrodo metálico en cada una de sus caras. Este cristal de cuarzo presenta una frecuencia de oscilación característica, que cambia al adsorber una película. En el caso de una película acoplada rígidamente, existe una relación lineal entre su masa y la frecuencia del cristal:

$$\Delta f_s = \frac{2f_s^2}{-\sqrt{\mu_Q \rho_Q}} \frac{\Delta m}{A} \quad \text{Ec.IV.2}$$

Donde  $\Delta f_s$  es el cambio de frecuencia medido,  $f_s$  la frecuencia resonante fundamental del cristal de cuarzo,  $\Delta m$  la masa de la película,  $A$  el área activa piezoeléctrica,  $\rho_Q$  la densidad de cuarzo (2.648 g.cm<sup>-3</sup>) y  $\mu_Q$  constante elástica del cuarzo (2.947x10<sup>11</sup> dina.cm<sup>-2</sup>). Esta ecuación, conocida como ecuación de Sauerbrey, puede reemplazarse por la relación de Sauerbrey, considerando  $\rho_Q$ ,  $\mu_Q$  y  $A$  como constantes y  $\Delta f_s \ll f_s$ .

La “relación de Sauerbrey” describe una relación lineal entre la masa depositada sobre el cristal y el cambio en la frecuencia de resonancia, válida para películas sólidas y muy delgadas:

$$\Delta m_{QCM} = -C \times \Delta f_{QCM} \quad \text{Ec.IV.3}$$

Donde  $C$  es la constante masa-sensibilidad (1.7 ng.cm<sup>-2</sup>.Hz<sup>-1</sup>).

Esta relación se aplica a capas rígidas, de poco espesor (de hasta unos pocos cientos de nm) adsorbidas desde la fase líquida. Sin embargo, para películas no-rígidas esto ya no

se cumple dado que la relación entre masa y frecuencia deja de ser lineal en un sistema que disipa.

El carácter viscoelástico de la película y, por lo tanto, la validez de la ecuación de Sauerbrey, puede determinarse en la microbalanza por la medida, de modo simultáneo a la frecuencia, de un parámetro denominado Disipación (D).

La disipación medida en la balanza de cuarzo se define por la expresión

$$D = E_{\text{disipada}} / (2E_{\text{almacenada}}) \quad \text{Ec.IV.4}$$

Donde la  $E_{\text{disipada}}$  y  $E_{\text{almacenada}}$  hacen referencia a la energía disipada y almacenada por el sistema oscilante en un período de oscilación.

Así, cuando la masa depositada tiene un marcado carácter de rigidez, la disipación energética del sistema es mucho menor que cuando el material que se adsorbe es viscoelástico [20,21].

La concentración de las soluciones de polielectrolitos utilizadas fue de 1.0 mg/ml en diferentes concentraciones de NaCl. Las disoluciones se prepararon a un pH 2 dónde ambos polielectrolitos están cargados evitando una posible precipitación y en consecuencia pérdida de material en la solución.

El equipo utilizado para el ensamblado de las capas en QCM-D es el módulo Q-Sense E4 (Q-Sense, Sweden).



### *Microscopia laser confocal (MCL)*

La microscopía láser confocal es una técnica de observación de amplio uso en diversas ramas de la ciencia como medicina, biología o geología. Es una técnica cuya característica fundamental es la capacidad para obtener imágenes enfocadas con gran resolución. Las imágenes son obtenidas punto a punto y reconstruidas digitalmente, lo que permite la reconstrucción tridimensional de muestras topológicamente complejas.

El marcaje fluorescente de vesículas poliméricas se puede lograr a través de diferentes enfoques. En la mayoría de los casos, los polímeros anfifílicos usados no presentan fluorescencia intrínseca y por lo tanto el medio de contraste debe ser encapsulado, o se debe añadir a la membrana de la vesícula un marcador fluorescente [22].

### *Preparación de las muestras*

Se extraen 20  $\mu$ l de la solución problema (capas ensambladas) y se depositan en un tubo ependorf. Luego se agrega un volumen de agua MilliQ para llevar la solución a un volumen final de 1.5 ml.

### *Microscopía de fuerza atómica (AFM)*

Actualmente, la técnica de AFM (por sus siglas en inglés, Atomic force microscopy) constituye una herramienta básica para la investigación de propiedades morfológicas de películas delgadas sobre sustratos sólidos. El microscopio de fuerzas atómicas es un instrumento mecánico-óptico capaz de registrar la topografía atómica de una superficie.

Los principios básicos por los que se rige el trabajo de un AFM son muy sencillos. Una punta muy delgada y aguda barre de manera automática una superficie mediante un mecanismo de retroalimentación que permite que unos “scanners” piezoeléctricos

mantengan la punta interaccionando con la superficie a fuerza constante (de esta manera se obtiene información de alturas topográficas), o a altura constante (para obtener información de fuerzas) respecto de la superficie de la muestra. El primer propósito de este instrumento es medir cuantitativamente la rugosidad superficial con una resolución nominal lateral de 5 nm y vertical de 0.01 nm en todo tipo de muestras [23,24].

En un AFM, se distinguen tres modos de operación básicos que son: de contacto, contacto intermitente o “Tapping” y de no-contacto.

En el modo de contacto, la punta barre la superficie de la muestra, sin levantar la punta de la superficie, aplicando una fuerza constante.

Es el único modo de trabajo que permite obtener imágenes con resolución atómica. Además de su alta velocidad de barrido, las muestras muy rugosas con cambios extremos en su topografía vertical pueden barrerse con facilidad.

El modo no-contacto se utiliza en situaciones en las que el contacto con la punta puede alterar la muestra. En este modo de trabajo la punta se sitúa a 50-150 Angstrom por encima de la superficie de la muestra. Las fuerzas atractivas de Van der Waals entre la punta y la superficie de la muestra, son detectadas y utilizadas para construir las imágenes topográficas. La única ventaja de éste es que no se ejercen fuerzas sobre la superficie de la muestra. Son empleados en su mayoría para superficies planas u homogéneas.

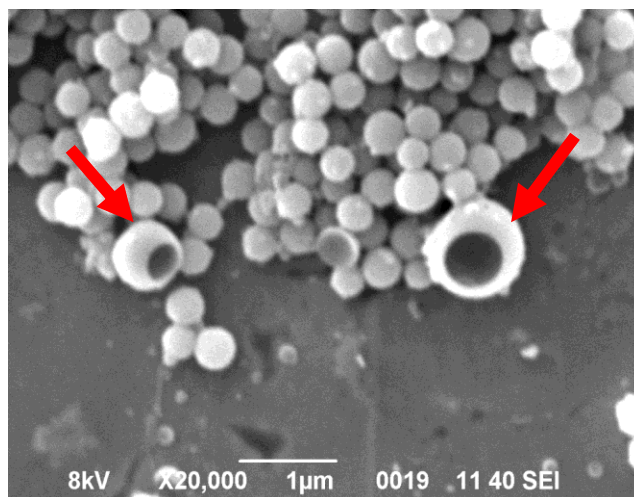
Por último, en el modo de contacto intermitente “Tapping”, durante el barrido, la punta con oscilación vertical contacta y se eleva de manera alternativa. Durante el contacto intermitente de la punta con la superficie, la oscilación del cantiléver se ve reducida debido a la pérdida de energía causada por el propio contacto. La reducción en la amplitud de oscilación se utiliza para identificar y medir las características superficiales. Presenta una mayor resolución lateral en la mayoría de las muestras (1-5nm).

En el presente trabajo de tesis se analizaron las películas ensambladas con la técnica de QCM-D empleando una solución 10 mM de NaCl. Las superficies empleadas para realizar las medidas son discos de sílice QSX 303 (QSense, Göteborg –Sweden-), válidos tanto para el uso en el módulo de la microbalanza de QCM como para realizar las medidas

en el equipo Veeco Multimodo conectado a un controlador Nanoscope V. La imagen es evaluada en el modo Tapping en una celda cerrada, donde la muestra se encuentra en una solución de 10 mM de NaCl.

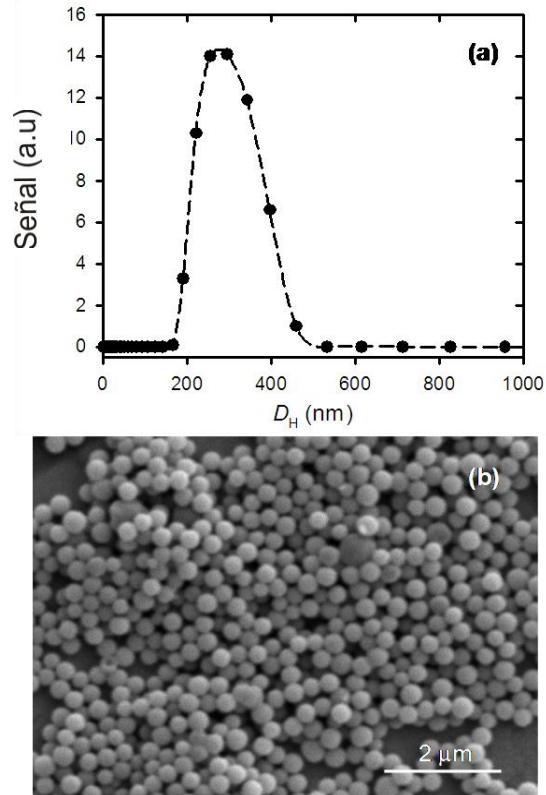
## *Resultados y discusión*

Las partículas o vesículas obtenidas a partir del copolímero en bloque PMABz-b-PMADMAE (2.8kDa-1.9kDa) presentan una morfología esférica y bastante uniforme, como puede apreciarse en las imágenes de SEM presentadas en la Figura.IV.4 En estas partículas ocurre una asociación de los bloques hidrofóbicos, los que en un ambiente polar (agua) tienden a formar la membrana de una vesícula, mientras que los bloques hidrofílicos son solvatados para formar la corona de dicha vesícula. Los tamaños de los polimerosomas formados utilizando el mencionado copolímero alcanzan los 300 nm. Los tamaños, como explican algunos autores, están estrechamente relacionados con el tamaño de los bloques que componen el copolímero block [25-28]. Las flechas rojas en la Figura.IV.4 señalan la formación de estas estructuras confirmando la morfología del sistema descrito.



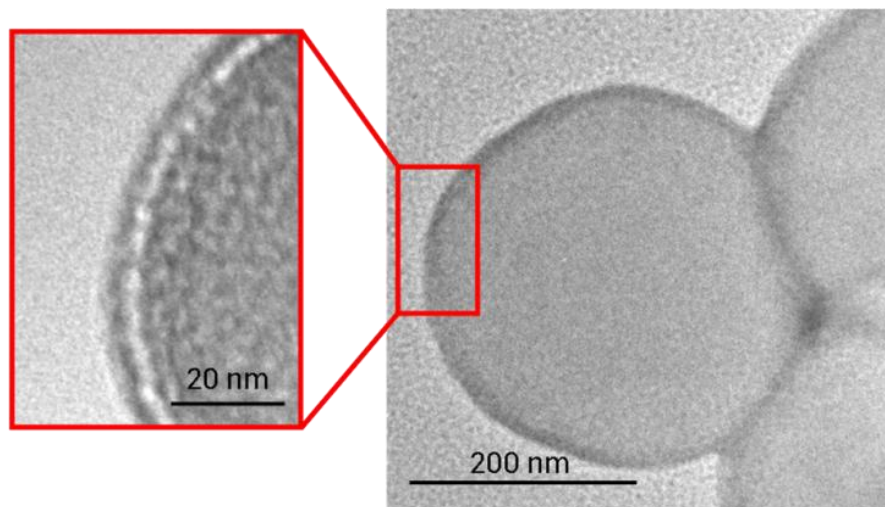
**Figura.IV.4:** Imágenes de SEM de los polimerosomas formados, visualizando su formación (flechas rojas).

El diámetro medio ( $D_H$ ) de los polimerosomas obtenidos evaluado mediante DLS fue de 275 nm con una distribución relativamente angosta (Figura IV.5a), el cual es cercano al determinado por SEM (Figura IV.5b).



**Figura IV.5:** Distribución de tamaños de polimerosomas evaluada mediante DLS (a) e imágenes de SEM de la muestra analizada.

Los polimerosomas fueron también caracterizados por microscopía electrónica de transmisión (TEM), revelando una estructura unilamelar (Figura IV.6), siendo el espesor de la pared del polímero cercano a 11 nm.

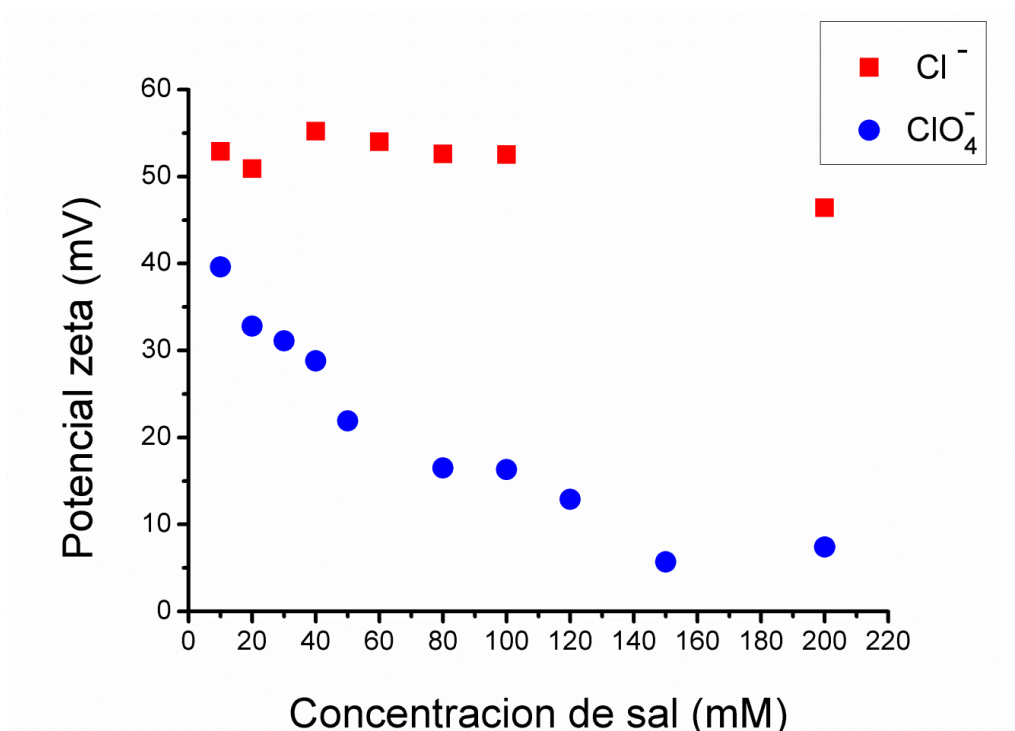


**Figura IV.6:** Imágenes TEM del polimerosoma. La magnificación permite distinguir la bicapa polimérica.

El estudio de potencial zeta de los polimerosomas en función de la concentración salina se muestra en la Figura.IV.7. La carga efectiva de los polimerosomas bajo diferentes condiciones experimentales representa un parámetro crucial en la técnica LbL, dado que las interacciones electrostáticas son la principal fuerza impulsora que gobierna el proceso de ensamblado. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto estas diferencias entre las fuerzas electrostáticas de los respectivos pares iónicos que se forman entre los polimerosomas y los distintos contraiones de las sales evaluadas.

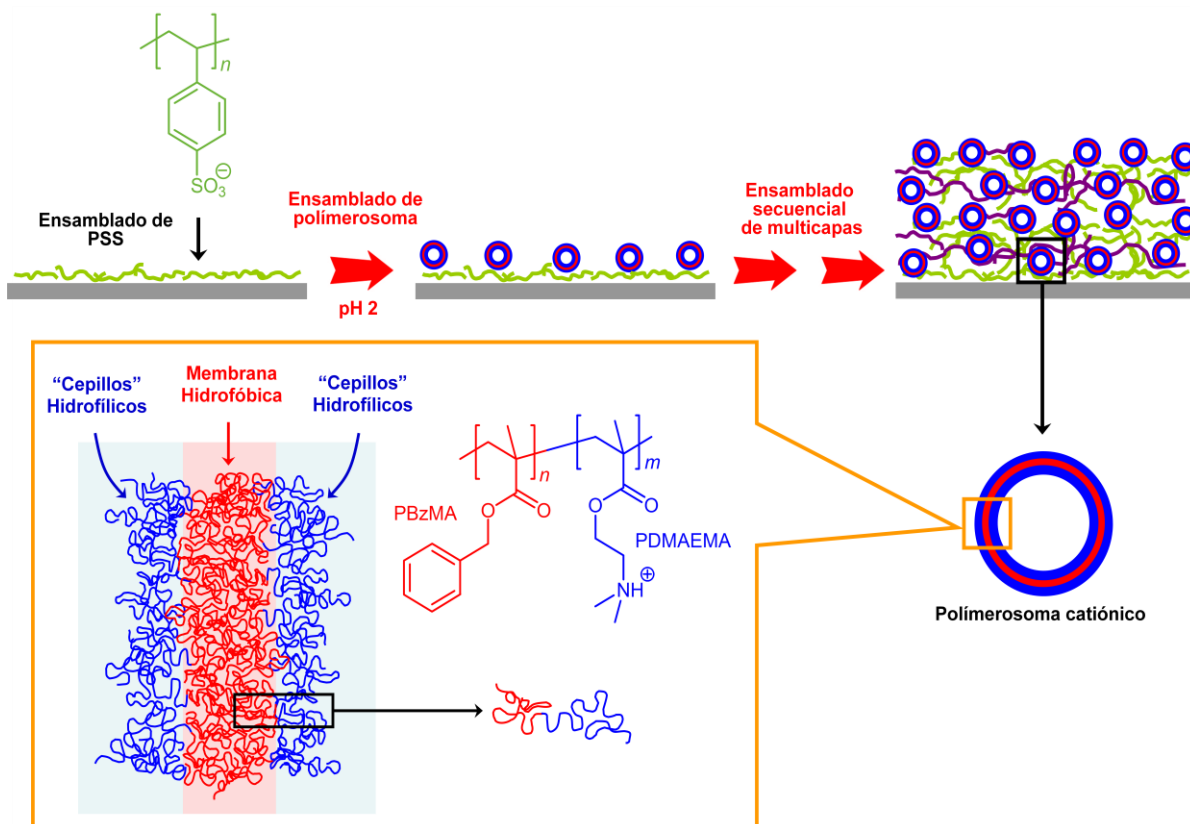
Los pares iónicos formados entre los polimerosomas (así como con el PSS) y los contraiones de las sales varían en función del tipo de contraion. En este caso en particular tanto el  $\text{Cl}^-$  como el  $\text{ClO}_4^-$  son aniones monovalentes, sin embargo la polarizabilidad y las características de solvatación de  $\text{ClO}_4^-$  promueven la formación de fuertes pares iónicos con los monómeros aminados. Esto conlleva a un apantallamiento más eficiente de las cargas del polielectrolito catiónico que el observado en presencia de iones cloruro. Por este motivo, bajo las mismas condiciones de concentración, las soluciones con iones perclorato

presentan un potencial zeta significativamente más bajo que las correspondientes a iones cloruro [18].



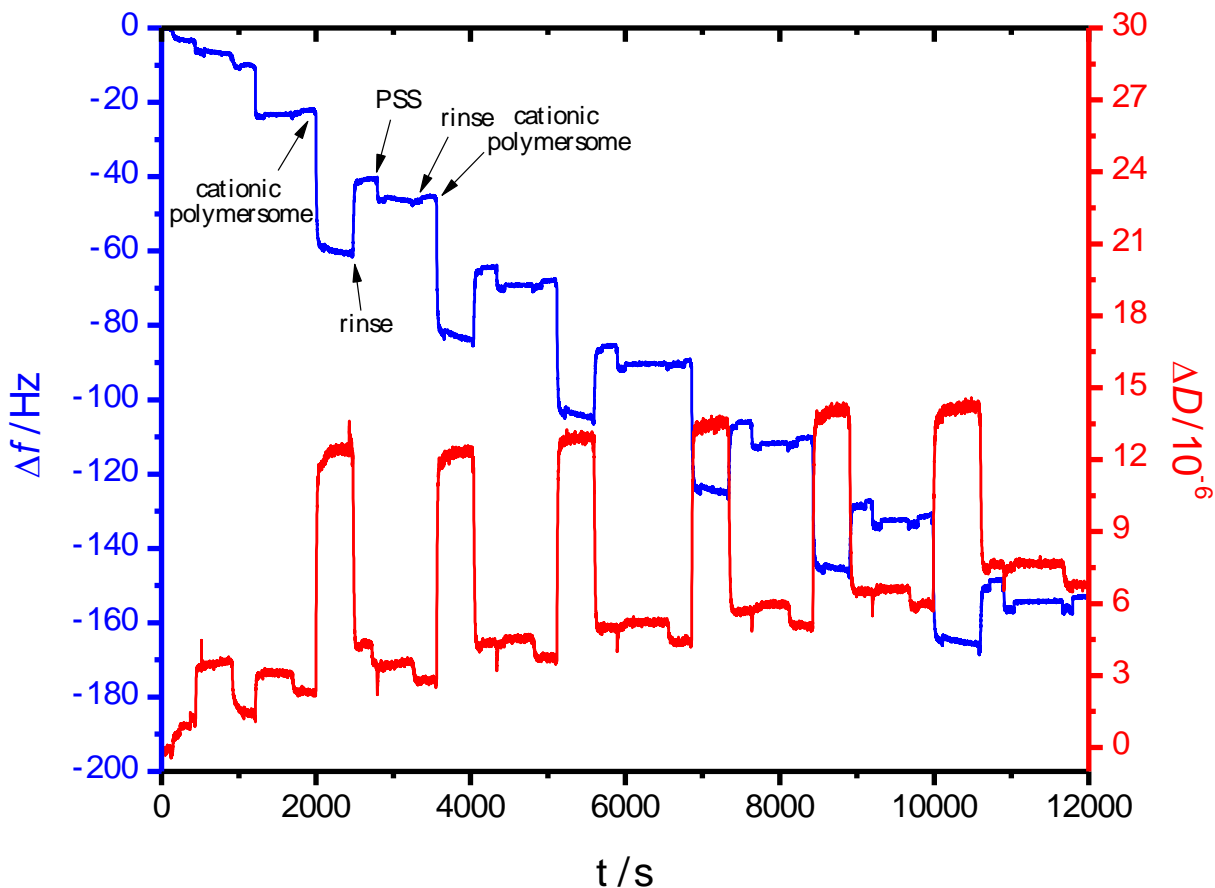
**Figura.IV.7:** Medidas de potencial zeta de los polimerosomas a distintas concentraciones de NaCl y LiClO<sub>4</sub>

En la Figura.IV.8 se representa un esquema de una bicapa ensamblada utilizando la técnica de QCM-D, los polimerosomas como bloques de construcción catiónicos para formar parte de la primera capa y el PSS como polianión en la segunda capa. Las etapas son seguidas de los lavados correspondientes, de esta forma se evita que polielectrolitos libres, que no estén ensamblados electrostáticamente, queden unidos a la capa formada.



**Figura.IV.8:** Esquema del proceso de formación secuencial del ensamblado capa a capa en superficies planas empleando polimerosomas (policación) y PSS (polianión) como bloques de construcción.

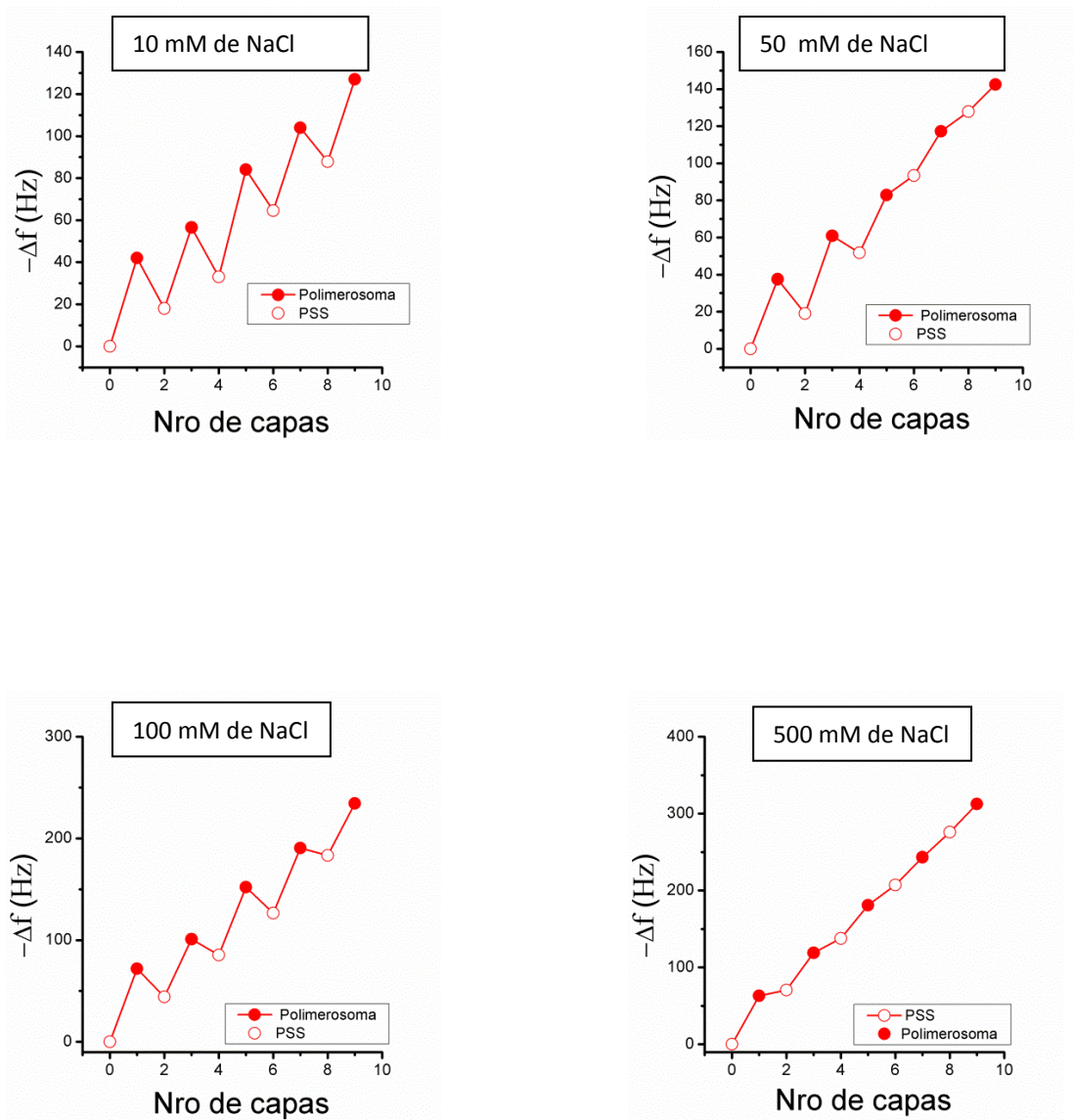
La gráfica a continuación (Figura.IV.9 ) muestra los resultados obtenidos sobre los ensamblados realizados con los polimerosomas y el PSS utilizando la balanza de QCM-D. Estos ensamblados se efectuaron a distintas concentraciones salinas, desde 10 mM a 500 mM en NaCl.



**Figura.IV.9:** Monitoreo in situ del autoensamblado capa a capa en QCM-D de polimerosomas PBzMA-b-PDMAEMA y PSS sobre los cristales de cuarzo recubierto de sílice. El trazo azul indica los cambios producidos en la frecuencia, mientras que la línea roja muestra un cambio correspondiente a la disipación. La traza de QCM-D se obtuvo a 15 MHz (armónicos  $n = 3$ ).

La Figura.IV.10 confirma la formación de una película resultante del ensamblado “capa a capa” de los respectivos polianiones y policationes, consecuencia del aumento de la frecuencia, la cual se encuentra en estrecha relación a la masa depositada en el cristal y predicha por la ecuación de Sauerbrey.





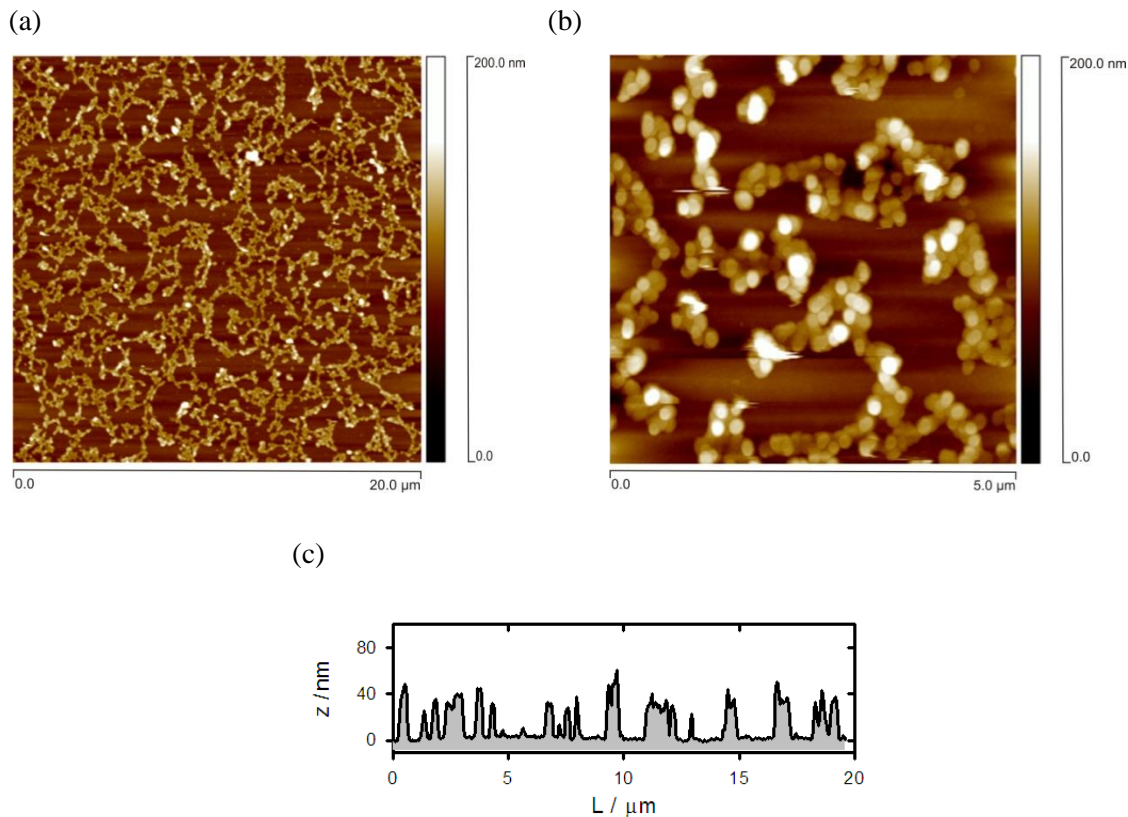
**Figura.IV.10:** Ensamblado de 4 bicapas a distintas fuerzas iónicas de 10 mM, 50 mM, 100 mM y 500 mM de NaCl.

En los gráficos se manifiesta una estrecha relación entre la concentración de la sal y los tamaños de las capas ensambladas. Este fenómeno ha sido estudiado extensivamente por el grupo de Schlenoff [32] quienes lo han explicado considerando que cuando un electrolito

fuerte se adsorbe sobre una superficie de carga opuesta este proceso está gobernado por dos tipos de interacciones electrostáticas: (a) interacción electrostática atractiva con la superficie (favoreciendo la adsorción) y (b) interacción electrostática repulsiva dentro de la capa de polielectrolito (inhibiendo la adsorción). Si esta repulsión es apantallada incrementando la fuerza iónica de la solución, entonces la cantidad de polielectrolito adsorbido durante cada ciclo de ensamblado es mayor aumentando así el espesor de cada capa.

Por lo tanto el comportamiento que se visualiza en la Figura.IV.10 es congruente con lo explicado anteriormente, obteniendo capas más gruesas al aumentar la concentración de la sal.

Los estudios de las superficies ensambladas con polimerosomas por AFM son frecuentes, y proporcionan información sobre la rugosidad y la estructura interfacial del ensamblado del film formado. Para ello las películas preparadas se enjuagaron con agua destilada y se secaron antes de caracterizarlas mediante AFM en modo “tapping”. En las imágenes de AFM de la Figura.IV.11. se presenta la incorporación de los polimerosomas del copolímero en bloque distribuidos sobre toda la superficie. Una imagen magnificada nos permite distinguir la formación de estructuras de mayor relieve las cuales son asignadas a los polimerosomas, ensamblados sobre la capa de PSS. El perfil de la sección transversal (Figura.IV.11c) indica que los polímerosomas se aplanan sobre la película, con una altura que varía desde 35 hasta 45 nm, y sus diámetros (270-290 nm) se corresponde con su distribución de tamaño, medido por DLS. Los datos de AFM corroboran que a pesar de una apreciable deformación, los polimerosomas permanecen intactos después del ensamble superficial. Los trabajos de Discher et al. [25] demostraron que los polimerosomas tienen membranas altamente flexibles que pueden tolerar deformaciones significativas. La relación promedio diámetro/altura de los polimerosomas ensamblados electrostáticamente es de 7,2, un valor cercano al valor recientemente reportado por Battaglia y colaboradores [33] para la inmovilización de polimerosomas biotinilados sobre superficies de estreptavidina (diámetro/altura = 7,7).

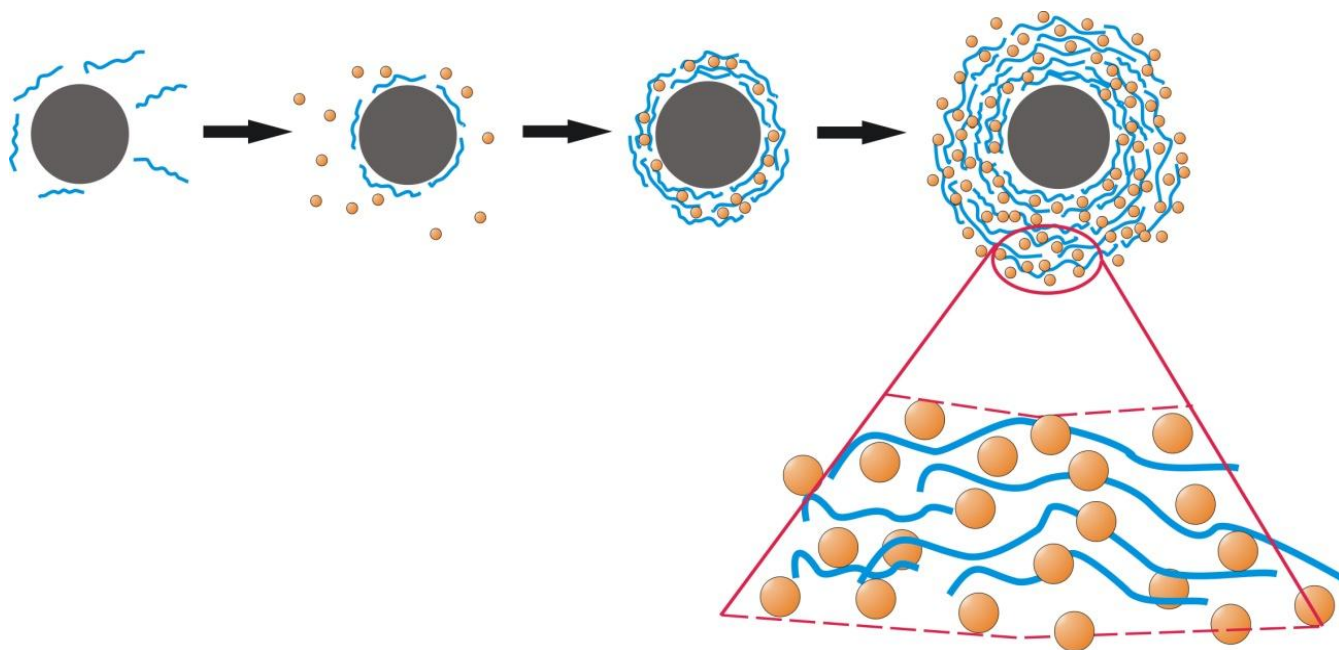


**Figura.IV.11:** Imágenes de AFM del films (PMABz-b-PMADMAE) 3 / (PSS) 2 construido con la técnica LBL: (a) 20 x 20  $\mu\text{m}^2$ ; (b) 5 x 5  $\mu\text{m}^2$ ; (c) análisis de la sección transversal resultante de la imagen AFM.

También puede observarse que si bien la superficie está cubierta con las vesículas hay una alta densidad de vacancias e inhomogeneidades sobre la misma, lo que significa que el ensamblado electrostático de los polimerosomas no conduce a la formación de una monocapa completamente compacta. Si bien la técnica de LbL se basa en la atracción electrostática y la formación de un complejo entre polianiones y policationes para formar una película supramolecular, el mecanismo de crecimiento tiene dos aspectos importantes a considerar: por un lado la capacidad de los bloques de construcción con cargas opuestas para adsorberse en la parte superior de la capa depositada previamente y por otro lado la repulsión existente entre los bloques de construcción de la misma carga, lo que en última instancia conduce a la autoregulación del proceso de adsorción y formación de una única capa. Es evidente que en el presente caso la inversión de cargas opera según lo esperado

para un sistema típico de LbL sin alcanzar un recubrimiento total de los polimerosomas. Una hipótesis para explicar este resultado es que las repulsiones electrostáticas e interacciones estéricas entre vesículas voluminosas altamente cargadas juegan un rol dominante y evitan la formación de una monocapa compacta.

En la Figura.IV.11 (c) se muestran distintas alturas, muy variadas, las cuales corresponden a los polimerosomas distribuidos en la superficie o en alguna capa más profunda del film, como consecuencia de las etapas de construcción capa a capa del mismo.

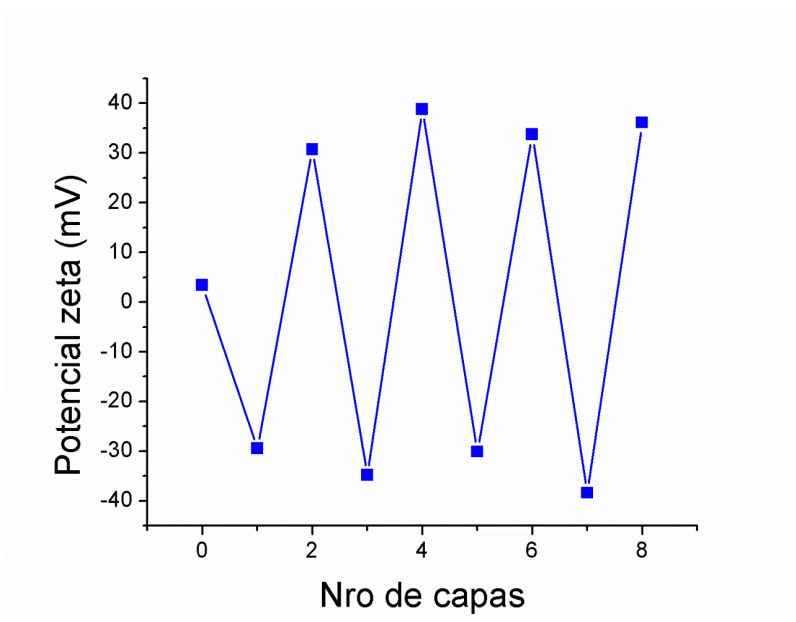


**Figura.IV.12:** Esquema de la formación de “layer by layer” en superficies esféricas funcionalizadas, empleando polimerosomas (policación) y PSS (polianión).

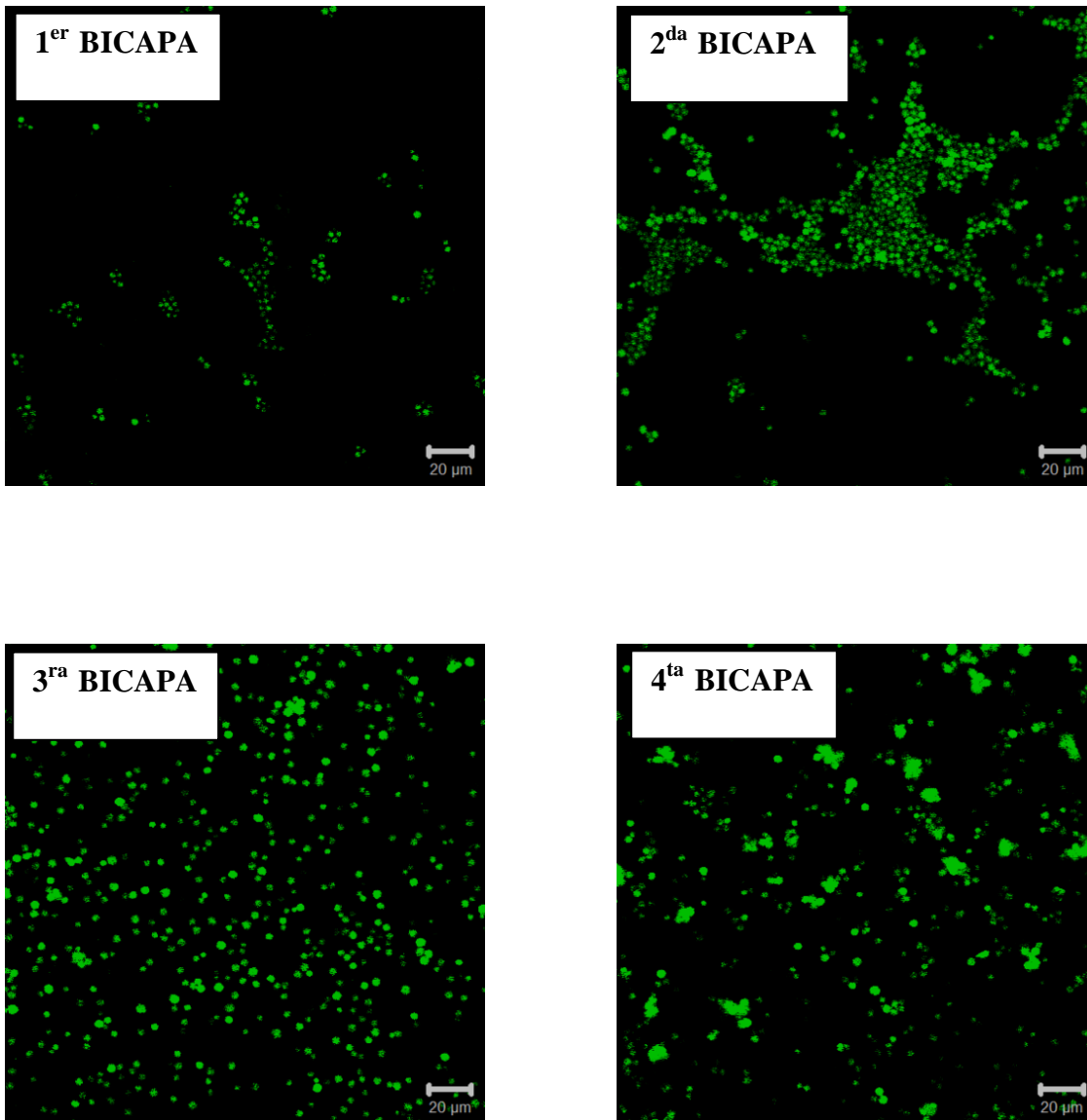
Utilizando una estrategia similar a la descrita para el ensamblado en superficies planas, se depositaron multicapas de polimerosoma/polielectrolito sobre partículas de sílica esféricas. Un esquema del ensamblado en las superficies esféricas se muestra en la Figura.IV.12.

La Figura.IV.13, presenta los cambios en el potencial zeta de las partículas de sílica cubiertas con los polimerosomas y PSS en función del número de capas, al igual que las nanopartículas de partida. El bajo valor del potencial zeta obtenido inicialmente para las

nanopartículas de sílica se hace negativo después de la adsorción de la primera capa del polianión PSS y la subsecuente adición del polimerosoma, conduce a una inversión de la carga superficial dando origen a valores de potencial zeta positivos. Cada deposición sucesiva conduce a la inversión completa de la carga, lo que indica una adsorción secuencial de PSS y polimerosomas adhieren unas a otras,. Esto se puede observar a través de la alternancia de valores de potencial durante el ensamblado secuencial de los distintos bloques de construcción (Figura.IV.13). Los valores del potencial zeta de las distintas capas son del orden de los valores observados en sistemas similares [17, 34, 35].



**Figura.IV.13:** Potencial zeta de las nanopartículas de sílica cubiertas con PSS/polimerosomas en función del número de capas mediante la técnica de LBL.

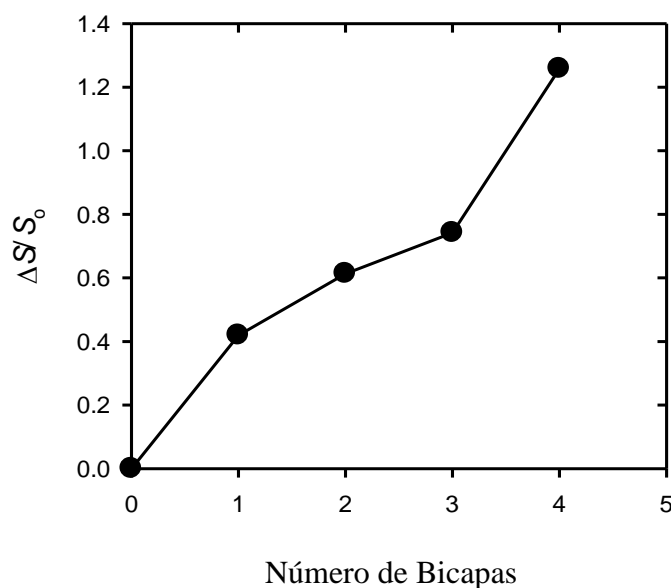


**Figura.IV.14:** Imágenes correspondientes a las distintas bicapas ensambladas dónde el color verde fosforescente se debe al marcador empleado (R6G).

El ensamblado de los polimerosomas sobre las partículas coloidales se caracterizó mediante microscopía confocal láser de barrido (MCL). El fluoróforo que se ha empleado para la visualización en las imágenes corresponde a la rodamina 6G (R6G) que se encuentra encapsulada en los polimerosomas. Se observa que a medida que crece el número de las bicapas ensambladas, la fluorescencia aumenta, indicando la presencia de un mayor número de polimerosomas unidos en cada etapa como se muestra en la Figura.IV.14. Este

procedimiento se emplea para evaluar la capacidad de las vesículas para encapsulación y su comportamiento frente a cambios del sistema como fuerza iónica, pH, temperatura y otros [36-38]. El tamaño de las partículas de sílica luego del ensamblado fue significativamente más grande que las partículas iniciales, las cuales tienen un diámetro medio de 500 nm.

En la Figura.IV.15 se puede observar que al aumentar el número de las bicapas ensambladas la señal de la R6G es mayor. Además, los valores graficados muestran un crecimiento lineal, haciendo referencia a lo semejante que son las deposiciones en cada etapa.

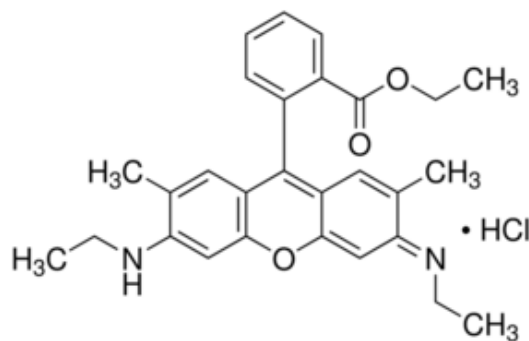


**Figura.IV.15:** Acumulación variada ( $\Delta S/S_0$ ) de la señal de fluorescencia de salida del citómetro de flujo con el cambio en el número de bicapas polimerosoma/polielectrolito en aumento.

Una vez ensambladas 4 bicapas se procedió a evaluar el comportamiento a distintos valores de pH. Estos ensayos mostraron resultados inesperados. Se observó que las partículas no se ven influenciadas con los cambios de pH, siendo esto un resultado contra intuitivo debido a la naturaleza química de los monómeros de PMADEMA. Las dimensiones como así también la fluorescencia permanecen constantes y no pueden apreciarse cambios en la liberación del fluoróforo. Es importante destacar que varios autores que han utilizado el monómero MADMAE como uno de los bloques del

copolímero han señalado que la pared de la bicapa de la vesícula comienza a ceder frente a los cambios de pH [39-41] permitiendo la liberación del marcador encapsulado.

Consecuentemente, la estabilidad del sistema formado y la capacidad de retención se atribuyen a la capa que conforma el PSS. Este PE tiene como característica importante la capacidad de interactuar a través de enlaces  $\pi$ - $\pi$  de corto alcance con contraiones aromáticos. Debido a la estructura del fluoróforo (Figura.IV.16) [42], la presencia del PSS inhibiría la liberación de la R6G que queda confinada en las capas ensambladas. El PSS actúa como una barrera que inhibe el desalajo de la R6G, evitando que el marcador sea liberado a la solución acuosa [43]. No obstante, el cambio de pH si produjo cambios en la estabilidad de la solución de coloides aumentando la interacción entre éstos y produciendo un número mayor de agregados al ir creciendo la basicidad de la solución. Las partículas ensambladas pierden las cargas superficiales lo que produce que las fuerzas de repulsión disminuyan y las fuerzas de cohesión predominen y sean posibles las interacciones entre ellas. Esto provoca la desestabilización del sistema estimulando que se formen agregados en la solución.



**Figura.IV.16:** Estructura del fluoróforo rodamina 6G (R6G).

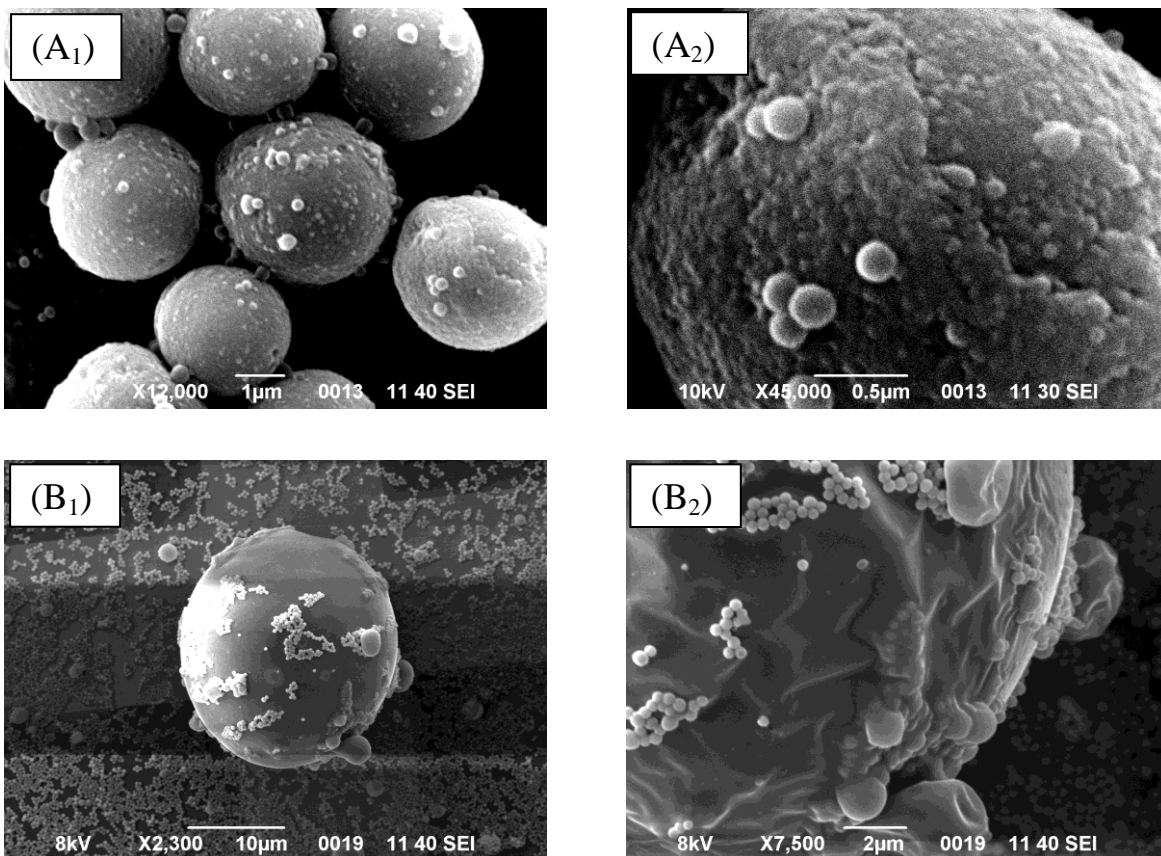
Las imágenes de SEM (Figura.IV.17) corroboran el esquema mostrado en la Figura.IV.11 donde se visualizan las vesículas en la superficie de la última capa de la partícula, algunas libres y otras envueltas por una capa de PSS. Se observa un aumento del diámetro de las mismas y de la rugosidad aparente de las partículas cubiertas con polimerosomas.



Las partículas ensambladas fueron caracterizadas por SEM y TEM, como se muestra en la Figura.IV.17 y Figura.IV.18 respectivamente. Las imágenes de SEM (A) corresponden a partículas ensambladas donde las etapas de lavado se realizan con agua MilliQ y en las imágenes de SEM (B) se pueden observar partículas ensambladas donde los lavados se realizaron empleando un solvente orgánico, THF. Los lavados con THF fueron realizados como una posible solución para eliminar los restos de reactivo (impurezas en el medio) encontrados en las imágenes con lavados de agua, correspondientes a las imágenes de SEM (A). Por lo tanto, se realizó el mismo procedimiento que con agua pero el último lavado se hizo con THF buscando alcanzar una muestra sin residuos, más limpia.

En las imágenes de SEM  $A_1$  y  $A_2$  se puede observar una eliminación parcial de dichas capas ensambladas, probablemente como consecuencia del proceso de secado. Como resultado de los lavados con THF, en las imágenes  $B_1$  y  $B_2$  se pueden observar cambios significativos tanto en los tamaños como en la estructura de los ensamblados. Se pueden ver más traslúcidas las capas de PSS que recubren las vesículas y como dejan a la vista el contraste entre las vesículas ubicadas en la capa superior de PSS y las vesículas situadas en la parte inferior de la misma capa. Se ven polimerosomas en capas más profundas de PSS que permanecen después de la adsorción de polielectrolito.

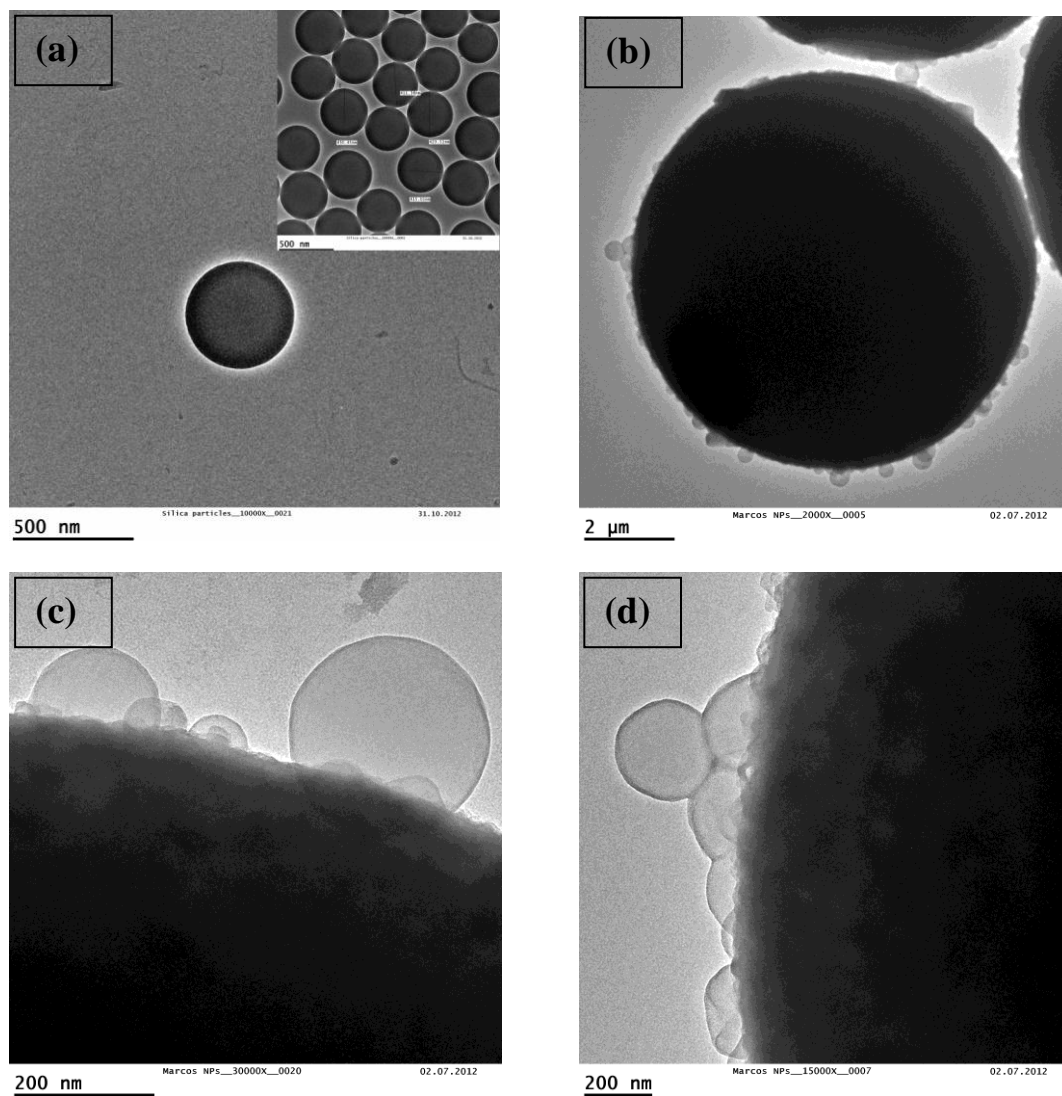
De esta forma las imágenes nos dan una información más precisa de la formación de las películas en superficies esféricas. Los lavados con THF producen la precipitación de las vesículas, aumentando el número significativamente en la muestra a diferencia de los lavados con agua MilliQ, esto probablemente se debió a los cambios de solubilidad en el medio generando una parcial precipitación de los polimerosomas en solución.



**Figura.IV.17:** Imágenes de SEM de las partículas ensambladas: (A) lavadas con agua MilliQ y (B) lavadas con THF.

En la Figura.IV.18 se muestran las imágenes de TEM de las partículas, antes y después de los ensamblados correspondientes. Se observa un significativo crecimiento de los tamaños en comparación con las partículas de sílica originales. Una inspección de la morfología de las partículas recubiertas por multicapa revela la presencia de polimerosomas en diferentes configuraciones interfaciales. La mayoría de las muestras mostraron un claro aplanamiento o la dispersión de los polimerosomas homogéneamente distribuidos en la superficie de la partícula. Puede suponerse que esta reorganización estructural conduce no solamente a interpenetración de la subsecuente capa, sino también a la compactación de la película. Por otro lado, algunas muestras revelaron la presencia de polimerosomas intactos

en la capa superior del recubrimiento de múltiples capas, lo que conduce a un aumento de la rugosidad aparente de las partículas de sílice recubiertas con polimerosomas.



**Figura.IV.18:** Imágenes de TEM de la partículas de sílice inicial (a) y de sílice recubiertas con polimerosoma, que muestran que las vesículas que se adhieren exhiben una variedad de diferentes formas (b, c y d).

La adherencia de vesículas sobre superficies sólidas ha sido muy estudiada durante las últimas décadas, especialmente en el caso de las vesículas lipídicas [44,45]. En la actualidad es ampliamente aceptado que las vesículas que se adhieren puede exhibir una

gran variedad de formas a condición de que la adhesión pueda cambiar la topología ya que puede inducir reorganización estructural de los constituyentes de la membrana. Por ejemplo, en la mayoría de los casos las vesículas sufren una transición de la adhesión desde un estado libre a un estado asociado. Esta transición está gobernada por el balance de las energías de flexión y adhesión, y ocurre incluso en ausencia de fluctuaciones de la forma.

La técnica utilizada, layer by layer, permitió la formación de varias capas de polielectrolitos al sistema. Esta técnica refuerza o genera nuevas propiedades que pueden ser utilizadas con una aplicación definida (anticorrosivas, liberación de drogas, separación de gases, etc). Por lo tanto, la importancia de esta técnica, además de la facilidad de ser usada, es que permite de forma sencilla alcanzar importantes resultados en cuanto a modificaciones en la estructura de cualquier tipo de superficie, empleando una variedad de compuestos que no depende necesariamente que estos elementos sean polielectrolitos como los empleados en este capítulo para la modificación de estas estructuras, en este caso vesículas y polielectrolitos, sino que existe una gran variedad de posibilidades (nanotubos de carbono, bacterias, micelas, etc.) las cuales son presentadas desde hace décadas en miles de trabajos publicados los cuales desarrollan las riquezas e importancia de los alcances de la técnica capa a capa. .

## *Conclusiones parciales*

- Los polimerosomas de PMABz<sub>60</sub>-b-PMADMAE<sub>40</sub> previamente obtenidos y el polielectrolito PSS fueron ensamblados eficientemente por la técnica de LbL en superficies planas y partículas coloidales de sílice y estudiados por diversas técnicas
- Tanto la técnica de QCM-D como la de AFM demostraron que el ensamble tiene lugar en forma continua en la superficie plana formando una cubierta progresiva en toda el área de trabajo. El recubrimiento ocurre con el depósito de islas de polimerosomas que crecen de forma vertical con el número de capas depositadas y el revestimiento de la superficie completo se produce en un número de 4 bicapas depositadas. Se puede inferir que el número de bicapas depositadas no es el máximo alcanzado, debido a la estabilidad medida del film.
- Los estudios realizados por medidas del potencial zeta y MCL de las partículas coloidales ensambladas utilizando polimerosomas cargados con el colorante fluorescente Rodamina mostraron un aumento continuo de la distribución de fluorescencia con el número de capas y la capacidad para encapsular moléculas pequeñas. Durante la deposición de subsecuentes capas el tamaño de las partículas aumenta desde 500 nm hasta 3  $\mu\text{m}$ ; dicho aumento está de acuerdo con la deposición de capas densamente empaquetadas de polimerosomas.
- Las diferencias en la estructura de capas sobre superficies planas y partículas coloidales bajo las mismas condiciones de ensamblado pueden ser explicadas por la alta densidad de polimerosomas alrededor de las partículas durante la centrifugación que desencadena un empaquetamiento denso y una cobertura completa de la superficie de las partículas coloidales.

## Referencias

- [1] M. M. de Villiers, D. P. Otto, S. J. Strydom, Y. M. Lvov. "Introduction to nanocoatings produced by layer-by-layer (LBL) self-assembly". *Advanced Drug Reviews*. (2011), 63, 701.
- [2] N. Reitzel, D. R. Greve, K. Kjaer, P.B. Howes, M. Jayaraman, S. Savoy, R. D. McCullough, J. T. Mc Devitt, and T. Bjornholm. "Self-Assembly of Conjugated Polymers at the Air/Water Interface. Structure and Properties of Langmuir and Langmuir-Blodgett Films of Amphiphilic Regioregular Polythiophenes". *J. Am. Chem. Soc.* (2000), 122, 5788.
- [3] G. Decher and J. D. Hong. "Buildup of ultrathin multilayer films by self-assembly process: I. Consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles". *Makromol. Chem. Macromol. Symp.* (1991), 46, 321.
- [4] G. Decher and J. D. Hong. "Buildup of ultrathin multilayer films by self-assembly process: II. Consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles and polyelectrolytes on charged surfaces". *Ber. Bunsenges. Phys.Chem.* (1991), 95, 1430.
- [5] G. Decher, J. D. Hong and J. Schmitt. "Buildup of ultrathin multilayer films by self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces". *Thin Solid. Films.* (1992), 210/211, 831.
- [6] K. Katagiri, R. Hamasaki, K. Ariga and J. Kikuchi. "Layer-by-Layer Self-Assembling of Liposomal Nanohybrid "Cerasome" on Substrates". *Langmuir*. (2002), 18, 6709.
- [7] X. Liu, L. Zhou, W. Geng and J. Sun. "Layer-by-Layer-Assembled Multilayer Films of Polyelectrolyte-Stabilized Surfactant Micelles for the Incorporation of Noncharged Organic Dyes". *Langmuir*. (2008), 24, 12986.
- [8] K. Ariga, Y. M. Lvov, K. Kawakami, Q. Ji, J. P. Hill. "Layer-by-layer self-assembled shells for drug delivery". *Advanced Drug Delivery Reviews*. (2011), 63, 762.

- [9] H. Huang, E. Pierstorff, E. Osawa and D. Ho. "Protein-Mediated Assembly of Nanodiamond Hydrogels into a Biocompatible and Biofunctional Multilayer Nanofilm". *ASC NANO*. (2008), 2, 203.
- [10] J. Hong, Y. S. Kang and S. W. Kang. "Nanoassembly of Block Copolymer Micelle and Graphene Oxide to Multilayer Coatings". *Industrial & Engineering Chemistry Research*. (2011), 50, 3095.
- [11] F. Caruso, M. Spasova, A. Susa, M. Giersig and R. A. Caruso. "Magnetic Nanocomposite Particles and Hollow Spheres Constructed by a Sequential Layering Approach". *Chem. Mater.* (2001), 13, 109.
- [12] S. F. M. van Dongen, H. M. de Hoog, R. J. R. Peters, M. Nallani, R. J. M. Nolte and J. C. M. van Hest. "Biohybrid Polymer Capsules". *Chem. Rev.* (2009), 109, 6212.
- [13] J. Hong, J. Cho, K. Char. "Hollow capsules prepared from all block copolymer micelle multilayers". *Journal of Colloid and Interface Science*. (2011), 364, 112.
- [14] B. Yang, H. Matsumura, K. Katoh, H. Kise and K. Furusawa. "Formation of Multilayer Composite Particles Comprised of Silica/Vesicle/Silica Particles by Hetero coagulation". *Langmuir*. (2001), 17, 2283.
- [15] H. Kim, S. W. Keller and T. E. Mallouk.. "Characterization of Zirconium Phosphate/Polycation Thin Films Grown by Sequential Adsorption Reactions". *Chem. Mater.* (1997), 9, 1414.
- [16] J. Du and R. K. O'Reilly. "Advances and challenges in smart and functional polymer vesicles". *Soft Matter*. (2009), 5, 3544.
- [17] R.J. Hunter. "Zeta Potential in Colloid Science. Principles and Applications". *Colloid Science*, R.H. Ottewill and R.L. Rowell Eds. *Academic Press*, (1981).
- [18] J. Irigoyen, S. E. Moya, J. J. Iturri, I. Llarena, O. Azzaroni, and E. Donath. "Specific  $\zeta$ - Potencial Response of Layer-by-Layer Coated Colloidal Particles Triggered by Polyelectrolyte Ion Interactions". *Langmuir*. (2009), 25, 3374.

- [19] A. Arnau, ed. (2004). *Piezoelectric Transducers and Applications*. Heidelberg: Springer.
- [20] S. M. Notley, M. Eriksson, L. Wagberg. "Visco-elastic and adhesive properties of adsorbed polyelectrolyte multilayers determined in situ with QCM-D and AFM measurements". *Journal of Colloid and Interface Science*. (2005), 292, 29.
- [21] R. Etchenique. "Aplicaciones analíticas de la Balanza de Cristal de Cuarzo". Tesis Doctoral (1998). Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires-Argentina.
- [22] W. Mueller, K. Koynov, K. Fischer, S. Hartmann, S. Pierrat, T. Basché and M. Maskos. "Hydrophobic Shell Loading of PB-b-PEO Vesicles". *Macromolecules*. (2009), 42, 357.
- [23] K. Jaskiewicz, M. Makowski, M. Kappl, K. Landfester, and A. Kroeger. "Mechanical Properties of Poly (dimethylsiloxane)-block-poly (2-methyloxazoline) Polymersomes Probed by Atomic Force Microscopy". *Langmuir*. (2012), 28, 12629.
- [24] A. Potisatityuenyong, G. Tumcharern, S. T. Dubas, M. Sukwattanasinitt. "Layer-by-layer assembly of intact polydiacetylene vesicles with retained chromic properties". *Journal of Colloid and Interface Science*. (2006), 304, 45.
- [25] a) D. E. Discher, A. Eisenberg. "Polymer vesicles". *Science*. (2002), 297, 967. b) D. E. Discher and F. Ahmed. "Polymersomes". *Annu. Rev. Biomed. Eng.* (2006), 8, 323.
- [26] Y. Zhou and D. Yan. "Supramolecular Self-Assembly of Giant Polymer Vesicles with Controlled Sizes". *Angew. Chem. Int. Ed.* (2004), 43, 4896.
- [27] M. E. Yildiz, R. K. Prud'homme, I. Robb and D. H. Adamson. "Formation and characterization of polymersomes made by a solvent injection method". *Polym. Adv. Technol.* (2007), 18, 427.
- [28] J. A. Opsteen, J. J. L. M. Cormelissen, and J. C. M. van Hest. "Block copolymer vesicles". *Pure Appl. Chem.* (2004), 76, 1309.



- [29] M. Lundin, F. Solaqa, E. Thormann, L. Macakova, and E. Blomberg. "Layer-by-Layer Assemblies of Chitosan and Heparin: Effect of Solution Ionic Strength and pH". *Langmuir* (2011), 27, 7537.
- [30] G. Findenig, R. Kargl, K. Stana-Kleinschek, and V. Ribitsch. "Interaction and Structure in Polyelectrolyte/Clay Multilayers: A QCM-D Study". *Langmuir*. (2013), 29, 8544.
- [31] J. Iruthayaraj, E. Poptoshev, A. Vareikis, R. Makuska, A. van del Wal, and P. M. Claesson. "Adsorption of Low Charge Density Polyelectrolyte Containing Poly (ethylene oxide) Side Chains on Silica: Effects of Ionic Strength and pH". *Macromolecules*. (2005), 38, 6132.
- [32] J. B. Schlenoff and S. T. Dubas. "Mechanism of Polyelectrolyte Multilayer Growth: Charge Overcompensation and Distribution". *Macromolecules*. (2001), 34, 592.
- [33] G. Battaglia, C. LoPresti, M. Massignani, N. J. Warren, J. Madsen, S. Forster, C. Vasilev, J. K. Hobbs, S. P. Armes, S. Chirasatitsin, A. J. Engler. "Wet Nanoscale Imaging and Testing of Polymersomes". *small*. (2011), 7, 2010.
- [34] K. Sakai, G. B. Webber, C. Vo, E. J. Wanless, M. Vamvakaki, V. Btn, S. P. Armes, and S. Biggs. "Characterization of Layer-by-Layer Self-Assembled Multilayer Films of Diblock Copolymer Micelles". *Langmuir*. (2008), 24 (1), 116.
- [35] K. Sakai, E. G. Smith, G. B. Webber, C. Schatz, E. J. Wanless, V. Btn, S. P. Armes, and S. Biggs. "Comparison of the Adsorption of Cationic Diblock Copolymer Micelles from Aqueous Solution onto Mica and Silica". *Langmuir*. (2006), 22 (12), 5328.
- [36] U. Borchert, U. Lipprandt, M. Bilang, A. Kimpfler, A. Rank, R. Peschka-Süss, R. Schubert, P. Lindner, and S. Förster. "pH-Induced Release from P2VP-PEO Block Copolymer Vesicles". *Langmuir*. (2006), 22, 5843.
- [37] G. Liu, X. Liu, S. Wang, C. Chen, and J. Ji. "Biomimetic Polymersomes as Carriers for Hydrophilic Quantum Dots". *Langmuir*. (2012), 28, 557.

- [38] K. Kita-Tokarczyk, J. Grumelard, T. Haefele, W. Meier. "Block copolymer vesicles-using concepts from polymer chemistry to mimic biomembranes". *Polymer*. (2005), 46, 3540.
- [39] W. Agut, A. Brulet, C. Schatz, D. Taton, and S. Lecommandoux. "pH and Temperature Responsive Polymeric Micelles and Polymersomes by Self-Assembly of Poly [2-(dimethylamino) ethyl methacrylate-*b*-Poly (glutamic acid) Double Hydrophilic Block Copolymers". *Langmuir*. (2010), 26 (13), 10546.
- [40] K. Sakai, E.G. Smith, G. B. Webber, M. Baker, E. J. Wanless, V. Büttin, S. P. Armes, and S. Biggs. "Characterizing the pH-Responsive Behavior of Thin Films of Diblock Copolymer Micelles at the Silica/Aqueous Solution Interface". *Langmuir*. (2006), 22, 8435.
- [41] A. B. Lowe and C. L. McCormick. "Synthesis and Solution Properties of Zwitterionic Polymers". *Chem. Rev.* (2002), 102, 4177.
- [42] R. Araya. "Sensibilidad de Complejos Fluorescentes de Rodamina 6G-Polielelectrolitos a la Presencia de  $\text{Cu}^{+2}$  en Solución". Tesis de pregrado (2010). Facultad de Ciencias Escuela de Biología Marina. Universidad Austral de Chile.
- [43] E. A. Araya Hermosilla. "Encapsulación de una molécula modelo de bajo peso molecular en microcápsula de Alginato de calcio". Tesis de grado (2012). Facultad de Ciencias Escuela de Biología Marina. Universidad Austral de Chile. Valdivia-Chile.
- [44] U. Seifert, K. Berndl, R. Lipowsky. "Shape transformations of vesicles: Phase diagram for spontaneous- curvature and bilayer-coupling models". *Phys. Rev. A*. (1991), 44, 1182.
- [45] M.J. Blount, M.J. Miksis, S.H. Davis. "The equilibria of vesicles adhered to substrates by short-ranged potentials". *Proc. Royal Soc. A-Math. Phys Eng Sci.* (2013), 469, 2153.

## *Conclusiones Generales*

- Empleando la técnica de GTP se obtuvieron copolímeros, de la familia de los metacrilatos, con distintos bloques funcionalizados obteniendo los copolímeros deseados. Los productos de estas síntesis fueron caracterizados e identificados y los mismos presentan tamaños moleculares e índices de polidispersidad acordes a otros copolímeros obtenidos por el mismo método de síntesis.
- Si bien la síntesis por GTP de copolímeros en bloque de los fumaratos, dio lugar a una baja incorporación de los mismos en el extremo de cadena, la misma sugiere que su baja reactividad es dependiente de las condiciones de reacción utilizadas, por lo que podría estudiarse en mayor profundidad su polimerización empleando otras condiciones de iniciación
- Los copolímeros anfifílicos sintetizados se ensamblaron mediante el uso de solventes selectivos, ya sea en fase reversa como en fase directa. Esto pone en evidencia la importancia en la selección de los monómeros que conforman los bloques durante la síntesis, así como las potenciales aplicaciones que de ellos se derivan.
- Las micelas formadas por los copolímeros en fase reversa fueron utilizadas como nanoreactores para la síntesis de las NPs de Ag. La distribución de los tamaños de las NPs obtenidas poseen baja dispersidad y existe una estrecha relación entre los tamaños y la temperatura de la reacción de síntesis. Se observó que al aumentar la temperatura tanto las NPs como los agregados crecen. Estos resultados sugieren que los copolímeros sintetizados podrían ser utilizados a futuro para la obtención de otro tipo de nanopartículas metálicas, aptas para diversas aplicaciones.
- Los polimerosomas formados en fase directa, fueron utilizados en la construcción de ensamblados por la técnica de LbL en superficies planas y en partículas coloidales de sílice. Los estudios realizados por distintas técnicas demostraron que los ensamblados se formaban eficientemente, mostrando gran estabilidad. El tamaño de los films ensamblados está de acuerdo con la deposición de capas densamente empaquetadas de polimerosomas.