



GOBIERNO DE  
MÉXICO



CONACYT  
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
EN QUÍMICA APLICADA

Saltillo, Coahuila a 03 de noviembre de 2022

### Coordinación de Posgrado

#### Presente

Por este conducto nos permitimos informar a esta coordinación que, el documento de Tesis preparado por **ANGÉLICA VELÁZQUEZ ARELLANO** titulado **Síntesis de nano-hidrogeles termosensibles de poli(N-isopropilacrilamida) y poli(etilenglicol)/poli(etilenglicol)  $\alpha$ -metil éter mediante ATRP-AGET en medio acuoso** el cual fue presentado el día 27 de octubre de 2022, ha sido modificado de acuerdo a las observaciones, comentarios y sugerencias, realizadas por el Comité Evaluador asignado. Por tal motivo, avalamos que el documento adjunto corresponde a la versión final del documento de Tesis.

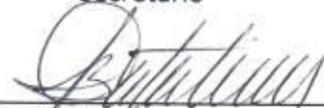
Atentamente,

#### SINODALES

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Enrique Javier Jiménez Regalado  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Enrique Saldívar Guerra  
Secretario

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Ricardo Acosta Ortiz  
1er. Vocal

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Catalina María Pérez Berumen  
2do. Vocal

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Isabel Araceli Facundo Arzola  
3er. Vocal

Vo. Bo. ASESOR  
  
\_\_\_\_\_  
Dr. Luis Ernesto Elizalde Herrera



## TESIS CON CARACTER ABIERTO

PROGRAMA: DOCTORADO EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

---

AUTOR: ANGÉLICA VELÁZQUEZ ARELLANO FIRMA 

TITULO: Síntesis de nano-hidrogeles termosensibles de poli(N-isopropilacrilamida) y poli(etilenglicol)/poli(etilenglicol)  $\alpha$ -metil éter mediante ATRP-AGET en medio acuoso

ASESOR: Dr. Luis Ernesto Elizalde Herrera FIRMA 

El Centro de Investigación en Química Aplicada clasifica el presente documento de tesis como ABIERTO.

Un documento clasificado como Abierto se expone en los estantes del Centro de Información para su consulta. Dicho documento no puede ser copiado en ninguna modalidad sin autorización por escrito del Titular del Centro de Información o del Director General del CIQA.

Saltillo, Coahuila, a 27 de Octubre de 2022

  
Sello de la Institución

  
Dr. Oliverio Santiago Rodríguez Fernández  
Director General del CIQA



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA**  
**Programa de Doctorado en Tecnología de Polímeros**

***TESIS***

**Síntesis de nano-hidrogeles termosensibles de poli(N-isopropilacrilamida) y  
poli(etilenglicol)/poli(etilenglicol)  $\alpha$ -metil éter mediante  
ATRP-AGET en medio acuoso**

***Presentada por:***

**ANGÉLICA VELÁZQUEZ ARELLANO**

***Para obtener el grado de:***

**Doctor en Tecnología de Polímeros**

***Asesorada por:***

**Dr. Luis Ernesto Elizalde Herrera**

**Octubre, 2022**

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA  
Programa de Doctorado en Tecnología de Polímeros

*TESIS*

Síntesis de nano-hidrogeles termosensibles de poli(N-isopropilacrilamida) y  
poli(etilenglicol)/poli(etilenglicol)  $\alpha$ -metil éter mediante  
ATRP-AGET en medio acuoso

*Presentada por:*

ANGÉLICA VELÁZQUEZ ARELLANO

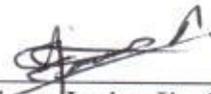
*Para obtener el grado de:*

Doctor en Tecnología de Polímeros

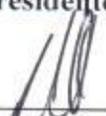
*Asesorada por:*

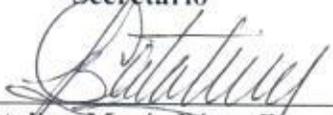
Dr. Luis Ernesto Elizalde Herrera

SINODALES

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Enrique Javier Jiménez Regalado  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Enrique Saldívar Guerra  
Secretario

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Ricardo Acosta Ortiz  
1er. Vocal

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Catalina María Pérez Berumen  
2do. Vocal

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Isabel Araceli Facundo Arzola  
3er. Vocal

## DECLARACIÓN

Declaro que la información contenida en la Parte Experimental así como en la Parte de Resultados y Discusiones de este documento y que forman parte de las actividades de investigación y desarrollo realizadas durante el período que se me asignó para llevar a cabo mi trabajo de tesis, será propiedad del Centro de Investigación en Química Aplicada.

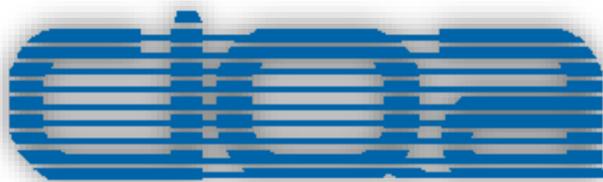
Saltillo, Coahuila a 27 de octubre de 2022

A handwritten signature in black ink, enclosed in a hand-drawn, irregular shape. The signature reads "Angélica" in a cursive script, with "O NA" written below it.

ANGÉLICA VELÁZQUEZ ARELLANO

Nombre y Firma

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA**



**PROGRAMA DE DOCTORADO EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS**

**T E S I S   D O C T O R A L :**

**Síntesis de nanohidrogeles termosensibles de poli(N-isopropilacrilamida) y poli(etilenglicol)/poli(etilenglicol)  $\alpha$ -metil éter mediante ATRP-AGET en medio acuoso**

*Presentada por:*

**M.C. ANGÉLICA VELÁZQUEZ ARELLANO**

*Asesor:*

**DR. LUIS ERNESTO ELIZALDE HERRERA**

**SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO**

**OCTUBRE DE 2022**



# PREFACIO

ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN FUE REALIZADO EN EL  
**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA**  
**(CIQA)** Y PERTENECE AL PROYECTO: SÍNTESIS DE  
COPOLÍMEROS ANFIFÍLICOS Y ESTUDIO DE SU APLICACIÓN  
COMO AGENTES DE LIBERACIÓN CONTROLADA, DE LA  
CONVOCATORIA DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA BÁSICA  
2017-2018, CON NÚMERO: **A1-S-35972**

# DEDICATORIA

*Dedico este gran esfuerzo a mis padres, hermanas/os, sobrinos y a mi sobrina, cuñados, amigos; y agradezco a cada una de las personas que fueron mi apoyo en días de inmenso trabajo, desvelo y estrés.*

# AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por otorgarme el apoyo económico para la realización de esta investigación y al **Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA)** por la oportunidad de continuar con mi formación profesional.

Agradezco a mi asesor, el **Dr. Luis Ernesto Elizalde Herrera**, por el apoyo, paciencia y disposición para el desarrollo del presente trabajo. Por compartir su experiencia y conocimientos que contribuyeron con mi formación académica.

A los sinodales: **Dr. Enrique Javier Jiménez Regalado**, **Dr. Enrique Saldívar Guerra** y al **Dr. Ricardo Acosta Ortiz** por el tiempo dedicado a la evaluación del presente trabajo, por dar soluciones y opiniones con validez y aplicación en la mejora científica de la investigación realizada. A la **Dra. Graciela Arias García**, por sus aportaciones en la primera etapa del proyecto.

Al Departamento de Posgrado: **Lic. Imelda Vargas García (†)**, **Lic. Nancy Espinosa Pinales**, **M.C. Gladys de los Santos Villarreal**, **Dra. Leticia Larios López**, **M.C. Aída Esmeralda García Valdez** y al **Dr. Luis Alfonso García Cerda** por el apoyo en los trámites administrativos.

Al personal del Departamento de Química Macromolecular y Nanomateriales: **Dra. Odilia Pérez Camacho** y a la **Dra. María Esther Treviño Martínez** por el apoyo y disposición para facilitar la conclusión del proyecto, al **M.C. J. Guadalupe Téllez Padilla**, **L.C.Q. Jorge Félix Espinosa Muñoz (†)** por el apoyo en análisis de muestras de RMN y apoyo en técnicas de laboratorio, a la **Ing. Beatriz Elvira Reyes Vielma** por la capacitación en el uso del equipo de DLS y a la **M.C. Hortensia Maldonado Textle** por el apoyo en la caracterización de muestras mediante GPC.

Al personal del Laboratorio de Microbiología: **Dr. Antonio Serguei Ledezma Pérez**, **Dr. Jorge Romero García (†)** y a la **Q.F.B. Natividad Alvarado Canché**, por el apoyo en

la liofilización de todas las muestras y por la disposición para la capacitación en el uso de equipos.

Un agradecimiento especial a la **Dra. Geraldina Rodríguez Riojas** del departamento de Materiales Avanzados, del Laboratorio Nacional de Materiales Grafénicos (LNMG) por el apoyo en la capacitación para el uso del equipo MALDI-TOF y por el análisis de muestras iniciales.

Al personal de Laboratorio Central de Instrumentación Analítica: al **Dr. Enrique Díaz Barriga** por el análisis de muestras mediante TEM y a la **M.C. María Teresa Rodríguez Hernández** por el apoyo en la caracterización de muestras mediante GPC.

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
RESUMEN.....	VIII
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>4</b>
2.1. NANOHIIDROGELES.....	4
2.1.1. <i>Nanohidrogeles funcionales</i> .....	5
2.1.1.1. <i>Nanohidrogeles sensibles a la temperatura</i> .....	6
2.2. MÉTODOS DE SÍNTESIS DE HIIDROGELES DE PNIPAM.....	10
2.2.1. <i>Estabilización estérica de nanohidrogeles de PNIPAM</i> .....	12
2.2.2. <i>Autoensamblaje de copolímeros en bloque anfífilos</i> .....	14
2.2.2.1. Autoensamblaje convencional de copolímeros en bloque anfífilos para la síntesis de nanohidrogeles.....	15
2.2.2.2. Autoensamblaje inducido por polimerización (PISA).....	17
<i>Nanomateriales obtenidos por RAFT-PISA</i> .....	19
<i>Nanomateriales obtenidos por ATRP-PISA</i> .....	24
2.3. APLICACIONES DE NANOHIIDROGELES.....	32
2.3.1. Cargado de fármacos en nanohidrogeles.....	33
2.3.2. Liberación y liberación controlada de fármacos.....	37
2.3.2.1. Mecanismo de liberación de fármacos de los nanohidrogeles.....	39
<b>III. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>41</b>
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>43</b>
<b>V. OBJETIVOS.....</b>	<b>44</b>
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	44
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
<b>VI. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>45</b>
6.1. MATERIALES Y REACTIVOS.....	45
6.1.1. <i>Síntesis y caracterización de macroiniciador ATRP de PEG y MPEG</i> .....	45
6.1.2. <i>Síntesis de copolímeros en bloque anfífilos</i> .....	46
6.1.3. <i>Síntesis de nanohidrogeles termosensibles de PNIPAM y PEG/MPEG</i> .....	46
6.2. ANÁLISIS Y EQUIPOS.....	47
6.2.1. <i>Resonancia magnética nuclear de protón (<sup>1</sup>H-RMN)</i> .....	47
6.2.2. <i>Espectroscopía infrarroja (IR)</i> .....	47

6.2.3.	<i>Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)</i> .....	47
6.2.4.	<i>Espectroscopía de masas (MALDI-TOF)</i> .....	48
6.2.4.1.	Preparación de la muestra .....	49
6.2.4.2.	Análisis de datos .....	49
6.2.4.3.	Cálculo de $M_n$ , $M_w$ , y $\bar{D}$ con MALDI-TOF MS .....	49
6.2.5.	<i>Dispersión de luz dinámica (DLS)</i> .....	49
6.2.6.	<i>Microscopía electrónica de transmisión (TEM)</i> .....	50
6.2.7.	<i>Viscosidad aparente</i> .....	50
6.3.	SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MACROINICIADORES ATRP .....	51
6.3.1.	<i>Síntesis de macroiniciadores ATRP de poli(etilenglicol) y <math>\alpha</math>-metil poli(etilenglicol)</i> .....	51
6.3.2.	<i>Caracterización de macroiniciadores ATRP de poli(etilenglicol) y <math>\alpha</math>-metil poli(etilenglicol)</i> . 51	
6.4.	SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE COPOLÍMEROS EN BLOQUE ANFÍFILOS MEDIANTE ATRP-AGET EN SOLUCIÓN ACUOSA HOMOGÉNEA .....	51
6.5.	SÍNTESIS DE NANOHIJOS TERMOSENSIBLES DE PNIPAM Y PEG/MPEG MEDIANTE ATRP-AGET EN SOLUCIÓN ACUOSA.....	53
<b>VII.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>56</b>
7.1.	SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MACROINICIADORES DE PEG Y MPEG .....	56
7.1.1.	<i>Caracterización de poli(glicoles) de PEG y MPEG</i> .....	56
7.1.2.	<i>Síntesis de macroiniciadores ATRP de PEG y MPEG</i> .....	58
7.1.2.1.	Caracterización espectroscópica de los macroiniciadores ATRP sintetizados .....	59
7.1.2.2.	Análisis de la distribución de masa molar .....	62
7.1.2.3.	Análisis MALDI-TOF de macroiniciadores monofuncionales y bifuncionales .....	63
7.2.	SÍNTESIS DE COPOLÍMEROS DIBLOQUE Y TRIBLOQUE MEDIANTE ATRP-AGET EN MEDIO ACUOSO 76	
7.2.1.	<i>Efecto del tipo de complejo de Cu utilizado</i> .....	83
7.2.2.	<i>Respuesta a la temperatura de los copolímeros dibloque y tribloque</i> .....	85
7.2.3.	<i>Tamaño de partícula</i> .....	92
7.2.4.	<i>Estabilidad de las dispersiones</i> .....	94
7.2.5.	<i>Morfología</i> .....	97
7.3.	SÍNTESIS DE NANOHIJOS .....	99
7.3.1.	<i>Efecto del contenido de MBA y tamaño de cadena de bloque hidrófilo en la temperatura de transición de fase en volumen y diámetro promedio de nanohijos</i> .....	106
7.3.2.	<i>Estudio reológico</i> .....	117
7.3.3.	<i>Morfología</i> .....	122
<b>VIII.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>125</b>
<b>IX.</b>	<b>PERSPECTIVAS A FUTURO</b> .....	<b>127</b>
<b>X.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>128</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> Propiedades de los nanohidrogeles para su uso como sistemas de liberación controlada de fármacos [9].	5
<b>Figura 2.2.</b> Diagrama de fases de una mezcla binaria que presenta LCST y punto de turbidez ( $T_{CP}$ ) [47].	7
<b>Figura 2.3.</b> Transición de cadena extendida hacia glóbulo colapsado de un polímero termosensible en solución acuosa [47].	8
<b>Figura 2.4.</b> Esquema de transición de fase en volumen de nanohidrogeles termosensibles y liberación de moléculas alojadas en su interior.	8
<b>Figura 2.5.</b> Grupos hidrófilos (C=O, N-H) e hidrófobos (-CH <sub>3</sub> ) de la poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) encargados de su carácter termosensible.	10
<b>Figura 2.6.</b> Polimerización típica para la obtención de nanohidrogeles.	11
<b>Figura 2.7.</b> Esquema de la síntesis de los nanohidrogeles basados en PNIPAM y estabilizados con enlaces covalentes de PEGMA (A) y nanohidrogeles con diferente longitud de cadena y densidades de recubrimiento (B) [63].	13
<b>Figura 2.8.</b> Síntesis de microgeles de NIPAM, PEGMA-OH y MBA como agente entrecruzante utilizando polimerización por precipitación libre de tensoactivo [64].	14
<b>Figura 2.9.</b> Mecanismo PISA basado en una polimerización en dispersión acuosa [77].	18
<b>Figura 2.10.</b> Mecanismo general de la polimerización radicalica por transferencia de átomo (ATRP) para la preparación de copolímeros en bloque anfífilos.	24
<b>Figura 2.11.</b> Ligandos comúnmente utilizados en ATRP con cobre (Cu) como catalizador.	25
<b>Figura 2.12.</b> Microgeles zwitteriónicos obtenidos mediante polimerización en dispersión isopropanol/H <sub>2</sub> O basada en ATRP.	27
<b>Figura 2.13.</b> Nanomateriales obtenidos mediante ATRP-ICAR-PISA [90].	29
<b>Figura 2.14.</b> Mecanismo ATRP-AGET para la preparación de copolímeros en bloque.	31
<b>Figura 2.15.</b> A) Nanohidrogel sensible al pH basado en H40-PCL y (PEG-(PVP) <sub>2</sub> ) y mecanismo de liberación PXT a pH=5.0 por el hinchamiento de las redes del nanohidrogel y B) tamaño de partícula ( $D_p$ ) evaluado a pH=7.4 y 5.0, respectivamente [57].	36
<b>Figura 2.16.</b> Liberación <i>in vivo</i> de fármacos cargados en nanohidrogeles.	38
<b>Figura 2.17.</b> Modelos de liberación de fármacos de nanohidrogeles funcionales.	40
<b>Figura 7.1.</b> Espectro de MALDI-TOF MS obtenido en modo reflectrón de PEG ( <b>1a</b> ) y MPEG ( <b>1e</b> ) en DCTB como matriz y NaTFA como un agente iónico en THF.	58
<b>Figura 7.2.</b> Proceso de esterificación de PEG y MPEG con bromuro de 2-bromoisobutirilo para la obtención de macroiniciadores ATRP.	58
<b>Figura 7.3.</b> Espectro FT-IR (2500-1110 cm <sup>-1</sup> ) de los ésteres ( <b>2a-f</b> ) de 2-bromo-2-metilpropanoato derivados de PEG y MPEG, respectivamente.	60
<b>Figura 7.4.</b> Espectro de <sup>1</sup> H RMN (500 MHz) de macroiniciador bifuncional <b>2a</b> en CDCl <sub>3</sub> .	61
<b>Figura 7.5.</b> Espectro de <sup>1</sup> H RMN (500 MHz) del macroiniciador monofuncional <b>2e</b> en CDCl <sub>3</sub> .	61

<b>Figura 7.6.</b> Distribución de masa molar los ésteres de 2-bromo-2-metilpropanoato ( <b>2a-f</b> ) derivados de poli(oxialquilenos).....	62
<b>Figura 7.7.</b> Distribución de masa molar del éster de PEG $DP=41$ ( <b>2a</b> ) obtenido por MALDI en modo reflectrón, utilizando DCTB como matriz y (a) AgTFA, (b) NaTFA como agentes cationizantes y (c) sin agente cationizante.....	64
<b>Figura 7.8.</b> Distribución de masa molar del éster MPEG $DP=44$ ( <b>2e</b> ) obtenido por MALDI en modo reflectrón, utilizando DCTB como matriz y (a) AgTFA, (b) NaTFA como agentes cationizantes y (c) sin agente cationizante.....	64
<b>Figura 7.9.</b> Distribución de masa molar de PEG bis(2-bromo-2-metilpropanoato) $DP=41$ ( <b>2a</b> ) obtenido por MALDI en modo reflectrón con AgTFA como agente catiónico. ....	66
<b>Figura 7.10.</b> Compuestos identificados en el análisis MALDI de PEG bis (2-bromo-2-metilpropanoato). ....	66
<b>Figura 7.11.</b> Mecanismo propuesto para polímeros funcionalizados al final de la cadena con 2-bromo-2-metilpropanoato durante el análisis MALDI-TOF utilizando $Ag^+$ y $Na^+$ como agentes catiónicos. ....	67
<b>Figura 7.12.</b> Influencia del AgTFA en la estabilidad del éster <b>2d</b> obtenido por espectroscopía de $^1H$ RMN en metanol deuterado. ....	69
<b>Figure 7.13.</b> Espectros MALDI-TOF del éster bromado <b>2a</b> utilizando AgTFS/ <b>2a</b> /DCTB con una relación molar de 310/1/18 empleando metanol como disolvente y obtenido en modo reflectrón. ....	70
<b>Figura 7.14.</b> Espectros MALDI-TOF del éster bromado <b>2a</b> utilizando NaTFA/ <b>2a</b> /DCTB con una relación molar de 310/1/18, metanol como disolvente y obtenido en modo reflectrón.....	73
<b>Figura 7.15.</b> Espectros MALDI-TOF del éster bromado <b>2e</b> utilizando NaTFA/ <b>2e</b> /DCTB con una relación molar de 310/1/18, metanol como disolvente y obtenido en modo reflectrón.....	73
<b>Figura 7.16.</b> Compuestos identificados en el análisis MALDI de bis(2-bromo-2-metilpropanoato) de PEG y MPEG con NaTFA/DCTB en metanol. ....	74
<b>Figura 7.17.</b> Espectros MALDI-TOF del éster dibromado <b>2a</b> utilizando NaTFA/ <b>2a</b> /DCTB con una relación molar de 310/1/18 y THF como disolvente, obtenido en modo reflectrón.....	75
<b>Figura 7.18.</b> Espectros MALDI-TOF del éster bromado <b>2e</b> utilizando NaTFA/ <b>2e</b> /DCTB con una relación molar de 310/1/18 y THF como disolvente, obtenido en modo reflectrón.....	76
<b>Figura 7.19.</b> Esquema de síntesis de copolímeros (A) dibloque y (B) tribloque mediante ATRP-AGET en medio acuoso utilizando PMDETA como ligando alifático tridentado y temperaturas de 70 y 50°C, respectivamente. ....	77
<b>Figura 7.20.</b> Esquema de síntesis de copolímeros (A) dibloque y (B) tribloque mediante ATRP-AGET en medio acuoso, utilizando HMTETA como ligando alifático tetradentado. ....	79
<b>Figura 7.21.</b> Espectro $^1H$ -RMN del copolímero tribloque PNIPAM <sub>44</sub> -PEG <sub>43</sub> -PNIPAM <sub>44</sub> en CDCl <sub>3</sub> .....	80
<b>Figura 7.22.</b> Espectros de $^1H$ -RMN del dibloque MPEG <sub>44</sub> -b-PNIPAM <sub>97</sub> en CDCl <sub>3</sub> .....	81
<b>Figura 7.23.</b> Distribución de pesos moleculares de las polymerizaciones <b>P1</b> , <b>P2</b> y <b>P4</b> realizadas por ATRP-AGET en medio acuoso utilizando CuBr <sub>2</sub> /HMTETA como complejo catalítico y conversiones de monómero entre 60.0 y 92.0 % de los copolímeros puros. ....	82
<b>Figura 7.24.</b> Espectros de IR de los copolímeros dibloque ( <b>P1-P3</b> ) y tribloque ( <b>P4-P6</b> ). ....	83

<b>Figura 7.25.</b> Espectros de $^1\text{H}$ RMN del copolímero dibloque MPEG <sub>15</sub> -PNIPAM <sub>116</sub> ( <b>P1</b> ) en D <sub>2</sub> O (20 mg/mL) en un intervalo de temperatura de 30-50°C.....	86
<b>Figura 7.26.</b> Fracción de PNIPAM colapsada en los copolímeros dibloque con el aumento de temperatura de 30-50°C, determinada a partir del seguimiento de la relación de integración del grupo (A) $-\text{CH}_2-\text{CH}-$ , ( $\delta=1.5-2.2$ ppm, 3H) de la cadena principal y de los grupos del isopropilo (B) $(-\text{CH}_3)_2$ , $\delta=3.3$ ppm, 6H). .....	88
<b>Figura 7.27.</b> Fracción de PNIPAM colapsada en los copolímeros tribloque con el aumento de temperatura de 30-50°C, determinada a partir del seguimiento de la relación de integración del grupo (A) $-\text{CH}_2-\text{CH}-$ , ( $\delta=1.5-2.2$ ppm, 3H) de la cadena principal y de los grupos colgantes del isopropilo (B) $(-\text{CH}_3)_2$ , $\delta=3.3$ ppm, 6H).....	90
<b>Figura 7.28.</b> Diámetro de partícula de los copolímeros dibloque ( $\phi_{\text{MPEG}}=0.07, 0.20$ y $0.43$ ) y tribloque ( $\phi_{\text{PEG}}=0.20, 0.30$ y $0.50$ ), con el aumento de la temperatura desde 20 a 50°C. ....	94
<b>Figura 7.29.</b> Estabilidad de los copolímeros (A) dibloque y (B) tribloque con diferentes fracciones volumen de MPEG y PEG al aumentar la temperatura desde 20 a 50°C después de 15 semanas de almacenamiento. ....	96
<b>Figura 7.30.</b> Micrografías de TEM del copolímero dibloque MPEG <sub>15</sub> -PNIPAM <sub>116</sub> ( <b>P1</b> ) con menor fracción volumen de MPEG ( $\phi_{\text{MPEG}}=0.07$ ) determinadas a 25°C (A) y 37°C (B). ....	97
<b>Figura 7.31.</b> Micrografía de TEM (A) e histograma (B) del copolímero dibloque MPEG <sub>44</sub> -b-PNIPAM <sub>125</sub> con fracción volumen de MPEG ( $\phi_{\text{MPEG}}$ ) de 0.20 evaluado a 25°C. ....	98
<b>Figura 7.32.</b> Micrografías de TEM de los copolímeros tribloque A) PNIPAM <sub>44</sub> -PEG <sub>43</sub> -PNIPAM <sub>44</sub> , B) PNIPAM <sub>42</sub> -PEG <sub>74</sub> -PNIPAM <sub>42</sub> y C) PNIPAM <sub>32</sub> -PEG <sub>131</sub> -PNIPAM <sub>22</sub> a 25°C.....	99
<b>Figura 7.33.</b> Esquema de síntesis de nanohidrogeles termosensibles mediante ATRP-AGET en solución acuosa homogénea, utilizando macroiniciadores ATRP a) monofuncionales MPEG <sub>n</sub> -Br y b) bifuncionales Br-PEG <sub>n</sub> -Br y diferentes concentraciones de agente entrecruzante (MBA). ....	101
<b>Figura 7.34.</b> Espectro de $^1\text{H}$ RMN del nanohidrogel <b>R4</b> [P(MPEG <sub>44</sub> )-b-pPNIPAM <sub>105</sub> -co-MBA <sub>0.17</sub> ] en CDCl <sub>3</sub> . ....	103
<b>Figura 7.35.</b> Espectro de $^1\text{H}$ RMN del nanohidrogel <b>R12</b> [P(NIPAM <sub>49</sub> -co-MBA <sub>0.075</sub> )-b-PEG <sub>43</sub> -b-P(NIPAM <sub>49</sub> -co-MBA <sub>0.075</sub> )] en CDCl <sub>3</sub> . ....	105
<b>Figura 7.36.</b> Conversión determinada por $^1\text{H}$ RMN de los nanohidrogeles ( <b>R1-R21</b> ) dependiente del porcentaje molar de N, N'-metilenbisacrilamida (MBA), después de 24 horas de reacción. ....	106
<b>Figura 7.37.</b> Diámetro promedio en nm evaluado de 20 a 50°C de los nanohidrogeles preparados con cadenas hidrófilas de MPEG con $DP=44$ y 117 y concentración de MBA de 0.00-0.15% molar.....	107
<b>Figura 7.38.</b> Distribución de diámetro de promedio evaluado a 35°C (VPTT) en los nanohidrogeles preparados con cadenas hidrófilas de MPEG con $DP=44$ y concentraciones de MBA de 0.00-0.15% molar. ....	109
<b>Figura 7.39.</b> Diámetro promedio en nm evaluado de 30 a 50°C de los nanohidrogeles preparados con cadenas hidrófilas de PEG con $DP=43, 74$ y 131 y concentración de MBA de 0.00-0.17% molar. ....	110
<b>Figura 7.40.</b> Diámetros promedio obtenidos por DLS de los nanohidrogeles preparados con los macroiniciadores de a) MPEG <sub>44</sub> y b) PEG <sub>43</sub> con diferente grado de entrecruzamiento (MBA=0.00-0.15%	

molar) en un rango de temperatura de 20-55°C y c) dispersión de nanohidrogeles de MPEG <sub>44</sub> y d) PEG <sub>43</sub> después de 10 días almacenamiento.....	112
<b>Figura 7.41.</b> Espectros de <sup>1</sup> H RMN del nanohidrogel <b>R3</b> [MPEG <sub>44</sub> -P(NIPAM <sub>98</sub> -co-MBA <sub>0.15</sub> )] obtenidos a 25°C y 50°C en D <sub>2</sub> O.....	114
<b>Figura 7.42.</b> Espectros de <sup>1</sup> H RMN del nanohidrogel <b>R12</b> [P(NIPAM <sub>49</sub> -co-MBA <sub>0.075</sub> )-b-PEG <sub>43</sub> -b-P(NIPAM <sub>49</sub> -co-MBA <sub>0.075</sub> )] a 25°C y 50°C en D <sub>2</sub> O. ....	115
<b>Figura 7.43.</b> Fracción de PNIPAM ( $f_{\text{NIPAM}}$ ) dependiente de la temperatura (25-50°C) de los copolímeros sin entrecruzar ( <b>R0-A</b> y <b>R0-C</b> ) y de los nanohidrogeles con 0.15% mol de MBA obtenidos con macroiniciadores de a) MPEG, $DP=44$ ( <b>R3</b> ) y b) PEG, $DP=43$ ( <b>R12</b> ) esta fracción fue determinada a partir del seguimiento de la relación de integración del grupo $-\text{CH}_2-\text{CH}-$ , ( $\delta=1.5-2.2$ ppm, <b>3H</b> ) de la cadena principal de NIPAM. ....	116
<b>Figura 7.44.</b> Viscosidad aparente ( $\eta$ ) en función de la velocidad de corte ( $\dot{\gamma}$ ) de nanohidrogeles sintetizados a partir del macroiniciador MPEG, $DP=117$ y diferentes concentraciones molares de MBA. ....	118
<b>Figura 7.45.</b> Viscosidad aparente ( $\eta$ ) en función de la velocidad de corte ( $\dot{\gamma}$ ) evaluada a diferentes temperaturas (20-45°C) de nanohidrogeles de MPEG, $DP=44$ con una concentración de 5% p/v y con diferentes concentraciones molares de agente entrecruzante (MBA).....	120
<b>Figura 7.46.</b> Viscosidad aparente ( $\eta$ ) en función de la velocidad de corte ( $\dot{\gamma}$ ) evaluada a diferentes temperaturas (25-50°C) y a una concentración de 15% p/v, del a) copolímero sin entrecruzar y b) entrecruzado con 0.15 % molar de MBA obtenidos del macroiniciador MPEG, $DP=44$ . ....	121
<b>Figura 7.47.</b> Micrograffas de TEM del nanohidrogel <b>R4</b> de MPEG <sub>44</sub> -P(NIPAM <sub>105</sub> -co-MBA <sub>0.17</sub> ) a) 25°C, b) 50°C y c) $D_p$ obtenido por DLS a 25 y 50°C, respectivamente. ....	122
<b>Figura 7.48.</b> Micrograffas de TEM del nanohidrogel <b>R13</b> P(NIPAM <sub>49</sub> -co-MBA <sub>0.085</sub> )-b-PEG <sub>43</sub> -b-P(NIPAM <sub>49</sub> -co-MBA <sub>0.085</sub> ) a) 25°C, b) 50°C y c) $D_p$ obtenido por DLS a 25 y 50°C respectivamente. .	124

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 2.1.</b> Autoensamblaje post-polimerización de copolímeros en bloque.....	16
<b>Tabla 2.2.</b> Resumen de nanomateriales obtenidos por RAFT-PISA y las principales aportaciones.....	22
<b>Tabla 6.1.</b> Composición de soluciones acuosas empleadas en las polimerizaciones ATRP-AGET para la síntesis copolímeros dibloque ( <b>P1-P3</b> ) y tribloque ( <b>P4-P6</b> ).....	53
<b>Tabla 6.2.</b> Componentes de las reacciones <b>R1-R21</b> para la preparación de nanohidrogeles termosensibles de poli(N-isopropilacrilamida) y poli(etilenglicol)/ $\alpha$ -metil éter.....	54
<b>Tabla 7.1.</b> Caracterización de masas molares de los poli(glicoles) PEG y MPEG por MALDI-TOF MS, RMN y SEC en THF antes de la esterificación con bromuro de 2-bromoisobutirilo.....	57
<b>Tabla 7.2.</b> Esterificación de poli(glicoles) con bromuro de 2-bromo-2-metilpropanoil en $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .....	59
<b>Tabla 7.3.</b> Análisis MALDI-TOF MS de ésteres bromados <b>2a-f</b> utilizando DCTB/ $\text{AgCF}_3\text{COO}$ y MeOH como disolvente.....	67
<b>Tabla 7.4.</b> Análisis MALDI-TOF MS de ésteres bromados <b>2a-f</b> con DCTB/ $\text{AgCF}_3\text{SO}_3$ y MeOH como disolvente.....	71
<b>Tabla 7.5.</b> Análisis MALDI-TOF-MS de ésteres bromados <b>2a-f</b> en DCTB/NaTFA y MeOH como disolvente.....	74
<b>Tabla 7.6.</b> Conversión y pesos moleculares de los copolímeros obtenidos por ATRP-AGET en medio acuoso, utilizado diferentes longitudes de cadena de bloque hidrófilo y $\text{CuBr}_2/\text{HMTETA}$ como como complejo catalítico.....	81
<b>Tabla 7.7.</b> Composición, conversión y pesos moleculares de los copolímeros obtenidos por ATRP-AGET en medio acuoso, utilizado diferentes longitudes de cadena de bloque hidrófilo y $\text{CuCl}_2/\text{HMTETA}$ como como complejo catalítico.....	85
<b>Tabla 7.8.</b> LCST y temperatura de turbidez (TCP) para la transición térmica de copolímeros MPEG-b-PNIPAM y el homopolímero de PNIPAM.....	89
<b>Tabla 7.9.</b> Valores de LCST y temperatura de turbidez ( $T_{CP}$ ) para la transición térmica de copolímeros $\text{PNIPAM}_m\text{-b-PEG}_n\text{-b-PNIPAM}_m$ .....	91
<b>Tabla 7.10.</b> Diámetro promedio de partícula ( $D_p$ ) obtenidos por DLS a temperaturas de 20 a 50°C para los copolímeros dibloque y tribloque con diferente fracción volumen de MPEG y PEG en dispersión acuosa. .	93
<b>Tabla 7.11.</b> Conversión, composición química y pesos moleculares de los nanohidrogeles obtenidos por ATRP-AGET en medio acuoso, utilizado diferente porcentaje molar de MBA y longitud de bloque hidrófilo de macroiniciadores monofuncionales de MPEG.....	102
<b>Tabla 7.12.</b> Conversión, composición química y pesos moleculares de los nanohidrogeles obtenidos por ATRP-AGET en medio acuoso, utilizado diferente % molar de MBA y longitud de bloque hidrófilo de macroiniciadores bifuncionales de PEG.....	104
<b>Tabla 7.13.</b> Temperatura de transición de fase en volumen (VPTT) y diámetro promedio de los nanohidrogeles sintetizados con diferente concentración molar de agente de entrecruzamiento, longitud de y naturaleza de bloque hidrófilo.....	111

## RESUMEN

Este proyecto de investigación se centró en el diseño de nanohidrogeles funcionales a partir de copolímeros en bloque anfífilos de poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) como bloque termosensible, poli(etilenglicol) (PEG<sub>n</sub>)/poli(etilenglicol)  $\alpha$ -metil éter (MPEG<sub>n</sub>) como bloque hidrófilo y biocompatible y N,N'-metilenbisacrilamida (MBA) como agente de entrecruzamiento. Debido a que todos los componentes son solubles en medio acuoso y a que los nanohidrogeles se destinarán hacia aplicaciones biomédicas, se seleccionó la técnica ATRP-AGET en solución acuosa homogénea para la síntesis de los nanomateriales.

En la primera etapa se sintetizaron ésteres de 2-bromo-2-metilpropanoato con altos rendimientos ( $\geq 93.0\%$ ) a partir de polímeros de poli(oxialquileno). El halógeno adicionado al final de la cadena se caracterizó detalladamente por MALDI-TOF MS y se determinó el peso molecular promedio ( $M_n$  MALDI) exacto de los polímeros cuando se utilizó una sal de sodio como agente cationizante. Estos materiales se utilizaron como macroiniciadores en las reacciones ATRP-AGET en agua.

Para lograr el control de la cinética involucrada en la técnica ATRP-AGET con el sistema estudiado, se evaluó el efecto de dos sales de cobre (CuBr<sub>2</sub> y CuCl<sub>2</sub>). La correcta selección de bases nitrogenadas y condiciones de reacción permitió obtener copolímeros dibloque y tribloque con fracciones volumen de MPEG o PEG ( $\phi_{\text{MPEG}}$  o  $\phi_{\text{PEG}}$ ) entre 0.1 y 0.5 y dispersidades  $\leq 1.3$ . Se evaluó el comportamiento de estos materiales al aumentar la temperatura (20 a 50°C) utilizando <sup>1</sup>H-RMN y DLS. Se determinó el diámetro de partícula promedio ( $D_p$ ) y se corroboró la formación de agregados micelares por encima de su LCST, la temperatura de formación de los agregados y diámetro está determinada por la composición del copolímero (balance hidrófilo-lipófilo).

Para lograr el entrecruzamiento de los materiales se agregó en el sistema N,N'-metilenbisacrilamida (MBA). Se evaluó sistemáticamente el efecto de la concentración molar (% molar) de MBA y el tamaño de la cadena del bloque hidrófilo de MPEG ( $DP=44$  y  $117$ ) y PEG ( $DP=43$ ,  $74$  y  $131$ ) sobre la composición química,  $D_p$ , temperatura de transición de fase en volumen (VPTT), viscosidad aparente y morfología.

## I. INTRODUCCIÓN

Los nanohidrogeles son materiales que presentan una restringida solubilidad en agua, tienen tamaños que oscilan entre 50-500 nm y una estructura tridimensional integrada por macromoléculas entrelazadas de manera química o física; son obtenidos a partir de monómeros que contienen grupos hidrófilos y presentan propiedades similares a muchos tejidos biológicos, tales como: permeabilidad, consistencia blanda y flexibilidad [1][2]. Estas características particulares permiten que sean candidatos idóneos para aplicaciones biomédicas [3], principalmente como sistemas de liberación controlada de fármacos [4]–[6]. Su interés reside principalmente en las ventajas específicas de los nanohidrogeles, entre estas: atravesar diferentes barreras biológicas, mayor selectividad y tiempo de permanencia en la sangre y protección contra la degradación enzimática. Además, en su interior se pueden encapsular una gran variedad de fármacos y pueden ser diseñados como materiales biodegradables y/o biocompatibles, con tamaños, morfologías, dispersidad y composición química controladas y con respuesta a estímulos externos (nanohidrogeles funcionales) [7]–[9].

Para su diseño se han utilizado copolímeros en bloque anfífilos que pueden autoensamblarse en diferentes morfologías (micelas, gusanos o vesículas) utilizando un disolvente selectivo para una de las fases o al cambiar parámetros como: pH, potencial eléctrico, campo magnético o temperatura [10][11]. De entre los materiales sensibles a estímulos externos, los termosensibles han sido de los más estudiados debido a que en solución acuosa presentan un cambio de fase al aumentar o disminuir la temperatura. Esta transición o separación de fases ocurre por cambios en la entropía de la solución, por debajo de cierta temperatura los copolímeros son solubles en el disolvente y por encima de la temperatura crítica más baja de la solución (LCST), el bloque termosensible disminuye su solubilidad y ocurre una separación de fases [12]–[14].

La poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) es uno de los polímeros termosensibles que más se ha estudiado, esto se debe a que en agua su homopolímero tiene una LCST de

aproximadamente 32°C [15] y este valor se puede modular mediante la copolimerización con otros monómeros hasta temperaturas que permitan su aplicación en áreas biomédicas (34-40°C) [16]. El etilenglicol se ha utilizado comúnmente como bloque hidrófilo en la copolimerización con NIPAM, debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y resistencia tanto a la adsorción de proteínas como a la adhesión celular, esto último le permite permanecer más tiempo en circulación dentro del organismo [17] [18].

Para la síntesis de los copolímeros en bloque anfífilos precursores de estos nanohidrogeles, se han utilizado técnicas de desactivación reversible (RDRP, por sus siglas en inglés), estas técnicas permiten desarrollar procesos químicos que requieren condiciones de reacción amigables con el medio ambiente (sustentables), como es el caso de los materiales destinados a aplicaciones biomédicas [19][20]. En estos sistemas de polimerización, los copolímeros en bloque anfífilos actúan como estabilizadores eliminando así el uso de agentes tensoactivos [21].

La técnica de polimerización radicalica controlada ATRP (*Atom Transfer Radical Polymerization*), es una técnica RDRP que permite obtener un control eficiente sobre el peso molecular y una distribución de pesos moleculares estrecha ( $\bar{M}_w/\bar{M}_n < 1.5$ ) [22]. Además, incluye la posibilidad de llevar a cabo las polimerizaciones a bajas temperaturas y fácil funcionalización del grupo final [23] [24]. Sin embargo, se ha observado que la ATRP utilizando un medio acuoso es rápida y produce polímeros con dispersidades amplias, indicando una pérdida del control, esto es ocasionado por reacciones secundarias involucradas en su equilibrio dinámico [25]–[29]. Aunado a lo anterior, en la literatura se establece que las poliacrilamidas (como el NIPAM) son más difíciles de sintetizar mediante ATRP en agua. En 2003, se reportó un sistema ATRP en medio acuoso para la síntesis de poliacrilamidas a altas temperaturas (130°C), los resultados proporcionaron deficiente control de las polimerizaciones con dispersidades  $\geq 1.6$  y además de un bajo peso molecular [30]. En un estudio posterior, se demostró que el uso de N,N',N'',N'''-pentametildietilentríamina (PMDETA) como ligando permite obtener dispersidades de hasta 1.24, pero conversiones muy bajas (9% en 48 horas), la polimerización se realizó a 90°C

[31]. También se reportó la síntesis de copolímeros derivados de NIPAM a 25°C por 22 horas, se obtuvieron dispersidades de 1.48 y conversiones de 5% [32].

Una opción para la síntesis de copolímeros en bloque anfífilos que contengan en su estructura bloques de NIPAM y que además se lleve a cabo en medio acuoso, es la técnica ATRP-ARGET/AGET (*Activator ReGenerated by Electron Transfer/Activators are Generated by Electron Transfer*), en ese tipo de polimerizaciones se emplea una sal de cobre en su estado de oxidación más alto y un agente reductor, por lo que la reacción puede llevarse a cabo en presencia de trazas de oxígeno. Ejemplo de esto, es la preparación de copolímeros de poli(oligo(etilenglicol) metil éter metacrilato (POEOMA) y poli(oligo(etilenglicol) metil éter acrilato (POEOA) por ATRP-ARGET en solución acuosa homogénea a temperatura ambiente, utilizando tris[(2-piridil)-metil amina] (TPMA) y bromuro de cobre II ( $\text{CuBr}_2=100\text{-}300$  ppm) como catalizador y ácido ascórbico como agente reductor alimentado de manera lenta y continua. Bajo estas condiciones se obtuvieron copolímeros de hasta 121.7 kDa con 80% de conversión y dispersidades entre 1.23-1.66 [20]. También se ha reportado la polimerización ATRP-SARA de NIPAM en medio acuoso utilizando macroiniciadores de PEG y  $[\text{CuBr}]/[\text{CuBr}_2]/[\text{Me}_6\text{TREN}]$  0.1/0.9/1.0 como sistema catalítico. Se obtuvieron conversiones de 86% después de 2 horas de reacción y dispersidades de 1.18 [33].

El objetivo del presente trabajo fue sintetizar mediante la técnica ATRP-AGET en solución acuosa homogénea, nanohidrogeles conformados de bloques hidrófilos y biocompatibles de MPEG y PEG con diferente longitud de cadena y esterificados con bromuro de 2-bromoisobitirilo, NIPAM como monómero termosensible y N,N'-metilenbisacrilamida (MBA) como agente entrecruzante. Se evaluó el efecto del halógeno en la sal de cobre (II) ( $\text{CuBr}_2$  o  $\text{CuCl}_2$ ) del complejo catalítico sobre el control de la polimerización. También se evaluó el efecto de la composición de los materiales en la respuesta de la LCST al aumentar progresivamente la temperatura desde 20 a 50°C, la concentración molar (% molar) de MBA y el tamaño de cadena de MPEG ( $DP=44$  y 117) y PEG ( $DP=43$ , 74 y 131) sobre la composición química, diámetro promedio ( $D_p$ ), temperatura de transición de fase en volumen (VPTT), viscosidad aparente y morfología de los nanomateriales obtenidos.

## II. ANTECEDENTES

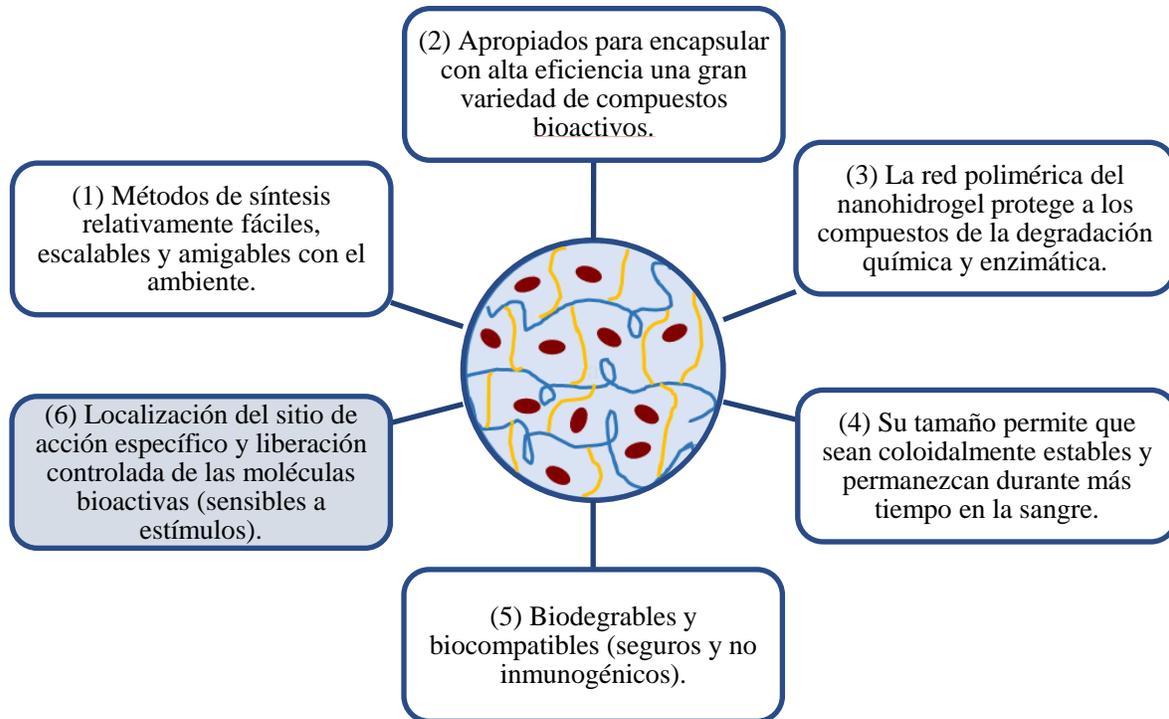
### 2.1. NANOHIIDROGELES

Los nanohidrogeles son partículas coloidales que tienen diámetros en el intervalo de 1-500 nm y una estructura tridimensional integrada por macromoléculas entrelazadas de manera química o física [34]. Un requerimiento estructural de estos materiales es que deben contener segmentos hidrófilos o anfífilos capaces de interactuar con el agua [35][36], proporcionándoles la capacidad de absorber grandes cantidades de este fluido y en consecuencia un aumento considerable en su volumen sin perder su estructura [37][38].

La hidrofilia es atribuida a la presencia de grupos funcionales:  $-\text{OH}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CONH}$  y  $-\text{SO}_3\text{H}$  [39]. La particularidad de absorber agua proporciona a los nanohidrogeles propiedades similares a muchos tejidos biológicos como permeabilidad, consistencia blanda y flexibilidad [1][2], convirtiéndolos en candidatos idóneos para aplicaciones biomédicas, principalmente en sistemas de diagnóstico clínico (sensores) [40][41], sistemas teragnósticos (sistemas de liberación controlada de fármacos guiados por imágenes) [42] y sistemas de liberación controlada de fármacos [4]–[6].

El interés sobre el uso de nanohidrogeles específicamente como agentes de liberación controlada de fármacos, reside principalmente en las ventajas específicas que estos nanomateriales proveen, tanto al momento de la preparación como de la aplicación. Por ejemplo, se pueden obtener mediante métodos de síntesis donde el disolvente utilizado es eliminado completamente del sistema, o bien, está aprobado por la normativa para su uso en sistemas biomédicos; además, mediante el control del balance hidrófilo-lipófilo se pueden encapsular en su interior diferentes compuestos bioactivos con alta efectividad y la red polimérica se encargará de protegerlos de la degradación química y enzimática; su tamaño nanométrico (50-500 nm) permite que tengan buena estabilidad coloidal y, por lo tanto, mayor tiempo de permanencia en la sangre. Se pueden diseñar como materiales biodegradables y biocompatibles y con respuesta a estímulos específicos (nanohidrogeles funcionales), esta última característica es de las más importantes cuando son usados como

sistemas de liberación controlada de fármacos [7]–[9]. En la **Figura 2.1** se muestra un resumen de lo antes descrito.



**Figura 2.1.** Propiedades de los nanohidrogeles para su uso como sistemas de liberación controlada de fármacos [9].

### 2.1.1. Nanohidrogeles funcionales

Los nanohidrogeles sensibles a estímulos (físicos, químicos o bioquímicos) han sido considerados como vehículos atractivos para la liberación controlada de fármacos, esto se debe a que pueden mantener su estabilidad mientras circulan por el cuerpo y cuando llegan al sitio de acción específico, el fármaco se libera en respuesta al estímulo apropiado [43]. Una de las particularidades más importantes es que los estímulos se pueden presentar dentro del cuerpo (endógenos), por ejemplo: presencia de antígenos, concentración de alguna enzima específica, cambios en las condiciones de oxidación-reducción, pH o temperatura. O bien, el estímulo puede ser aplicado de forma externa (exógenos), como: luz, presión y campo eléctrico o magnético.

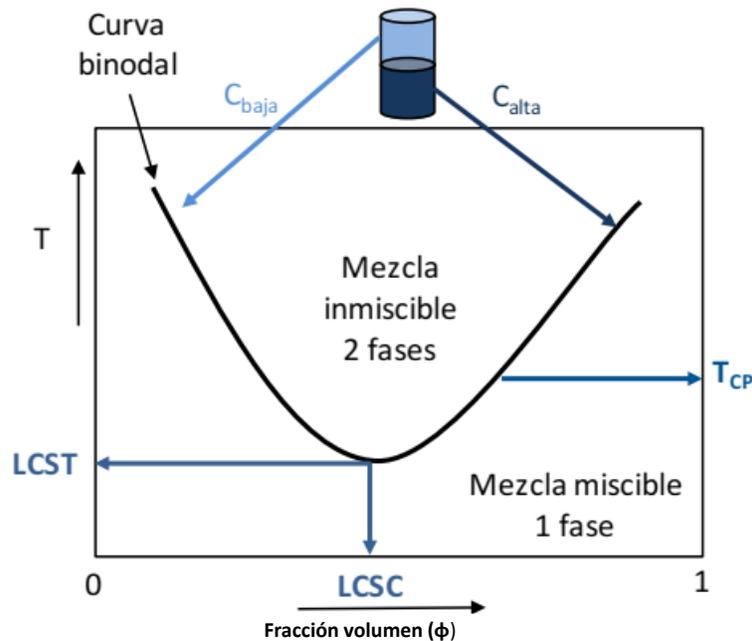
Las investigaciones sobre este tópico han sido dirigidas hacia la síntesis de nanohidrogeles con características controladas entre estas: tamaño, carga, porosidad, polaridad, suavidad y/o degradabilidad, moduladas por estímulos externos y con alta dependencia de la composición química [44]. Entre los diversos estímulos aplicables, la temperatura es la propiedad más explotada en el campo de los llamados “materiales inteligentes”, esto se debe a que la temperatura es uno de los factores más importantes en el cuerpo, permite su aplicación de manera no invasiva y el comportamiento que origina por lo regular es completamente reversible [45][46].

#### *2.1.1.1. Nanohidrogeles sensibles a la temperatura*

La razón por la que los polímeros termosensibles se consideran "materiales inteligentes" atractivos, es el hecho de beneficiarse de su hidrofilia al variar la temperatura. Tomando como referencia el diagrama de fases de la **Figura 2.2**, este comportamiento se debe a una brecha de miscibilidad en la mezcla binaria de polímero/disolvente, acompañada de una separación de fases, si el aumento de la temperatura conduce a la formación de dos fases líquidas inmiscibles con diferentes concentraciones de polímero, la mezcla presenta un fenómeno único e interesante denominado temperatura crítica más baja de la solución (LCST, por sus siglas en inglés) [47]. Cada punto entre la fase miscible e inmiscible se determina de acuerdo con variables de temperatura y concentración de la solución y se denomina punto de turbidez ( $T_{CP}$ ). Por lo tanto, el  $T_{CP}$  es la temperatura a la que se produce la transición de fase del estado soluble al estado agregado o colapsado en una solución de polímero a una concentración específica y puede estar localizada en cualquier posición de la curva binodal, este cambio se observa cualitativamente como un aspecto turbio en la solución. Un error común es el uso indistinto de los términos de LCST y  $T_{CP}$  lo cual por definición es incorrecto, ya que la LCST es el valor de temperatura más bajo que presenta el punto de turbidez en el diagrama de fases también mostrado en la **Figura 2.2** [48].

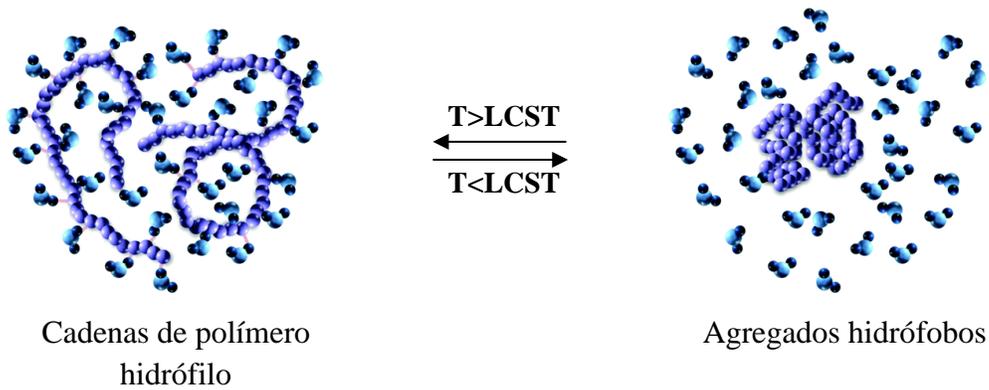
El mecanismo responsable de la termosensibilidad es el alcance de las interacciones moleculares y depende del cambio de energía libre del disolvente. Por debajo de la LCST, las cadenas de polímero son solubles por la formación de puentes de hidrógeno con las

moléculas de agua, dando lugar a un sistema monofásico; pero por encima de este valor, los puentes de hidrógeno se debilitan y debido a la hidrofobia de los grupos, las moléculas de agua comienzan a desprenderse, con una consiguiente separación de fases y esto se observa como agregados hidrófobos (**Figura 2.3**). El valor de LCST depende principalmente de la naturaleza química del monómero, concentración de polímero en la solución y del balance de los grupos hidrófilos/hidrófobos en la estructura de la molécula [49].



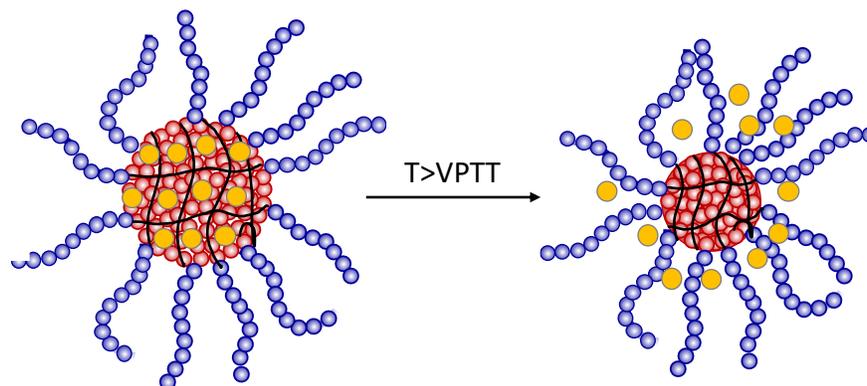
**Figura 2.2.** Diagrama de fases de una mezcla binaria que presenta LCST y punto de turbidez ( $T_{CP}$ ) [47].

El principio anterior se ha aplicado en el diseño de nanohidrogeles termosensibles usados como sistemas de liberación controlada de fármacos. Para desencadenar la liberación del fármaco se requiere un cambio de temperatura local en el sitio de acción deseado, en aplicaciones sistémicas se presenta una elevación de la temperatura corporal normal ( $37^{\circ}\text{C}$ ), por ejemplo, debido a una inflamación o infección [50]. Esta respuesta fisiológica se utiliza como un estímulo útil capaz de modular la administración de medicamentos terapéuticos para enfermedades que provoquen el incremento de la temperatura corporal [51].



**Figura 2.3.** Transición de cadena extendida hacia glóbulo colapsado de un polímero termosensible en solución acuosa [47].

Para sistemas entrecruzados (nanohidrogeles), el valor de temperatura en el cual se presenta un cambio en la red interna, se denomina temperatura de transición de fase en volumen (VPTT, por sus siglas en inglés) [12][52]. Por debajo de la VPTT, las redes tridimensionales del nanohidrogel se encuentran hinchadas debido a su carácter hidrófilo, pero por encima de este valor, las cadenas de polímero presentan una separación de fases, es decir, cambian su conformación de ovillo extendido hacia glóbulo colapsado, ocasionando un encogimiento o contracción en su volumen. Esta transición de fase en volumen es rápida y reversible y se ha utilizado para alojar fármacos en su interior, que posteriormente pueden ser liberados junto con la expulsión de agua [53][54] (**Figura 2.4**).



**Figura 2.4.** Esquema de transición de fase en volumen de nanohidrogeles termosensibles y liberación de moléculas alojadas en su interior.

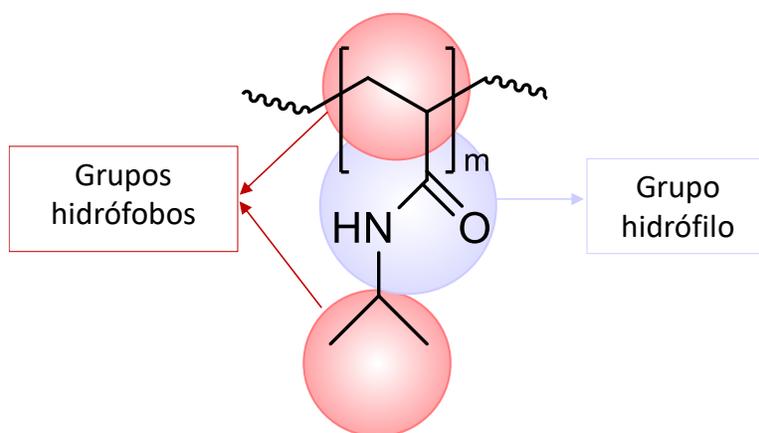
Por lo anterior, para utilizar nanohidrogeles termosensibles como sistemas de administración de fármacos, el valor de VPTT, así como el intervalo de temperatura en el que se produce la separación de la fase que se vuelve insoluble, son factores esenciales para evitar la eliminación prematura de la carga encapsulada. Los factores más importantes por considerar son las características del compuesto bioactivo a administrar, el diámetro y la densidad de entrecruzamiento del nanohidrogel. Estos factores deben controlarse para lograr una retención efectiva del bioactivo y liberación controlada dependiente de la temperatura. El valor del VPTT se puede obtener por dispersión de luz dinámica (DLS) midiendo el diámetro de los nanohidrogeles al calentar/enfriar la dispersión acuosa que los contiene [45].

### *Nanohidrogeles termosensibles de PNIPAM*

Como ya se mencionó anteriormente, los polímeros que presentan un comportamiento LCST en agua son de gran interés para el diseño de nanohidrogeles, debido a la oportunidad de beneficiarse de su alteración hidrófila tras la variación de la temperatura. Ejemplos típicos de polímeros que presentan esta propiedad están basados en monómeros como: 2-(dimetilamino)etil metacrilato (DMAEMA), N-vinil caprolactama (NVCL), N,N-dietilacrilamida (DEAM), metil 2-propenamidacrilato de etilo (MPA), olioligo(etilenglicol) (OEG), N-isopropilacrilamida (NIPAM), entre otros [12].

De todos los polímeros termosensibles, el más estudiado y ampliamente utilizado para la síntesis de nanohidrogeles funcionales es la poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM). Esto se debe principalmente a que en agua presenta una LCST muy cercana a la temperatura del cuerpo humano (32-34°C) [53]. Este polímero contiene grupos hidrófilos (C=O, N-H) e hidrófobos ( $-\text{CH}_3$ ), mostrados en la **Figura 2.5**, por debajo de su LCST presenta un carácter hidrófilo, pero a su LCST, o encima de ella, el puente de hidrógeno entre el agua y el PNIPAM desaparece, por lo que cambia su solubilidad [55]. Durante esta transición se forman puentes de hidrógeno intra e intermoleculares entre los grupos amida que inducen a la deshidratación del polímero lineal. Otra ventaja del uso de PNIPAM en el diseño de nanohidrogeles sensibles a la temperatura, es que la LCST de este polímero es poco dependiente del peso molecular y de su concentración en la solución acuosa. Además de lo

anterior, este polímero es biocompatible y esta propiedad es indispensable cuando su uso final es en áreas biomédicas. Adicionalmente, durante el proceso de polimerización el uso de NIPAM ha permitido obtener partículas con morfología definida y con características controladas [55].



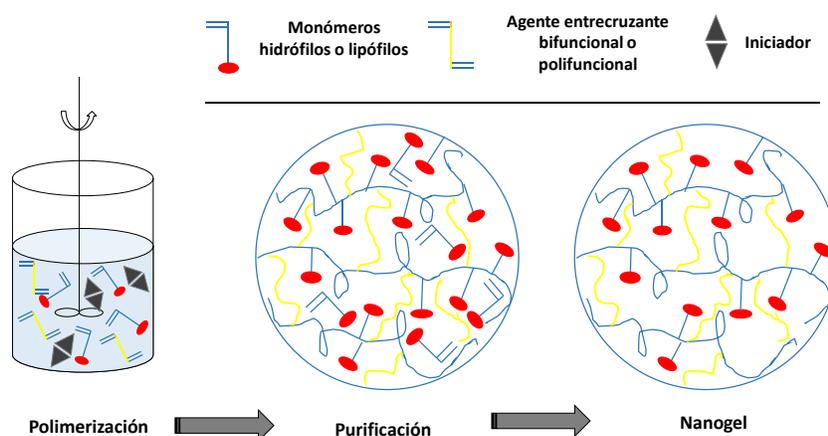
**Figura 2.5.** Grupos hidrófilos (C=O, N-H) e hidrófobos ( $-\text{CH}_3$ ) de la poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) encargados de su carácter termosensible.

## 2.2. MÉTODOS DE SÍNTESIS DE HIDROGELES DE PNIPAM

Típicamente los hidrogeles de PNIPAM se sintetizan mediante la copolimerización de la N-isopropilacrilamida y agentes de entrecruzamiento bifuncionales o polifuncionales, como la N,N'-metilenbisacrilamida (MBA) que es el agente de entrecruzamiento más utilizado (**Figura 2.6**). Sin embargo, esta estrategia de polimerización no garantiza el control en el tamaño de las partículas obtenidas y frecuentemente se obtienen materiales con altas cantidades de monómero residual y por lo tanto, la purificación de los nanohidrogeles se convierte en un paso crítico en el proceso ya que los monómeros residuales son tóxicos y pueden lixiviar continuamente desde los nanohidrogeles, esta purificación se realiza comúnmente por extracción con un solvente adecuado y puede tardar varias semanas [2].

La síntesis de nanohidrogeles de NIPAM se realiza regularmente mediante polimerización por radicales libres (polimerización radicalica clásica), que combina la polimerización y entrecruzamiento en un solo paso, donde el reto más importante es evitar la gelación del

sistema. También se han utilizado métodos de polimerización heterogénea como: emulsión, miniemulsión, microemulsión, dispersión, suspensión y precipitación, con estas técnicas se ha logrado cierto control sobre el problema de gelación [53]. Debido a las características fisicoquímicas del NIPAM, la polimerización por precipitación ha sido una de las más exploradas y esto se debe a que en estos sistemas todos los componentes (monómeros, iniciador y entrecruzante) son inicialmente solubles en la fase continua y, al formarse cadenas poliméricas en la fase acuosa, las cadenas tienden a precipitar y coagular.



**Figura 2.6.** Polimerización típica para la obtención de nanohidrogeles.

El primer informe encontrado en la literatura fue reportado por Pelton y cols. [56], estos autores prepararon mediante polimerización por precipitación partículas de hidrogel de PNIPAM de 1000 nm de diámetro en estado hinchado y con dispersidad estrecha. En una polimerización mediante radicales libres clásica, el NIPAM y los demás componentes se disuelven en agua, la polimerización se realiza en atmósfera inerte y por encima de la LCST del NIPAM, la reacción de polimerización se inicia mediante la degradación térmica de un iniciador radicalico que interacciona con el monómero, generando oligómeros que son solubles en el medio de reacción y cuando las cadenas de polímero alcanzan un cierto grado de polimerización ( $DP_n$ ) pueden llegar a precipitar. Sin embargo, las cadenas de polímero coaguladas carecen de estabilidad coloidal y en consecuencia se agregan [57].

En la síntesis de nanohidrogeles dirigidos hacia aplicaciones biomédicas, las características más importantes que se deben de controlar son el diámetro, distribución del tamaño de

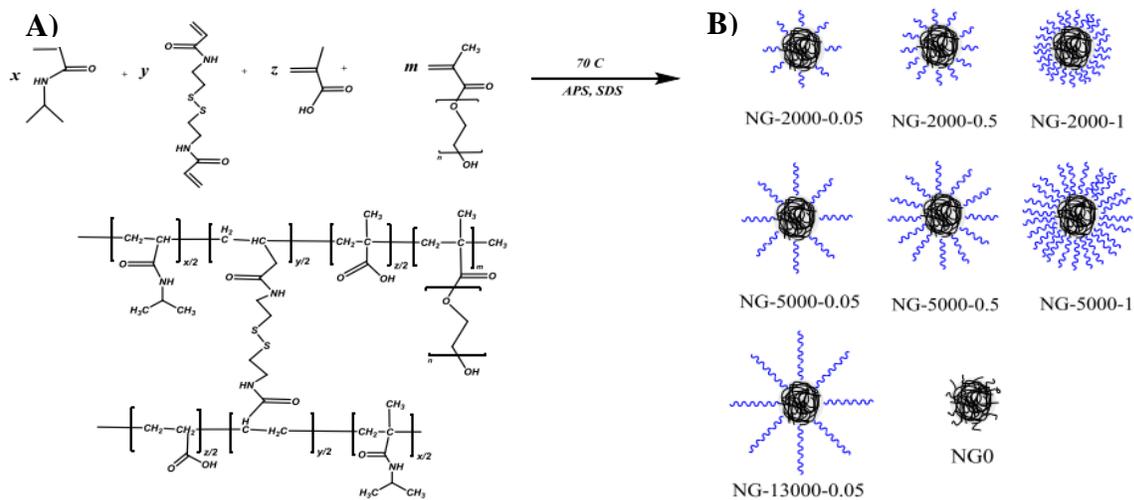
partícula y la estabilidad coloidal [36-38]. Esta última característica disminuye al aumentar la fuerza iónica o disminuir la densidad de carga superficial, y en consecuencia se observa un incremento drástico en el diámetro promedio de partícula. Para evitar o controlar lo anterior, se han agregado a la mezcla de reacción tensoactivos iónicos como el dodecilsulfato de sodio (SDS). Al agregar tensoactivos al sistema para estabilizar las partículas, el proceso se denomina polimerización en suspensión o emulsión dependiendo de la solubilidad del iniciador. Sin embargo, se ha demostrado que para lograr tamaños en la escala nanométrica se requiere de una alta concentración de tensoactivo [58]. Por ejemplo, Arleth y col., [59] reportaron la síntesis de microgeles que en estado colapsado tenían un diámetro de 50 nm utilizando una concentración de SDS de 5.3 mmol/dm<sup>3</sup>.

### **2.2.1. Estabilización estérica de nanohidrogeles de PNIPAM**

Una estrategia para evitar el uso de grandes cantidades de tensoactivos iónicos sin perder la estabilidad coloidal de los nanohidrogeles, es incorporar comonómeros hidrófilos que ayuden a generar una barrera estérica contra la agregación [60]. Los comonómeros que comúnmente se han utilizado en la copolimerización con NIPAM son los derivados del etilenglicol, esto se debe principalmente a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y resistencia a través de las diversas barreras del cuerpo, prolongando su tiempo de circulación en el organismo; también se ha reportado que al incorporar cadenas hidrófilas al sistema se puede modular el valor de VPTT de los nanohidrogeles de PNIPAM hasta temperaturas que permitan su aplicación en áreas biomédicas (34-37°C) [61].

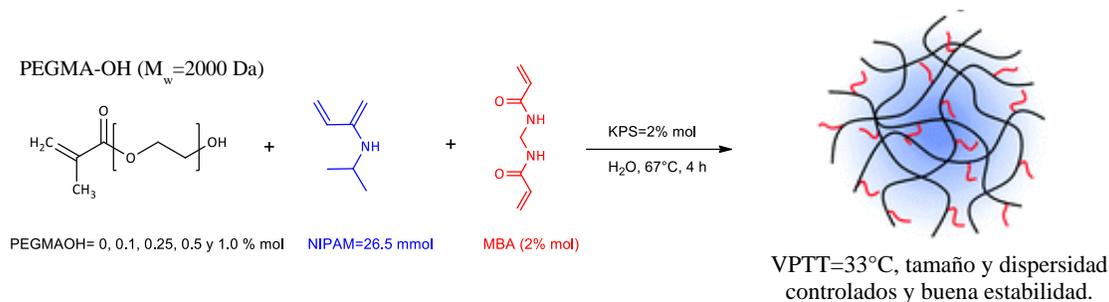
La estrategia de estabilización estérica fue utilizada por Gan y cols. [62], estos autores prepararon mediante polimerización en precipitación, microgeles termosensibles de PNIPAM y como agente estabilizante utilizaron cadenas de PEG con un peso molecular promedio de 1000 Da. Los resultados demostraron que incorporar de 10 a 40% p/p de PEG no fue suficiente para evitar un incremento en los valores de VPTT y dispersidad al incrementar la temperatura. Motlaq y cols. [63] mencionan que los recubrimiento de PEG se utilizan comúnmente para mejorar la estabilidad de los nanomateriales y lograr un mayor tiempo de circulación en la sangre. Estos autores sintetizaron nanohidrogeles de PNIPAM

recubiertos con cadenas de metil éter metacrilato de polietilenglicol (PEGMA) unidas mediante enlaces covalentes (**Figura 2.7**). Se evaluó el efecto de la longitud de las cadenas de PEGMA ( $DP= 2,000, 5,000$  y  $13,000$  Da) y densidad de recubrimiento (0.05, 0.50 y 1.00 % molar) sobre la estabilidad de los nanohidrogeles. Mediante DLS se determinó que en ausencia de recubrimiento de PEGMA, los nanohidrogeles se agregaron al aumentar la temperatura y que tanto el aumento de la longitud de las cadenas de PEGMA como la densidad del recubrimiento tienen una influencia importante en la estabilidad.



**Figura 2.7.** Esquema de la síntesis de los nanohidrogeles basados en PNIPAM y estabilizados con enlaces covalentes de PEGMA (A) y nanohidrogeles con diferente longitud de cadena y densidades de recubrimiento (B) [63].

El problema de estabilidad coloidal en nanohidrogeles de PNIPAM sigue siendo un tema de interés. Por ejemplo, Sayed y cols., en 2019 sintetizaron mediante polimerización por precipitación, microgeles de PNIPAM, PEGMA-OH y 2.0 % mol de MBA como agente de entrecruzamiento (**Figura 2.8**). Demostraron que la incorporación de PEGMA en la estructura de los microgeles influye en el tamaño y dispersidad, mientras que en el valor de VPTT no se observó un cambio importante comparado con los microgeles de PNIPAM que no contenían cadenas de PEGMA en su estructura [64].



**Figura 2.8.** Síntesis de microgeles de NIPAM, PEGMA-OH y MBA como agente entrecruzante utilizando polimerización por precipitación libre de tensoactivo [64].

### 2.2.2. Autoensamblaje de copolímeros en bloque anfífilos

El autoensamblaje de copolímeros en bloque anfífilos es una estrategia conocida para preparar una gran variedad de nanomateriales con morfologías como: esferas, gusanos, láminas y vesículas. Estas morfologías han mostrado un potencial prometedor y aplicaciones prácticas en la biomedicina. El avance de las polimerizaciones por radicales con desactivación reversible (RDRP) efectuadas en ausencia de tensoactivos, se ha utilizado también para sintetizar estructuras como los nanohidrogeles. En este grupo de técnicas se incluyen principalmente a la polimerización mediada por nitroxidos (NMP), polimerización por adición-fragmentación y transferencia de cadena reversible (RAFT) y polimerización por transferencia de átomo (ATRP). El uso de estas técnicas permite la síntesis de macromoléculas con peso molecular ( $M_w$ ) controlado, dispersidad estrecha ( $\mathcal{D} = <1.5$ ) y diferentes arquitecturas observadas en un amplio rango de temperaturas (20 a 140°C) y con mínimos requerimientos de purificación de monómeros y disolventes. El principio fundamental de las RDRP tiene sus raíces conceptuales en la polimerización aniónica viviente cuyo pionero fue Szwarc en 1956 [65]. Las mejoras y diversificaciones de las técnicas RDPR, han permitido que en pocos años sean de las más utilizadas en la síntesis de nanomateriales con tamaño, funcionalidad superficial y morfología controlados [66][67].

Dentro de la gran variedad de arquitecturas poliméricas desarrolladas hasta el momento, los copolímeros en bloque son de los más interesantes, sobre todo cuando están integrados de bloques incompatibles que permiten la separación de fases. Su uso también se ha incrementado debido a la creciente necesidad de desarrollar procesos químicos sustentables

donde se requieren condiciones de reacción amigables con el medio ambiente y cumplimiento de normativas al ser diseñados para aplicaciones biomédicas [19][20]. En estos sistemas de polimerización, los copolímeros en bloque anfífilos actúan como estabilizadores, eliminando el uso de agentes tensoactivos. De esta categoría, los copolímeros dibloque anfífilos (es decir, con un bloque hidrófilo y otro hidrófobo) son los que más atraen la atención debido a su dispersabilidad en agua, y a que pueden autoensamblarse para formar morfologías como micelas, gusanos o vesículas, que tienen aplicaciones potenciales en la liberación controlada de fármacos [21][68]. El autoensamble se induce utilizando un disolvente selectivo para una de las fases o al cambiar parámetros del entorno (pH, potencial eléctrico, campo magnético o temperatura) [11][10].

#### **2.2.2.1. Autoensamblaje convencional de copolímeros en bloque anfífilos para la síntesis de nanohidrogeles**

El autoensamblaje de copolímeros en bloque anfífilos en medio acuoso, fue reportado por primera vez por el grupo de Eisenberg en 1997 [69]. Desde entonces, otros grupos de investigación dirigidos por Discher [70], Kataoka [71] y Bates [72], han trabajado en la mejora de este método, se han enfocado principalmente en controlar la morfología y tamaño de los nanomateriales, así como en mejorar la eficiencia del proceso en cuanto a la concentración de sólidos. Algunos de estos autores mencionan que el núcleo segregado de las morfologías formadas podría funcionar para alojar compuestos bioactivos con actividad farmacológica. En la **Tabla 2.1** se muestran las principales aportaciones de estos grupos de investigación en el campo del autoensamblaje de copolímeros en bloque anfífilos post-polimerización.

A pesar de los múltiples desarrollos realizados con la técnica de autoensamblaje convencional, es conocido que este ensamblaje se realiza después de la polimerización utilizando un disolvente selectivo para uno de los dos bloques, o bien, mediante un cambio de pH en el medio de reacción y, por lo tanto, requiere de varios pasos como síntesis, aislamiento y purificación antes del proceso de ensamblaje. Además, para lograr tamaños de

regiones en la escala nanométrica se requieren concentraciones de copolímeros muy bajas (< 1.0 % p/p) y esto conduce a que el escalamiento del proceso sea poco viable [74][75].

**Tabla 2.1.** Autoensamblaje post-polimerización de copolímeros en bloque

Grupo de investigación	Principales resultados
<b>Eisenberg</b> [69]	Estos autores realizaron los primeros estudios sobre el autoensamblaje de copolímeros en bloque asimétricos, investigaron la morfología de copolímeros en bloque anfífilos de poliestireno-b-poli(ácido acrílico); (PS-b-PAA) obtenidos mediante desplazamiento de solvente y preparados previamente vía polimerización aniónica, obtuvieron 6 morfologías bajo las diferentes condiciones: esferas, varillas, laminas, vesículas, agregados micelares, esferas de tamaño micrométrico que tienen superficies hidrófilas. Posteriormente, realizaron un estudio detallado sobre el efecto de la adición de iones (HCl, NaOH, CaCl <sub>2</sub> , Ca (Ac) <sub>2</sub> NaCl) en la morfología de los agregados de los copolímeros. Demostraron que la morfología de los agregados puede controlarse mediante la adición de los iones estudiados y este efecto es directamente proporcional al aumento de la longitud del bloque hidrófilo. Además de las morfologías reportadas en el estudio previo, mencionan la obtención de 3 vesículas con nueva morfología las cuales pueden ser especialmente útiles como vehículos de suministro de fármacos y como modelos de biomateriales microestructurados estables.
<b>Discher</b> [70]	Este grupo de investigación se enfoca principalmente en el desarrollo y estudio de las propiedades de vesículas a partir de copolímeros en bloque, por ejemplo, Ahmed y cols., [73] desarrollaron vesículas a partir de PEG y poli-L-ácido láctico (PEG-b-PLA) o PEG y policaprolactona (PEG-PCL) con varias composiciones de monómero para cada bloque, se obtuvieron vesículas con tamaños desde micras hasta nanómetros dependiendo de la composición de los bloques del copolímero. Estos sistemas se evaluaron como agentes para la liberación controlada de fármacos contra el cáncer (doxorrubicina). Se demostró que la velocidad de liberación del fármaco se incrementó proporcionalmente con el contenido de PEG en la composición de los bloques y disminuyó cuando se

adicionaron cadenas hidrófobas de PCL. Mediante crio-TEM determinaron las morfologías de los copolímeros, obteniéndose vesículas ensambladas del copolímero dibloque con composición PEG<sub>43</sub>-PLA<sub>44</sub> y varios agregados con morfología esférica y gusanos al utilizar otras composiciones.

**Kataoka [71]**

Estos autores mencionan que las micelas formadas por copolímeros en bloque son vehículos prometedores en la liberación controlada de moléculas con actividad farmacológica. Una de las características más destacadas de este tipo de nanomateriales es que presentan una arquitectura núcleo-coraza. Además, se pueden sintetizar a partir de una gran variedad de polímeros hidrófilos como el PEG, que es utilizado como coraza. Se destaca que el núcleo segregado se utiliza para alojar fármacos de diferente naturaleza. También se menciona que la funcionalización de estas micelas con receptores dirigidos puede mejorar la captación de células malignas y que se pueden diseñar como micelas que responden a estímulos externos.

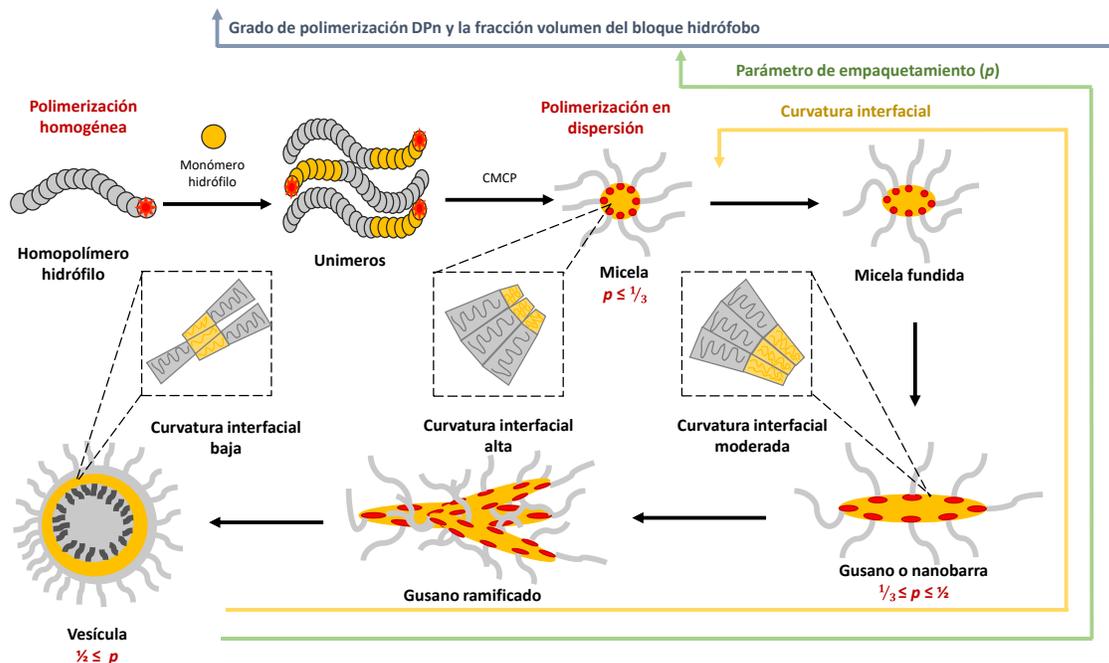
**Bates [72]**

Desarrollaron mediante polimerización aniónica copolímeros en bloque de poli(1,2-butadieno-b-óxido de etileno) (PB-b-PEO), los resultados evidencian la formación de uniones tipo “Y” y redes tridimensionales en agua cuando la fracción en peso de PEO es menor, las fracciones mayor de PEG permitieron la obtención de vesículas y gusanos micelares, esto ocurre a un peso molecular crítico.

#### 2.2.2.2. Autoensamblaje inducido por polimerización (PISA)

Otra técnica que frecuentemente se ha utilizado es el autoensamblaje inducido por polimerización (PISA, por sus siglas en inglés) este enfoque se realiza en medio acuoso y debido a ello se considera una técnica atractiva desde el punto de vista ambiental y por lo tanto, los nanomateriales obtenidos se pueden utilizar en aplicaciones biomédicas [76]. Esta estrategia consiste en la extensión de la cadena de un polímero precursor hidrófilo con características vivientes (preparado mediante un método RDRP) con un segundo bloque hidrófobo. Cuando el segundo bloque alcanza un grado de polimerización crítico, las cadenas anfífilas en crecimiento se ensamblan *in situ* para generar nanoestructuras estables en el marco de un proceso de emulsión o dispersión. Al incrementar la longitud de la cadena del

segundo bloque hidrófobo, ocurre una reorganización de las cadenas en morfologías termodinámicamente estables, estas morfologías se obtienen al incrementar el grado de polimerización ( $DP_n$ ) y el parámetro de empaquetamiento ( $p$ ) y con la disminución de la curvatura interfacial y la tensión superficial entre los bloques hidrófobos e hidrófilos. Cuando se cambia la composición del bloque que forma el núcleo del nanomaterial, es decir, la proporción del monómero, se observan diferentes morfologías durante el transcurso de la polimerización (micelas, esferas, gusanos y vesículas), esto sugiere que la morfología es promovida por la hidrofilia de los copolímeros en bloque, ya que se disminuye la movilidad de las cadenas y en consecuencia, las cadenas individuales de polímeros “unimeros” se autoensamblan, en la **Figura 2.9** se presenta una ilustración del proceso [77].



**Figura 2.9.** Mecanismo PISA basado en una polimerización en dispersión acuosa [77].

Generalmente PISA se lleva a cabo en un proceso por lotes (*batch*) *ab initio* tal como lo reportó Charleux y cols., [78], no obstante, algunas reacciones se pueden realizar en semicontinuo. A pesar de sus ventajas, muy pocos monómeros vinílicos son idóneos para ser utilizados en este tipo de polimerización, ejemplos de estos incluyen: N-isopropilacrilamida

(NIPAM), N,N'-dietilacrilamida (DEAA), 2-metoxietil acrilato (MEA), 2-hidroxipropil metacrilato (HPMA) y di(etilen glicol) metil éter metacrilato (DEGMA) [67].

En los últimos años se ha aumentado el interés en el uso de la estrategia PISA para la síntesis de nanopartículas poliméricas destinadas a la liberación controlada de fármacos. Es importante comentar que esta estrategia de síntesis de nanoestructuras es llevada a cabo regularmente bajo condiciones de emulsión o dispersión vía polimerización RAFT usando iniciadores del tipo *azo* como fuente de radicales, esto se debe a que con este tipo de polimerización se pueden utilizar una gran variedad de monómeros vinílicos y disolventes polares y no polares. También existen reportes del uso de otras técnicas RDRP como ATRP y NMP para conducir el proceso PISA [76][79].

#### ***Nanomateriales obtenidos por RAFT-PISA***

En el mecanismo RAFT-PISA se utiliza un macro-CTA de tipo organosulfurado como los ditiobenzoatos, xantatos y sus derivados (ditioésteres, ditiocarbamatos y tritiocarbonatos) y un iniciador como fuente de radicales para polimerizar el monómero soluble en el medio de reacción, que al alcanzar un grado de polimerización crítico forma bloques poliméricos insolubles, formando así copolímeros en bloque anfífilos los cuales se autoensamblan *in situ* durante el crecimiento de la cadena. La morfología de las nanopartículas obtenidas mediante PISA está determinada por diversos parámetros entre los que destacan: la longitud de bloque hidrófobo, interacciones electrostáticas, solubilidad del monómero/polímero en el medio acuoso y la compatibilidad entre ambos bloques [80].

Sugihara y cols. [81] del grupo de investigación de Armes, reportaron el uso de RAFT-PISA para obtener copolímeros en bloque utilizando poli(2-metacrilatoiloxi etilfosforicolina) (PMPC) como macro-agente (PMPC-CTA) y metacrilato de 2-hidroxipropilo (HPMA) como monómero del segundo bloque, en este estudio se estableció el grado de polimerización de PMPC ( $DP_n=25$ ) y se varió el grado de polimerización del bloque de HPMA y el contenido de sólidos. Los resultados permitieron elucidar un diagrama de fases detallado para predecir

la composición de los bloques asociadas a morfologías bien definidas (esferas, gusanos o vesículas) a las que llamaron fases puras.

Posteriormente, Warren y cols. [82] del mismo grupo de investigación de Armes, estudiaron un proceso de RAFT-PISA utilizando como macro-CTA poli(etilenglicol) con un  $DP=113$  (PEG<sub>113</sub>), las cadenas de PEG estaban unidas a un agente de control RAFT al final de la cadena por medio de un enlace amida (PEG<sub>113</sub>-DB) y como monómero hidrófilo utilizaron metacrilato de 2-hidroxiopropilo (HPMA). En este trabajo se estudió el efecto del grado de polimerización de HPMA, el contenido de sólidos y la temperatura de polimerización. Los resultados demostraron que las polimerizaciones realizadas a 50°C conducen a altas conversiones de monómero (>95.0%) y dispersidad estrecha ( $\bar{D}<1.25$ ), esto permitió la construcción de un diagrama de fases para predecir las morfologías (micelas esféricas, gusanos o vesículas). Adicionalmente, mediante SAXS se demostró la respuesta térmica de estos materiales. Se menciona que esta nueva formulación permite la obtención de nanomateriales biocompatibles y con respuesta a la temperatura que se podrían utilizar en áreas biomédicas.

Por otra parte, Zhou y cols. [68] reportaron la síntesis mediante RAFT-PISA de nanoesferas y vesículas de poli(N,N-dimetilacrilamida) (PDMA) como macro-CTA (PDMA-CTA) y como segundo bloque utilizaron diacetona acrilamida (DAAm). El principal objetivo era obtener una dispersidad estrecha y controlar el tamaño de partícula. Los resultados obtenidos demostraron que la dispersidad de las partículas mejoró cuando disminuía la temperatura de polimerización y la concentración de iniciador, esto se atribuyó a una disminución en la velocidad de polimerización ocasionando que los polímeros se relajaran y reorganizaran. Adicionalmente, se logró la funcionalización del núcleo de las nanoesferas y vesículas formadas por PDAAm utilizando oxima.

Mediante polimerización RAFT-PISA en medio acuoso Figg y cols. [77] evaluaron el efecto de la composición química en la reacción de copolimerización de poli(N,N-dimetilacrilamida) (PDMA) funcionalizado al final de la cadena con un agente de control RAFT (PDMA-CTA) y diacetona acrilamida (DAAm) como segundo bloque. Se evaluó el

efecto de la relación molar PDMA-CTA/DAAm (0/90, 15/85, 20/80 y 35/75) y el grado de polimerización del bloque de DAAm ( $DP_2=54, 87, 141$  y  $217$ ) sobre la morfología de los nanomateriales. Se realizó el entrecruzamiento del bloque hidrófobo mediante una reacción de los grupos cetona del DAAm con una alcoxiamina para obtener enlaces oxima con estabilidad hidrolítica. Se observaron diversas morfologías (micelas, gusanos, gusanos ramificados y vesículas), con notable dependencia de la relación de alimentación de monómero. Por ejemplo, con DAAm<sub>90</sub> se observaron estructuras micelares esféricas en todos los grados de polimerización del segundo bloque ( $DP_2$ ) evaluados. Sin embargo, cuando se utilizó DAAm<sub>85</sub> se observaron morfologías diversas: gusanos con  $DP_2=87$ , esferas con  $DP_2=141$  y una población pequeña de vesículas que persistieron hasta  $DP_2=217$ . Para un DAAm<sub>80</sub> se observaron morfologías que son comunes en PISA, micelas a un  $DP_2=54$ , y gusanos y gusanos ramificados a un  $DP_2=87$ . Otras estructuras tales como medusas y pulpos se observaron a un  $DP_2=141$ , mientras que las vesículas y una pequeña población de micelas se presentaron al mayor grado de polimerización del segundo bloque. Por otra parte, con DAAm<sub>75</sub> se obtuvieron transiciones morfológicas diversas: micelas, gusanos de menor longitud, gusanos extendidos y vesículas.

Otro enfoque de RAFT-PISA está basado en polimerizaciones en dispersión utilizando mezclas de agua y disolventes orgánicos como por ejemplo H<sub>2</sub>O/etanol y H<sub>2</sub>O/1,4-dioxano. Fu y cols., [83] reportaron la síntesis de nanohidrogeles zwitteriónicos con respuesta a la temperatura, utilizando poli(etilenglicol metil éter metacrilato poli(PEGMMA) funcionalizado al final de la cadena con un agente de control RAFT poli(PEGMMA-CTA), 3-dimetil (metacrililoxietyl amonio propanosulfonato), DMAPS, como monómero termosensible, MBA como agente de entrecruzamiento y como medio de reacción utilizaron mezclas de disolventes de H<sub>2</sub>O/etanol y H<sub>2</sub>O/tetrahidrofurano y una temperatura de polimerización de 70°C. Los autores evaluaron: (i) efecto de la relación volumen de la mezcla de disolventes, (ii) relación molar de PEGMMA-CTA/DMAPS y (iii) cantidad de agente entrecruzante (MBA) sobre diámetro de partícula ( $D_p$ ), dispersidad ( $\mathfrak{D}$ ), volumen de hinchamiento ( $D_{p70^\circ\text{C}}/D_{p10^\circ\text{C}}$ ) y temperatura de transición de fase en volumen (VPTT). Los resultados de diámetro de partícula, dispersidad e hinchamiento mostraron una respuesta

directamente proporcional con la cantidad de etanol y tetrahidrofurano en la mezcla de reacción y también con la cantidad de monómero. Mientras que, al disminuir la cantidad de agente entrecruzante se obtuvieron diámetros de partícula mayores. Los autores sugieren utilizar estos materiales en la liberación prolongada e inducida al aumentar la temperatura de un sistema. En la **Tabla 2.2** se muestra un resumen de las contribuciones previamente descritas y que estuvieron enfocadas en la síntesis de nanomateriales utilizando el enfoque de RAFT-PISA. Se muestra el material y las variables evaluadas y también los principales resultados.

**Tabla 2.2.** Resumen de nanomateriales obtenidos por RAFT-PISA y las principales aportaciones.

Variables evaluadas y referencia	Principales resultados
PMPC <sub>25</sub> -b-PHPMA <sub>x</sub> : <i>DP</i> del bloque de PHPMA y contenido de sólidos sobre morfología y diámetro [81].	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Un aumento sistemático del <i>DP</i> (100-400) conduce a un aumento en el diámetro de partícula (12-58 nm).</li> <li>→ Se observaron cambios drásticos en la morfología del copolímero con el incremento de <i>DP</i> hasta 400 y esta morfología dependía de la concentración de sólidos (10.0%: esferas, 12.5 y 15.0%: esferas y gusanos, 16.2%: gusanos, 17.0 y 20.0%: gusanos y vesículas y 22.5%: vesículas).</li> </ul>
PEG <sub>113</sub> -DB-b-PHPMA <sub>x</sub> : <i>DP</i> del bloque de PHPMA, contenido de sólidos, temperatura y relación molar de macro-CTA/iniciador sobre la morfología, tamaño y dispersidad ( $\bar{D}$ ) [82].	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ La optimización de las condiciones de polimerización (<math>T=50^{\circ}\text{C}</math> y relación molar de PEG<sub>113</sub>-DB/AIPD=3.0) conduce a altas conversiones de monómero (&gt;95%) y <math>\bar{D}</math> estrecha (<math>M_w/M_n &lt; 1.25</math>).</li> <li>→ La variación sistemática del grado de polimerización del bloque que forma el núcleo permite obtener esferas, gusanos o vesículas con hasta 17.5% p/p de sólidos.</li> </ul>
PDMA-b-PDAAm: PDMA-CTA/iniciador y temperatura sobre el tamaño ( $D_p$ ) y $\bar{D}$ [68].	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Se obtuvo una dispersidad estrecha al disminuir la temperatura de polimerización y la concentración del iniciador, el tamaño de los nanomateriales fue afectado por el contenido de sólidos y concentración de iniciador.</li> </ul>
PDMA-b-PDAAm: PDMA-CTA/monómero y $DP_2$ sobre morfología [77].	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Morfologías diversas con notable dependencia de la relación de alimentación de monómero.</li> <li>→ La morfología de las nanopartículas se define por la naturaleza hidrófoba de las cadenas anfífilas en crecimiento.</li> </ul>

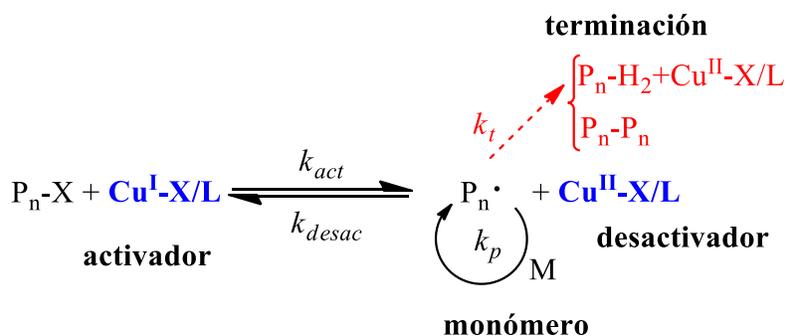
	→ En todas las composiciones se obtuvieron vesículas al mayor grado de polimerización del segundo bloque ( $DP_2$ ).
PPEGMMA <sub>40</sub> -b-PDMAPS <sub>x</sub> : relación etanol/agua, relación molar PPEGMMA-CTA/DMAPS, concentración de agente entrecruzante (MBA), sobre tamaño ( $D_p$ ), $\bar{D}$ y termosensibilidad (10-70°C) [83].	→ Mayor contenido de etanol y DMAPS incrementa el $D_p$ e hinchamiento. → El hinchamiento y la cantidad de agente entrecruzante fueron inversamente proporcionales. → La temperatura de transición de fase en volumen (VPTT) incrementó al aumentar la cantidad de monómero.

Como se pudo constatar en los apartados anteriores, se han reportado una gran cantidad de desarrollos tecnológicos basados en RAFT-PISA cuyos avances parecen ser particularmente prometedores en aplicaciones comerciales. A pesar de ello, la técnica de polimerización RAFT presenta algunas desventajas, entre estas, el hecho de que la estructura final contiene átomos de azufre unidos mediante enlaces covalentes sobre las cadenas poliméricas, existiendo la posibilidad de que el polímero genere especies reactivas por efecto de la temperatura. Adicionalmente, estos compuestos azufrados confieren un color y olor desagradables en los productos finales y en algunos productos especializados como aditivos para cosméticos o pinturas, estos parámetros estarían fuera de las especificaciones de calidad. Se ha trabajado en la remoción de estos grupos RAFT de las cadenas poliméricas, pero hasta el momento no se ha encontrado una alternativa eficiente. Lo anterior se atribuye a que el proceso de remoción se lleva a cabo después de la polimerización, lo cual incrementa el costo y la complejidad del proceso PISA, esto podría ser rentable cuando el producto final se utiliza en aplicaciones muy especializadas como las biomédicas [76].

Como se mencionó en apartados anteriores, la polimerización RAFT no es un requisito previo para el uso de PISA, esta técnica también se ha llevado a cabo utilizando polimerización radicalica por transferencia de átomo (ATRP), que es un proceso de polimerización RDRP desarrollada por el Prof. Krzysztof Matyjaszewski en 1998 [84], con esta técnica de polimerización se pueden preparar materiales de arquitectura y composición química controladas a través de la propagación de radicales libres.

**Nanomateriales obtenidos por ATRP-PISA**

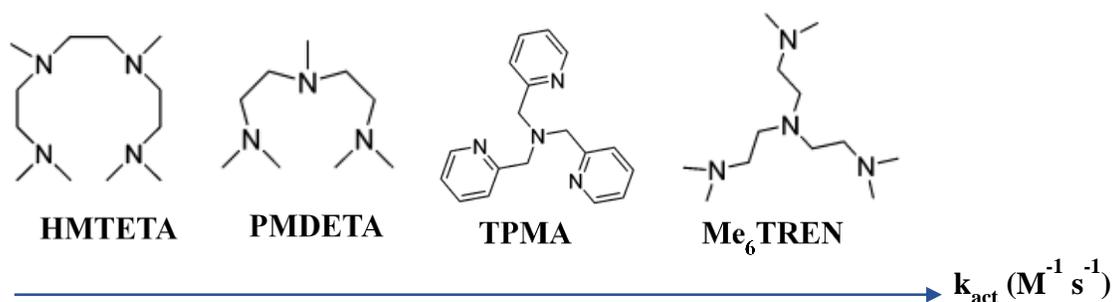
La técnica ATRP está basada en la generación de un equilibrio dinámico entre una gran cantidad de especies latentes y una pequeña cantidad de radicales propagantes. La propagación de especies  $P_n\cdot$  es generada mediante un proceso redox reversible catalizado por un complejo que contiene un metal de transición  $M_t^m(L)_z$ , llamado activador. La función de este complejo catalítico es activar el enlace carbono-halógeno ( $P_n-X$ ) mediante su oxidación por la transferencia de un electrón al átomo del pseudohalógeno ( $-X$ ) proveniente de una especie latente  $P_n-X$  y también tiene la función de desactivar los macro-radicales en crecimiento, que reaccionan reversiblemente con el complejo metálico en su estado de oxidación más alto  $X-M_t^{m+1}(L)_z$  y con las especies desactivantes para formar nuevamente la especie latente y el activador. Este proceso se lleva a cabo con constantes de velocidad de activación,  $k_{act}$ , y desactivación,  $k_{desac}$ . Por lo tanto, si la concentración de radicales es suficientemente baja ( $k_{act} \ll k_{desac}$ ) la probabilidad de que la reacción presente una terminación bimolecular es muy baja [85].



**Figura 2.10.** Mecanismo general de la polimerización radical por transferencia de átomo (ATRP) para la preparación de copolímeros en bloque anfífilos.

De acuerdo con la cinética que rige a este proceso (mostrado en la **Figura 2.10**), la velocidad de activación ( $k_{act}$ ) es uno de los factores determinantes en el control de la polimerización y es conocido que parámetros como: disolvente, estructura del iniciador, monómero, presión, temperatura del sistema y tipo de ligando, están involucrados en el equilibrio de activación-desactivación del sistema ( $k_{act} \ll k_{desac}$ ) [66].

Específicamente los ligandos unidos al centro metálico determinarán la solubilidad de la reacción que es un requisito indispensable para que la polimerización transcurra. Generalmente los ligandos unidos al cobre tienen en su estructura átomos de nitrógeno y se les denomina moléculas multidentadas que permiten la formación de un complejo metálico, similar a los quelatos (**Figura 2.11**). Por lo tanto, el uso de ligandos proporciona al complejo de cobre una mayor solubilidad y promoverá en cierta medida el control.



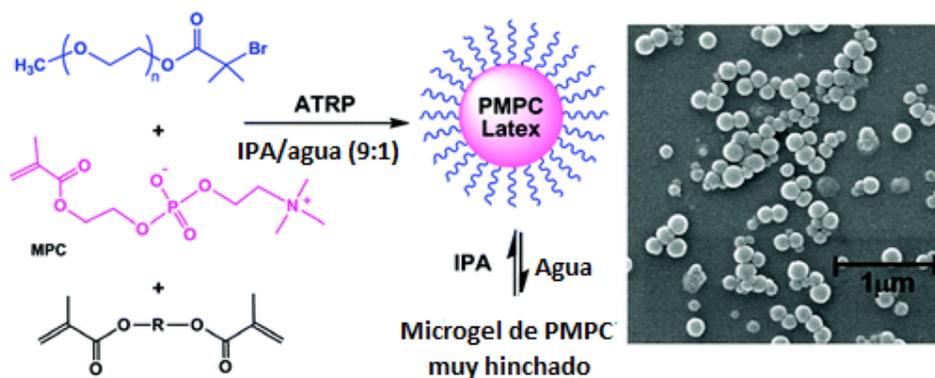
dispersos acuosos se basaron en una receta de miniemulsión utilizando un copolímero reactivo anfífilo que actuaba como estabilizador y como iniciador. Por ejemplo, en el trabajo realizado por Xu y cols., [86] se reporta un proceso ATRP en emulsión para la síntesis de copolímeros en bloque anfífilos de poli(etilenglicol)-b-poli(estireno), PEG-b-PS, utilizando un macroiniciador de poli(etilenglicol)-clorado (PEG-Cl), para la iniciación utilizaron irradiación de microondas a 75°C. No obstante, las polimerizaciones se llevaron a cabo en presencia de un tensoactivo no iónico y no se demostró la síntesis de un copolímero en bloques de PEG-b-PS, ni el control sobre la polimerización, a pesar de ello, los resultados evidenciaron la obtención de partículas esféricas muy pequeñas ( $D_p < 50$  nm) y monodispersas, pero es difícil considerar estos experimentos como una demostración real de PISA.

Siguiendo con este tópico de investigación, Kim y cols., [87] prepararon copolímeros en bloques de poli(etilenglicol) metil éter (PEG)-b-poli(N-isopropilacrilamida) (PEG-b-PNIPAM) mediante polimerización en dispersión acuosa de NIPAM, usando PEG químicamente modificado como macroiniciador ATRP. Dependiendo de la temperatura de polimerización (25 o 50°C), es decir, por debajo o por encima de la LCST del NIPAM, formaron copolímeros con los dos bloques hidrófilos, o bien, una suspensión de micelas con un bloque hidrófobo de PNIPAM en el núcleo y el bloque hidrófilo de PEG como coraza. El uso de MBA como comonomero de entrecruzamiento condujo a la formación de pequeñas partículas de hidrogel con  $D_p < 100$  nm que estaban estabilizadas por segmentos de PEG. El cambio de color (verde - azul turbio) de la mezcla de reacción cuando se polimerizó a 50°C, indicó que las micelas obtenidas se formaron durante el proceso de polimerización, es decir, *in situ*. Por lo anterior, se considera a este desarrollo como el primer ejemplo de ATRP-PISA utilizado en la síntesis de nanohidrogeles a partir de copolímeros en bloque anfífilos, aunque en este tiempo todavía no se había descrito como tal el concepto de autoensamblaje inducido por polimerización, PISA. Por otra parte, los autores mencionan que el uso de una mezcla de disolventes (H<sub>2</sub>O/THF) incrementó el tamaño de las partículas de hidrogel ( $D_p > 500$  nm) y esto se atribuyó a que el THF incrementa la solubilidad de las cadenas de PNIPAM en

crecimiento, por lo tanto, se sugiere que el tamaño de las partículas puede controlarse cambiando el disolvente utilizado en la polimerización.

Por lo anterior, en otros trabajos de ATRP-PISA y siguiendo el mecanismo de polimerización en dispersión se reporta el uso de mezclas de disolventes. El primer estudio encontrado está basado en la polimerización de 4-vinilpiridina (4VP) en una mezcla de H<sub>2</sub>O/etanol, utilizando un macroiniciador de PEG-Br y MBA con agente entrecruzante. Los autores demuestran la obtención de micelas con un núcleo hidrófobo y entrecruzado y estabilizadas por las cadenas de PEG. Concluyen que cuando se incrementa la cantidad de etanol en la mezcla de reacción, el diámetro promedio de partícula ( $D_p$ ) también incrementó debido a la mayor solubilidad del 4VP en el medio [88].

Así mismo, Sugihara y cols. [89] reportaron la síntesis de microgeles zwitteriónicos de PMPC en una mezcla de isopropanol/H<sub>2</sub>O (9/1; v/v), estos microgeles estaban estabilizados estéricamente con cadenas de PEG y entrecruzados con dimetilacrilato de etilenglicol (EGDMA) o bisfenol A dimetacrilato (BPDMA), el esquema del proceso se muestra en la **Figura 2.12**.



**Figura 2.12.** Microgeles zwitteriónicos obtenidos mediante polimerización en dispersión isopropanol/H<sub>2</sub>O basada en ATRP [89].

Se demostró la obtención de geles que se pueden hinchar en presencia de agua, con diámetro de partícula ( $D_p$ ) y dispersidad ( $\mathcal{D}$ ) dependientes del grado de entrecruzamiento. Por ejemplo, a una concentración de 10% mol de EGDMA se obtuvieron microgeles con diámetros

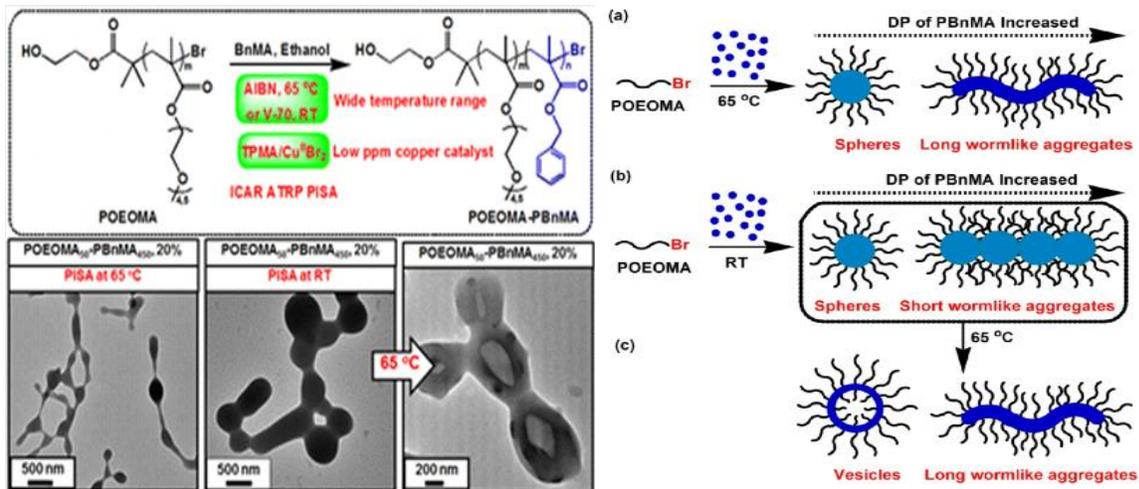
promedio de partícula ( $D_p$ ) entre 81-830 nm y con dispersidad estrecha, mientras que con una concentración menor de agente entrecruzante (4% mol) se obtuvieron dispersidades más amplias (bimodales). Se concluye que otros factores como la concentración de monómero inicial, composición del copolímero en bloque y el grado de polimerización objetivo ( $DP$ ), también interfieren en el  $D_p$  y  $\mathcal{D}$  de los materiales.

El principal problema del uso de la técnica ATRP-PISA, es la contaminación del producto con el catalizador metálico, así, una de las variables de mayor interés y que implica un reto interesante para la comunidad científica, es la disminución de la concentración del catalizador. Otro desafío para el mecanismo PISA basado en ATRP, es que el complejo catalítico se utiliza como activador ( $Cu^I$ /ligando) y como desactivador ( $Cu^{II}$ /ligando) y ambos compuestos deben estar presentes en la polimerización. Debido a estas características estrictas de reacción, el uso de monómeros hidrófilos necesarios para la preparación de copolímeros en bloque anfífilos autoensamblados está limitado [66].

Para subsanar los problemas evidenciados en la técnica ATRP, se ha propuesto un equilibrio de activación y desactivación reversible catalizado por complejos activos redox de metal de transición, permitiendo que el proceso ATRP normal mejore considerablemente ya que se utiliza una menor concentración de catalizador y se tiene una mayor tolerancia a las impurezas y al oxígeno. Entre los procedimientos reportados se encuentran: ATRP inversa, ATRP simultánea e inversa e iniciación normal (SR&NI), activadores generados por transferencia de electrón (AGET), activadores regenerados por transferencia de electrón (ARGET), iniciadores por regeneración continua del activador (ICAR), activadores suplementarios y agente reductor (SARA), ATRP mediada electroquímicamente (eATRP) y ATRP foto-inducida.

Como ejemplo, Wang y cols., [90] mediante ATRP-ICAR sintetizaron en medio acuoso un macroiniciador de poli(oligo(óxido de etileno) metil éter metacrilato (POEOMA<sub>50</sub>) y posteriormente realizaron la polimerización en dispersión de metacrilato de bencilo (BnMA) en etanol con un complejo de  $Cu^{II}Br_2$ / tris(piridin-2-ilmetil) amina, TPMA o  $Cu^I Br$ /TPMA a temperatura ambiente y a 65°C utilizando azobis(isobutironitrilo) (AIBN) y 2,2'-azodi(2,4-

dimetil-4-metoxivaleronitrilo) (V-70) como iniciadores de radicales. En el esquema de la **Figura 2.13** se muestra este proceso. Evaluaron el efecto de la concentración de  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Br}_2$  y TPMA, tipo de iniciador, grado de polimerización ( $DP$ ) de BnMA, contenido de sólidos y temperatura de polimerización sobre las características moleculares y el comportamiento del autoensamblaje (morfología) del copolímero en bloque de POEOMA-PBnMA. Se demostró que estos copolímeros se autoensamblan en esferas, agregados de gusano y vesículas con diámetro de partícula ( $D_p$ ) entre 100 y 600 nm, dependiendo de la temperatura de polimerización, contenido de sólidos y grado de polimerización ( $DP$ ) del PBnMA.



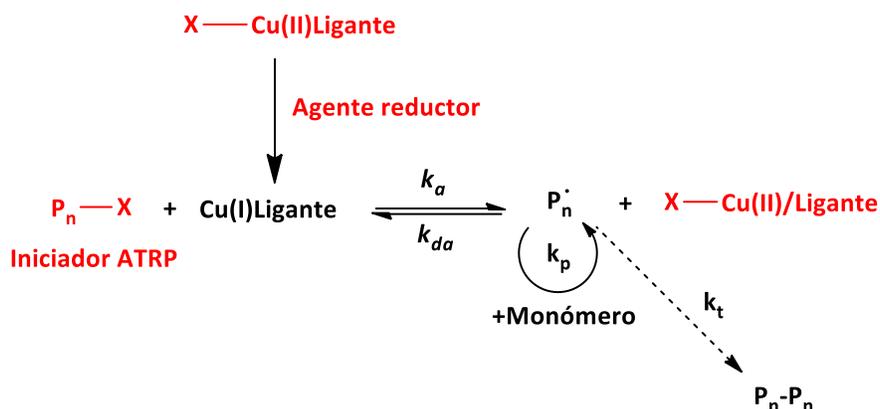
**Figura 2.13.** Nanomateriales obtenidos mediante ATRP-ICAR-PISA [90].

Así, en ATRP-ICAR-PISA llevada a temperatura ambiente, la mínima concentración de  $[\text{Cu}^{\text{II}}\text{Br}_2]_0$  necesaria para el control de la polimerización depende del contenido de sólidos y  $DP$  de PBnMA obteniendo estructuras de agregados esféricos y varillas. Mientras que, con una concentración de  $[\text{Cu}^{\text{II}}\text{Br}_2]_0=400$  ppm y una relación molar de  $[\text{Cu}^{\text{II}}\text{Br}_2]_0:[\text{TPMA}]_0:[\text{AIBN}]_0=1:4:10$ , la ATRP-ICAR-PISA llevada a  $65^\circ\text{C}$  se realizó con éxito y no dependía del contenido de sólidos. La cinética mostró que la polimerización podría dividirse en dos etapas: polimerización inicial en solución homogénea lenta y polimerización micelar más rápida en la etapa posterior. Estos resultados que implican el uso de bajas concentraciones de catalizador, aunado a la amplia gama de monómeros accesibles para las

reacciones de ATRP, son factores determinantes que impulsan los procesos de PISA basados en ATRP.

Considerando lo anterior, en el presente trabajo inicialmente se propuso el uso de ATRP-AGET-PISA para obtener nanohidrogeles basados en PEG<sub>n</sub>/MPEG<sub>n</sub>-b-PNIPAM, tal como el sistema reportado por Kim y cols. [87], con la variante de utilizar ATRP-AGET para obtener mayor control en las variables implicadas en la reacción de polimerización y subsecuentemente en las características de los materiales. El interés sobre el uso de ATRP-AGET radicó en que con este método se asegura una ruta sencilla para sintetizar polímeros con arquitecturas compleja y manteniendo la dispersidad estrecha. La idea principal era contar con una metodología que permitiera la manipulación de los reactivos durante y después del proceso de polimerización y esto se logra en gran medida con el uso de un complejo de Cu<sup>II</sup>, ya que se evita el uso de condiciones especiales de reacción como en el caso de la ATRP-normal. Para la ATRP-AGET se requiere del uso de un agente reductor y se consideró mejor opción en comparación con ATRP-ICAR, ya que en esta última se requieren iniciadores térmicos que continuamente formen especies reactivas para iniciar nuevas cadenas poliméricas.

El proceso ATRP-AGET se puede llevar a cabo incluso en un sistema en miniemulsión, tal como el primer estudio que se realizó con ATRP-AGET reportado por Min y cols., [91], estos autores reportan la síntesis de homopolímeros y copolímeros en bloque puros basados en poli(acrilato de n-butilo) (n-BuA) y poliestireno (nBuA-b-PS) mediante polimerización en miniemulsión usando un nuevo proceso de activación del catalizador al que denominaron AGET (**Figura 2.14**). Con este nuevo enfoque se asegura que el catalizador permanece dentro de las micelas, disminuyendo la probabilidad de migrar hasta las gotas de monómero presentes en la fase acuosa, esto les permitió tener una polimerización controlada de n-BuA. Después de la adición *in situ* de estireno y subsecuente reanudación de la polimerización se obtuvo un copolímero en bloque con dispersidad estrecha ( $\mathcal{D}=1.3$ ).



**Figura 2.14.** Mecanismo ATRP-AGET para la preparación de copolímeros en bloque.

Jakubowski y col., [85] reportaron un método enfocado en la síntesis de un catalizador activo, usando una transferencia de electrones en lugar de radicales orgánicos, esto con la finalidad de reducir el metal de transición en su estado de oxidación más alto. Mencionan que se pueden utilizar varios compuestos para la reducción *in situ*, sin embargo, en su estudio utilizaron 2-etilhexanoato de estaño (II) ( $\text{Sn}(\text{EH})_2$ ). Con este método se demostró la activación/iniciación de una gran cantidad de sistemas, entre estos, estireno y metacrilato de octadecilo polimerizado con  $\text{CuCl}_2/4,4'$ -di-(nonil)-2,2'-bipiridina (dNbpy), acrilato de metilo y n-BuA polimerizado por  $\text{CuCl}_2/\text{N,N,N',N'',N''}$ -pentametildietilentriamina (PMDETA) y acrilato de metilo usando  $\text{CuCl}_2/\text{tris}(2\text{-dimetilamino)etil-amina}$  ( $\text{Me}_6\text{TREN}$ ). Así, el activador generado por transferencia de electrones (AGET) en condiciones de ATRP permite la preparación de copolímeros en bloque puros. La polimerización se llevó a cabo de manera controlada para todos los sistemas, se obtuvieron polímeros bien definidos con grado de polimerización controlado y dispersidad estrecha ( $\text{Đ} < 1.3$ ), este estudio permitió demostrar la eficiencia de ATRP-AGET.

A pesar de los múltiples esfuerzos realizados se ha observado que la ATRP en medios acuosos es rápida y se producen polímeros con dispersidades amplias, lo que indica una pérdida del control. Un proceso ATRP controlado al utilizar un medio acuoso es un reto debido a la generación de reacciones secundarias involucradas en el equilibrio dinámico. En la literatura se establece que las poli(acrilamidas) (como el NIPAM) son más difíciles de

synthetizar por ATRP en agua. En 2003, se reportó un sistema ATRP en medio acuoso para la síntesis de poliacrilamidas a altas temperaturas (130°C), los resultados proporcionaron pobre control de las polimerizaciones con dispersidades  $\geq 1.6$  y bajo peso molecular [30]. En un estudio posterior, se demostró que el uso de PMDETA como ligando permite obtener dispersidades de hasta 1.24, pero conversiones muy bajas (9% en 48 horas), la polimerización se realizó a 90°C [31]. También se reportó la síntesis de copolímeros derivados de NIPAM a 25°C por 22 horas, se obtuvieron dispersidades de 1.48 pero conversiones de 5% [32]. Los resultados como amplias distribuciones de peso molecular y/o bajas conversiones encontrados en la mayoría de las polimerizaciones se atribuyen a una pérdida del control por diversos factores involucrados en el equilibrio dinámico [23].

### 2.3. APLICACIONES DE NANOHIIDROGELES

La configuración particular de los nanohidrogeles permite que estos materiales tengan propiedades únicas en comparación con otros nanomateriales y esto ha promovido su uso en diversas industrias. Sin embargo, debido especialmente a su hidrofilia son altamente biocompatibles por lo que se han utilizado principalmente en áreas biomédicas, por ejemplo, en la fabricación de lentes de contacto, vendajes para heridas, andamios en ingeniería de tejidos, separación de biomoléculas o células, sistemas de administración de fármacos y/o proteínas [4], sistemas de diagnóstico clínico [41] y sistemas teragnósticos [42].

La aplicación que más ha sido abordada por la comunidad científica y por la industria, es su uso como vehículos en la liberación controlada de fármacos. Esto se debe a que los nanohidrogeles presentan una alta eficiencia de encapsulación de las moléculas incorporadas (fármacos, proteínas, carbohidratos y ADN) y la encapsulación protege a estos compuestos de la degradación química y enzimática. Además de lo anterior, se ha comprobado que debido al comportamiento que exhiben los nanohidrogeles frente a estímulos externos, aunado a su capacidad de hinchamiento y subsecuente suavidad, también participan activamente en el proceso de liberación controlada de las moléculas alojadas en su interior hasta sitios específicos de entornos patológicos [44][54]. Esto se puede lograr mediante la bioconjugación de la superficie del nanohidrogel con ligandos que tienen la capacidad de

reconocer receptores de células en estado patológico, un ejemplo de esto, son los receptores que reconocen células cancerosas como los derivados de ácido fólico, péptidos y anticuerpos [54].

El general, el desarrollo de nanohidrogeles que protejan, transporten, dirijan y liberen compuestos con actividad farmacológica, es uno de los desafíos más importantes para la comunidad científica ya que para lograrlo es necesario considerar varios factores, siendo los de mayor interés la estabilidad y el tamaño nanométrico (<200 nm), esto es necesario para lograr una circulación prolongada en el torrente sanguíneo y fácil absorción celular a través del proceso de endocitosis. El tamaño nanométrico facilita el paso a través de las membranas celulares y al mismo tiempo una disminución de la captación por el Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) y, por lo tanto, también se incrementará el tiempo de circulación en la sangre. Otro criterio que se debe considerar es la biodegradabilidad, esta característica es necesaria para asegurar la eliminación del nanohidrogel después de que el fármaco es liberado y así minimizar la toxicidad asociada a la acumulación de estos productos en el organismo [54][92]. Se han desarrollado una gran variedad de nanohidrogeles que demuestran su efectividad como agentes de liberación controlada de fármacos. A continuación, se presentan algunos de estos estudios.

### **2.3.1. Cargado de fármacos en nanohidrogeles.**

En general, el cargado de fármacos se basa en el atrapamiento físico e interacciones covalentes y no covalentes entre los nanohidrogeles y las moléculas alojadas en su interior [54]. Por ejemplo, las moléculas utilizadas en terapia macromolecular como ADN, ARN y proteínas, son encapsuladas a través de atrapamiento físico [53]. Un nanohidrogel se considera una alternativa viable para la encapsulación de una gran variedad de moléculas ya que estado hinchado puede alojar en su interior hasta 30% en peso de una solución acuosa, superando la capacidad de carga de los liposomas y micelas poliméricas. Pero debido a su carácter hidrófilo se han utilizado principalmente para cargar fármacos de la misma naturaleza [44].

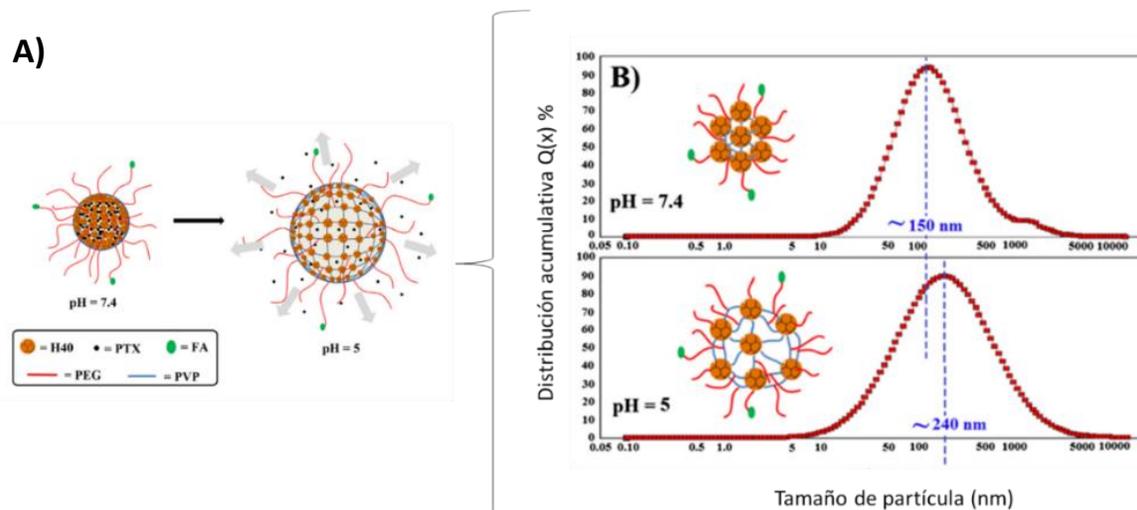
Como ejemplo de lo anterior, Manchun y cols., [93] realizaron un estudio utilizando dextrina como matriz polimérica y glioxal como agente de entrecruzamiento para la preparación de nanohidrogeles sensibles al pH, mediante el método de emulsión-entrecruzamiento. Los nanohidrogeles obtenidos presentaron un diámetro promedio entre 200 y 256 nm y se utilizaron para cargar doxorubicina (DOX) que es un fármaco hidrófilo usado ampliamente en el tratamiento de varios tipos de cáncer (mama, ovarios, gástrico, entre otros) y mediante estudios *in vitro* se demostró su efectividad. Posteriormente, estos mismos autores cambiaron el agente de entrecruzamiento por formaldehído, esto permitió disminuir el tamaño de partícula hasta  $146 \pm 1.3$  nm y también se reportó una menor citotoxicidad en comparación con los materiales diseñados previamente. La eficiencia de encapsulación fue similar en ambos estudios (23.5% p/v) [94].

Otro caso de nanohidrogeles cargados con moléculas hidrófilas fue reportado por Karnoosh-Yamchi y cols., [95] estos autores diseñaron nanohidrogeles sensibles al pH como vehículos para la liberación controlada de insulina. Los nanohidrogeles fueron preparados utilizando un copolímero tribloque de PNIPAM, poli(ácido metacrílico) (PMAA) y poli(hidroxietil metacrilato) (PHEM) (PNIPAM-b-PMAA-b-PHEM), MBA como agente entrecruzante y peróxido de benzoilo o persulfato de amonio como iniciadores. En esta investigación el cargado de insulina en los nanohidrogeles se realizó mediante un método de doble emulsión modificado y se utilizó alcohol polivinílico (PVA) como agente estabilizante. Posteriormente, se llevó a cabo un estudio de la liberación del fármaco hidrófilo variando el pH del medio, la temperatura se estableció en 37°C. El tamaño y morfología de los materiales se determinaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), se obtuvieron materiales con diámetro promedio entre 10 y 150 nm y con morfología esférica. Por otra parte, la eficiencia de cargado de insulina fue de 60%, este valor se determinó por HPLC y FT-IR.

A pesar de los resultados que se han obtenido en el cargado de fármacos hidrófilos, es conocido que muchas moléculas de interés farmacológico presentan baja o nula solubilidad en agua, siendo esta una de las principales características que ocasionan bajos perfiles

farmacológicos cuando no se utilizan sistemas basados en nanotecnología para su suministro. En este sentido, se ha demostrado que cuando se introducen segmentos hidrófobos en la estructura tridimensional del nanohidrogel, es posible incorporar fármacos con baja o nula solubilidad en agua. Un ejemplo de lo anterior fue reportado por Abandansari y cols., [96] estos autores realizaron un estudio para la obtención de nanohidrogeles sensibles al pH utilizando una técnica de polimerización en miniemulsión. Los nanohidrogeles diseñados están formados por dendrímeros de Boltorn® H40 (H40) y poli( $\epsilon$ -caprolactama) (H40-PCL) como núcleo hidrófobo y poli(vinilpiridina) (PVP) como agente de entrecruzamiento y como bloque sensible al pH. El grupo colgante de poli(etilenglicol) (PEG) se incorporó como segmento hidrofílico mediante ATRP en la mitad de las cadenas de PVP, PEG-(PVP)<sub>2</sub>, lo anterior se realizó con la finalidad de obtener una capa hidrófila que permitiera mejorar la dispersabilidad y estabilidad de los nanohidrogeles. Posteriormente, mediante una reacción de esterificación, se acopló ácido fólico al final de algunos grupos carboxilos libres del PEG como receptores de células cancerosas. Finalmente, se utilizó el método de membrana de diálisis para cargar paclitaxel (PTX) un fármaco insoluble en agua. Para evaluar el comportamiento de los nanohidrogeles al variar los valores de pH, se utilizó Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y TEM. Los resultados obtenidos demostraron que los nanohidrogeles presentan un diámetro promedio ( $D_p$ ) cercano a 150 nm cuando se exponen a un pH similar al del citosol (pH=7.4), sin embargo, cuando el nanohidrogel fue expuesto a un pH ácido (pH=5.0), se presentó un hinchamiento de las redes del material alcanzando un  $D_p \approx 240$  nm y subsecuente liberación del PTX.

En la **Figura 2.15** se presenta el hinchamiento de las redes del nanohidrogel por efecto del pH que permite la liberación PXT (A) y tamaño de partícula ( $D_p$ ) evaluado a diferentes valores de pH (B). La finalidad de la incorporación de una capa de PEG alrededor del nanohidrogel era evitar la degradación enzimática prematura del nanomaterial, prolongando su tiempo de circulación dentro del organismo y aumentando la captación del nanohidrogel por las células objetivo, además de proporcionarle alta biocompatibilidad y estabilidad al momento de circular por los vasos sanguíneos.



**Figura 2.15.** A) Nanohidrogel sensible al pH basado en H40-PCL y (PEG-(PVP)<sub>2</sub>) y mecanismo de liberación PXT a pH=5.0 por el hinchamiento de las redes del nanohidrogel y B) tamaño de partícula ( $D_p$ ) evaluado a pH=7.4 y 5.0, respectivamente [57].

Gupta y cols., [97] realizaron un estudio enfocado en aumentar el potencial terapéutico y reducir los efectos citotóxicos de la curcumina, que es un compuesto altamente hidrófobo, proponen la conjugación de la curcumina con nanohidrogeles de poli(b-amino éster) (C-PBAE) utilizando la química de adición de Michael. Los resultados evidenciaron un control en el diámetro promedio de partícula ( $D_p \approx 210$  nm), una liberación prolongada y moléculas de curcumina activas durante 48 horas. Estos factores permitieron aumentar el límite de concentración segura del fármaco ( $IC_{50} > 100$   $\mu\text{g/mL}$ ) en comparación con la curcumina libre que fue de  $IC_{50} > 5.3$   $\mu\text{g/mL}$ . Además, se demostró que los nanohidrogeles obtenidos presentaron una supresión efectiva y prolongada (por 24 horas) del estrés oxidativo mitocondrial inducido por peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) sobre el pretratamiento de células endoteliales con los materiales preparados. Este sistema de nanohidrogeles mejorado mediante la incorporación de marcadores específicos se sugiere como una alternativa de administración localizada de fármacos hidrófobos.

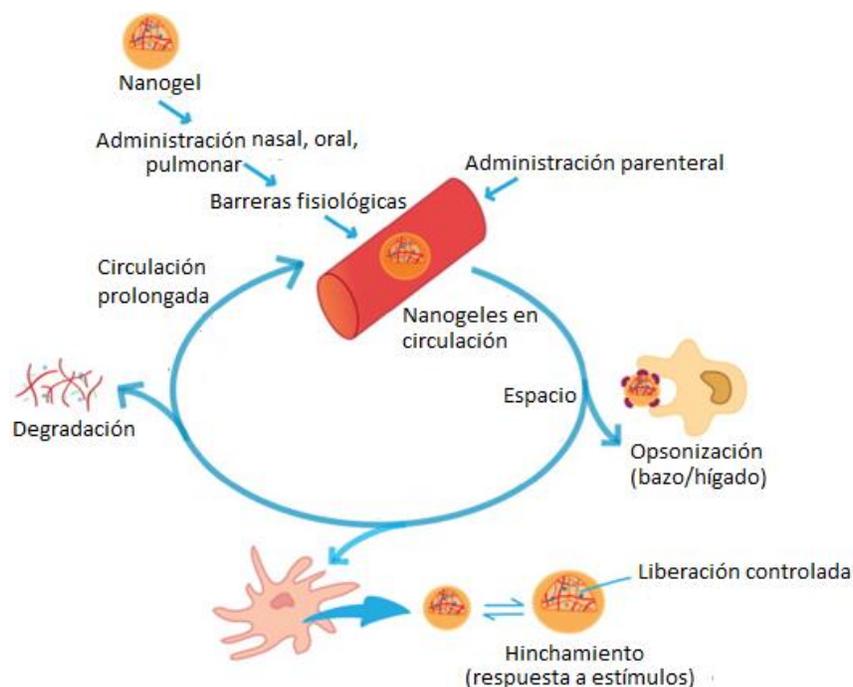
### 2.3.2. Liberación y liberación controlada de fármacos

Para que los nanohidrogeles o cualquier otro sistema nanométrico puedan llegar hasta un sitio de acción específico y liberar el fármaco alojado en su interior, tienen que atravesar diversas barreras fisiológicas, es decir, obstáculos del organismo que las nanoestructuras cargadas con fármaco deben superar para lograr su propósito, especialmente cuando se administra por una vía distinta a la parenteral, tales como: oral, pulmonar, nasal, gastroentérica, rectal, intraocular o transdérmica (**Figura 2.16**) [44].

La vía transdérmica como su nombre lo indica, implica el paso de los nanohidrogeles a través de las diferentes capas de la piel hasta llegar al sistema vascular. Sin embargo, dadas las características de las diferentes capas que constituyen la piel, esto es bastante difícil de lograr. En el caso de las otras vías, el paso de los nanohidrogeles se lleva a cabo a través de las diferentes mucosas que posee el cuerpo, tales como: tracto gastrointestinal, ojos, tubos bronquiales, nasal, rectal y vaginal. De todas las mucosas del cuerpo, la que reviste al intestino delgado es probablemente la que ofrece el mayor potencial para la internación de nanohidrogeles al sistema circulatorio. Sin embargo, estas nanoestructuras deben resistir el agresivo ambiente gastrointestinal para proteger la carga de fármaco y permanecer en el lumen intestinal el tiempo suficiente para ser transportadas por las células intestinales como los enterocitos y las células M, estas últimas están situadas dentro de los epitelios de los parches de Peyer [44].

Las características del epitelio intestinal hacen posible el transporte de los nanohidrogeles mediante dos posibles mecanismos: paracelular y transcelular. El primero implica el aprovechamiento de los espacios entre las células epiteliales, sin embargo, estos espacios son muy estrechos (diámetros de 0.3-1.0 nm) y su área total disponible es muy pequeña. El transporte transcelular ocurre por transcitosis, proceso en el cual los nanohidrogeles son absorbidos por las células (enterocitos y células M) mediante diferentes mecanismos de endocitosis, dependiendo de su tamaño, forma, suavidad, carga y receptores específicos de su superficie, finalmente son transportadas y liberadas en el medio basal [98]. Durante este transporte, los nanohidrogeles son confinados por las vesículas intracelulares desde donde

son tratados en las endosomas y finalmente en los lisosomas. En cada una de las etapas de transporte, los nanohidrogeles se exponen a diferentes pH's, que son característicos de cada uno de los compartimentos. También se exponen a enzimas o entornos reductores, situación que se aprovecha como estímulo para la liberación de la carga alojada en su interior [44].



**Figura 2.16.** Liberación *in vivo* de fármacos cargados en nanohidrogeles.

La vida media de la circulación de los fármacos cargados en nanohidrogeles se puede mejorar mediante la prevención de dos factores esenciales i) eliminación rápida (especialmente de moléculas pequeñas) y ii) degradación rápida (biomoléculas). No obstante, Owens III y cols., [98] demostraron que uno de los fenómenos más importantes que evitan la circulación prolongada de los nanomateriales en el cuerpo es la opsonización, es decir, la cobertura de los nanomateriales con proteínas de opsonina, este fenómeno ocasiona la captación de los nanomateriales por células fagocíticas y su subsecuente eliminación a través de los órganos de SFM (bazo e hígado), donde son absorbidos por los monocitos y macrófagos residentes. Este fenómeno es más frecuente y sucede más rápido en partículas con superficie hidrófoba, debido a que en el proceso de opsonización también participan proteínas del suero sanguíneo, proceso que no ocurre con las partículas de superficie hidrófila. Por lo tanto, uno de los

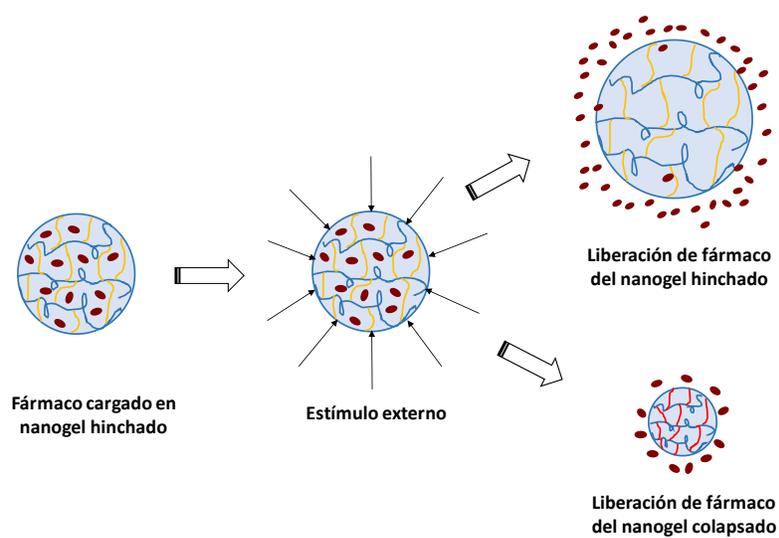
métodos más utilizados para prevenir la opsonización de nanomateriales, es el uso de grupos hidrófilos adsorbidos o injertados en la superficie de las nanopartículas, su función es bloquear las interacciones para evitar que las opsoninas puedan unirse a la superficie de las partículas. Los grupos utilizados por lo regular son cadenas poliméricas hidrófilas, entre estas las más utilizadas han sido las de PEG por su carácter hidrófilo y biocompatibilidad.

### 2.3.2.1. Mecanismo de liberación de fármacos de los nanohidrogeles

Mientras que la difusión pasiva es el mecanismo más común en la liberación de fármacos alojados en los hidrogeles, en los nanohidrogeles los mecanismos de liberación de fármacos pueden clasificarse como: i) difusión, ii) hinchamiento y químico [99]. El proceso de liberación del fármaco no sólo depende de las propiedades físicas de los nanohidrogeles, también tiene relación con la forma en la que está cargado o atrapado el compuesto bioactivo en las redes del nanohidrogel.

Tanto el proceso de hinchamiento como el de difusión pueden ser desencadenados por una gran cantidad de estímulos, si el fármaco está atrapado de forma física o covalente en los nanohidrogeles, el mecanismo de liberación tiende a ser la liberación controlada por estímulos de agentes terapéuticos (nanohidrogeles funcionales). De este modo, la liberación del fármaco puede ser controlada en respuesta a una condición predispuesta que satisfaga las necesidades fisiológicas en el lugar apropiado y en el momento adecuado [100].

El mecanismo de liberación controlado por hinchamiento es uno de los más comunes y sucede cuando el nanohidrogel se expone a estímulos externos, este hinchamiento ocasiona un incremento en el tamaño de malla del material permitiendo así la difusión de las moléculas hacia su exterior (**Figura 2.17**). En este caso, si el tamaño de malla lo permite el fármaco se liberará después del hinchamiento del material, por lo anterior, la liberación del fármaco dependerá principalmente de los tamaños de malla dentro de la matriz del nanohidrogel. La mayoría de las moléculas de bajo peso molecular pueden liberarse fácilmente de la malla, mientras que moléculas más grandes tendrán una liberación prolongada [53].



**Figura 2.17.** Modelos de liberación de fármacos de nanohidrogeles funcionales.

### III. JUSTIFICACIÓN

La nanotecnología se ha utilizado como una herramienta para el suministro eficiente de una gran variedad de fármacos y con efectos secundarios mínimos para los pacientes. Una de las alternativas que ha destacado por sus características únicas, son los nanohidrogeles, es decir, redes de polímeros entrecruzados que tienen la particularidad de absorber grandes cantidades de agua, soluciones acuosas o fluidos fisiológicos (30% p/v), dando lugar a materiales blandos y elásticos. Estas propiedades permiten alta eficiencia de encapsulación en el interior del nanohidrogel, buena estabilidad en presencia de sueros biológicos, además, pueden ser diseñados como materiales biodegradables y/o biocompatibles y con tamaños, morfologías, dispersidad y composición química controladas y con respuesta a estímulos externos (nanohidrogeles funcionales).

Para el diseño de nanohidrogeles funcionales se han empleado copolímeros en bloque anfífilos, que se pueden autoensamblar utilizando un disolvente selectivo para una de las fases, o bien, al aplicar estímulos específicos, como pH y/o temperatura, que son diferentes en un organismo en estado patológico en comparación con un organismo sano. Además, se pueden incorporar bloques biocompatibles y biodegradables en la estructura del nanohidrogel, ya que son requisitos indispensables en el diseño de materiales utilizados en aplicaciones biomédicas. Uno de los polímeros más utilizados es la poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM), esto se debe a que presenta una respuesta interesante a temperaturas cercanas a las del cuerpo humano (32°C) y esta propiedad puede modularse hasta temperaturas similares a las de los estados patológicos de interés (34-40°C), al incorporar bloques hidrófilos en su estructura. El poli(etilenglicol) (PEG) es uno de los polímeros más utilizados para este fin, debido a que es biocompatible, biodegradable y presenta buena resistencia tanto a la adsorción de proteínas como a la adhesión celular y estas características prologan su tiempo de circulación en el organismo.

Para la síntesis de los copolímeros en bloque anfífilos precursores de estos nanohidrogeles, se han utilizado técnicas RDRP como una alternativa sustentable y sin restricciones cuando su uso final está destinado hacia aplicaciones biomédicas. En estos sistemas de

polimerización los copolímeros en bloque anfífilos actúan como estabilizadores y por lo tanto se elimina el uso de agentes tensoactivos, que frecuentemente son utilizados en grandes cantidades para lograr la estabilización ( $5.3 \text{ mmol/dm}^3$ ). A pesar de que se pueden utilizar diversas rutas para la síntesis de copolímeros en bloque anfífilos, una alternativa prometedora es la técnica de polimerización radicalica controlada ATRP (*Atom Transfer Radical Polymerization*) ya que se puede obtener un control eficiente sobre el peso molecular del copolímero y una distribución de pesos moleculares estrecha,  $\text{Đ} < 1.5$ . Además, la polimerización se puede llevar a cabo a temperaturas por debajo de la LCST del PNIPAM ( $< 32^\circ\text{C}$ ). A pesar de estas ventajas, se ha observado que utilizar la ATRP para la síntesis de poliacrilamidas (como el PNIPAM) en medios acuosos es rápida y se producen polímeros con dispersidades amplias, lo que indica una pérdida del control ( $\geq 1.6$ ) y baja conversión de monómero (5.0 a 9.0%) dependientes de la temperatura y tiempo de reacción, así como de los componentes utilizados en el sistema ATRP (ligando y sistema catalítico). Estos resultados sugieren que el control de este tipo de polimerizaciones podría lograrse al controlar factores involucrados en su equilibrio dinámico. Por lo anterior, una opción para la síntesis de copolímeros en bloque en medio acuoso es la técnica ATRP-AGET, en este tipo de polimerizaciones se emplea una sal de cobre en su estado de oxidación más alto y un agente reductor, por lo que la reacción puede llevarse a cabo en presencia de trazas de oxígeno. Con esta técnica se han preparado copolímeros de hasta 121.7 kDa con conversiones  $> 85\%$ , además de peso molecular y dispersidades controlados ( $\text{Đ} < 1.2$ ).

Por lo anterior, en este trabajo la variante ATRP-AGET en solución acuosa homogénea se presenta como una nueva metodología para la síntesis de nanohidrogeles sensibles a la temperatura basados en poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) como bloque termosensible y poli(etilenglicol) ( $\text{PEG}_n$ )/poli(etilenglicol)  $\alpha$ -metil éter ( $\text{MPEG}_n$ ) como bloque hidrófilo y biocompatible. Por sus características controladas estos materiales se pueden utilizar como sistemas para la encapsulación de moléculas con actividad farmacología y subsecuente liberación controlada.

## IV. HIPÓTESIS

---

De acuerdo con los estudios enfocados en el diseño y desarrollo de nanohidrogeles funcionales (sensibles a la temperatura) utilizando diversas técnicas de polimerización se propone la siguiente hipótesis.

Mediante la técnica de ATRP-AGET en solución acuosa homogénea se sintetizarán copolímeros en bloque anfífilos autoensamblados, estos estarán formados por segmentos hidrófilos de poli(etilenglicol) o  $\alpha$ -metil-poli(etilenglicol) y poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) como segmento termosensible (PNIPAM-b-PEG<sub>n</sub>-b-PNIPAM y MPEG<sub>n</sub>-b-PNIPAM) y con la adición de un agente de entrecruzamiento se obtendrán nanohidrogeles. Debido a la naturaleza de los polímeros utilizados en la formulación los nanohidrogeles obtenidos presentarán sensibilidad a la temperatura y debido a su biocompatibilidad y características controladas, se espera que en un futuro puedan ser utilizados para alojar una amplia variedad de moléculas con actividad farmacológica.

## V. OBJETIVOS

### 5.1. OBJETIVO GENERAL

Obtener nanohidrogeles funcionales mediante la técnica de ATRP-AGET en solución acuosa homogénea a partir de copolímeros en bloque anfífilos de poli(etilenglicol) (PEG) o  $\alpha$ -metil-poli(etilenglicol) (MPEG), poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) como bloque termosensible y N, N'-metilenbisacrilamida (MBA) como agente entrecruzante.

### 5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Sintetizar y caracterizar macroiniciadores ATRP hidrófilos derivados de poli(etilenglicol) y  $\alpha$ -metil-poli(etilenglicol) con diferente peso molecular.
- 2) Establecer las condiciones de reacción de la técnica de ATRP-AGET en solución acuosa homogénea para la síntesis de copolímeros en bloque anfífilos de poli(etilenglicol) o  $\alpha$ -metil-poli(etilenglicol) y poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) (PNIPAM -b-PEG<sub>n</sub>-b- PNIPAM y MPEG<sub>n</sub>-b-PNIPAM) con características controladas y evaluar su respuesta a la temperatura.
- 3) Evaluar el efecto del entrecruzamiento con N,N'-metilenbisacrilamida (MBA) y longitud de la cadena de bloque hidrófilo en la síntesis de nanohidrogeles funcionales de poli(etilenglicol) o  $\alpha$ -metil-poli(etilenglicol) y poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) al evaluar su respuesta termoinducida.

## VI. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La primera etapa incluye la síntesis y caracterización de macroiniciadores ATRP que también son utilizados como estabilizadores y que fueron obtenidos a partir de PEG (Br-PEG<sub>n</sub>-Br) o MPEG (MPEG<sub>n</sub>-Br). Estos macroiniciadores fueron rigurosamente caracterizados mediante FT-IR, GPC, RMN y MALDI-TOF, lo anterior con la finalidad de obtener macroiniciadores para ser utilizados en ATRP.

En la segunda etapa se sintetizaron copolímeros en bloque anfífilos mediante la técnica ATRP-AGET en solución acuosa homogénea, utilizando como bloque hidrófilo macroiniciadores de 2-bromo-2-metilpropionilo derivados de poli(etilenglicol) (PEG<sub>n</sub>) o  $\alpha$ -metil éter (MPEG<sub>n</sub>) y N-isopropilacrilamida (NIPAM) como bloque termosensible. Se evaluó el efecto de dos sales de cobre (CuBr<sub>2</sub> y CuCl<sub>2</sub>) sobre el control de la polimerización y mediante <sup>1</sup>H RMN y dispersión de luz dinámica (DLS) se evaluó el comportamiento de estos materiales al aumentar progresivamente la temperatura desde 20 hasta 50°C.

Para lograr el entrecruzamiento de los materiales, en la tercera etapa se agregó al sistema N,N'-metilenbisacrilamida (MBA) como agente entrecruzante. Se evaluó sistemáticamente el efecto de la concentración molar (% molar) de MBA y el tamaño de cadena de MPEG (DP=44 y 117) y PEG (DP=43, 74 y 131) sobre la composición química, diámetro promedio (D<sub>p</sub>), temperatura de transición de fase en volumen (VPTT), viscosidad aparente y morfología de los nanohidrogeles.

### 6.1. MATERIALES Y REACTIVOS

#### 6.1.1. Síntesis y caracterización de macroiniciador ATRP de PEG y MPEG

Poli(etilenglicol) (PEG=2000, 3350 y 6000 Da) y  $\alpha$ -metil-poli(etilenglicol) (MPEG=750, 2000 y 5000 Da) fueron adquiridos en Aldrich, estos polímeros se secaron antes de su uso en una estufa a temperatura ambiente y vacío (10 mm Hg) durante 24 horas. El diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, JTBK) se destiló dos veces utilizando pentóxido de fósforo como agente secante (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, Aldrich, 99%). La trietilamina (TEA, Aldrich, 99%) se secó bajo reflujo con hidruro

de calcio ( $\text{CaH}_2$ ) y posteriormente se destiló antes de ser usada. Bromuro de 2-bromo-2-metilpropionilo (BIBB, Aldrich 98%), tetrahidrofurano (THF, JTBK, 99%), metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ , JTBK, 97%), metanol deuterado 99.8 %D ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , Aldrich), trans-2-[3-(4-terbutilfenil)-2-metil-2-propeniliden] malononitrilo (DCTB, Aldrich), trifluorometan sulfonato de plata ( $\text{AgTFS}$ , Aldrich, 99%), trifluoroacetato de sodio ( $\text{NaTFA}$ , Aldrich, 99%) y cloroformo deuterado 99.8 %D ( $\text{CDCl}_3$  Aldrich,) fueron utilizados sin tratamiento previo. El trifluoroacetato de plata ( $\text{AgTFA}$ ) se preparó a partir de nitrato de plata acuoso y ácido trifluoroacético, el producto obtenido se evaporó y se lavó con metanol y éter dietílico, finalmente se secó a vacío (1 mm Hg) durante la noche a temperatura ambiente.

### 6.1.2. Síntesis de copolímeros en bloque anfífilos

La N-isopropilacrilamida (NIPAM, 99%) se obtuvo de Boc Sciences, se purificó recristalizando tres veces con n-hexano, los cristales fueron secados bajo vacío durante 48 horas. N,N,N',N'',N'''-pentametildietilentriamina (PMDETA; 99%, Aldrich) y 1,1,4,7,10,10-hexametiltriilentetramina (HMTETA; 97%, Aldrich) fueron destilados antes de ser usados.  $\text{CuBr}_2$  (99.99%, Aldrich),  $\text{CuCl}_2$  (99.99%, Aldrich), L-ácido ascórbico (99%, Aldrich) y ácido fosfotúngstico (99%, Aldrich) se utilizaron sin purificación previa. Agua desionizada que se obtuvo de columnas Milli-Q PLUS, Millipore, con una resistividad mínima de 18.0  $\text{M}\Omega$  cm. Membranas de diálisis de celulosa regenerada con tamaño de poro de 1000 Da (Spectra). Tetrahidrofurano (Aldrich  $\geq 99.9\%$ ), cloroformo deuterado,  $\text{CDCl}_3$  (Aldrich, 99.96% D), óxido de deuterio,  $\text{D}_2\text{O}$  (Aldrich, 99.99% D). Rejillas de cobre cubiertas con carbono de tamaño de malla 300 (Lacey 300 Mesh Cop).

### 6.1.3. Síntesis de nanohidrogeles termosensibles de PNIPAM y PEG/MPEG

Se utilizaron los mismos materiales y reactivos utilizados en la sección de síntesis de copolímeros en bloque anfífilos, la única variante fue el uso de N, N'-metilenbisacrilamida, MBA (99%, Aldrich) como agente entrecruzante. En este caso sólo se utilizaron los macroiniciadores ATRP de poli(etilenglicol  $\alpha$ -metil éter [(MPEG) $_{44}$ -Br, (MPEG) $_{117}$ -Br] y poli(etilenglicol [Br-(PEG) $_{43}$ -Br, Br-(PEG) $_{74}$ -Br, Br-(PEG) $_{131}$ -Br].

## 6.2. ANÁLISIS Y EQUIPOS

### 6.2.1. Resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN)

Los espectros fueron adquiridos en un espectrómetro Bruker Avance III, a una frecuencia de 500 MHz, usando  $\text{CDCl}_3$  o  $\text{D}_2\text{O}$  como disolventes y tetrametilsilano (TMS) como estándar interno, a una temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . Los desplazamientos químicos son reportados en partes por millón (ppm, escala  $\delta$ ) relativo a las señales de los disolventes de RMN.

**$^1\text{H}$  RMN con variación de temperatura.** Las muestras fueron preparadas a una concentración de  $20 \text{ mg mL}^{-1}$ , por disolución directa de la muestra de polímero en  $\text{D}_2\text{O}$  a  $25^\circ\text{C}$  durante 24 h. La solución se transfirió a un tubo de vidrio el cual fue calentado de  $20$ - $50^\circ\text{C}$  en intervalos de  $5^\circ\text{C}$ . En cada lapso de temperatura la muestra se equilibró durante 300 segundos y posteriormente se registró un espectro de  $^1\text{H}$  RMN.

### 6.2.2. Espectroscopía infrarroja (IR)

La caracterización por esta técnica se realizó en un equipo Thermo-Nicolet iS10, mediante ATR (*Attenuated total reflection*). Los espectros fueron colectados con 64 barridos, con una resolución espectral de  $2 \text{ cm}^{-1}$  en modo de transmitancia desde  $4000$  a  $400 \text{ cm}^{-1}$ .

### 6.2.3. Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

Las muestras de macroiniciadores fueron analizadas por cromatografía de permeación en gel (GPC) utilizando un cromatógrafo Waters Alliance modelo 2695, este estaba equipado con un detector de índice de refracción modelo 2414 y dos columnas "PL-Gel  $5 \mu\text{m}$  Mixed C". Las muestras se disolvieron en THF anhidro ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) y las soluciones obtenidas fueron filtradas en membranas de nylon de  $0.2 \mu\text{m}$ . Se utilizó THF como eluyente a un flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  a  $30^\circ\text{C}$ . El sistema fue calibrado utilizando estándares de poliestireno ( $M_p = 1,350$  a  $1,997,000 \text{ g mol}^{-1}$ ) y la corrección de los cambios en los volúmenes hidrodinámicos se realizó con las constantes de Kuhn-Mark-Houwink-Sakurada para el sistema PEG-THF ( $\eta = 3.39 \times 10^{-4} M^{0.66}$ ) [101].

El peso molecular y la distribución de peso molecular de los copolímeros dibloque y tribloque se determinaron por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), en un cromatógrafo Hewlett-Packard (HPLC series 1100) equipado con dos columnas “PL-Gel 5  $\mu\text{m}$  Mixed C” (300 x 7.5 mm) con tamaño de poro de 106 y 105 Å y detector de índice de refracción. Como disolvente se empleó THF grado HPLC a una velocidad de flujo de 1 mL/min a 40°C. El sistema se calibró con estándares de poliestireno ( $M_p=1,350$  a  $7.0 \times 10^6$  g mol<sup>-1</sup>).

#### 6.2.4. Espectroscopía de masas (MALDI-TOF)

La determinación de peso molecular de los macroiniciadores también se realizó por MALDI-TOF MS, utilizando un espectrómetro de masas Bruker Daltonics Autoflex Speed (Bruker Daltonics, Billerica Ma.). El sistema utiliza un láser Nd:YAG de frecuencia triplicada (355 nm) y una frecuencia de repetición de 2 kHz (Smartbeam-II<sup>TM</sup>). Las mediciones se realizaron en modo reflectivo (para muestras con un rango de masa de 0.7 a 5 kDa) o en modo lineal (para muestras con masas molares de hasta 5 kDa). Se utilizó el modo de iones positivos para todos los análisis con un voltaje de aceleración de 20.00 Kv y extracción retardada. Se detectaron iones en el rango de masa ( $m/z$ ) de 700–7000 con una frecuencia de muestreo de  $5.0 \text{ GS s}^{-1}$  para el modo reflectivo y  $0.63 \text{ GS s}^{-1}$  para el modo lineal. Los iones recolectados se agregaron con más de 500 disparos a una frecuencia de 2000 Hz, para ello la sonda láser se movió lentamente para evitar señales deficientes. La energía de la potencia del láser se moduló para producir señales suficientemente intensas (60% en modo lineal y 80% en modo reflectivo). Para la calibración externa se utilizó: insulina (5734.52 Da), citocromo c (6161.05 Da), mioglobina (8476.66 Da), ubiquitina I (8565.89 Da), citocromo c (12360.97 Da) y mioglobina (16952.31 Da), con esto se asegura una precisión de masa de aproximadamente 50 ppm. La resolución de los espectros MALDI alcanzó valores entre 2,000 y 18,000 Da, dependiendo de la distribución de masa molar, pureza y agente catiónico utilizados.

#### 6.2.4.1. Preparación de la muestra

Los polímeros de PEG, MPEG y sus ésteres correspondientes se disolvieron en CH<sub>3</sub>OH o THF a una concentración de 5 mg mL<sup>-1</sup>. La solución de DCTB se preparó a una concentración de 20 mg mL<sup>-1</sup> y las soluciones de agente catiónico (AgTFS, AgTFA, NaTFA) a una concentración de 0.1 M. Enseguida, se mezclaron 10 µl de la solución del polímero, 10 µl de DCTB y 2.0 µl de la de agente catiónico. Posteriormente, una gota de cada mezcla se depositó en la placa metálica del espectrómetro MALDI-TOF MS, las muestras se secaron al aire libre y a temperatura ambiente antes de ser analizadas.

#### 6.2.4.2. Análisis de datos

La adquisición de datos se realizó utilizando el Software flexControl 3.4 (Bruker Daltonics, Billerica Ma.) y el análisis de datos de la masa de cada pico monoisotópico seleccionado se determinó utilizando un algoritmo de centroide calculado con el Software FlexAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics, Billerica Ma.) asumiendo la composición elemental de PEG. Los datos se procesaron utilizando PolyTools 1.31 (Bruker Daltonics).

#### 6.2.4.3. Cálculo de $M_n$ , $M_w$ , y $\mathcal{D}$ con MALDI-TOF MS

Los valores de peso molecular promedio en número ( $M_n$ ), peso molecular promedio en peso ( $M_w$ ) y dispersidad ( $\mathcal{D}$ ) para los polímeros de PEG, MPEG y sus ésteres correspondientes se calcularon sin la ayuda del software.  $M_n$  se calculó como sigue:  $M_n = \Sigma(n_i M_i) / \Sigma n_i$ , donde,  $n_i$  representa la intensidad encontrada en los espectros de MALDI y  $M_i$  la relación  $m/z$ .  $M_w$  se calculó como sigue:  $M_w = \Sigma(n_i M_i^2) / \Sigma(n_i M_i)$  y  $\mathcal{D}$  se determinó a partir de la relación  $M_w / M_n$ .

#### 6.2.5. Dispersión de luz dinámica (DLS)

El estudio de respuesta a la temperatura de los copolímeros se realizó por DLS, en un equipo Microtac modelo Nanotracs Wave II Q utilizando el software Flex (TSET) que permite el control de la temperatura de la muestra. Los materiales se re-dispersaron en agua desionizada a una concentración de 0.1% p/v. Las mediciones se programaron para obtener 6 repeticiones

a cada una de las temperaturas experimentales (20-55°C), la longitud de onda del láser del equipo se encontraba en 780 nm.

#### **6.2.6. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

La morfología de algunos de los copolímeros sintetizados se determinó a dos temperaturas (25 y 37°C) por microscopía electrónica de transmisión en un equipo FEI modelo Titán 80-300 kV. La preparación de las muestras para las mediciones en TEM se llevó a cabo como se describe a continuación: los copolímeros se prepararon en solución acuosa al 0.1% p/v y el agente de tinción (ácido fosfotúngstico) al 0.2% p/v. Estas soluciones junto con las rejillas de cobre se colocaron en una estufa con temperatura controlada por 30 minutos. Unas gotas de la solución de cada copolímero se depositaron en las rejillas antes mencionadas. Las rejillas con la muestra se dejaron secar por media hora en la estufa a temperatura controlada. A esta muestra se le agregaron unas gotas de la solución de ácido fosfotúngstico, dejándose reposar durante 20 segundos, finalmente, las muestras se secaron por 30 minutos a 25 y 37°C, respectivamente.

#### **6.2.7. Viscosidad aparente**

Todos los experimentos de reología se realizaron utilizando un reómetro Anton Parr Physica MCR 501, se utilizó una geometría cono-plato (25 mm 1°). Las temperaturas de medición fueron desde 20-55°C. Los parámetros de entrada para el análisis en estado estacionario que se utilizaron fueron: 30 puntos de medición con intervalos de 10 segundos y el intervalo de medición de velocidades de corte fue de 0.0001 a 1000 s<sup>-1</sup> (este intervalo máximo fue necesario en las muestras que presentaron mayor viscosidad).

### 6.3. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MACROINICIADORES ATRP

#### 6.3.1. Síntesis de macroiniciadores ATRP de poli(etilenglicol) y $\alpha$ -metil poli(etilenglicol)

En un matraz de tres bocas se colocaron 0.001 moles de  $\text{OH}-(\text{PEG})_n-\text{OH}$  o  $\text{CH}_3-(\text{PEG})_n-\text{OH}$  y se disolvieron en 80 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , posteriormente se agregaron 0.006 moles de TEA (en el caso de PEG o 0.003 moles para MPEG), todos los componentes se mezclaron bajo agitación magnética y se enfriaron hasta  $0^\circ\text{C}$ . Después, se disolvieron 0.002 moles de bromuro de 2-bromo-2-metilpropionilo, BIBB (en el caso de PEG o 0.001 moles para MPEG) en 20 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco y se agregó gota a gota y bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  durante una hora, finalmente la temperatura se incrementó hasta  $40^\circ\text{C}$  y se dejó en reacción por 7 horas. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se concentró en un evaporador rotatorio. El concentrado se diluyó con una cantidad de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se extrajo con una solución acuosa de  $\text{NaHCO}_3$  (10% p/v). El extracto orgánico se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro y después se filtró, enseguida se eliminó el disolvente orgánico mediante vacío a temperatura ambiente.

#### 6.3.2. Caracterización de macroiniciadores ATRP de poli(etilenglicol) y $\alpha$ -metil poli(etilenglicol).

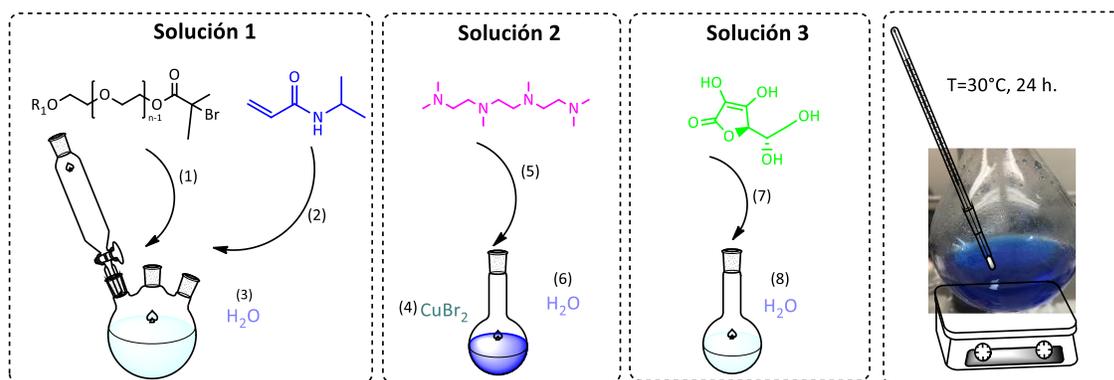
Los parámetros moleculares de peso molecular, distribución de peso molecular y funcionalización de cada macroiniciador, se determinaron mediante cromatografía de permeación en gel (GPC), espectroscopía infrarroja (FT-IR), resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) y MALDI (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz) acoplada a un analizador TOF (tiempo de vuelo).

### 6.4. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE COPOLÍMEROS EN BLOQUE ANFÍFILOS MEDIANTE ATRP-AGET EN SOLUCIÓN ACUOSA HOMOGÉNEA

Se sintetizaron copolímeros dibloque y tribloque mediante la técnica ATRP-AGET, utilizando los macroiniciadores de  $(\text{PEG})_n$  y  $(\text{MPEG})_n$  que fueron sintetizados y caracterizados previamente. El contenido de sólidos inicial para todos los copolímeros preparados fue de 15% p/v. El agua desionizada utilizada como medio de reacción se

desgasificó previamente en un tubo Schlenk con burbujeo de nitrógeno ( $N_2$ ) y ultrasonido por 30 min.

En una síntesis típica como la polimerización **P2** mostrada en la **Tabla 6.1**, se colocaron 0.3425 g de  $(MPEG)_{44}-Br$  (0.1615 mmol) y 1.8277 g de NIPAM (16.1512 mmol) en un matraz de Schlenk de tres bocas con capacidad de 100 mL previamente desgasificado con burbujeo de nitrógeno ( $N_2$ ) por 30 minutos, enseguida se agregaron 9.0 g de agua desionizada y desgasificada, la mezcla se agitó hasta que los componentes se disolvieron completamente bajo flujo de  $N_2$  y temperatura ambiente (Solución 1). Posteriormente, en viales desgasificados y sellados se prepararon las soluciones acuosas de 0.0361 g (0.1615 mmol) de  $CuBr_2$  y 0.0558 g, (0.2423 mmol de HMTETA, Solución 2), además de 0.0284 g, 0.1615 mmol de ácido ascórbico (Solución 3). Las relaciones molares de los diferentes ensayos (**P1-P6**) también se muestran en la **Tabla 6.1**.



**Figura 6.1.** Proceso de síntesis de copolímeros dibloque y tribloque de poli(N-isopropilacrilamida) y macroiniciadores de  $\alpha$ -metil éter/poli(etilenglicol) mediante ATRP-AGET en medio acuoso.

A la mezcla de monómero e iniciador preparada previamente (Solución 1) se le añadió la solución del complejo catalítico (Solución 2) con ayuda de una cánula y se continuó con agitación hasta formar una mezcla homogénea de color azul transparente. Finalmente, el matraz Schlenk previamente adaptado con un embudo de adición, se colocó en un baño de hielo ( $4^{\circ}C$ ) y se le agregó gota a gota la solución de ácido ascórbico (Solución 3). Enseguida se inició la polimerización poniendo el sistema a  $30^{\circ}C$  y agitación constante. La reacción se

detuvo después de 24 horas exponiendo al aire la mezcla. La ilustración del proceso de reacción se muestra en la **Figura 6.1**.

**Tabla 6.1.** Composición de soluciones acuosas empleadas en las polimerizaciones ATRP-AGET para la síntesis copolímeros dibloque (**P1-P3**) y tribloque (**P4-P6**).

ID	Tipo De bloque hidrófilo	DP <sub>MPEG/PEG</sub>	MI <sub>ATRP</sub> (mmol)	NIPAM (mmol)	CuBr <sub>2</sub> /HMTETA (mmol)	Ácido ascórbico (mmol)
P1		CH <sub>3</sub> -PEG <sub>15</sub>	0.1897	18.9716	0.1897/0.2846	0.1897
P2	MPEG <sup>a</sup>	CH <sub>3</sub> -PEG <sub>44</sub>	0.1615	16.1512	0.1615/0.2423	0.1615
P3		CH <sub>3</sub> -PEG <sub>117</sub>	0.1395	13.9538	0.1395/0.2093	0.1395
P4		PEG <sub>43</sub>	0.1717	17.1651	0.3063/0.4594	0.3063
P5	PEG <sup>b</sup>	PEG <sub>74</sub>	0.1562	15.6243	0.3125/0.4687	0.3125
P6		PEG <sub>131</sub>	0.1329	13.2901	0.2658/0.3987	0.2658

$([MI_{ATRP} \text{ MPEG}]/[NIPAM]/[CuBr_2]/[HMTETA]/[AA])^a = ([1]/[100]/[1]/[1.5]/[1])$

$([MI_{ATRP} \text{ PEG}]/[NIPAM]/[CuBr_2]/[HMTETA]/[AA])^b = ([1]/[100]/[2]/[3]/[2])$

Sólidos iniciales=15 %

Una porción de esta mezcla final se liofilizó (liofilizadora Labconco Freezone) para eliminar el agua y posteriormente se caracterizó por <sup>1</sup>H RNM para determinar la conversión a partir de la relación de integración entre cada bloque. La purificación de cada mezcla de reacción se realizó en membranas de diálisis con tamaño de poro de 1000 Da por 48 horas a 26°C. El resto de la mezcla purificada se liofilizó para eliminar la cantidad de agua para su posterior caracterización por RMN y SEC.

### 6.5. SÍNTESIS DE NANOHIROGELES TERMOSENSIBLES DE PNIPAM Y PEG/MPEG MEDIANTE ATRP-AGET EN SOLUCIÓN ACUOSA

Los materiales entrecruzados también fueron preparados mediante ATRP-AGET en agua a 30°C, con un contenido inicial de sólidos de 15% p/v. Se siguió la misma metodología utilizada en la preparación de copolímeros dibloque o tribloque descrita en la sección anterior con la variante de la adición de MBA como agente de entrecruzamiento. Los componentes de las reacciones **R1-R21** se muestran en la **Tabla 6.2**. Por ejemplo, en la reacción **R1**,

0.3640 g de (MPEG)<sub>44</sub>-Br (0.1717 mmol) y 1.9424 g de NIPAM (17.1651 mmol) se colocaron en un matraz de Schlenk de tres bocas con capacidad de 100 mL previamente desgasificado con burbujeo de nitrógeno (N<sub>2</sub>) por 30 minutos, enseguida se agregaron 9.0 g de agua desionizada y desgasificada, la mezcla se agitó hasta que los componentes se disolvieron completamente bajo flujo de N<sub>2</sub> y temperatura ambiente. Posteriormente, en viales desgasificados y sellados se prepararon las soluciones acuosas de: (1) CuBr<sub>2</sub>/HMTETA, (0.0383 g/0.0593 g; 0.1717 mmol/ 0.2575 mmol), (2) ácido ascórbico (0.0302 g, 0.1717 mmol y (3) MBA (0.0140 g/10 mL; 0.0091 mmol), que se agregaron en ese orden.

**Tabla 6.2.** Componentes de las reacciones **R1-R21** para la preparación de nanohidrogeles termosensibles de poli(N-isopropilacrilamida) y poli(etilenglicol)/ $\alpha$ -metil éter.

Bloque hidrófilo (MPEG/PEG)	ID	MI (mmol)	NIPAM (mmol)	CuBr <sub>2</sub> /HMTETA (mmol)	Ácido ascórbico (mmol)	% molar de MBA
CH <sub>3</sub> -PEG <sub>44</sub>	<b>R0-A</b>	0.1717	17.1651	0.2575/0.1717	0.1717	<b>0.00</b>
	R1	0.1717	17.1651	0.2575/0.1717	0.1717	0.05
	R2	0.1717	17.1651	0.2575/0.1717	0.1717	0.10
	R3	0.1717	17.1651	0.2575/0.1717	0.1717	0.15
	R4	0.1717	17.1651	0.2575/0.1717	0.1717	0.17
CH <sub>3</sub> -PEG <sub>117</sub>	<b>R0-B</b>	0.1395	13.9538	0.1395/0.2093	0.1395	<b>0.00</b>
	R5	0.1395	13.9538	0.1395/0.2093	0.1395	0.05
	R6	0.1395	13.9538	0.1395/0.2093	0.1395	0.10
	R7	0.1395	13.9538	0.1395/0.2093	0.1395	0.15
	R8	0.1395	13.9538	0.1395/0.2093	0.1395	0.17
PEG <sub>43</sub>	<b>R0-C</b>	0.1733	17.3312	0.3466/0.5199	0.3466	<b>0.00</b>
	R10	0.1733	17.3312	0.3466/0.5199	0.3466	0.05
	R11	0.1733	17.3312	0.3466/0.5199	0.3466	0.10
	R12	0.1733	17.3312	0.3466/0.5199	0.3466	0.15
	R13	0.1733	17.3312	0.3466/0.5199	0.3466	0.17

## METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

## TESIS

	<b>R0-D</b>	0.1562	15.6271	0.3125/0.4688	0.3125	<b>0.00</b>
	R14	0.1562	15.6271	0.3125/0.4688	0.3125	0.05
PEG <sub>74</sub>	R15	0.1562	15.6271	0.3125/0.4688	0.3125	0.10
	R16	0.1562	15.6271	0.3125/0.4688	0.3125	0.15
	R17	0.1562	15.6271	0.3125/0.4688	0.3125	0.17
	<b>R0-E</b>	0.1329	13.2901	0.2658/0.3987	0.2658	<b>0.00</b>
	R18	0.1329	13.2901	0.2658/0.3987	0.2658	0.05
PEG <sub>131</sub>	R19	0.1329	13.2901	0.2658/0.3987	0.2658	0.10
	R20	0.1329	13.2901	0.2658/0.3987	0.2658	0.15
	R21	0.1329	13.2901	0.2658/0.3987	0.2658	0.17

$([MI\ MPEG]/[NIPAM]/[CuBr_2]/[HMTETA]/[AA])^a = ([1]/[100]/[1]/[1.5]/[1])$

$([MI\ PEG]/[NIPAM]/[CuBr_2]/[HMTETA]/[AA])^b = ([1]/[100]/[2]/[3]/[2])$

MI ATRP<sup>c</sup> = Macroiniciador ATRP

Sólidos iniciales = 15 %

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MACROINICIADORES DE PEG Y MPEG

#### 7.1.1. Caracterización de poli(glicoles) de PEG y MPEG

Las masas molares de seis muestras de poli(oxialquilenos) (**1a-f**) se determinaron por MALDI-TOF MS y posteriormente fueron comparadas con las obtenidas por RMN y SEC, se utilizó THF como disolvente en todas las técnicas de análisis. De los espectros de masas obtenidos mediante MALDI-TOF, se seleccionó el pico que presentó la mayor intensidad en la distribución de masas molares y se definió como peso molecular pico experimental ( $M_p$  experimental,  $[M_p+Na]^+$ , Da). Adicionalmente, este valor se comparó con el peso molecular teórico pico ( $M_p$  teórico,  $[M_p+Na]^+$ , Da), que corresponde al peso molecular obtenido para el grado de polimerización pico ( $DP_p$ ) y sus correspondientes sustituyentes en las posiciones  $\alpha$  y  $\omega$  de los seis polímeros evaluados. Posteriormente, de los mismos espectros se determinaron los valores promedio de peso molecular ( $M_n$  MALDI, Da), grado de polimerización promedio ( $DP_n$  MALDI,  $M_n$  MALDI/44.053) y dispersidad ( $\mathcal{D}$ ). Estos valores experimentales se compararon con los valores teóricos de las masas molares para PEG o MPEG, obteniéndose una buena concordancia entre estos valores ( $\Delta M \approx 1$ ). Lo anterior nos permitió establecer la fórmula molecular como  $HO(CH_2CH_2O)_nH$  para PEG y  $CH_3O(CH_2CH_2O)_nH$  para MPEG en los seis polímeros de poli(oxialquileno) que fueron caracterizados por MALDI-TOF MS.

Al comparar los resultados de peso molecular obtenidos por MALDI ( $M_n$  MALDI, Da) con los obtenidos por SEC ( $M_n$  SEC, Da), mostrados en la **Tabla 7.1**, se aprecian algunas diferencias, los valores obtenidos por SEC siempre fueron mayores (entre 600 y 3,600 Da en los PEG y entre 100 y 2,800 Da en los MPEG), estas diferencias se observaron a pesar de la corrección a los cambios en los volúmenes hidrodinámicos con las constantes de Kuhn-Mark-Houwink-Sakurada para el sistema PEG-THF ( $[\eta] = 3.39 \times 10^{-4} M^{0.66}$ ) [101]. Adicionalmente, también se determinó el peso molecular por RMN ( $M_n$  RMN, Da) y se observó que estos valores mostraron mayor concordancia con los determinados por MALDI-TOF, entre 20 y 440 Da

para los dos tipos de poli(glicoles) en estudio. Con estos resultados se puede inferir que el fenómeno de supresión de iones está ausente durante el análisis MALDI, esto se atribuye a las dispersidades estrechas ( $\bar{D} < 1.03$ ) obtenidas para los dos poli(glicoles) [102].

**Tabla 7.1.** Caracterización de masas molares de los poli(glicoles) PEG y MPEG por MALDI-TOF MS, RMN y SEC en THF antes de la esterificación con bromuro de 2-bromoisobutirilo.

Muestra	MALDI-TOF MS*					<sup>1</sup> H-RMN		SEC		
	M <sub>p</sub> teórico ([M <sub>p</sub> +Na] <sup>+</sup> ) (Da) <sup>a</sup>	M <sub>p</sub> exp. ([M <sub>p</sub> +Na] <sup>+</sup> ) (Da) <sup>b</sup>	M <sub>n</sub> MALDI (Da) <sup>c</sup>	DP <sub>n</sub> MALDI	Đ	M <sub>n</sub> RMN (Da) <sup>c</sup>	DP RMN	M <sub>n</sub> (Da) <sup>c</sup>	DP	Đ
<b>1<sup>a</sup></b>	1935.303	1936.331	1845.792	41.49	1.03	1876.885	42.20	2472	56	1.1
<b>1<sup>b</sup></b>	3300.960	3301.365	3387.090	76.477	1.00	3522.105	79.54	4916	112	1.1
<b>1<sup>c</sup></b>	5812.006	5812.508	5894.964	133.41	1.00	5971.736	135.15	9508	216	1.1
<b>1<sup>d</sup></b>	715.834	715.343	710.932	15.729	1.03	669.323	14.78	824	19	1.1
<b>1<sup>e</sup></b>	1993.384	1993.338	1944.913	43.74	1.01	1965.605	44.21	2683	61	1.1
<b>1<sup>f</sup></b>	5209.285	5210.323	5116.76	115.74	1.01	5555.810	125.71	7939	180	1.1

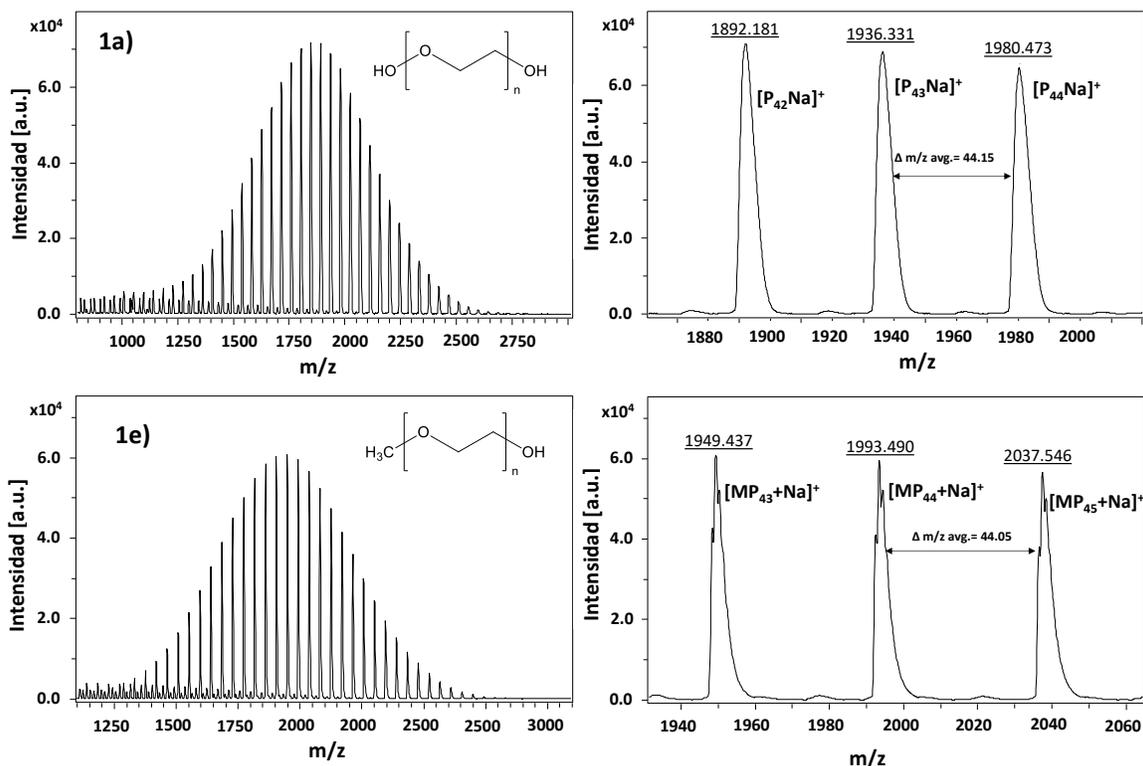
\*Se utilizaron DCTB como matriz, NaTFA como agente cationizante.

<sup>a</sup>M<sub>p</sub> experimental, [M<sub>p</sub>+Na]<sup>+</sup>, Da: peso molecular pico experimental, obtenido del ion molecular de mayor intensidad en los espectros de masas-MALDI.

<sup>b</sup>M<sub>p</sub> teórico, [M<sub>p</sub>+Na]<sup>+</sup>, Da: peso molecular pico teórico, calculado a partir de la fórmula molecular de los poli(glicoles) y el grado de polimerización pico (DP<sub>p</sub>).

<sup>c</sup>M<sub>n</sub>: peso molecular teórico obtenido por MALDI, RMN y SEC, respectivamente.

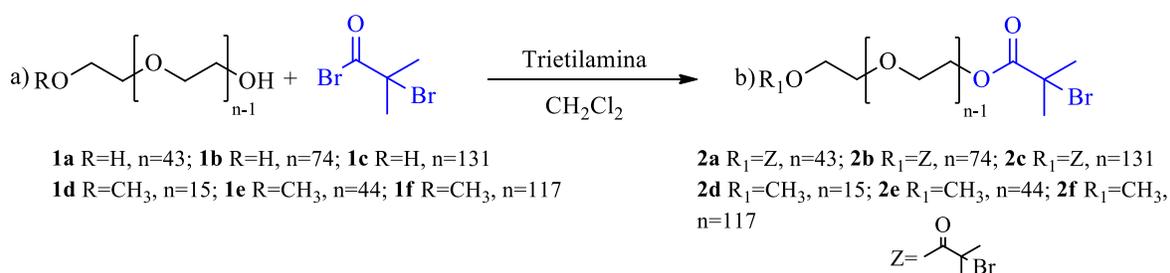
En los espectros de MALDI-TOF de las muestras de PEG y MPEG (**1a-f**) que fueron evaluadas con el sistema de ionización DCTB/NaTFA, solo se observó un tipo de ion molecular para PEG ([P<sub>n</sub>+Na]<sup>+</sup>) y MPEG ([MP<sub>n</sub>+Na]<sup>+</sup>). Esto indica la ausencia de reacciones secundarias en todas las muestras analizadas independientemente de las condiciones de análisis. Como evidencia de lo anterior, en la **Figura 7.1** se muestran los espectros de masas para PEG (**1a**) y MPEG (**1e**) con M<sub>p</sub> ≈ 2000 Da.



**Figura 7.1.** Espectro de MALDI-TOF MS obtenido en modo reflectrón de PEG (**1a**) y MPEG (**1e**) en DCTB como matriz y NaTFA como un agente iónico en THF.

### 7.1.2. Síntesis de macroiniciadores ATRP de PEG y MPEG

Para obtener los macroiniciadores de polietilenglicol (PEG) y  $\alpha$ -metil-poli(etilenglicol) (MPEG), los polímeros antes caracterizados se esterificaron con bromuro de 2-bromoisobutirilo y trietilamina en cloruro de metileno durante 7 horas a 40°C, siguiendo la metodología mostrada en el esquema de la **Figura 7.2** [48].



**Figura 7.2.** Proceso de esterificación de PEG y MPEG con bromuro de 2-bromoisobutirilo para la obtención de macroiniciadores ATRP.

### 7.1.2.1. Caracterización espectroscópica de los macroiniciadores ATRP sintetizados

El desempeño de la reacción de esterificación de los poli(oxialquilenos) (**2a-f**) se caracterizó mediante técnicas espectroscópicas y los rendimientos se calcularon gravimétricamente después del proceso de purificación, los resultados se muestran en la **Tabla 7.2**. Los valores obtenidos demostraron una funcionalización casi completa. El peso molecular teórico de cada polímero funcionalizado (**2a-2f**) se calculó considerando el grado promedio de polimerización obtenido previamente mediante MALDI-TOF (ver **Tabla 7.1**) y también considerando la fracción de 2-bromo-2-metilpropanoato.

**Tabla 7.2.** Esterificación de poli(glicoles) con bromuro de 2-bromo-2-metilpropanoil en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Muestra	Rendimiento (%)	Grado de funcionalización (%) <sup>a</sup>	M <sub>n</sub> (Da) <sup>b</sup>	DP <sup>c</sup> MALDI
<b>2a</b>	93	97	2143.747	41.49
<b>2b</b>	94	94	3685.029	76.48
<b>2c</b>	92	93	6192.879	133.41
<b>2d</b>	97	98	873.938	15.73
<b>2e</b>	95	95	2107.907	43.74
<b>2f</b>	93	98	5279.723	115.74

<sup>a</sup> Grado de funcionalización calculado a partir de los espectros de <sup>1</sup>H RMN.

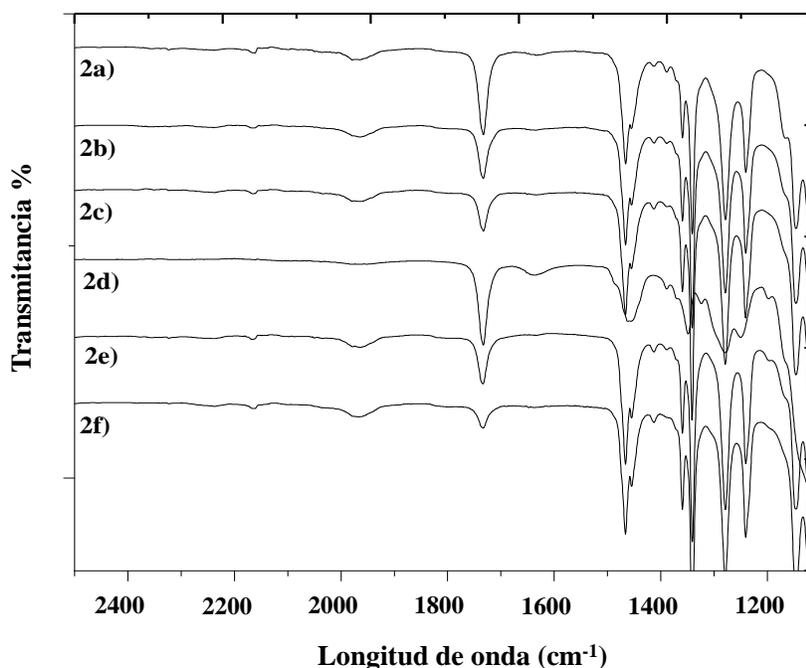
<sup>b</sup> Peso molecular teórico (M<sub>n</sub>) calculado a partir del DP promedio del análisis MALDI-TOF MS.

<sup>c</sup> Grado de polimerización promedio obtenido por MALDI-TOF MS (DP<sub>MALDI</sub>).

La caracterización espectroscópica se centró en identificar la fracción de 2-bromo-2-metilpropanoato en las muestras de polímero esterificado. El análisis FT-IR de los ésteres (**2a-f**) mostró la desaparición de la banda de alargamiento del enlace O–H en la región de 3500-3300 cm<sup>-1</sup> y la aparición de una banda de estiramiento que corresponde al carbonilo (ν<sub>C=O</sub>) en 1734 cm<sup>-1</sup> característica del grupo éster, así como la presencia del alargamiento de la banda C–O en 1100 cm<sup>-1</sup> (**Figura 7.3**).

El análisis mediante resonancia magnética nuclear se realizó empleando cloroformo deuterado y en un equipo de 11.7 Tesla con una frecuencia de oscilación de Larmor de hidrógeno de 500 MHz. En todos los espectros de <sup>1</sup>H RMN de los ésteres **2a-f**, se identificó una resonancia en 4.29 ppm cuya multiplicidad es un triplete, que fue asignada al grupo

metileno ( $-\text{CH}_2$ ) terminal en los poli(oxialquilenos) que después de la reacción se transformó químicamente y que ahora se encuentra adyacente al átomo de oxígeno del grupo éster, esto representa una señal característica de la fracción del 2-bromo-2-metilpropanoato. Aunado a lo anterior, se observó una resonancia simple con desplazamiento químico en 1.85 ppm, que corresponde a los seis hidrógenos del metilo de la fracción del éster.



**Figura 7.3.** Espectro FT-IR ( $2500\text{-}1110\text{ cm}^{-1}$ ) de los ésteres (**2a-f**) de 2-bromo-2-metilpropanoato derivados de PEG y MPEG, respectivamente.

Una vez establecida la estructura química de cada macroiniciador, se calculó el grado de funcionalización de cada éster a partir de la relación de integración de las señales asociadas con los protones característicos. La señal en 1.95 ppm y las resonancias de la unidad de etileno observada en 3.63 ppm se consideraron para los macroiniciadores de PEG (**Figura 7.4**). Mientras que la señal en 1.95 ppm correspondiente al metilo del grupo éster y el desplazamiento en 3.37 ppm del grupo metoxi se tomaron como referencia para el cálculo de peso molecular por RMN para los macroiniciadores de MPEG (**Figura 7.5**). En la **Figura 7.4** se muestra la asignación correspondiente al macroiniciador bifuncional en el espectro  $^1\text{H}$  RMN **2a** y en la **Figura 7.5** el espectro de protón del macroiniciador monofuncional **2e**.

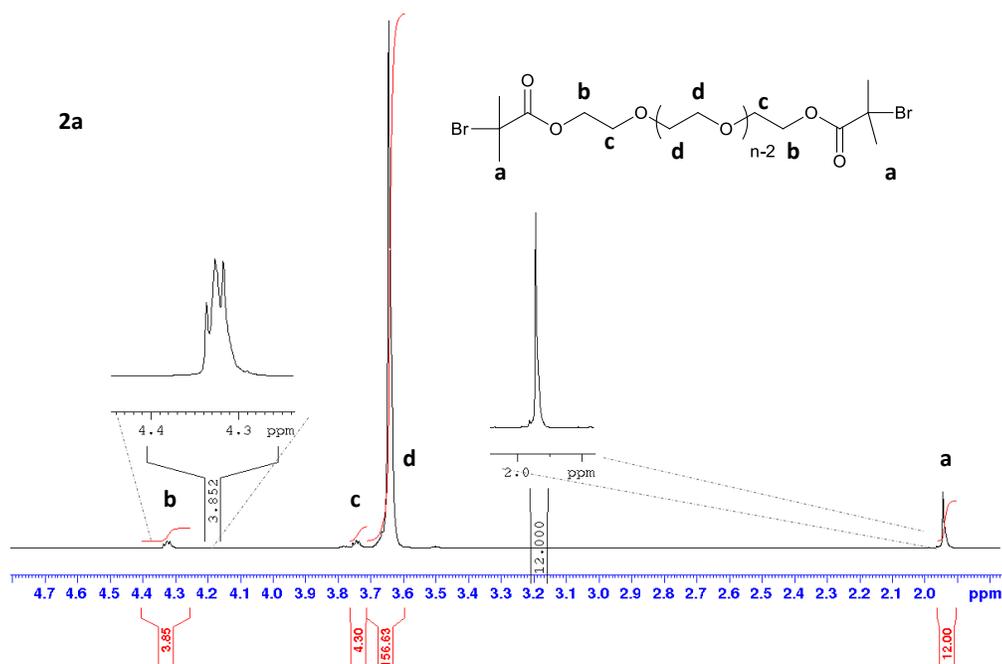


Figura 7.4. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz) de macroiniciador bifuncional **2a** en  $\text{CDCl}_3$ .

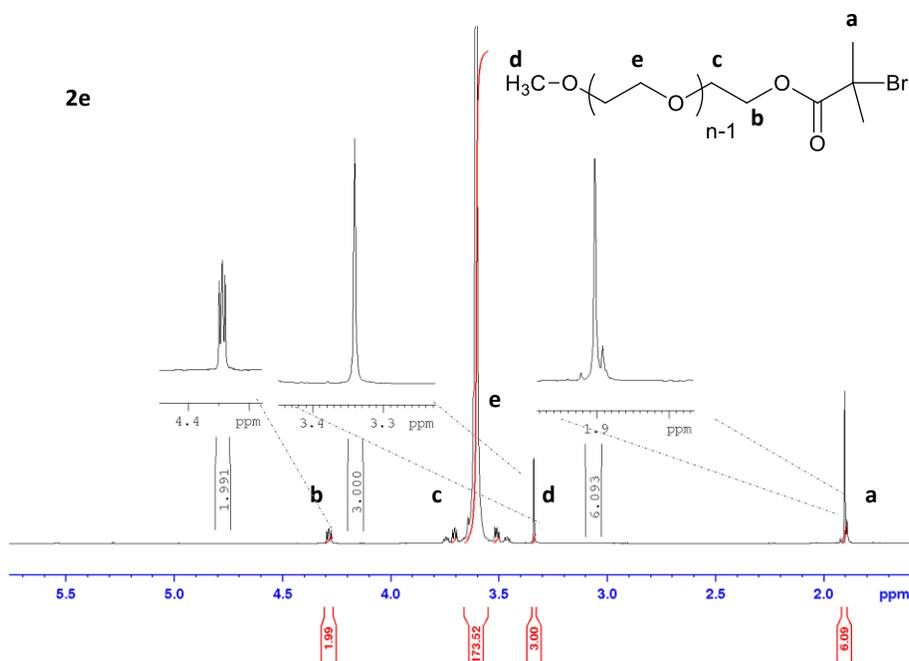
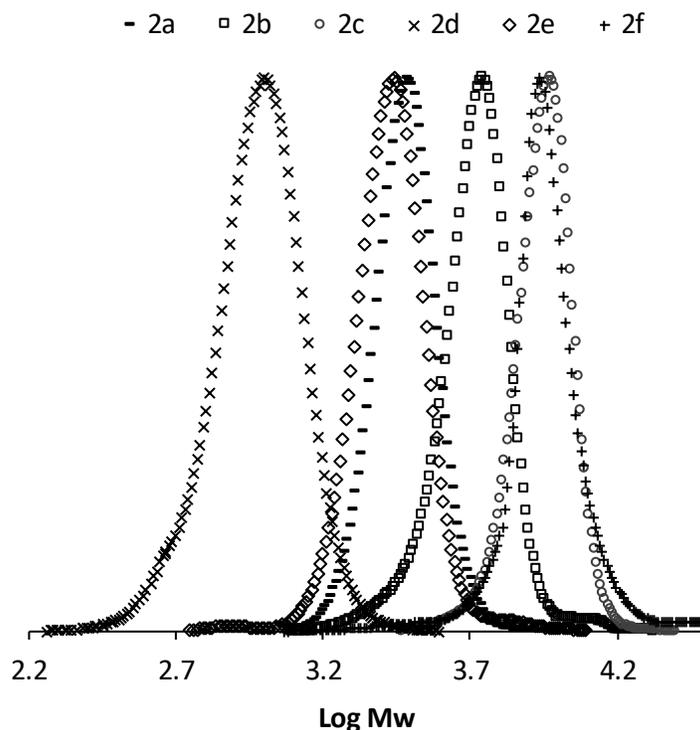


Figura 7.5. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz) del macroiniciador monofuncional **2e** en  $\text{CDCl}_3$ .

### 7.1.2.2. Análisis de la distribución de masa molar

El objetivo principal de la estimación de las distribuciones de masa molar de los ésteres de PEG y MPEG de 2-bromo-2-metilpropanoato (**2a-f**), fue asegurar que la esterificación era la única reacción que había tenido lugar durante la preparación de estos materiales. Las separaciones cromatográficas de todos los polímeros fueron realizadas por SEC. Los resultados obtenidos muestran que las dispersidades permanecen en los mismos valores ( $\bar{D} < 1.11$ ) con ligeros incrementos en sus pesos moleculares, los cromatogramas típicos se muestran en la **Figura 7.6**, estas curvas indican distribuciones monomodales de masa molar y dispersidades estrechas.



**Figura 7.6.** Distribución de masa molar los ésteres de 2-bromo-2-metilpropanoato (**2a-f**) derivados de poli(oxialquilenos).

A pesar de lo anterior, no se puede excluir ninguna dimerización u otra reacción secundaria en condiciones no controladas. Esta preocupación se basó en la posible reacción entre el átomo de bromo del grupo metilpropanoato con la trietilamina, ya que esta última se adicionó

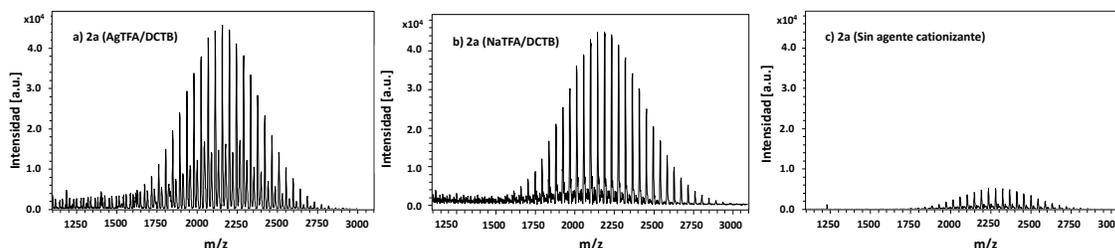
en exceso durante la reacción de esterificación. Estos componentes podrían dar lugar a una reacción de eliminación del hidro-bromo y subsecuente formación de un grupo funcional metacrilato, que eventualmente podría sufrir alguna reacción de dimerización, oligomerización y/o polimerización ocasionando un incremento en el peso molecular [103].

### 7.1.2.3. Análisis MALDI-TOF de macroiniciadores monofuncionales y bifuncionales

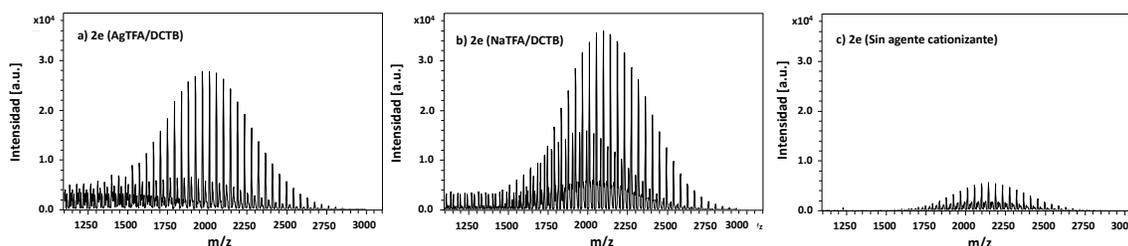
Los polímeros funcionalizados con grupos halógenos en los extremos de la cadena se pueden usar como macroiniciadores para la preparación de arquitecturas macromoleculares complejas. Sin embargo, estos grupos terminales halogenados deben caracterizarse mediante una técnica adecuada, existe evidencia de que algunos polímeros obtenidos con grupos halógeno al término de la cadena no han sido observados adecuadamente mediante MALDI-TOF, se menciona que bajo las condiciones de análisis existe una reacción de hidro-dehalogenación generando grupos insaturados en el extremo de la cadena, esto aparentemente se origina por la pérdida del átomo de halógeno ( $X = \text{Br}, \text{Cl}$ ) durante el análisis MALDI-TOF MS [103]. La formación de compuestos insaturados también puede ocurrir derivado de un incremento en la temperatura [104]. Por lo tanto, establecer una correcta estructura de los ésteres con un átomo de bromo al final de la cadena puede ser considerado un problema a resolver, ya que para llevar a cabo una reacción ATRP en condiciones controladas, es necesario establecer una estructura precisa de los macroiniciadores. Como se discutió antes, los ésteres de PEG o MPEG se prepararon mediante esterificación, con esta estrategia se evitó la presencia de polímeros insaturados, ya que se utilizaron poli(glicoles) con dispersidades estrechas como reactivos de inicio.

En algunos reportes de caracterización de PEG o MPEG por MALDI-TOF-MS no se reporta el uso de agentes catiónicos. A pesar de lo anterior, se han encontrado especies como  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  y  $[\text{M}+\text{K}]^+$  que pueden provenir de la matriz y de las especies alcalinas de los residuos de estos metales presentes en el agua o disolvente utilizado [105] [106]. Por lo anterior, el presente estudio se enfocó inicialmente en el análisis mediante MALDI-TOF MS de los polímeros **2a** y **2e** sin la adición de un agente catiónico y DCTB como matriz. En este análisis se encontró una pobre generación de iones, estos fueron insuficientes para un análisis

preciso y confiable de la funcionalidad halógeno al final de la cadena. Para resolver este hecho, se realizaron algunas caracterizaciones utilizando AgTFA y NaTFA como agentes catiónicos, los resultados mostraron diferencias notables en la formación de iones, estos espectros se muestran en la **Figura 7.7** para macroiniciadores bifuncionales y en la **Figura 7.8** para macroiniciadores monofuncionales.



**Figura 7.7.** Distribución de masa molar del éster de PEG  $DP=41$  (**2a**) obtenido por MALDI en modo reflectrón, utilizando DCTB como matriz y (a) AgTFA, (b) NaTFA como agentes cationizantes y (c) sin agente cationizante.



**Figura 7.8.** Distribución de masa molar del éster MPEG  $DP=44$  (**2e**) obtenido por MALDI en modo reflectrón, utilizando DCTB como matriz y (a) AgTFA, (b) NaTFA como agentes cationizantes y (c) sin agente cationizante.

Considerando los resultados anteriores, se evaluó la influencia de agentes cationizantes con diferente fuerza ácida, como el trifluorometanosulfonato de plata (AgTFS) o el trifluoroacetato de plata (AgTFA) y con diferente valor de dureza absoluta como el trifluoroacetato de sodio (NaTFA). Se evaluó este efecto en el proceso de ionización, así como en la aparición de picos secundarios en los espectros MALDI-TOF. En estas condiciones se observó una mayor intensidad en las señales de los espectros, lo que indica una buena ionización en cada caso. En todas las muestras evaluadas las secuencias de iones se separaron por un valor nominal cercano a 44.053 Da, lo que fue consistente con la masa molar de la unidad repetitiva ( $OCH_2CH_2$ ) presente en los polímeros derivados del glicol. Se

observaron diferentes especies moleculares dependiendo de la sal de cationización o disolvente empleado. La discusión detallada de estos resultados se presenta en las siguientes secciones.

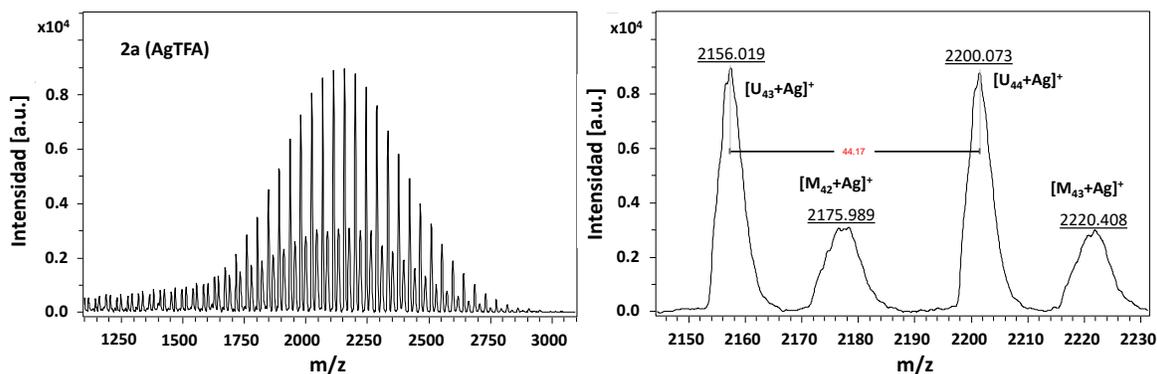
#### 7.1.2.3.1. *Influencia de los agentes iónicos durante el análisis MALDI-TOF MS*

Para este estudio se empleó DCTB como matriz, trifluoroacetato de plata como agente catiónico y metanol como disolvente. Como se indicó anteriormente, el mecanismo de interacción entre la plata y el analito polimérico sigue siendo desconocido [107]. Sin embargo, se ha reportado que la reacción entre las sales de plata con compuestos halogenados ocurre antes del impacto de la fuente láser en la matriz. Por ejemplo, Tintaru y cols. [108] concluyeron que la eliminación de HBr probablemente se había producido durante la preparación de la muestra.

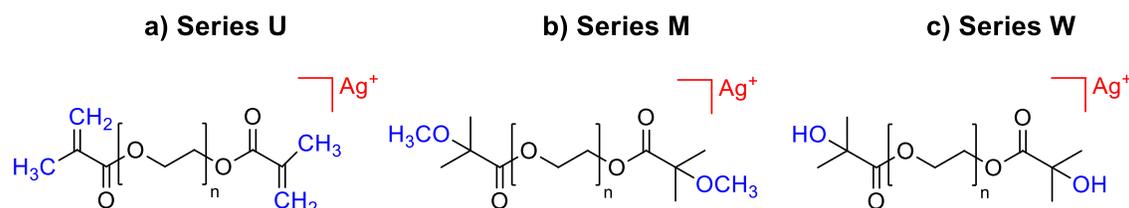
En el presente estudio se utilizó una relación molar de DCTB/polímero/AgTFA de 310/1/18. Con esta relación se obtuvo una ionización eficiente para los seis ésteres de 2-bromo-2-metilpropanoato de PEG y MPEG (**2a-f**). El análisis se centró en los picos de mayor intensidad, se comparó la relación experimental  $m/z$  con la masa molar calculada de las posibles estructuras. La distribución de masa molar del éster **2a** ( $DP=41$ ) obtenido en el análisis MALDI se muestra en la **Figura 7.9**, donde se identificaron claramente dos patrones, el de mayor intensidad se asignó a la terminación insaturada (estructura mostrada en la **Figura 7.10a** y denominada Serie U), la segunda secuencia de iones se asignó a los productos metoxilados formados durante la interacción entre el analito y el metanol que se usó como disolvente. Estos derivados metoxilados se observan como picos secundarios de menor intensidad (estructura mostrada en la **Figura 7.10b** y nombrada Serie M).

El compuesto insaturado se formó debido a la eliminación del bromo terminal del éster original **2a**. La explicación de esta observación surge del hecho de que la plata ( $Ag^+$ ) tiene un valor de dureza bajo ( $\eta = 6.9$  eV), y este catión tiene la capacidad de reaccionar con compuestos halo-orgánicos de carácter más blando y como resultado de esta interacción se promueve una sustitución nucleofílica [106]. A través de esta reacción, la pérdida del bromo

terminal podría ser promovida por un catión de plata dando un complejo, este intermedio reacciona con el ácido conjugado del agente catiónico para formar así un compuesto insaturado, un bromuro de plata y el ácido correspondiente.



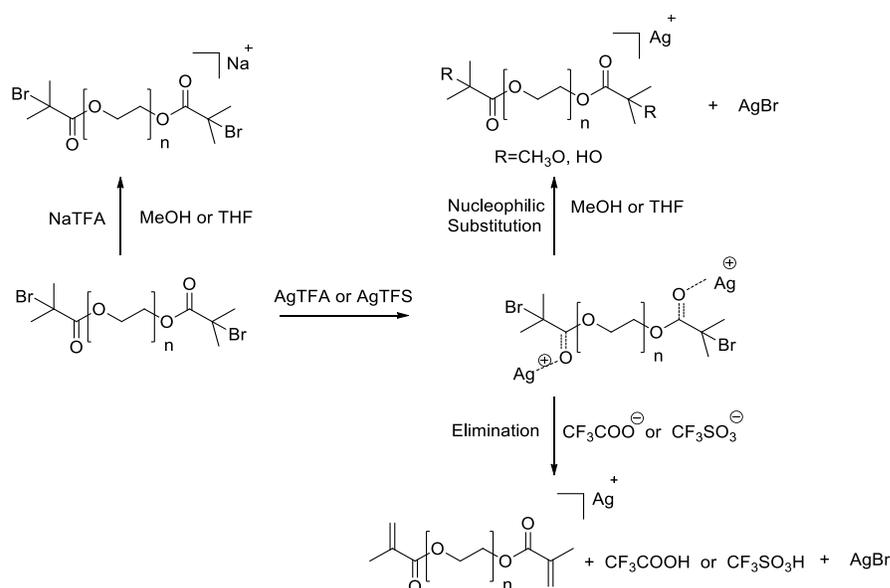
**Figura 7.9.** Distribución de masa molar de PEG bis(2-bromo-2-metilpropanoato)  $DP = 41$  (**2a**) obtenido por MALDI en modo reflectrón con AgTFA como agente catiónico.



**Figura 7.10.** Compuestos identificados en el análisis MALDI de PEG bis (2-bromo-2-metilpropanoato).

Con un aumento de la masa molar de los ésteres derivados del PEG, se observó una inversión en las intensidades de secuencia (muestras **2b** y **2c** en la **Tabla 7.3**). En estas muestras, los ésteres metoxilados tenían mayores intensidades en comparación con los compuestos insaturados cuando se empleaba el mismo sistema de ionización. En el MPEG esterificado se encontró un comportamiento similar, se identificaron grupos terminales insaturados como los productos principales (muestras **2d-2e** en la **Tabla 7.3**). No obstante, se identificó un patrón de secuencia de iones con menor intensidad que surge de la sustitución de un grupo hidroxilo de los ésteres bromados (Serie W en la **Figura 7.10c**). En el caso de una muestra

de masa molar más alta (**2f**), la Serie W presentó mayor intensidad que la Serie U (muestra **2f**, **Tabla 7.3**). El mecanismo propuesto se muestra en el esquema de la **Figura 7.11**.



**Figura 7.11.** Mecanismo propuesto para polímeros funcionalizados al final de la cadena con 2-bromo-2-metilpropanoato durante el análisis MALDI-TOF utilizando Ag<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> como agentes catiónicos.

**Tabla 7.3.** Análisis MALDI-TOF MS de ésteres bromados **2a-f** utilizando DCTB/AgCF<sub>3</sub>COO y MeOH como disolvente.

<i>M<sub>p</sub></i> MI <sup>b</sup>	Picos con mayor intensidad			Picos con menor intensidad		
	<i>M<sub>p</sub></i>	<i>M<sub>p</sub></i>	<i>M<sub>p</sub></i>	<i>M<sub>p</sub></i>	<i>M<sub>p</sub></i>	<i>M<sub>p</sub></i>
MI <i>DP<sub>p</sub></i> <sup>a</sup> ([ <i>M<sub>p</sub></i> +Ag] <sup>+</sup> ) (Da)	encontrado ([ <i>M<sub>p</sub></i> +Ag] <sup>+</sup> ) (Da)	Estructura asignada	Calculado ([ <i>M<sub>p</sub></i> +Ag] <sup>+</sup> ) (Da)	encontrado ([ <i>M<sub>p</sub></i> +Ag] <sup>+</sup> ) (Da)	Estructura asignada	calculado ([ <i>M<sub>p</sub></i> +Ag] <sup>+</sup> ) (Da)
<b>2a</b> 43 2341.125	2156.019	[U+Ag] <sup>+</sup>	2156.332	2220.408	[M+Ag] <sup>+</sup>	2220.396
<b>2b</b> 74 3706.768	3585.934	[M+Ag] <sup>+</sup>	3586.039	3521.792	[U+Ag] <sup>+</sup>	3521.989
<b>2c</b> 131 6217.789	5988.232	[M+Ag] <sup>+</sup>	5989.192	5924.564	[U] <sup>+</sup>	5925.167
<b>2d</b> 15 972.682	869.487	[U+Ag] <sup>+</sup>	868.787	887.530	[W+Ag] <sup>+</sup>	886.795
<b>2e</b> 44 2250.219	2146.178	[U+Ag] <sup>+</sup>	2146.337	2164.480	[W+Ag] <sup>+</sup>	2164.332
<b>2f</b> 117 5466.088	5380.624	[W+Ag] <sup>+</sup>	5380.201	5362.534	[U+Ag] <sup>+</sup>	5362.238

<sup>a</sup> DP valor correspondiente a *M<sub>p</sub>*.

<sup>b</sup> Masa molar teórica de macroiniciadores (MI) relacionada con el valor de *DP<sub>p</sub>* correspondiente.

Tintaru y cols. [108] también informaron de la presencia de especies insaturadas y metoxiladas obtenidas de la pérdida del grupo terminal haluro en muestras de  $\omega$ -poliestireno que fueron funcionalizadas con bromo y analizadas mediante MALDI TOF MS utilizando agentes catiónicos de plata. Concluyeron que la reacción de eliminación tuvo lugar durante la preparación de la muestra, es decir, antes de la ionización.

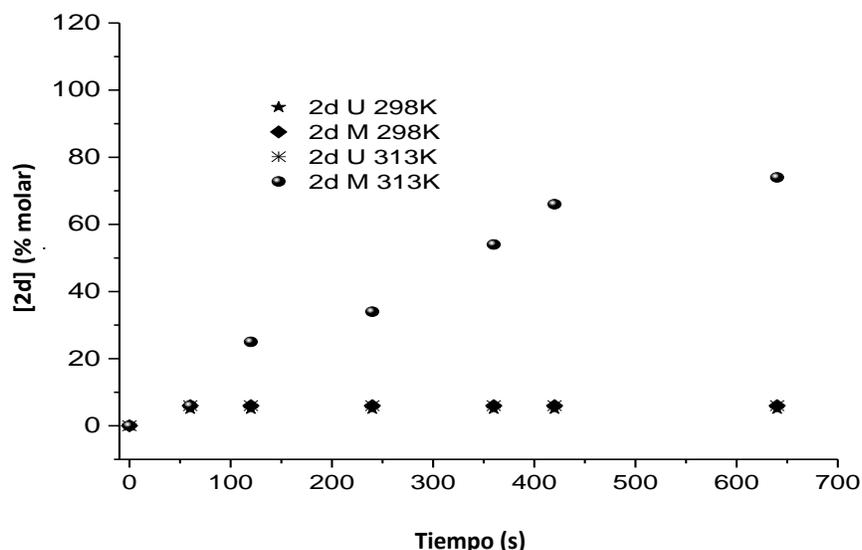
Tomando como antecedente las conclusiones realizadas por Tintaru y cols. [108], en este trabajo de investigación se realizó un estudio por  $^1\text{H}$ -RMN de la reacción entre el éster de 2-bromo-2-metilpropanoato de MPEG (**2d**) con trifluoroacetato de plata (AgTFA), para esto se utilizó metanol deuterado como disolvente ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) y temperatura ambiente (298 K). En este análisis solo se consideró la reacción del éster con la sal de plata y se utilizó una relación molar de 1:5 MPEG 2-metil-2-bromopropionato (**2d**): AgTFA, sin el uso de DCTB.

Teniendo en cuenta que la función principal de la matriz en el análisis MALDI es transferir la energía de la irradiación láser a la muestra durante el proceso de ionización, se puede inferir que ésta no influye en la reacción de eliminación del bromo. En el espectro de RMN de protón que se obtuvo se pudieron apreciar los cambios químicos del éster **2d**. El éster fue estable durante al menos 60 segundos; durante este tiempo no hubo señales que indicaran la presencia de un compuesto insaturado (**2dU**). Después de este tiempo, se pudo identificar una proporción muy baja (<6%) del producto insaturado (Serie U); su concentración se calculó mediante los valores de integración para las señales de los protones del vinilo observados en un desplazamiento químico de 6.13 y 5.66 ppm, respectivamente y se comparó con las señales de los protones de  $\text{CH}_2$  del éster de carbonilo observado en 4.27 ppm.

Los productos metoxilados o hidroxilados (Serie M o W) observados al final de las cadenas de polímero se caracterizaron indirectamente por cambios en el entorno magnético que rodea a los metilos en el grupo 2-bromopropionato. El grupo metilo cercano al átomo de bromo tuvo un desplazamiento químico en 1.95 ppm en el éster **2d**, sin embargo, se desplazó hasta 2.06 ppm en el producto insaturado (Serie U) y hasta 1.20 ppm en el éster hidroxilado o metoxilado (Serie M). Se siguió y cuantificó la evolución de estos dos productos durante 700

segundos a una temperatura de 298 K, manteniéndose constante la concentración de estos dos productos y con mínima variación durante este tiempo.

Para emular el proceso de ionización en la caracterización MALDI, se aumentó la temperatura de la sonda de RMN desde temperatura ambiente (298 K) hasta 313 K y se monitorearon los cambios en la mezcla de **2d** y AgTFA en metanol deuterado [109]. La concentración de la Serie M aumentó al 50% después de 300 segundos, mientras que la concentración del compuesto insaturado (Serie U) permaneció constante durante todo el experimento. De acuerdo con estas observaciones se infiere que los cambios en la estructura de los ésteres bromados pueden ser promovidos por una fuente de energía como el proceso de ionización y no durante el proceso de preparación de la muestra. El aumento en la concentración de productos de sustitución (Serie M) a mayor temperatura en lugar de productos de eliminación (Serie U) sugiere la presencia de un intermediario promovido por la reacción entre el ion de plata y el átomo de bromo. Los resultados se muestran en la **Figura 7.12**.

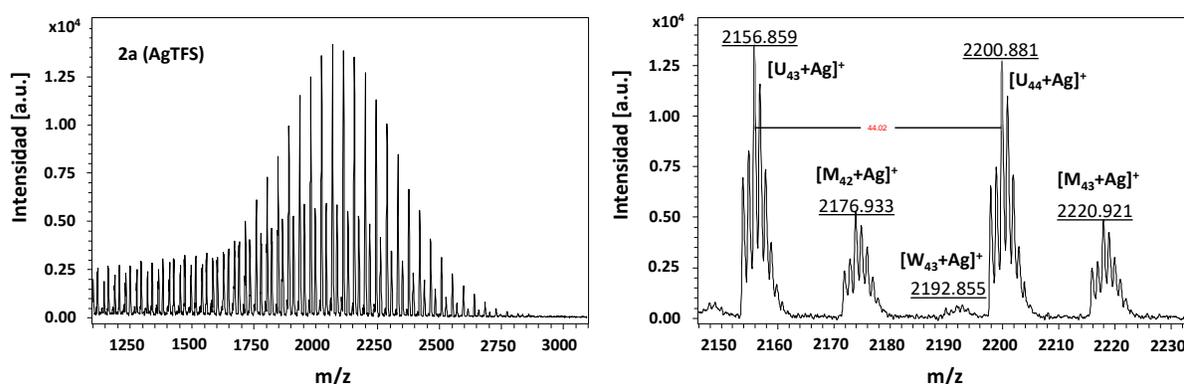


**Figura 7.12.** Influencia del AgTFA en la estabilidad del éster **2d** obtenido por espectroscopía de  $^1\text{H}$  RMN en metanol deuterado.

Con la finalidad de obtener un panorama más claro sobre los resultados anteriores, se propuso el uso de trifluorometanosulfonato de plata ( $\text{AgCF}_3\text{SO}_3$ ) como agente catiónico, en esta serie

de experimentos el ácido conjugado del contraión tiene una mayor fuerza ácida, factor que también podría influir en la formación de compuestos de eliminación. Para ello se seleccionaron condiciones de MALDI con una relación molar similar al estudio anterior, DCTB/**2a-f**/AgCF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> de 310/1/18. Se encontró una excelente ionización de los seis ésteres de 2-bromo-2-metilpropanoato derivados de PEG o MPEG. En la **Figura 7.13** se muestran los espectros MALDI TOF para el éster **2a**, se observaron principalmente dos patrones, es decir, las Series U y M, que correspondían a los productos de eliminación o sustitución.

Las relaciones  $m/z$  obtenidas en cada espectro de masas MALDI-TOF se compararon con las masas molares teóricas de las posibles estructuras, los resultados se muestran en la **Tabla 7.4**. Cuando se compararon los seis ésteres bromados con los ésteres caracterizados con AgTFA como agente iónico, se observó un comportamiento similar bajo las nuevas condiciones de ionización. También se observó la pérdida del átomo de bromo, y subsecuentes reacciones de eliminación o sustitución (Series U, M o W, respectivamente). En los macroiniciadores con masas molares menores o iguales a 2,000 Da, los productos de eliminación fueron preponderantes (Serie U), y con el incremento de la masa molar se observó la formación de productos de adición (Serie M).



**Figure 7.13.** Espectros MALDI-TOF del éster bromado **2a** utilizando AgTFS/**2a**/DCTB con una relación molar de 310/1/18 empleando metanol como disolvente y obtenido en modo reflectrón.

**Tabla 7.4.** Análisis MALDI-TOF MS de ésteres bromados **2a-f** con DCTB/AgCF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> y MeOH como disolvente.

MI	DP <sub>p</sub> <sup>a</sup>	M <sub>p</sub> MI <sup>b</sup> ([M <sub>p</sub> +Ag] <sup>+</sup> ) (Da)	Picos con mayor intensidad			Picos con menor intensidad		
			M <sub>p</sub> encontrado ([M <sub>p</sub> +Ag] <sup>+</sup> ) (Da)	Estructura asignada	M <sub>p</sub> Calculado ([M <sub>p</sub> +Ag] <sup>+</sup> ) (Da)	M <sub>p</sub> encontrado ([M <sub>p</sub> +Ag] <sup>+</sup> ) (Da)	Estructura asignada	M <sub>p</sub> encontrado ([M <sub>p</sub> +Ag] <sup>+</sup> ) (Da)
2a	43	2341.125	2156.859	[U+Ag] <sup>+</sup>	2156.332	2220.921	[M+Ag] <sup>+</sup>	2220.396
2b	74	3706.768	3585.627	[M+Ag] <sup>+</sup>	3586.039	3558.687	[W+Ag] <sup>+</sup>	3557.985
2c	131	6217.789	6070.653	[W+Ag] <sup>+</sup>	6069.006	6096.611	[U+Ag] <sup>+</sup>	6097.060
2d	15	972.682	869.089	[U+Ag] <sup>+</sup>	868.787	887.093	[W+Ag] <sup>+</sup>	886.795
2e	44	2250.219	2147.411	[U+Ag] <sup>+</sup>	2146.337	2165.427	[W+Ag] <sup>+</sup>	2164.332
2f	117	5466.088	5380.217	[W+Ag] <sup>+</sup>	5380.201	5362.621	[M+Ag] <sup>+</sup>	5362.238

<sup>a</sup> DP valor correspondiente a M<sub>p</sub>.<sup>b</sup> Masa molar teórica de macroiniciadores (MI) relacionada con el valor de DP<sub>p</sub> correspondiente.

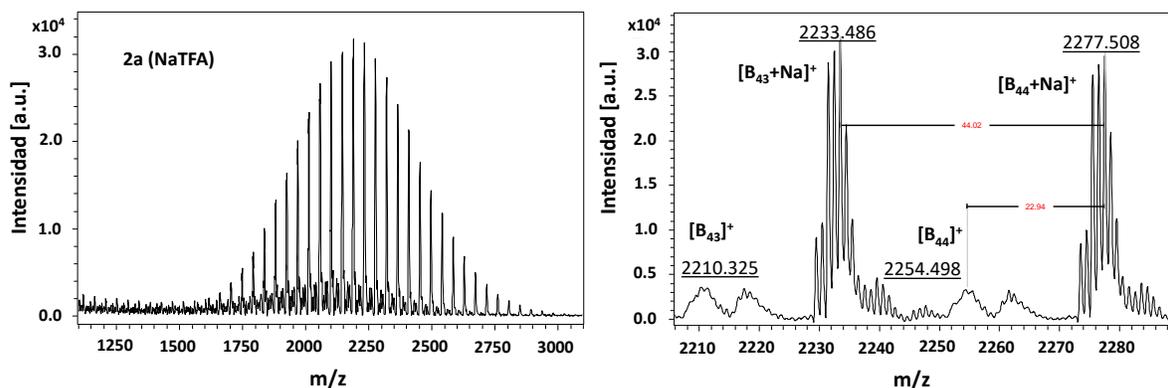
Como se puede apreciar en la tabla anterior, los iones con mayor intensidad mostraron la misma tendencia que los primeros resultados, presencia de compuestos insaturados en ésteres con masas molares menores o iguales a 2,000 Da. Sin embargo, para los ésteres con masas molares superiores a 2,000 Da (muestras **2b**, **2c** y **2f**), no se detectaron grupos terminales insaturados. Con estos resultados se podría mencionar que el incremento de la acidez del contraión en el agente catiónico no influyó en los espectros MALDI-TOF. Es importante mencionar que los ésteres, la matriz (DCTB) y el agente catiónico se disolvieron en metanol, luego se depositó una pequeña alícuota de la mezcla en una placa donde la matriz y el polímero co-cristalizaron a medida que se evaporaba el disolvente, por lo tanto, durante este proceso es posible que las moléculas de metanol o agua puedan quedar atrapadas en los cristales formados dependiendo de las condiciones ambientales. En esta etapa los polímeros se dispusieron en el cristal de acuerdo con sus polaridades, así, los polímeros funcionalizados con masas molares inferiores tenían el grupo terminal 2-metil-2-bromopropionato disponible para interactuar con el agente catiónico, seguido de la eliminación de protones para dar lugar a un polímero insaturado. Por el contrario, en polímeros con masas molares superiores a 2,000 Da, el grupo terminal estaría alejado del agente catiónico, por lo que sería más fácil

reaccionar con el resto de las moléculas de disolvente/agua, dando lugar a los productos de sustitución (Serie M o W) observados en los espectros de masas.

Considerando los resultados anteriores, cuando se emplearon condiciones de ionización específicas, el átomo de bromo no estaba presente en los macroiniciadores ATRP, debido a su labilidad. Este análisis inexacto puede generar incertidumbre en la calidad de los macroiniciadores ATRP. En este estudio, el ion de plata reaccionó con el compuesto  $\alpha$ -bromo carbonilo debido a su característica suave similar. Los metales con un valor absoluto de dureza más alto, como el sodio ( $\eta=21.1$  eV), deben de tener una reactividad diferente con el compuesto halo-carbonilo y serían más estables durante la excitación del láser en el proceso de ionización en el análisis MALDI.

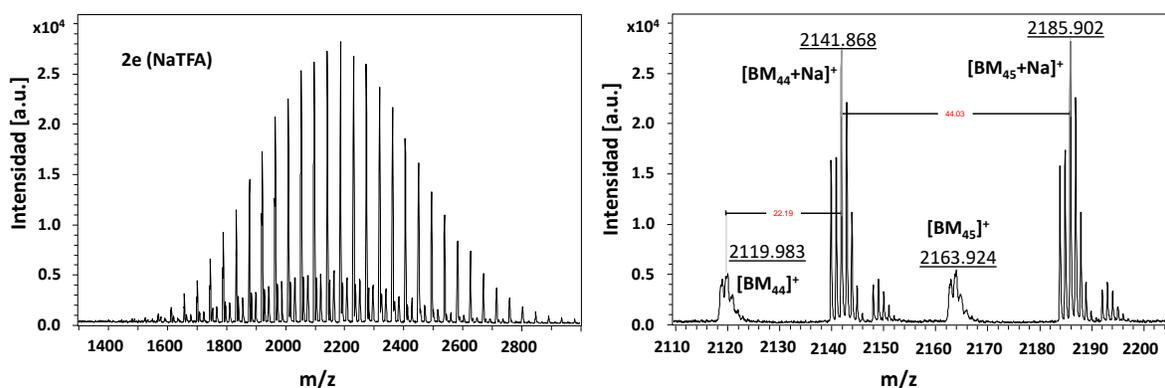
Con la finalidad de demostrar la baja reactividad de los compuestos  $\alpha$ -halo-carbonilo con metales alcalinos, se seleccionó como agente catiónico trifluoroacetato de sodio (NaTFA). Todas las muestras se analizaron bajo las condiciones ya establecidas, DCTB como matriz, metanol como disolvente y una relación molar de DCTB/ésteres bromados **2a-f**/NaTFA de 310/1/18. Los espectros de masas MALDI-TOF de todos los ésteres revelaron la presencia de un único patrón de iones. Por tanto, se puede deducir cierta estabilidad de los iones moleculares durante el proceso de ionización. Este resultado confirmó el hecho de que el catión sodio tenía una baja reactividad con los  $\alpha$ -bromo ésteres y no se identificaron en los espectros de masas, productos de eliminación o adición (Serie U, M o W, respectivamente). Por el contrario, algunos picos secundarios con muy baja intensidad se identificaron como iones moleculares sin la presencia de agente catiónico ( $\text{Na}^+$ ).

Como ejemplo, en la **Figura 7.14** se muestra la distribución de masa molar para la muestra **2a**, en la que se identificaron dos especies, es decir, moléculas de PEG con 2-metil-2-bromopropionato con y sin contraión. Estas estructuras moleculares (Serie B en la **Figura 7.16**) se asignaron con base a la relación  $m/z$  de iones observados en cada espectro de masas y se compararon con las masas molares calculadas para los ésteres bromados (**2a-f**).



**Figura 7.14.** Espectros MALDI-TOF del éster bromado **2a** utilizando NaTFA/**2a**/DCTB con una relación molar de 310/1/18, metanol como disolvente y obtenido en modo reflectrón.

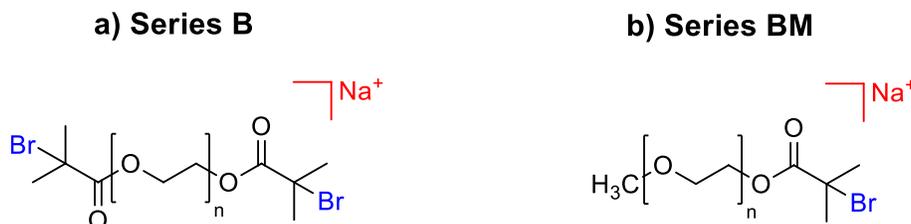
En todos los casos el patrón isotópico experimental concordó bien con el teórico, como se puede ver en la **Tabla 7.5**. Es importante mencionar que estas muestras (**2a-2c**) son ésteres dibromados, por lo que el patrón isotópico resultante en todos los espectros de masas se debe a los isótopos de bromo natural ( $^{79}\text{Br}$  y  $^{81}\text{Br}$ ).



**Figura 7.15.** Espectros MALDI-TOF del éster bromado **2e** utilizando NaTFA/**2e**/DCTB con una relación molar de 310/1/18, metanol como disolvente y obtenido en modo reflectrón.

Los espectros de masas MALDI-TOF de los ésteres de 2-metil-2-bromopropionato de MPEG **2d-f** también muestran los picos isotópicos de bromo como los iones principales en la curva de distribución de masa molar. El espectro de masas para la muestra **2e** se muestra en la **Figura 7.15**, las moléculas de MPEG con funcionalización final de bromo se identificaron como Serie BM (ver estructura en la **Figura 16b**). Estos resultados de MALDI-TOF confirmaron que la estabilización de los macroiniciadores se logró en presencia del catión

sodio. Esta alta estabilidad fue suficiente para detectar los iones moleculares de los ésteres **2d-f**, donde el agente catiónico está ausente (Serie BM<sup>+</sup>).



**Figura 7.16.** Compuestos identificados en el análisis MALDI de bis(2-bromo-2-metilpropanoato) de PEG y MPEG con NaTFA/DCTB en metanol.

Además, los resultados mostrados en la **Tabla 7.5** mostraron que la masa molar de los ésteres de 2-metil-2-bromopropionato de PEG **2a-c** o de los ésteres de 2-metil-2-bromopropionato de MPEG **2d-f** no tuvo influencia en el proceso de ionización y detección durante el análisis MALDI-TOF. En todos los casos, la masa molar de los ésteres bromados o dibromados se determinó con precisión y se estableció la alta calidad de los macroiniciadores ATRP.

**Tabla 7.5.** Análisis MALDI-TOF-MS de ésteres bromados **2a-f** en DCTB/NaTFA y MeOH como disolvente.

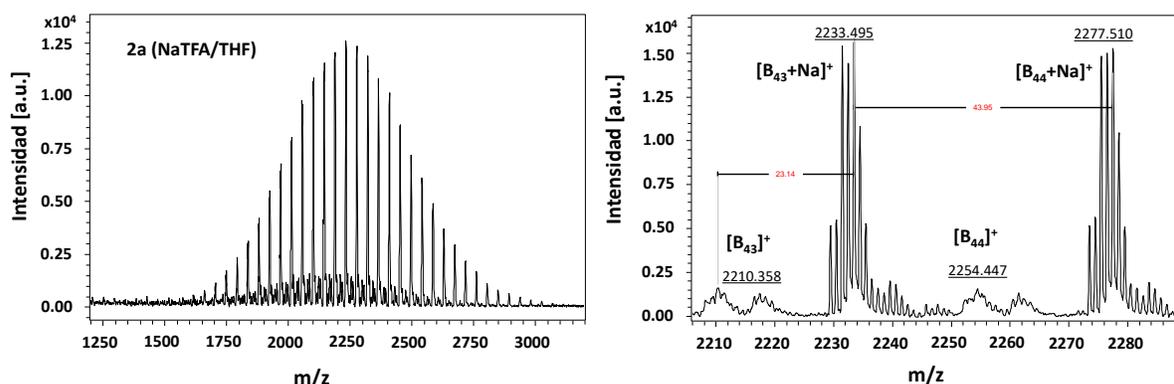
MI	DP <sub>p</sub> <sup>a</sup>	Mp PEG-Br <sup>b</sup> ([Mp+Na] <sup>+</sup> (Da))	Picos con mayor intensidad			Picos con menor intensidad		
			Mp encontrado ([Mp+Na] <sup>+</sup> (Da))	Estructura asignada	Mp calculado ([Mp+Na] <sup>+</sup> (Da))	Mp encontrado ([Mp+Na] <sup>+</sup> (Da))	Estructura asignada	Mp calculado ([Mp+Na] <sup>+</sup> (Da))
2a	43	2233.257	2233.486	[B+Na] <sup>+</sup>	2233.257	2210.325	[B] <sup>+</sup>	2210.267
2b	74	3598.900	3597.883	[B+Na] <sup>+</sup>	3598.900	3582.040	[W] <sup>+</sup>	3582.276
2c	131	6109.921	6108.93	[B+Na] <sup>+</sup>	6109.921	6085.570	[B] <sup>+</sup>	6086.931
2d	15	864.814	865.128	[B+Na] <sup>+</sup>	864.814	843.555	[B] <sup>+</sup>	843.555
2e	44	2142.351	2141.868	[B+Na] <sup>+</sup>	2142.351	2119.983	[B] <sup>+</sup>	2119.361
2f	117	5358.220	5295.739	[W+Na] <sup>+</sup>	5295.323	5358.219	[B+Na] <sup>+</sup>	5358.220

<sup>a</sup> DP valor correspondiente a M<sub>p</sub>.

<sup>b</sup> Masa molar teórica de macroiniciadores (MI) relacionada con el valor de DP<sub>p</sub> correspondiente.

### 7.1.2.3.2. Influencia del solvente durante el análisis MALDI-TOF MS

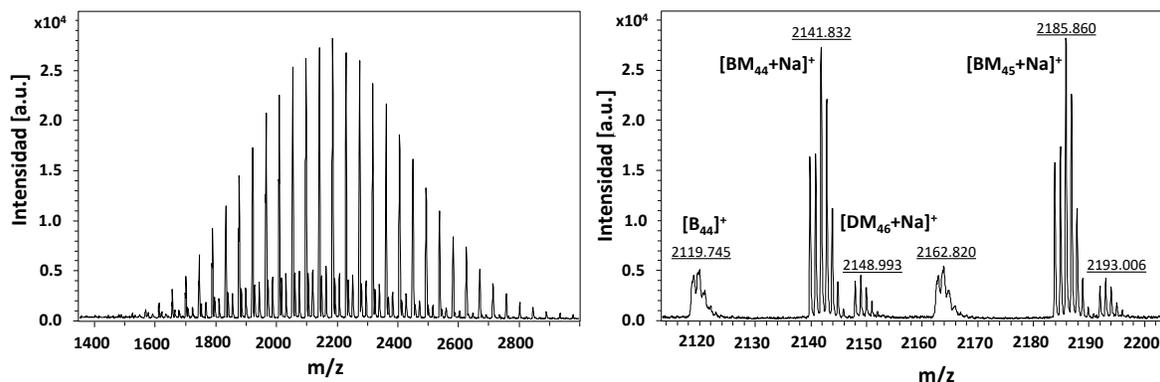
Es importante considerar que en el análisis MALDI TOF MS la preparación de la muestra tiene una influencia importante en el proceso de ionización y definitivamente lo tiene en la estructura química final obtenida. En este proceso la muestra interactuará con todos los componentes, es decir, matriz, agente catiónico y disolvente y dependiendo de su compatibilidad con el agente catiónico, producirá compuestos diferentes en lugar de las moléculas originales. El solvente tiene un papel muy importante ya que promoverá la solvatación del ion metálico y lo hará disponible para cualquier reacción química. Además, el disolvente también se utiliza como vehículo para tener una mezcla homogénea al momento de colocarla en el porta muestras, el solvente se evapora y la mezcla comienza a cristalizar, y dependiendo de la polaridad y la volatilidad del solvente, la muestra y el agente catiónico están disponibles para interactuar con la fuente de energía. Por lo anterior, se evaluó el efecto del THF como disolvente común en la caracterización de ésteres de 2-metil-2-bromopropionato de PEG o MPEG durante el análisis de MALDI-TOF MS. Los seis ésteres bromados **2a-f** se analizaron utilizando los mismos reactivos y proporciones molares.



**Figura 7.17.** Espectros MALDI-TOF del éster dibromado **2a** utilizando NaTFA/**2a**/DCTB con una relación molar de 310/1/18 y THF como disolvente, obtenido en modo reflectrón.

El uso de THF no influyó en el proceso de ionización de los macroiniciadores ATRP, de hecho, se obtuvieron los mismos patrones de distribución de masa molar en comparación con los resultados obtenidos con metanol. Las principales estructuras obtenidas con el catión sodio fueron iones moleculares dibromados de los ésteres **2a-f** y también se identificó un

segundo patrón para los iones moleculares sin el metal sodio, estos resultados se muestran en la **Figura 7.17** y **Figura 7.18** para los ésteres **2a** y **2e**, respectivamente. En este estudio también se demostró que el agente metálico catiónico era el principal responsable de la formación de ésteres insaturados, metoxilados o hidroxilados.



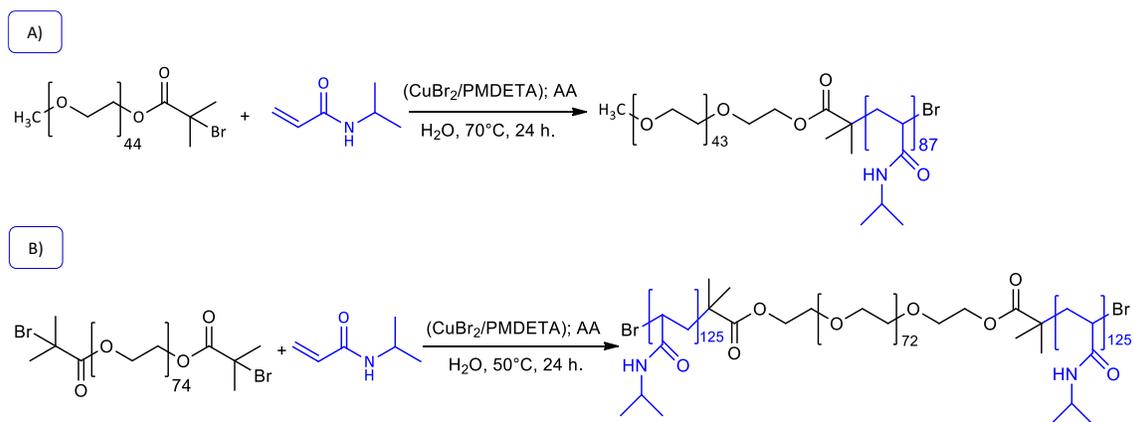
**Figura 7.18.** Espectros MALDI-TOF del éster bromado **2e** utilizando NaTFA/**2e**/DCTB con una relación molar de 310/1/18 y THF como disolvente, obtenido en modo reflectrón.

## 7.2. SÍNTESIS DE COPOLÍMEROS DIBLOQUE Y TRIBLOQUE MEDIANTE ATRP-AGET EN MEDIO ACUOSO

En la siguiente etapa, los copolímeros en bloque anfífilos se sintetizaron mediante la técnica ATRP-AGET en medio acuoso, utilizando los macroiniciadores de 2-bromo-2-metilpropionilo sintetizados y caracterizados previamente [48]. En sistemas ATRP en medio acuoso es necesario considerar la solubilidad de todos los componentes: sistema catalítico ( $\text{CuBr}_2/\text{PMDETA}$ ), agente reductor (ácido ascórbico), monómero (NIPAM) e iniciador (macroiniciadores de 2-bromo-2-metilpropionilo derivados de  $\text{MPEG}_n$  o  $\text{PEG}_n$ ). Todos los componentes fueron solubles en agua a temperatura ambiente, sin embargo, es necesario considerar el diagrama de fases de la N-isopropilacrilamida ya que es un monómero termosensible, es decir, su solubilidad en agua depende de la temperatura, siendo más evidente este efecto por encima de los  $25^\circ\text{C}$  [110].

Para obtener un buen control en ATRP, el ligando es un factor muy importante por considerar, puesto que, de éste depende la capacidad de coordinación con el cobre, así como

el potencial óxido-reducción. Se consideró inicialmente el uso de PMDETA ya que es un ligando tridentado y su potencial óxido-reducción es lo suficientemente bajo para promover reacciones de oxidación de compuestos bromados, esto dependiendo de la temperatura de reacción. Así, se consideró el uso de macroiniciadores de 2-bromo-2-metilpropionilo (MPEG<sub>44</sub> o PEG<sub>74</sub>) como bloques hidrófilos en reacción con NIPAM, a una temperatura de 70 y 50°C, respectivamente, durante 24 horas (esquema de la **Figura 7.19**). Después de dos horas de haber iniciado la reacción, en ambos sistemas se observó una apariencia turbia que permaneció durante las 24 horas de reacción, esto es atribuido a la separación de fases en el sistema de polimerización por efecto de las temperaturas utilizadas (70 y 50°C). Estas polimerizaciones se caracterizaron por SEC y los resultados demostraron deficiente control de las polimerizaciones, ya que se obtuvieron dispersidades muy amplias, por ejemplo, del copolímero dibloque MPEG<sub>44</sub>-b-PNIPAM<sub>87</sub> se obtuvo una dispersidad de 4.32 y del copolímero tribloque PNIPAM<sub>125</sub>-b-PEG<sub>74</sub>-b-PNIPAM<sub>125</sub> una dispersidad de 3.75.



**Figura 7.19.** Esquema de síntesis de copolímeros (A) dibloque y (B) tribloque mediante ATRP-AGET en medio acuoso utilizando PMDETA como ligando alifático tridentado y temperaturas de 70 y 50°C, respectivamente.

El análisis de estos resultados puede encontrar fundamento en el mecanismo de reacción ATRP, en donde para lograr un control sobre el proceso de polimerización, se requiere que la concentración de radicales permanezca baja, esto permite disminuir las reacciones prematuras de terminación. En ATRP la concentración de radicales está determinada por la constante de equilibrio ( $K_{\text{ATRP}}=k_{\text{act}}/k_{\text{deact}}$ ) [25]. En este sentido, y de acuerdo a lo observado,

el copolímero en crecimiento sale de fase a las temperaturas utilizadas, por lo que hay una restricción en la interacción con el complejo desactivador que se encuentra disuelto en la fase continua, esto evita la desactivación del radical en crecimiento, dando como resultado una baja velocidad de desactivación y subsecuentemente una polimerización rápida y pérdida del control (dispersidades más amplias) de acuerdo a la siguiente ecuación [29] [111].

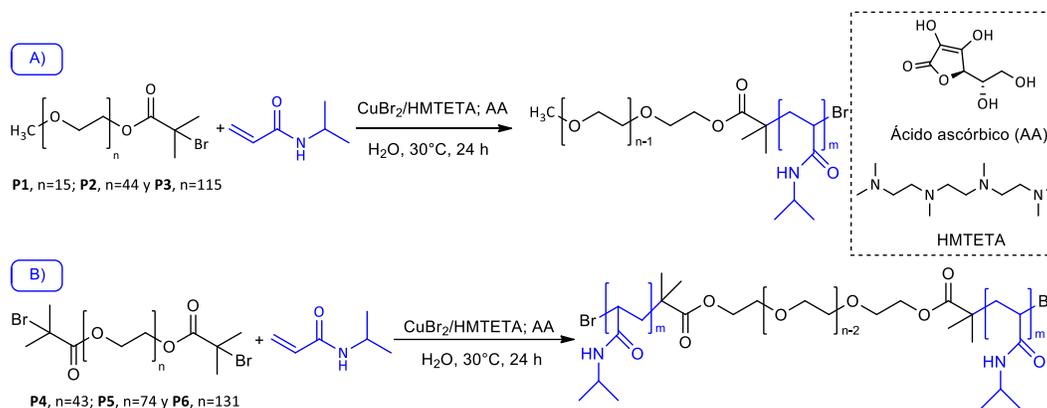
$$\bar{D} = \frac{M_w}{M_n} = 1 + \left( \frac{K_p[RX]_0}{k_{deact}[Cu^{II}LmX]} \right) \left( \frac{2}{Conv} - 1 \right) \dots \text{(Ecuación 1)}$$

Conforme a este supuesto, para lograr una polimerización controlada es necesario mantener los componentes de la polimerización en la fase continua. Para ello, se consideró la disminución de la temperatura de reacción (temperatura cercana a los 30°C), esto con el objetivo de mantener al copolímero en crecimiento en la fase continua sin que se presente una separación de fases. Sin embargo, también es necesario tomar en cuenta que la  $K_{ATRP}$  depende directamente de la temperatura y del complejo de cobre, ya que a menor temperatura la reactivación de la especie durmiente es menos favorecida [112].

Se ha reportado que las constantes de ATRP aumentan aproximadamente 3 órdenes de magnitud al cambiar un ligando tridentado como el PMDETA a ligandos tetradentados, un ejemplo de ello, es la tris[2-dimetilamino) etil] amina ( $Me_6TREN$ ) [27]. Sin embargo, los resultados reportados en polimerizaciones ATRP en agua para complejos de Cu- $Me_6TREN$  han evidenciado bajo control de las polimerizaciones, esto es atribuido a una desproporción muy rápida de los complejos de Cu, aunado a que es muy sensible al oxígeno [111].

Considerando lo anterior, en el presente estudio se propuso el uso de HMTETA como ligando alifático tetradentado, ya que la adición de más grupos amino donadores de electrones, estabiliza el estado de oxidación del Cu(I) [23]. Además, los complejos formados con HMTETA en agua, presentan buena solubilidad y baja probabilidad de desproporción [111]. Así, se sintetizaron una serie de copolímeros en bloque bajo condiciones ATRP-AGET a 30°C por 24 horas. Empleando NIPAM como monómero y macroiniciadores de 2-bromo-

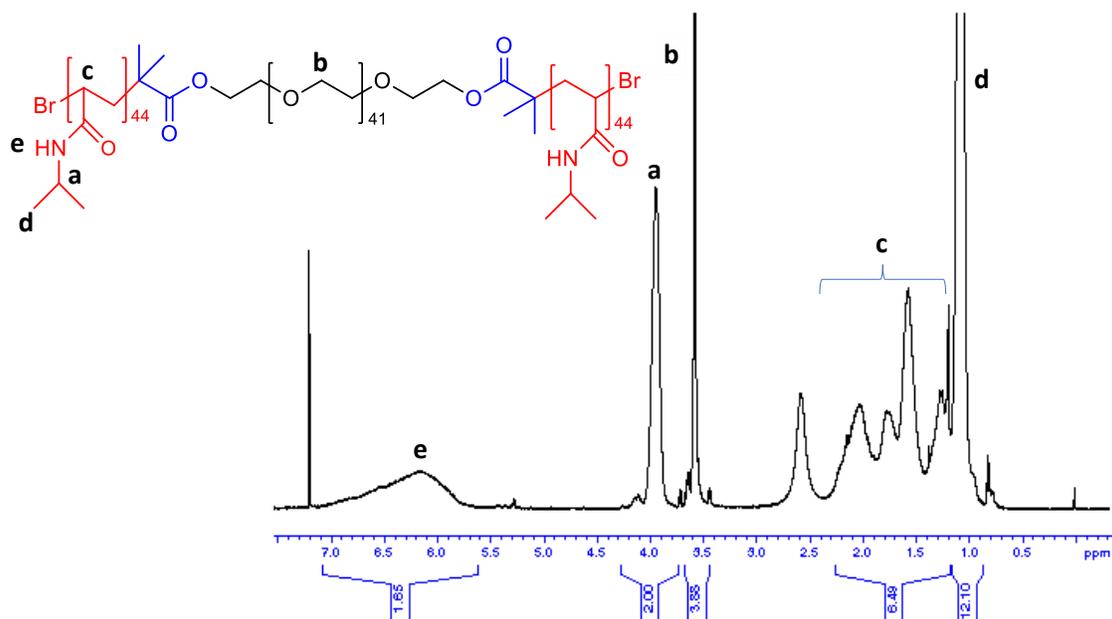
2-metilpropionilo derivados de (MPEG)<sub>n</sub> o (PEG)<sub>n</sub> con diferente longitud de cadena, agua como disolvente, complejos de HMTETA-Cu (II) y ácido ascórbico como agente reductor. Todos estos componentes se utilizaron en cantidades estequiométricas, con esta proporción de catalizador se aseguran suficientes especies activadoras presentes en el equilibrio de la ATRP, tal como se muestra en el esquema de la **Figura 7.20**.



**Figura 7.20.** Esquema de síntesis de copolímeros (A) dibloque y (B) tribloque mediante ATRP-AGET en medio acuoso, utilizando HMTETA como ligando alifático tetradentado.

Los copolímeros sintetizados fueron caracterizados por espectroscopía de <sup>1</sup>H-RMN. En todos los espectros obtenidos se observan las señales características de los bloques de PEG o MPEG y de NIPAM. Esta técnica se utilizó para determinar la composición molar de los copolímeros sintetizados y la conversión.

La composición molar de los copolímeros tribloque (PNIPAM<sub>m</sub>-b-PEG<sub>n</sub>-b-PNIPAM<sub>m</sub>) se determinó mediante la relación de integración entre la resonancia correspondiente al metino del grupo isopropilo del bloque de NIPAM (-CONHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, δ=4.0 ppm) que se tomó como referencia y la resonancia de los protones del óxido de etileno del PEG ((-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)<sub>n</sub>, δ=3.6 ppm), considerando el grado de polimerización promedio (*DP<sub>n</sub>*) obtenida por MALDI-TOF (*DP<sub>n</sub>*=43, 74 y 131, respectivamente). Para determinar el peso molecular de los bloques de PNIPAM se asumió que los dos bloques tienen la misma composición. Un espectro del copolímero tribloque PNIPAM<sub>44</sub>-PEG<sub>43</sub>-PNIPAM<sub>44</sub> se muestran en la **Figura 7.21**.



**Figura 7.21.** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del copolímero tribloque  $\text{PNIPAM}_{44}\text{-PEG}_{43}\text{-PNIPAM}_{44}$  en  $\text{CDCl}_3$ .

En los copolímeros dibloque ( $\text{MPEG}_n\text{-b-PNIPAM}_m$ ), la composición se determinó mediante la relación de integración entre las señales del bloque de NIPAM ( $-\text{CONHCH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $\delta=4.0$  ppm) y del óxido de etileno del MPEG ( $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2-)_n$ ,  $\delta=3.6$  ppm), donde  $n=15$ , 44 y 117, en estos materiales se estableció como referencia la señal del grupo metilo del bloque de MPEG ( $-\text{CH}_3$ ,  $\delta=3.3$  ppm, 3H). Un espectro del copolímero dibloque  $\text{MPEG}_{44}\text{-PNIPAM}_{97}$  se muestra en la **Figura 7.22**.

Los resultados de conversión y peso molecular experimental de los copolímeros tribloque y dibloque se muestran en la **Tabla 7.6**. En general, se observa buena concordancia entre el peso molecular teórico ( $M_n$  teórico) y los pesos moleculares obtenidos por RMN ( $M_n$  experimental RMN) y SEC ( $M_p$  experimental SEC). Las discrepancias observadas entre los valores de  $M_n$  teórico y  $M_n$  SEC son atribuidas a que en los análisis de SEC se utilizó una curva de calibración realizada con estándares de PS y el volumen hidrodinámico entre el PS y PNIPAM o PEG son muy diferentes en el solvente utilizado (THF). Después de 24 horas de reacción, en las polymerizaciones se alcanzaron conversiones entre 42-92% para los copolímeros dibloque y entre 38-60% para los copolímeros tribloque. Entre los factores más importantes que están

involucrados en el proceso ATRP se encuentran el tipo de monómero e iniciador utilizados [111]. En este sentido, las diferencias en el grado de conversión en los copolímeros sintetizados se pueden atribuir al tamaño de la cadena del bloque hidrófilo. Cuando se utilizó un macroiniciador de MPEG o PEG con cadenas más largas, la conversión fue menor.

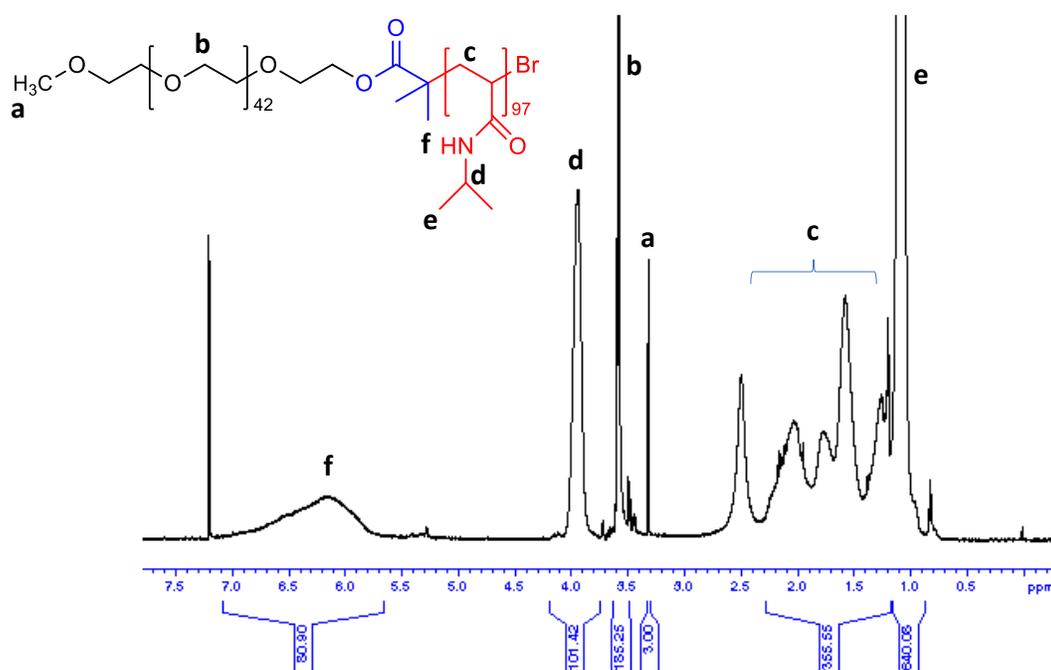


Figura 7.22. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN del dibloque  $\text{MPEG}_{44}\text{-b-PNIPAM}_{97}$  en  $\text{CDCl}_3$ .

Tabla 7.6. Conversión y pesos moleculares de los copolímeros obtenidos por ATRP-AGET en medio acuoso, utilizando diferentes longitudes de cadena de bloque hidrófilo y  $\text{CuBr}_2/\text{HMTETA}$  como como complejo catalítico.

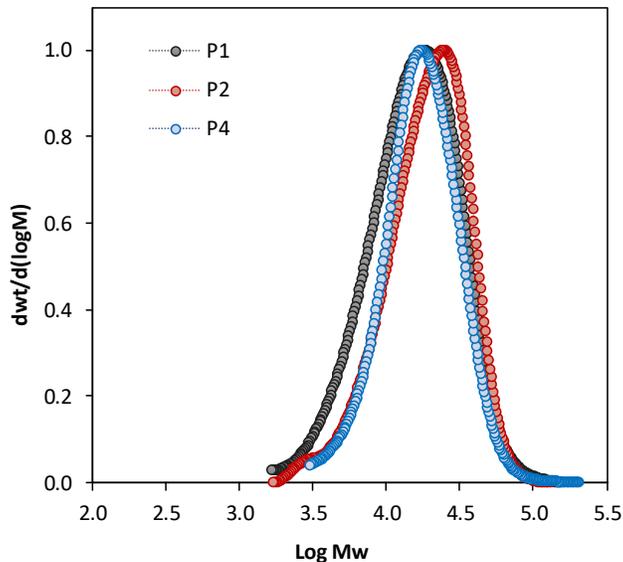
ID	$M_n$ del macroiniciador ATRP <sup>MALDI</sup> <sup>a</sup>	Conversión <sup>b</sup> (%)	$M_n$ teórico (Da) <sup>c</sup>	$M_n$ experimental RMN (Da) <sup>d</sup>	$M_p$ experimental SEC (Da)	$\bar{D}$ SEC	$\phi_{\text{MPEG/PEG}}$	Composición <sup>e</sup>
P1	841.8	69.7	8735.6	14006.9	8581.0	1.30	0.07	$\text{MPEG}_{15}\text{-PNIPAM}_{116}$
P2	2119.4	92.0	12535.2	13067.5	8121.0	1.33	0.20	$\text{MPEG}_{44}\text{-PNIPAM}_{97}$
P3	5291.2	42.5	10097.6	14271.8	5928.0	1.31	0.43	$\text{MPEG}_{117}\text{-PNIPAM}_{79}$
P4	2152.2	60.5	8999.8	11956.1	8942.0	1.24	0.20	$\text{PNIPAM}_{44}\text{-PEG}_{43}\text{-PNIPAM}_{44}$
P5	3606.0	55.7	9907.9	13565.3	6064.0	1.35	0.29	$\text{PNIPAM}_{44}\text{-PEG}_{74}\text{-PNIPAM}_{44}$
P6	6175.1	38.2	10495.2	13289.8	7372.0	1.28	0.50	$\text{PNIPAM}_{32}\text{-PEG}_{131}\text{-PNIPAM}_{32}$

Complejo catalítico=  $\text{CuBr}_2/\text{HMTETA}$ ;  $([\text{M}]_0/[\text{RX}]_0) = 100$ ; Temperatura=  $30^\circ\text{C}$ ; Tiempo= 24 horas. <sup>d,e</sup>H-RMN  
<sup>c</sup>  $M_n$  teórico =  $([\text{M}]_0/[\text{RX}]_0 * \text{UR}) * \text{conversión} + M_n \text{ RX}$

Para determinar la composición de los copolímeros en términos de fracción volumen ( $\Phi_{\text{MPEG}}$  o  $\Phi_{\text{PEG}}$ ) se utilizó la **Ecuación 2**. El  $M_n$  del bloque 1 (PEG o MPEG) se determinó por MALDI-TOF-MS (**Tabla 7.6**), mientras que el  $M_n$  del bloque 2 (PNIPAM) se obtuvo restando el  $M_n$  del bloque 1 al  $M_n$  experimental RMN (Da) de cada copolímero. Se obtuvieron copolímeros en bloque con fracciones volumen de MPEG o PEG entre 0.07 y 0.50.

$$\Phi_{\text{MPEG/PEG}} = \frac{\frac{M_n \text{ Bloque 1, MALDI}}{\rho_{\text{Bloque 1}} \left(\frac{\text{g}}{\text{cm}^3}\right)}}{\frac{M_n \text{ Bloque 1, MALDI}}{\rho_{\text{Bloque 1}} \left(\frac{\text{g}}{\text{cm}^3}\right)} + \frac{M_n \text{ Bloque 2, RMN}}{\rho_{\text{Bloque 2}} \left(\frac{\text{g}}{\text{cm}^3}\right)}} \dots \text{ (Ecuación 2)}$$

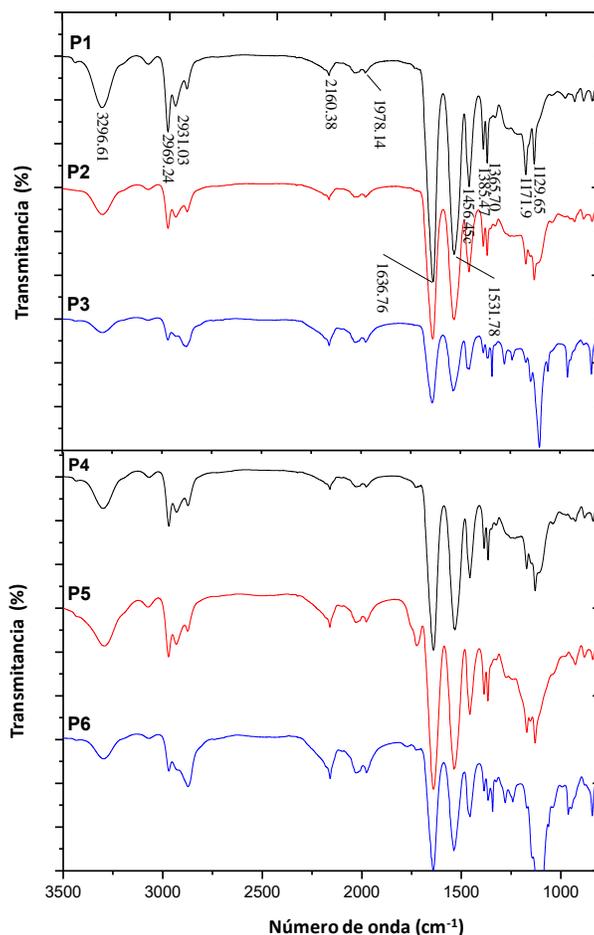
En la **Figura 7.23** se presenta la distribución de los pesos moleculares de las polymerizaciones **P1**, **P2** y **P4**. A pesar de los diferentes valores de conversión obtenidos, se puede observar que en todos los casos las curvas son monomodales. En todas las polymerizaciones se obtuvieron dispersidades entre 1.2 y 1.3.



**Figura 7.23.** Distribución de pesos moleculares de las polymerizaciones **P1**, **P2** y **P4** realizadas por ATRP-AGET en medio acuoso utilizando  $\text{CuBr}_2/\text{HMTETA}$  como complejo catalítico y conversiones de monómero entre 60.0 y 92.0 % de los copolímeros puros.

Adicionalmente, se analizaron los copolímeros dibloque y tribloque mediante espectroscopía de infrarrojo. En todos los espectros mostrados en la **Figura 7.24**, se observa cerca de 3300

$\text{cm}^{-1}$  el estiramiento del hidrógeno presente en el grupo amida (N–H) del PNIPAM y la flexión de hidrógeno cercano a  $1530 \text{ cm}^{-1}$ . También se observa cerca de  $1380 \text{ cm}^{-1}$  la flexión de hidrógeno del grupo metilo del isopropilo.



**Figura 7.24.** Espectros de IR de los copolímeros dibloque (P1-P3) y tribloque (P4-P6).

### 7.2.1. Efecto del tipo de complejo de Cu utilizado

Los complejos catalíticos formados a partir de sales de Cu con ligandos basados en nitrógeno y haluros se forman dinámicamente, en el sistema de polimerización la concentración del complejo catalítico (sal de cobre) depende principalmente de las constantes de estabilidad en el medio de reacción. Se ha reportado que los catalizadores de bromuro de cobre presentan una constante de estabilidad mayor cuando se utiliza agua como medio de reacción y esto

permite un mayor control en las polimerizaciones ATRP donde se utiliza agua como disolvente, esto comparado con los complejos de cloruro de cobre. Lo anterior se atribuye a valores de  $k_{\text{deact}}$  más altas en el caso de los complejos derivados de los bromuros. Sin embargo, si el iniciador de haluro de alquilo o el estado latente del polímero es propenso a participar en reacciones de sustitución nucleofílica, es necesario el uso de iniciadores y catalizadores derivados de cloruros [111].

Considerando lo anterior, en este trabajo de investigación también se evaluó el uso de complejos catalíticos basados en cloruro ( $\text{CuCl}_2/\text{HMTETA}$ ), utilizando los mismos componentes de la serie de experimentos mencionados anteriormente. Los resultados de composición, conversión, peso molecular teórico y experimental (RMN y SEC) se presentan en la **Tabla 7.7**. Los resultados indican un menor control, comparados con las polimerizaciones realizadas con el complejo de  $\text{CuBr}_2/\text{HMTETA}$ . En esta serie de experimentos, en todos los casos se obtuvieron dispersidades entre 1.4 y 1.5, mientras que para los experimentos realizados con los complejos de bromuro se obtienen dispersidades entre 1.2 y 1.3.

Los valores de peso molecular teórico y experimental obtenido por SEC ( $M_{p, \text{SEC}}$ ) tuvieron mayor concordancia en comparación con los obtenidos por RMN. Los pesos moleculares obtenidos por RMN siempre fueron mayores que los teóricos. Esto se atribuye a que los valores de peso molecular en RMN fueron calculados considerando la composición final del copolímero puro. En el proceso de purificación de los productos se utilizó una membrana de diálisis con tamaño de poro de 1,000 Da, esto indica que cadenas de copolímero o iniciador menores a este peso molecular fueron eliminadas en el proceso de diálisis.

Los valores de conversión fueron mayores cuando se utilizaron macroiniciadores con dos funcionalidades bromuro ( $\text{Br-PEG}_n\text{-Br}$ ). No obstante, cuando se comparó el efecto de la longitud de la cadena en macroiniciadores de la misma naturaleza se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con el complejo de bromuro, es decir, se obtuvo una menor conversión cuando se utilizaron macroiniciadores de mayor longitud de cadena.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se recomienda el uso de complejos catalíticos basados en bromuro ( $\text{CuBr}_2/\text{HMTETA}$ ) para ATRP-AGET en medio acuoso ya que se obtiene mayor control en la polimerización.

**Tabla 7.7.** Composición, conversión y pesos moleculares de los copolímeros obtenidos por ATRP-AGET en medio acuoso, utilizando diferentes longitudes de cadena de bloque hidrófilo y  $\text{CuCl}_2/\text{HMTETA}$  como complejo catalítico.

ID	$M_n$ del macroiniciador ATRP <sup>MALDI</sup> <sup>a</sup>	Conversión <sup>b</sup> (%)	$M_n$ teórico (Da) <sup>c</sup>	$M_n$ experimental RMN (Da) <sup>d</sup>	$M_p$ experimental SEC (Da)	$\bar{D}_{SEC}$	$\phi_{\text{MPEG/PEG}}$	Composición <sup>e</sup>
P7	841.8	54.5	7015.1	15853.3	10892.0	1.47	0.07	MPEG <sub>15</sub> -PNIPAM <sub>133</sub>
P8	2119.4	63.5	9302.0	16318.0	10041.0	1.46	0.20	MPEG <sub>44</sub> -PNIPAM <sub>125</sub>
P9	5291.2	38.2	9616.5	14997.9	10715.0	1.54	0.43	MPEG <sub>117</sub> -PNIPAM <sub>85</sub>
P10	2152.2	86.1	11892.7	13130.9	10179.0	1.44	0.20	PNIPAM <sub>48</sub> -PEG <sub>43</sub> -PNIPAM <sub>48</sub>
P11	3606.0	89.3	13708.0	13193.4	10601.0	1.50	0.30	PNIPAM <sub>42</sub> -PEG <sub>74</sub> -PNIPAM <sub>42</sub>
P12	6175.1	61.9	13177.3	14659.1	7475.0	1.40	0.50	PNIPAM <sub>38</sub> -PEG <sub>131</sub> -PNIPAM <sub>38</sub>

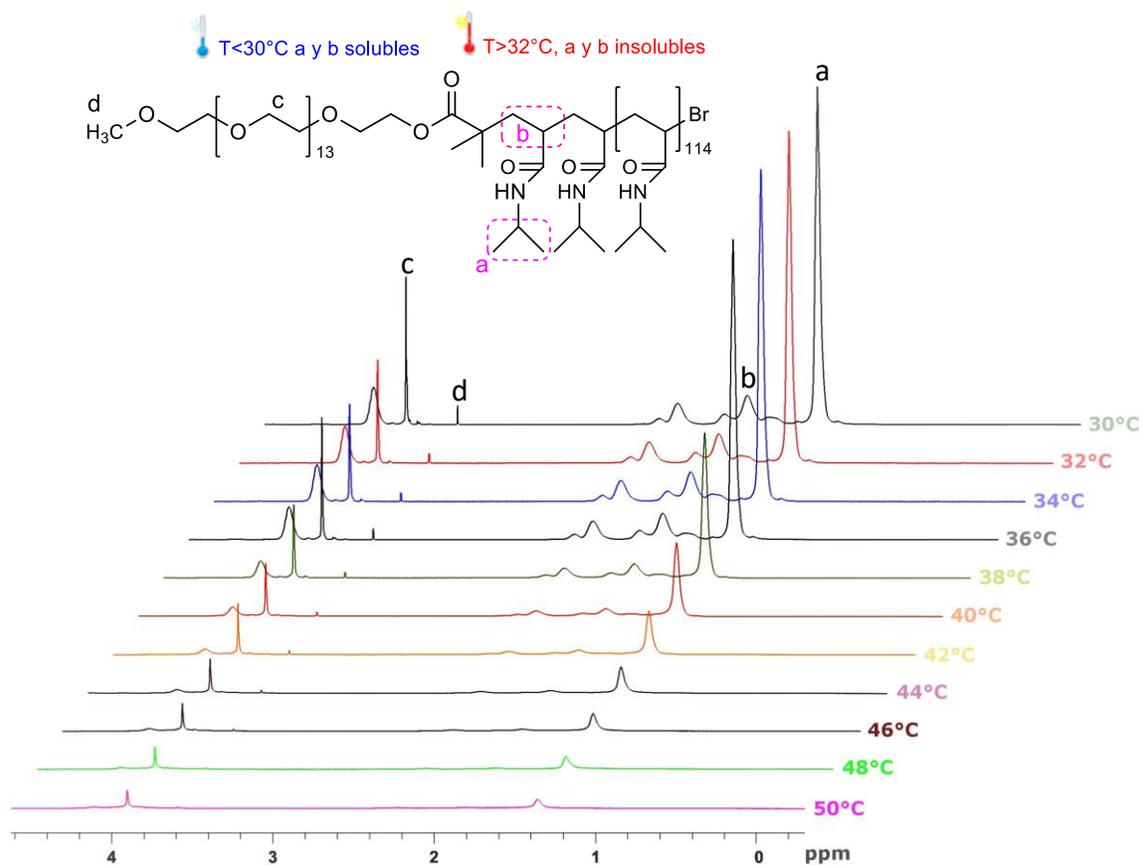
Complejo catalítico=  $\text{CuCl}_2/\text{HMTETA}$ ;  $([M]_0/[RX]_0) = 100$ ; Temperatura= 30°C; Tiempo= 24 horas. <sup>d,e</sup>H-RMN  
<sup>c</sup>  $M_n$  teórico =  $[[M]_0/[RX]_0 * UR] * \text{conversión}] + M_n \text{ RX}$

### 7.2.2. Respuesta a la temperatura de los copolímeros dibloque y tribloque

Una vez obtenidos los copolímeros dibloque y tribloque se evaluó el efecto de la fracción volumen de MPEG y PEG sobre los parámetros fisicoquímicos en el bloque termosensible, sobre todo en las transiciones de fase [113]. Para ello, se evaluó por <sup>1</sup>H RMN en solución de óxido de deuterio ( $\text{D}_2\text{O}$ ) el comportamiento de los materiales al aumentar progresivamente la temperatura, puesto que, derivado de la insolubilidad del bloque de PNIPAM por efecto del cambio de temperatura, se debe observar una desaparición de las señales correspondientes a este bloque [114].

En la **Figura 7.25** se presentan los espectros de <sup>1</sup>H RMN del copolímero dibloque MPEG<sub>15</sub>-PNIPAM<sub>116</sub> en  $\text{D}_2\text{O}$  (**P1**) a una concentración de 20 mg/mL y en un intervalo de temperatura de 30 a 50° C. La resonancia de los protones de la unidad repetitiva del bloque hidrófilo (MPEG) permanece sin cambios ( $\delta=3.65$  ppm) en todas las temperaturas evaluadas, mientras que, las resonancias asociadas al bloque de NIPAM, ( $-\text{CH}_2-\text{CH}-$ ),  $\delta=1.5-2.2$  ppm asignadas

a los metilenos y metinos en la cadena principal y de los grupos metilo del isopropilo ( $(-\text{CH}_3)_2$ ,  $\delta=3.3$  ppm) disminuyeron su intensidad después de la LCST del copolímero. Este comportamiento indica que las cadenas de PNIPAM disminuyen su solubilidad a temperaturas por encima de su LCST, a este fenómeno se le denomina separación de fases o colapso termoinducido [114].



**Figura 7.25.** Espectros de <sup>1</sup>H RMN del copolímero dibloque MPEG<sub>15</sub>-PNIPAM<sub>116</sub> (P1) en D<sub>2</sub>O (20 mg/mL) en un intervalo de temperatura de 30-50°C.

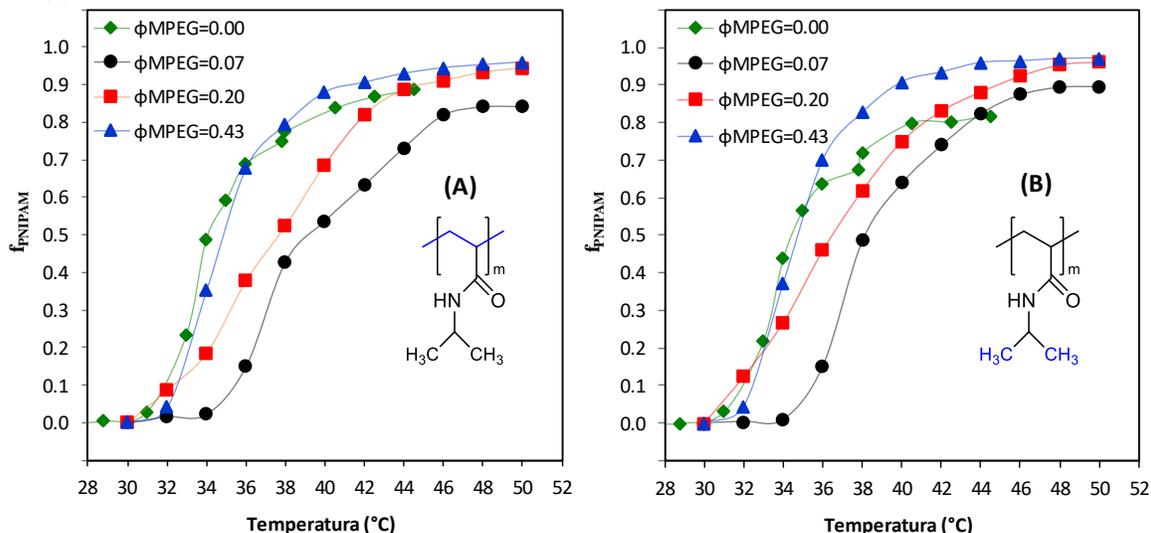
En los copolímeros dibloque y tribloque con fracción volumen de MPEG ( $\phi_{\text{MPEG}}$ ): 0.07, 0.20 y 0.43 o de PEG ( $\phi_{\text{PEG}}$ ): 0.20, 0.30 y 0.50, la fracción del bloque de PNIPAM que sale de fase ( $f_{\text{PNIPAM}}$ ) se determinó cuantitativamente a partir de los valores de integración en los espectros de RMN obtenidos a diferentes temperaturas (30-50°C, con incrementos cada 2°C la temperatura de la dispersión), utilizando la siguiente ecuación:

$$f_{PNIPAM} = 1 - \frac{I_T}{I_{T_0}} \dots \dots \dots \text{(Ecuación 3)}$$

Donde  $I_T$  es la relación de integración a cada una de las temperaturas experimentales y el valor de  $I_{T_0}$  es la relación de integración inicial (temperatura antes de la separación de los bloques de PNIPAM) [114]. Para determinar la solubilidad del bloque del poli(NIPAM) en el disolvente acuoso, se consideró que el óxido de deuterio ( $D_2O$ ) de igual manera favorece la solubilidad de bloque de PNIPAM formando puentes de deuterio entre el átomo de nitrógeno y el átomo de deuterio, evidentemente habrá un efecto isotópico del átomo de deuterio y la brecha energética para romper el puente de deuterio será mayor en comparación con los puentes de hidrógeno en el  $H_2O$ .

A pesar de lo antes mencionado, se consideró que la evaluación mediante RMN de la separación de fases por efecto de la temperatura, es completamente comparable entre los dos disolventes ( $H_2O$  y  $D_2O$ ). Un dato adicional es que dentro del bloque de PNIPAM se tienen principalmente un conjunto de tres resonancias, una de ellas es la resonancia del hidrógeno  $-CH-$  del grupo isopropilo (marcado como “d” en la **Figura 7.22**) con desplazamiento químico en 3.95 ppm, las resonancias de la cadena polimérica  $-CH_2-CH-$  que tienen un desplazamiento químico en  $\delta=1.5-2.2$  ppm, (identificadas como “c” en la **Figura 7.22**) y los grupos metilos del isopropilo ( $(-CH_3)_2$  que presentan resonancias con desplazamiento químico de 0.9-1.3 ppm, (identificados como “e” en la **Figura 7.22**). Considerando lo anterior, se calcularon las fracciones del bloque de PNIPAM que salen de solución en cada uno de los copolímeros preparados. En la **Figura 7.26** se presentan los resultados de la fracción de PNIPAM que colapsa y sale de fase en los copolímeros preparados con diferente fracción volumen de MPEG ( $\phi_{MPEG}=0.07, 0.20$  y  $0.43$ ), considerando la señal del grupo  $-CH-$  del isopropilo (**Figura 7.26 A**) y la cadena polimérica,  $-CH_2-CH-$  (**Figura 7.26 B**). Adicionalmente, se estableció que la señal de resonancia más representativa en la separación de los bloques de PNIPAM, es la señal con desplazamiento en 3.95 ppm, ya que es la señal directamente involucrada en el proceso de ruptura del puente de hidrógeno, al mismo tiempo,

es más sensible debido a que esta resonancia representa a un solo átomo de hidrógeno en la unidad repetitiva del bloque de PNIPAM.



**Figura 7.26.** Fracción de PNIPAM colapsada en los copolímeros dibloque con el aumento de temperatura de 30-50°C, determinada a partir del seguimiento de la relación de integración del grupo (A)  $-\text{CH}_2-\text{CH}-$ , ( $\delta=1.5-2.2$  ppm, 3H) de la cadena principal y de los grupos del isopropilo (B) ( $(-\text{CH}_3)_2$ ,  $\delta=3.3$  ppm, 6H).

De acuerdo con Hoogenboom y cols., [47] la temperatura crítica de solubilidad más baja (LCST) es definida como la temperatura a la cual se presenta una mínima separación de fases, considerando lo anterior, se estableció que al 10% ocurre una separación de fases mínima y la temperatura a la que ocurre esta separación se estableció como el valor de LCST. Así mismo, otro parámetro importante a considerar en los materiales termosensibles es la temperatura de turbidez ( $T_{\text{CP}}$ , *cloud point temperatura*, por sus siglas en inglés) y es definida como la transición de fase de una solución polimérica a una concentración definida de una solución estable hacia un estado agregado-colapsado acompañado de una turbidez en la solución. Tomando en cuenta lo anterior, se consideró que estas aglomeraciones se presentan cuando se ha separado más del 50% de la fracción de PNIPAM presente y se estableció que a esta condición se presenta la  $T_{\text{CP}}$ . En **Tabla 7.8** se presentan los valores de LCST y  $T_{\text{CP}}$  encontrados para la transición térmica de los copolímeros dibloque, **P7-P9** ( $\text{MPEG}_n\text{-b-PNIPAM}$ ) determinados mediante resonancia magnética nuclear y también los valores del

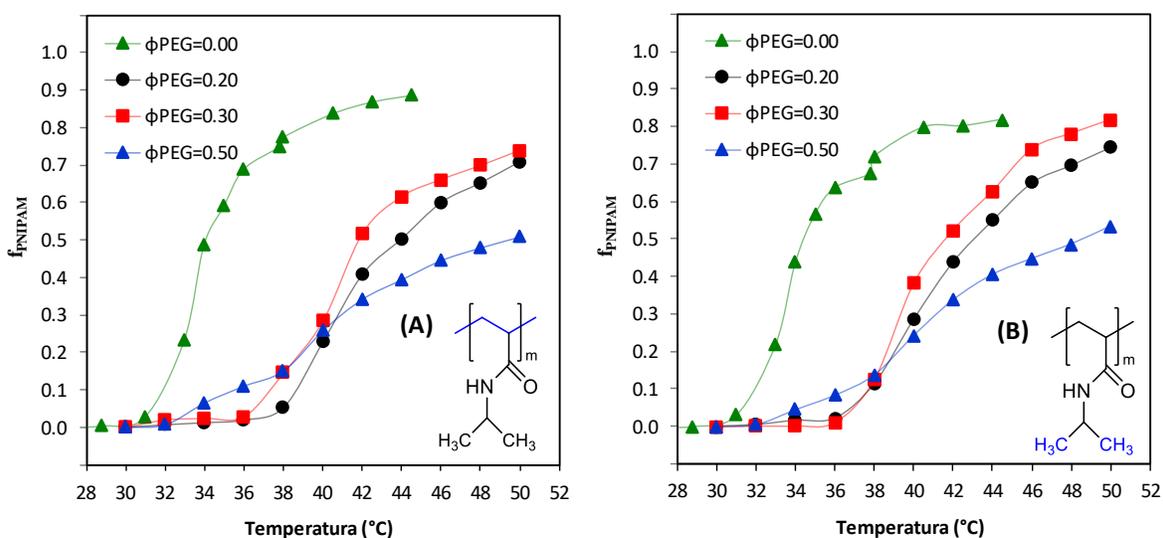
homopolímero de PNIPAM (**P0**) que fue sintetizado mediante ATRP-AGET en medio acuoso a una temperatura de 32°C y empleando el 2-bromo-2-metil propanoato de hidroxietilo como iniciador y cloruro de cobre (II).

**Tabla 7.8.** LCST y temperatura de turbidez (TCP) para la transición térmica de copolímeros MPEG-b-PNIPAM y el homopolímero de PNIPAM

ID	Composición	$\Phi_{\text{MPEG}}$	LSCT (10% colapso), °C	T <sub>CP</sub> (50% de colapso), °C
P0	PNIPAM	0.00	31.0	34.0
P7	MPEG <sub>15</sub> -PNIPAM <sub>133</sub>	0.07	36.0	38.5
P8	MPEG <sub>44</sub> -PNIPAM <sub>125</sub>	0.20	34.0	36.5
P9	MPEG <sub>117</sub> -PNIPAM <sub>85</sub>	0.43	32.5	34.8

Como se puede observar en la tabla anterior, el PNIPAM tiene una LCST de 31°C que es muy similar a la LCST del monómero [9]. También se observa que el copolímero dibloque que contiene una menor fracción de MPEG ( $\Phi_{\text{MPEG}}=0.07$ ), tiende a estabilizar el bloque de PNIPAM evitando su colapso hasta que la LCST alcanza una temperatura de 36°C esto se puede explicar debido a que la hidrofilia del bloque poli(óxido de etileno) tenderá a mantener en solución al bloque de PNIPAM, esta misma tendencia se observa con la temperatura de turbidez (T<sub>CP</sub>) y la aglomeración se presenta hasta los 38.5°C. Esta tendencia se esperaría que fuera consistente con el incremento de la fracción volumen del poli(óxido de etileno), sin embargo, lo que se observa con el incremento en la fracción volumen de MPEG ( $\Phi_{\text{MPEG}}=0.20$  y 0.43) es la disminución de la LCST hasta casi alcanzar el valor de la LCST del homopolímero de PNIPAM (**P0**). Esta tendencia también se presenta con los valores de T<sub>CP</sub> calculados, es decir, el valor de T<sub>CP</sub> disminuye al aumentar la concentración del bloque de PNIPAM y el mayor valor de T<sub>CP</sub> se obtuvo en el copolímero con la menor concentración de poli(óxido de etileno), ( $\Phi_{\text{MPEG}}=0.07$ ). Los resultados anteriores podrían ser controversiales, ya que se esperaría que al incrementar la fracción volumen del poli(óxido de etileno) este bloque hidrófilo debería estabilizar el bloque hidrófobo de PNIPAM impidiendo que éste salga de fase a las temperaturas evaluadas y esto aparentemente no está sucediendo.

En los copolímeros tribloque (PNIPAM<sub>m</sub>-b-PEG<sub>n</sub>-b-PNIPAM<sub>m</sub>) también se realizaron una serie de experimentos similares a los presentados en la sección anterior para los copolímeros dibloque. De igual manera se incrementó la temperatura de las soluciones en dióxido de deuterio (D<sub>2</sub>O) y mediante <sup>1</sup>H RMN se determinaron las concentraciones del bloque de PNIPAM remanente en solución y se calculó la fracción de NIPAM que colapsa ( $f_{\text{NIPAM}}$ ). El comportamiento de  $f_{\text{NIPAM}}$  con respecto al incremento de la temperatura se presenta en la **Figura 7.27**. También se consideró que, la resonancia del hidrógeno del grupo –CH– en el grupo isopropilo en la unidad repetitiva del NIPAM que tiene un desplazamiento químico de 3.95 ppm, es la señal distintiva que describe el proceso del cambio de fase del bloque termosensible. Además, también considerando que se trata de un solo hidrógeno, es más sensible a los cambios de concentración.



**Figura 7.27.** Fracción de PNIPAM colapsada en los copolímeros tribloque con el aumento de temperatura de 30-50°C, determinada a partir del seguimiento de la relación de integración del grupo (A) –CH<sub>2</sub>–CH–, ( $\delta=1.5-2.2$  ppm, 3H) de la cadena principal y de los grupos colgantes del isopropilo (B) ((–CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,  $\delta=3.3$  ppm, 6H).

Tal como se realizó en el caso de los copolímeros dibloque, se estableció el valor de LCST como la temperatura en donde se alcanza al menos el 10% del colapso del bloque termosensible y  $T_{\text{CP}}$  como la temperatura en donde este mismo bloque presenta al menos el 50% del colapso, los datos encontrados se muestran en la **Tabla 7.9**.

**Tabla 7.9.** Valores de LCST y temperatura de turbidez ( $T_{CP}$ ) para la transición térmica de copolímeros  $PNIPAM_m$ -b- $PEG_n$ -b- $PNIPAM_m$ .

ID	Composición	$\phi_{PEG}$	LSCT (10% colapso), °C	$T_{CP}$ (50% de colapso), °C
P0	PNIPAM	0.00	31.0	34.0
P10	$PNIPAM_{48}$ - $PEG_{43}$ - $PNIPAM_{48}$	0.20	38.5	44.0
P11	$PNIPAM_{42}$ - $PEG_{74}$ - $PNIPAM_{42}$	0.30	37.0	41.0
P12	$PNIPAM_{38}$ - $PEG_{131}$ - $PNIPAM_{38}$	0.50	36.0	48.0

En este tipo de copolímeros, la presencia del bloque de poli(óxido de etileno) proporcionó una mayor estabilidad a los bloques de NIPAM, y se presentó la misma tendencia que en el caso de los copolímeros dibloque, es decir, un mayor valor de LCST para los materiales con una concentración menor de óxido de etileno, esto al compararlos con el homopolímero de PNIPAM (31°C). En el caso del copolímero que contiene la menor concentración de PEG ( $\phi_{PEG}=0.20$ ) se obtuvo un valor cercano a 38.5°C, seguido de los terpolímeros que contienen fracciones de PEG entre 0.3-0.5 (37 y 36°C, respectivamente). Con respecto a la  $T_{CP}$  se observa que en todos los materiales la introducción del bloque de poli(óxido de etileno) conduce a valores de temperatura de turbidez mayores que los obtenidos en los copolímeros dibloque, un dato interesante a discutir es la diferencia entre los valores de LCST y  $T_{CP}$ , ya que en el homopolímero de PNIPAM esta diferencia es de 3°C, mientras que, para los copolímeros con fracciones volumen de PEG entre 0.2 y 0.3, esta diferencia alcanza hasta 6°C y la mayor diferencia (12°C) se observa en los terpolímeros con la mayor fracción de PEG ( $\phi_{PEG}=0.50$ ).

Los resultados anteriores sugieren que en el caso de macroiniciadores bifuncionales (PEG), una mayor fracción volumen de este bloque permite envolver el núcleo hidrófobo de PNIPAM, disminuyendo su tendencia hacia el colapso y esto se presenta como un aumento en los valores de  $T_{CP}$ . Respecto a estos resultados, Filippov y cols., [21] reportaron que la separación de fases en copolímeros tribloque similares a los preparados en este estudio, depende en gran medida de la composición de cada bloque. Tal como se observó en los copolímeros en estudio, donde la mayor fracción de NIPAM ( $f_{NIPAM}$ ) que se separa o sale de fase se presentó en los terpolímeros con menor fracción volumen de PEG ( $\phi_{PEG}=0.20$  y 0.30) esto en comparación con los terpolímeros preparados con la mayor fracción de PEG ( $\phi_{PEG}=0.50$ ).

En cuanto a la temperatura de separación de fases, Teodorescu y cols., [17] mencionan que las temperaturas de asociación y/o agregación disminuyen en copolímeros tribloque con fracciones volumen de PEG más altas. Para demostrar lo anterior, estos autores también determinaron cuantitativamente el valor de LCST, y en todos los casos este valor fue de 40°C, tanto en los grupos de la cadena principal como en los grupos colgantes del isopropilo. Los resultados se atribuyen a que a esta temperatura los segmentos de PNIPAM hidrofóbos se concentran en el núcleo de la micela similar a una flor y en consecuencia, se reduce su movilidad molecular.

En general, cuando se comparó la cantidad de PNIPAM que sale de la fase continua en los copolímeros dibloque y tribloque, es muy notorio que en los copolímeros dibloque entre el 84-97% de los bloques de PNIPAM pierden su solubilidad en el medio. Mientras que en los copolímeros tribloque, se determinó una separación de los bloques de PNIPAM del 50-80%, esto indica que el tener dos bloques hidrofóbos en la cadena principal, disminuye el fenómeno de separación de fases. En los dos tipos de copolímeros estudiados (dibloque y tribloque), el comportamiento de los grupos de la cadena principal y de los grupos colgantes del isopropilo es muy similar y es evidente que ambos grupos contribuyen en la transición de fase de los materiales sintetizados. No obstante, en los grupos metilos colgantes la fracción de PNIPAM que se sale de fase siempre fue mayor comparada con los grupos de la cadena principal. Resultados similares fueron reportados por Filippov y cols., [21] para copolímeros tribloque con fracción volumen de PEG de 0.52 y 0.44, respectivamente.

### 7.2.3. Tamaño de partícula

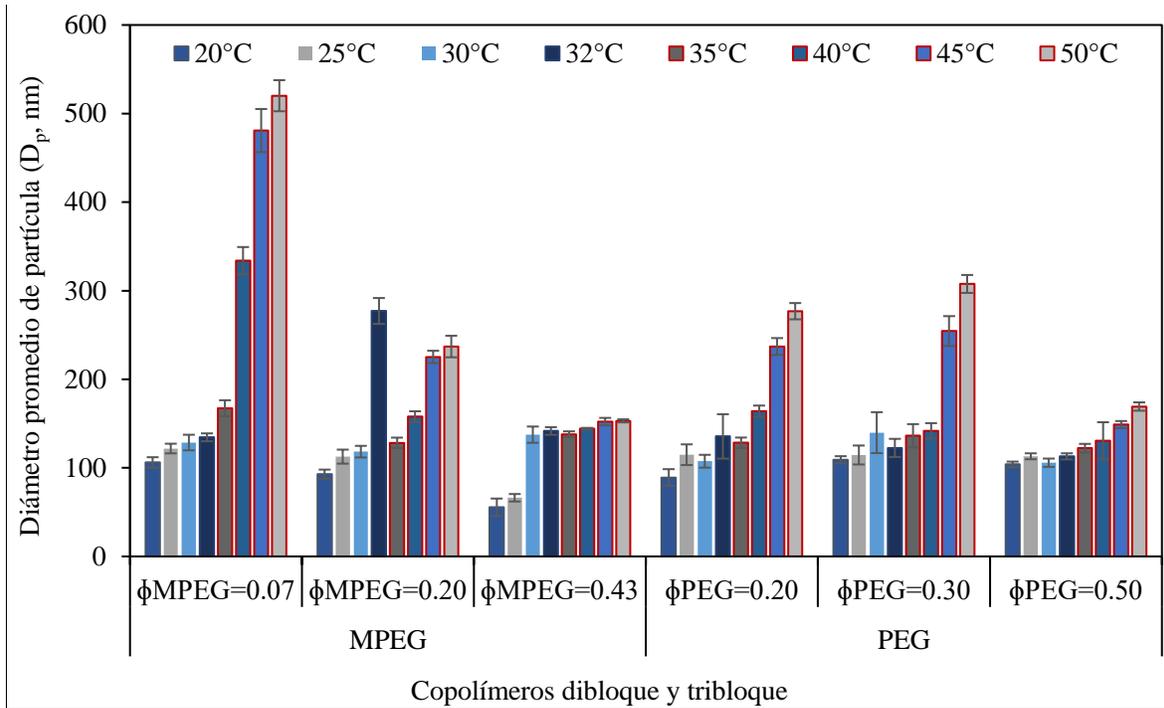
Para evaluar el tamaño de partícula y confirmar la formación de agregados micelares a temperaturas superiores a la LCST del bloque de PNIPAM, se realizaron mediciones de dispersión de luz dinámica (DLS) en solución acuosa de todos los copolímeros a temperaturas entre 20-50°C, en intervalos de 5°C y una concentración de 0.1% p/v. Se consideró esta concentración porque se ha reportado que este valor se encuentra por encima de la concentración micelar crítica (CMC) para este tipo de materiales [113]. Debido a la sensibilidad de la técnica, cada medición se programó para obtener 6 repeticiones en cada

temperatura evaluada. En la **Tabla 7.10** se muestran los datos obtenidos para cada copolímero.

**Tabla 7.10.** Diámetro promedio de partícula ( $D_p$ ) obtenidos por DLS a temperaturas de 20 a 50°C para los copolímeros dibloque y tribloque con diferente fracción volumen de MPEG y PEG en dispersión acuosa.

Temperatura (°C)	MPEG			PEG		
	$\phi_{\text{MPEG}}=0.07$	$\phi_{\text{MPEG}}=0.20$	$\phi_{\text{MPEG}}=0.43$	$\phi_{\text{PEG}}=0.20$	$\phi_{\text{PEG}}=0.30$	$\phi_{\text{PEG}}=0.50$
20	106.1	92.9	55.5	89.2	109.2	103.9
25	121.8	112.7	66.3	114.9	114.6	113.1
30	128.6	118.3	137.5	107.5	139.8	105.8
32	134.5	277.2	141.7	135.5	122.5	113.0
35	167.3	128.3	138.0	128.3	136.3	122.2
40	333.8	157.8	144.3	164.0	141.8	130.5
45	480.8	225.3	152.2	237.0	254.5	148.9
50	520.2	237.0	153.1	276.9	307.7	169.3

En la **Figura 7.28** se muestran los diámetros de partícula ( $D_p$ ) obtenidos para los copolímeros con diferente fracción volumen de MPEG ( $\phi_{\text{MPEG}}=0.07, 0.20$  y  $0.43$ ) y PEG ( $\phi_{\text{PEG}}=0.20, 0.30$  y  $0.50$ ). En general para los dos tipos de bloques hidrófilos evaluados, cuando se tenía una menor fracción volumen de MPEG o PEG se formaron agregados de mayor tamaño después de los 35 y 40°C, respectivamente. Sin embargo, el copolímero dibloque que contiene la menor cantidad de MPEG ( $\phi_{\text{MPEG}}=0.07$ ) fue el que presentó un incremento más notable en los diámetros promedio de partícula determinados después de los 35°C, alcanzando un  $D_p > 500$  nm a los 50°C y distribuciones de tamaño de partícula más amplias. En el copolímero que contiene la mayor fracción de MPEG ( $\phi_{\text{MPEG}}=0.43$ ), los diámetros obtenidos a diferentes temperaturas siempre fueron menores a 200 nm. En el caso de los copolímeros tribloque se obtuvo un comportamiento similar para el copolímero con la mayor fracción de PEG y en los copolímeros con fracción de PEG de 0.20 y 0.30, respectivamente se observó un pequeño incremento en los tamaños de diámetro promedio después de 35°C.



**Figura 7.28.** Diámetro de partícula de los copolímeros dibloque ( $\phi_{\text{MPEG}}=0.07, 0.20$  y  $0.43$ ) y tribloque ( $\phi_{\text{PEG}}=0.20, 0.30$  y  $0.50$ ), con el aumento de la temperatura desde  $20$  a  $50^\circ\text{C}$ .

Este fenómeno ya ha sido reportado para copolímeros tribloque en estudios de diámetro de partícula mediante DLS, se menciona que al calentar las dispersiones acuosas por encima de la LCST del bloque termosensible se observa aumento continuo en el diámetro promedio de las micelas presentes en el medio y este fenómeno es atribuido a la formación de agregados micelares [21][115].

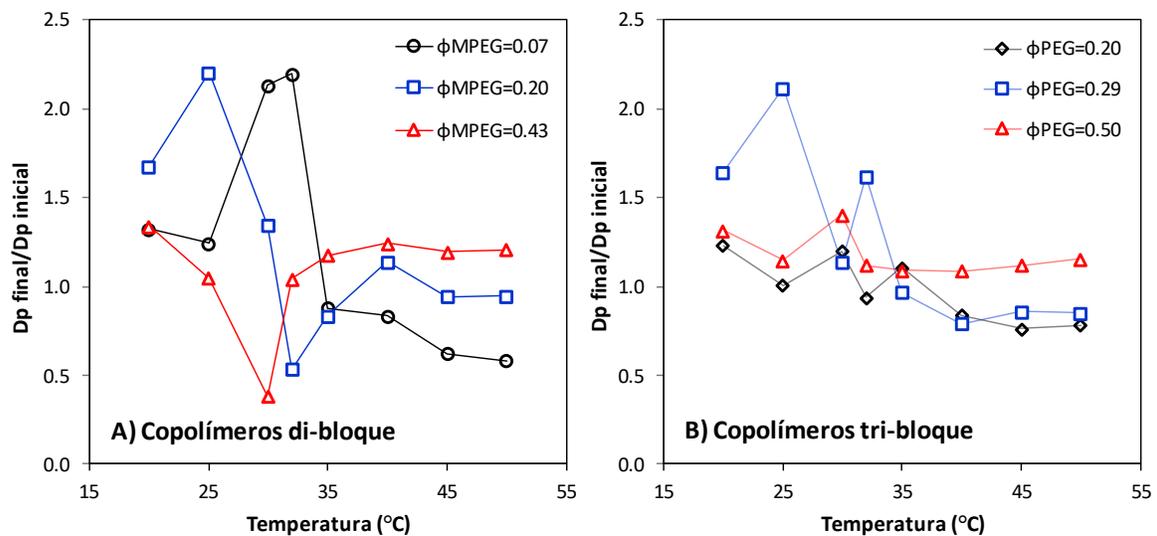
#### 7.2.4. Estabilidad de las dispersiones

Para evaluar el efecto del tamaño de la cadena hidrófila en la estabilidad de los copolímeros en bloque de poli(oxialquilen)-b-poli(NIPAM) en agua, se determinó mediante DLS el diámetro de partícula de los materiales después de almacenarlos a temperatura ambiente por 15 semanas, siempre procurando que se mantuvieran por debajo de la LCST del bloque termosensible. De manera preliminar se puede decir que no se observó separación de fases, incremento en la viscosidad o formación de aglomerados, esto se infiere ya que no se observó turbidez en las muestras almacenadas.

Para obtener cuantitativamente la estabilidad de las dispersiones, se determinaron los diámetros de partícula de las dispersiones acuosas de cada uno los copolímeros en bloque en estudio, considerando una concentración de 0.1% p/v y temperaturas entre 20-50°C, los datos obtenidos se definieron como diámetros promedio iniciales ( $D_{p_0}$ ) y se reportan en la **Tabla 7.10**. Después de 15 semanas de almacenamiento, se volvieron a determinar los diámetros de partícula de las dispersiones acuosas a las mismas temperaturas, estos valores se definieron como  $D_{p_t}$ . Una solución se puede considerar estable si el cociente  $D_{p_t}/D_{p_0}=1$ , por el contrario, una aglomeración de partículas indicaría una baja estabilidad de las soluciones y esta pudiera establecerse cuando  $D_{p_t}/D_{p_0}>1$ .

De acuerdo con los resultados obtenidos (**Figura 7.29**), se puede apreciar que, en las soluciones de los copolímeros dibloque con mayor fracción volumen de MPEG ( $\phi=0.20$  y  $0.43$ ), la estabilidad de las dispersiones es menor a temperaturas inferiores a la LCST ( $T\leq 32^\circ\text{C}$ ), establecida como  $D_{p_t}/D_{p_0}>1$ . Mientras que, por encima de esta temperatura, las dispersiones acuosas de estos copolímeros presentaron mayor estabilidad, es decir,  $D_{p_t}/D_{p_0}\approx 1$ . Estos resultados se puede atribuir a que los bloques hidrófilos presentes en los copolímeros en bloque de poli(oxialquilen-b-poli(NIPAM)) y a esas fracciones volumen ( $\phi=0.20$  y  $0.43$ ) han logrado establecer un equilibrio termodinámico entre los grupos etilenoxi, las moléculas del agua y los puentes hidrógeno presentes los bloques de poli(NIPAM). Después, por efecto de la temperatura ( $T\geq 35^\circ\text{C}$ ) ocurre el colapso del bloque del PNIPAM, atribuido a una alteración transitoria del puente de hidrógeno formado entre el agua y el hidrógeno de la amida secundaria y también influenciado por la presencia del grupo isopropilo en el NIPAM. Este colapso resulta en una disminución en los tamaños de partícula en las muestras almacenadas por más de 15 semanas, siguiendo un orden directamente proporcional con respecto a la fracción volumen de MPEG en los copolímeros dibloque, poli(MPEG)-b-poli(NIPAM) ( $\phi=0.43>0.20>\phi=0.07$ ). Lo anterior, nos orienta a afirmar que la presencia de la cadena del óxido de etileno incrementa la estabilidad de la partícula durante el colapso favorecido con el tiempo. Estos resultados se muestran en la **Figura 7.25A**.

Los copolímeros tribloque poli(NIPAM)-b-poli(PEG)-b-poli(NIPAM) se pueden considerar estables, debido a que el comportamiento del diámetro de partícula antes, durante y después de la LCST del bloque termosensible permanece sin cambio aparente es decir,  $Dp_t/Dp_0 \approx 1$ , esto entre las muestras iniciales y las almacenadas por 15 semanas. Sin embargo, para las dispersiones de los copolímeros tribloque con fracción volumen de PEG de 0.29, el diámetro de partícula antes de la LCST aumenta casi al doble de su valor inicial. Una explicación a este comportamiento es que, a esta concentración específica se presentó una probable afectación en las condiciones de almacenamiento de esta muestra, ya que, en los copolímeros con menor fracción volumen de bloque hidrófilo ( $\phi_{\text{PEG}}=0.20$ ) el comportamiento con respecto al diámetro de partícula es similar a las muestras que contienen la mayor fracción volumen de bloque hidrófilo ( $\phi_{\text{PEG}}=0.5$ ). Estos resultados se muestran en la **Figura 7.29B**.



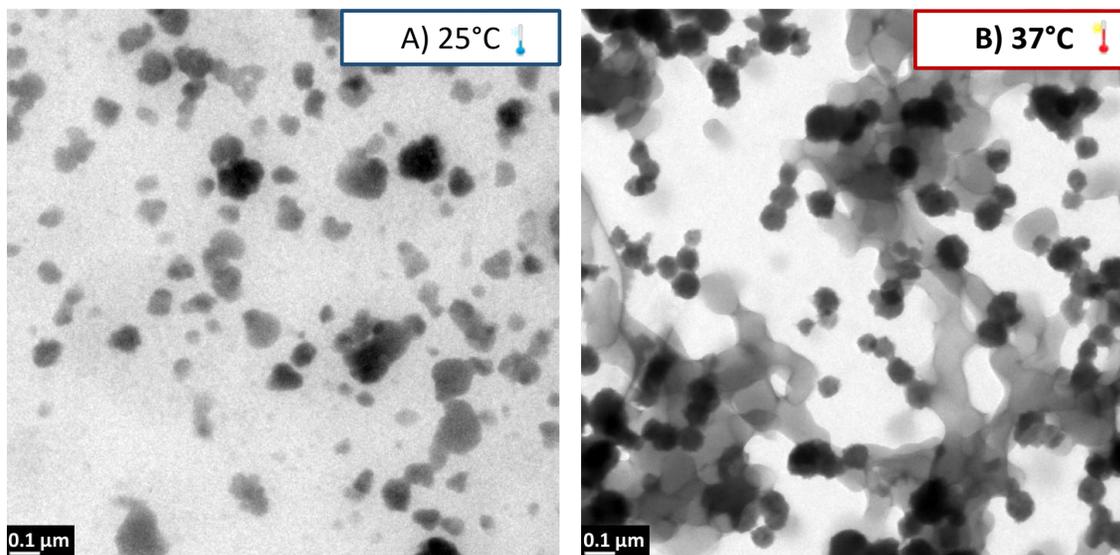
**Figura 7.29.** Estabilidad de los copolímeros (A) dibloque y (B) tribloque con diferentes fracciones volumen de MPEG y PEG al aumentar la temperatura desde 20 a 50°C después de 15 semanas de almacenamiento.

En resumen, las dispersiones acuosas de las muestras de copolímeros en bloque analizados son estables al menos en un período de 15 semanas y específicamente en el caso de los copolímeros de poli(MPEG)-b-poli(NIPAM) una mayor fracción volumen de bloque hidrófilo proporciona una mejor estabilidad. La estabilidad en los sistemas analizados también puede atribuirse a que en la mayoría de los copolímeros estudiados el diámetro

promedio obtenido antes de la separación de fases se encontraba entre 100 y 200 nm, estos tamaños de partícula proporcionan una mayor estabilidad termodinámica comparado con sistemas donde el tamaño de partícula es menor a 100 nm.

### 7.2.5. Morfología

La morfología obtenida del autoensamble en agua de copolímeros en bloque anfífilos está determinada principalmente por la fracción del bloque hidrófilo, el peso molecular del copolímero y el parámetro de interacción entre el bloque formador de núcleos y el agua ( $\chi$ ) [116]. Con el sentido de evaluar la morfología del copolímero dibloque MPEG<sub>15</sub>-b-NIPAM<sub>133</sub> ( $\phi_{\text{MPEG}}=0.07$ ) se depositó una solución diluida de este material (0.1% p/v) en rejillas de *Lacy-carbon* a temperatura ambiente (25°C) y se analizó en un microscopio electrónico del cual se obtuvo la micrografía mostrada en la **Figura 7.30A**.

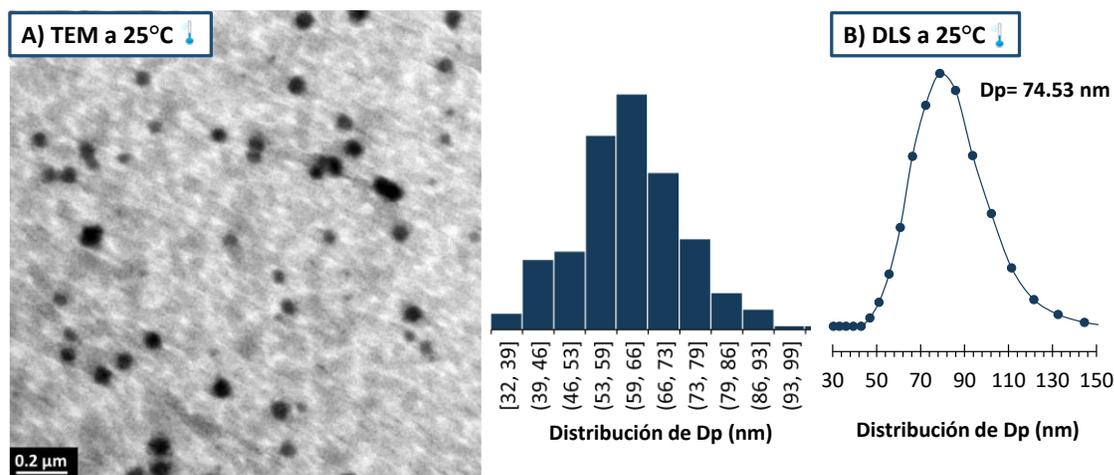


**Figura 7.30.** Micrografías de TEM del copolímero dibloque MPEG<sub>15</sub>-PNIPAM<sub>116</sub> (**P1**) con menor fracción volumen de MPEG ( $\phi_{\text{MPEG}}=0.07$ ) determinadas a 25°C (A) y 37°C (B).

De esta micrografía se puede establecer que el copolímero en bloque tiene un diámetro de partícula promedio de 97 nm, también se puede apreciar una morfología esférica. Adicionalmente, una solución acuosa de este mismo copolímero se calentó hasta 37°C y posteriormente se depositó en rejillas de *Lacy-carbon* también previamente calentadas a 37°C y tratadas para su análisis por TEM. En la micrografía (**Figura 7.30B**) se observa que

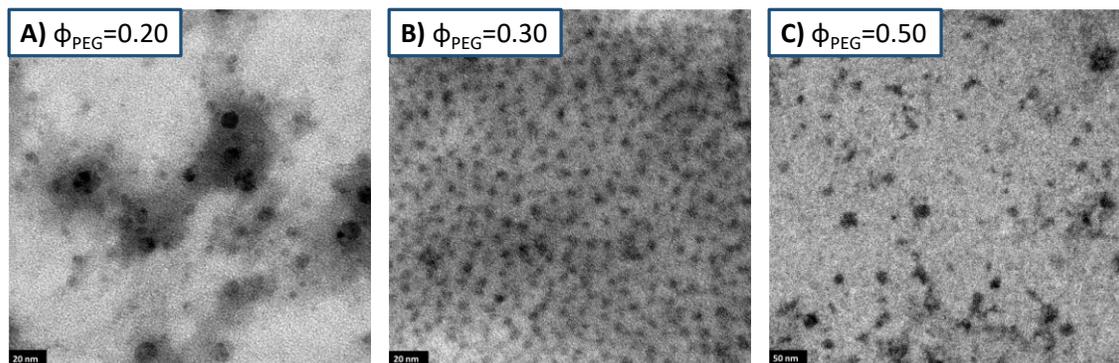
hay una población de partículas en donde el diámetro de partícula promedio fue muy similar al obtenido a 25°C ( $D_p=110$  nm). En otro sector de esta micrografía se puede observar que los copolímeros empiezan a salir de fase y a aglomerarse para formar partículas de mayor tamaño. Es necesario recordar que de acuerdo con el análisis de  $^1\text{H}$  RMN reportado previamente para el mismo copolímero, a 37°C únicamente el 50% del bloque de PNIPAM había salido de fase, esta fracción tenderá a formar partículas de mayor tamaño probablemente por aglomeración y su tamaño y forma estarán determinados por la fracción volumen del bloque hidrófilo.

El copolímero dibloque MPEG<sub>44</sub>-b-PNIPAM<sub>125</sub> ( $\phi_{\text{MPEG}}=0.20$ ) también se analizó por TEM, pero sólo a 25°C. En la **Figura 7.31** se presenta una micrografía y el histograma de la distribución del diámetro de partícula obtenidos por TEM (A). Se observaron partículas de morfología esférica y sin formación de aglomerados a la temperatura de análisis (25°C). El histograma obtenido de las micrografías de TEM sugiere tamaños de partículas promedio de 32 a 99 nm en toda la distribución. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por DLS a la misma temperatura (25°C), donde se obtuvo un  $D_p=74.53$  nm y distribución de tamaño estrecha (B).



**Figura 7.31.** Micrografía de TEM (A) e histograma (B) del copolímero dibloque MPEG<sub>44</sub>-b-PNIPAM<sub>125</sub> con fracción volumen de MPEG ( $\phi_{\text{MPEG}}$ ) de 0.20 evaluado a 25°C.

También se determinó la morfología de los copolímeros tribloque A) PNIPAM<sub>44</sub>-PEG<sub>43</sub>-PNIPAM<sub>44</sub> ( $\phi_{\text{PEG}}=0.20$ ), B) PNIPAM<sub>42</sub>-PEG<sub>74</sub>-PNIPAM<sub>42</sub> ( $\phi_{\text{PEG}}=0.30$ ) y C) PNIPAM<sub>32</sub>-PEG<sub>131</sub>-PNIPAM<sub>22</sub> ( $\phi_{\text{PEG}}=0.50$ ). Las micrografías obtenidas por TEM a 25°C se muestran en la **Figura 7.32**.



**Figura 7.32.** Micrografías de TEM de los copolímeros tribloque A) PNIPAM<sub>44</sub>-PEG<sub>43</sub>-PNIPAM<sub>44</sub>, B) PNIPAM<sub>42</sub>-PEG<sub>74</sub>-PNIPAM<sub>42</sub> y C) PNIPAM<sub>32</sub>-PEG<sub>131</sub>-PNIPAM<sub>22</sub> a 25°C.

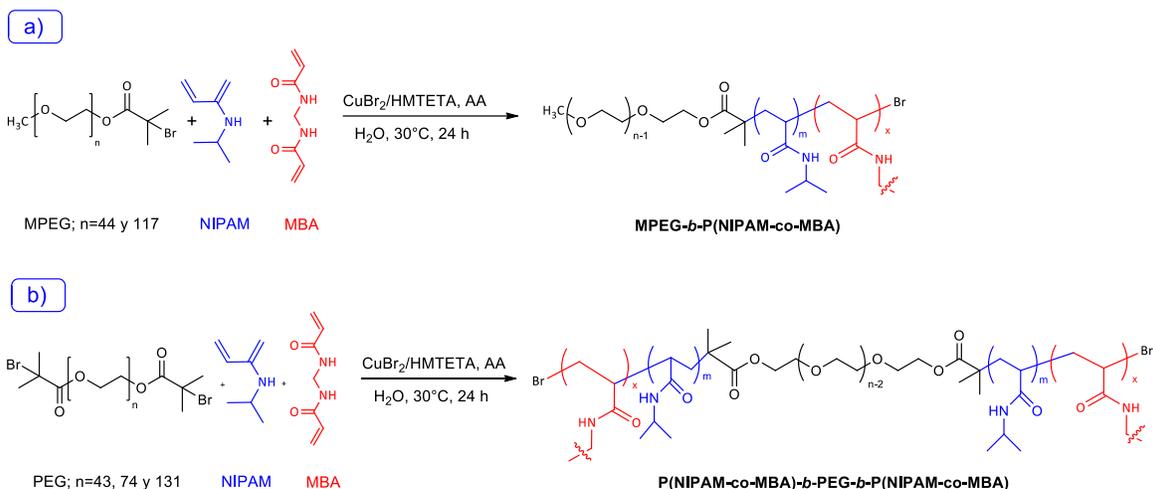
Se ha reportado que para copolímeros tribloque PNIPAM<sub>m</sub>-b-PEG<sub>n</sub>-b-PNIPAM<sub>m</sub>, antes de la LCST del bloque termosensible no se observa la formación de micelas ya que el copolímero se encuentra disuelto, y por lo tanto, en las micrografías obtenidas a 25°C se observan diámetros de partícula muy pequeños (15-25 nm) [117]. En las micrografías obtenidas de los copolímeros analizados en el presente estudio (**Figura 7.32**), se observó que a 25°C las partículas son de diámetros muy pequeños (<20 nm) en todas las fracciones de PEG analizadas y no se observó el fenómeno de formación de aglomerados.

### 7.3. SÍNTESIS DE NANOHIIDROGELES

Se sintetizaron una serie de nanohidrogeles de N-isopropilacrilamida (NIPAM) como monómero termosensible y macroiniciadores de MPEG y PEG con diferente longitud de cadena, además, para lograr el entrecruzamiento del bloque de PNIPAM se agregó a la mezcla de reacción ATRP-AGET un monómero bifuncional hidrófilo como el N,N'-metilenbisacrilamida (MBA). Se ha reportado que al utilizar monómeros macroméricos y/o entrecruzantes (diacrilato de polietilenglicol (PEGDA), polisacáridos, colágeno, quitosano y ácido hialurónico), o bien, cuando se utilizan altas cantidades de los agentes entrecruzantes,

la conformación de las redes poliméricas no siguen el modelo establecido por Flory–Rehner para estructuras entrecruzadas [118]. Un ejemplo de lo anterior, fue reportado por Truong y cols., 2012 para hidrogeles de PEG, concluyen que cuando se introdujo poli(carbonato de trimetileno), (PTMC) como agente entrecruzante, se obtuvieron geles anfífilos con mayor densidad de entrecruzamiento y subsecuentemente con mayor tiempo de degradación. Proponen que el tiempo de degradación podría ajustarse mediante el control del peso molecular y la estructura de los precursores [119]. Adicionalmente, se ha demostrado que la longitud de la cadena del macroiniciador ATRP o el peso molecular del mismo, afecta considerablemente el tamaño y la estabilidad coloidal de los nanohidrogeles [63][64].

Por lo tanto, para investigar el efecto de la concentración de agente entrecruzante y la longitud de cadena de MPEG y PEG en las propiedades de estabilidad, diámetro de partícula y morfología de los materiales, se seleccionaron los macroiniciadores que presentaron la mejor estabilidad y respuesta a la temperatura en la sección anterior (MPEG,  $DP=44$  y  $117$  y PEG,  $DP=43$ ,  $74$  y  $131$ ). Considerando el supuesto de que al adicionar grandes cantidades de agente entrecruzante los nanohidrogeles podrían presentar mayor densidad de entrecruzamiento y en consecuencia la pérdida o disminución de su flexibilidad para hincharse o contraerse como respuesta a estímulos específicos, que finalmente evitará o dificultará la liberación del fármaco atrapado en su interior [120]; en el presente estudio se propuso evaluar diferentes concentraciones de agente entrecruzante (MBA=0.00, 0.05, 0.10, 0.15, 0.17 y 0.19% molar). Se utilizó MBA ya que se ha reportado que es un monómero bifuncional con alta reactividad y conduce a la obtención de partículas mono-dispersas [64]. La ruta de síntesis detallada se muestra en el esquema de la **Figura 7.33**. Los parámetros moleculares de los materiales obtenidos se caracterizaron por espectroscopía de  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura 7.33.** Esquema de síntesis de nanohidrogeles termosensibles mediante ATRP-AGET en solución acuosa homogénea, utilizando macroiniciadores ATRP a) monofuncionales  $\text{MPEG}_n\text{-Br}$  y b) bifuncionales  $\text{Br-PEG}_n\text{-Br}$  y diferentes concentraciones de agente entrecruzante (MBA).

Los parámetros moleculares como peso molecular teórico ( $M_n$  teórico), peso molecular experimental ( $M_n$  experimental), grado de polimerización ( $DP$ ), fracción volumen de PEG o MPEG ( $\Phi_{\text{vol PEG/MPEG}}$ ) y conversión del NIPAM en los nanohidrogeles **R1-R9** ( $\text{MPEG}_n\text{-b-P(NIPAM}_m\text{-MBA}_x)$ ) se muestran en la **Tabla 7.11**. Para calcular estos valores se determinó su composición química mediante la relación de integración entre las señales del bloque de NIPAM ( $-\text{CONHCH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $\delta=4.0$  ppm) y del óxido de etileno del MPEG ( $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2-)_n$ ,  $\delta=3.6$  ppm), considerando los valores de  $DP$  calculados previamente por MALDI-TOF MS ( $DP_{\text{MPEG}}=44$  y 117), en estos materiales se estableció como referencia la señal del grupo metilo del bloque de MPEG ( $-\text{CH}_3$ ,  $\delta=3.3$  ppm, 3H).

En general, el peso molecular experimental obtenido por RMN ( $M_n$  experimental RMN) es muy similar al peso molecular teórico ( $M_n$  teórico) indicando el buen control en este proceso de polimerización. En los nanohidrogeles que contienen cadenas de MPEG más cortas (**R1-R4**) los valores de conversión aumentaron de 71.49 -94.95% cuando se aumentó el contenido de MBA (0.05-0.17 % mol), esto también ocurrió con el peso molecular teórico ( $M_n$  teórico) y esto se considera un resultado lógico, ya que, para su determinación está involucrado el valor de conversión, tal como se muestra en la **Ecuación 4**.

**Tabla 7.11.** Conversión, composición química y pesos moleculares de los nanohidrogeles obtenidos por ATRP-AGET en medio acuoso, utilizado diferente porcentaje molar de MBA y longitud de bloque hidrófilo de macroiniciadores monofuncionales de MPEG.

Bloque hidrófilo	Nanohidrogel	% molar de MBA	Conversión RMN (%) <sup>a</sup>	M <sub>n</sub> teórico (Da) <sup>b</sup>	M <sub>n</sub> experimental RMN (Da) <sup>c</sup>	DP <sub>NIPAM</sub> <sup>d</sup>	Φ <sub>MPEG</sub>	Sólidos al final (%)
CH <sub>3</sub> -PEG <sub>44</sub>	R0-A	0.00	70.00	12,531.39	13,067.50	97	0.20	12.99
	R1	0.05	71.49	10,210.43	13,431.23	100	0.19	10.48
	R2	0.10	86.48	11,906.66	11,817.88	86	0.22	12.88
	R3	0.15	91.95	12,525.69	13,206.00	98	0.19	14.26
	R4	0.17	94.95	12,865.27	13,939.99	105	0.18	13.85
CH <sub>3</sub> -PEG <sub>117</sub>	R0-B	0.00	42.50	10,098.23	14,271.80	79	0.43	6.44
	R5	0.05	62.29	12,338.07	11,843.93	58	0.50	9.50
	R6	0.10	60.53	12,138.99	13,059.46	73	0.46	8.29
	R7	0.15	52.26	11,202.86	12,810.18	66	0.47	8.89
	R8	0.17	52.51	11,231.21	12,167.52	61	0.49	7.93
	R9	0.19	51.18	11,080.10	12,167.52	61	0.49	7.66

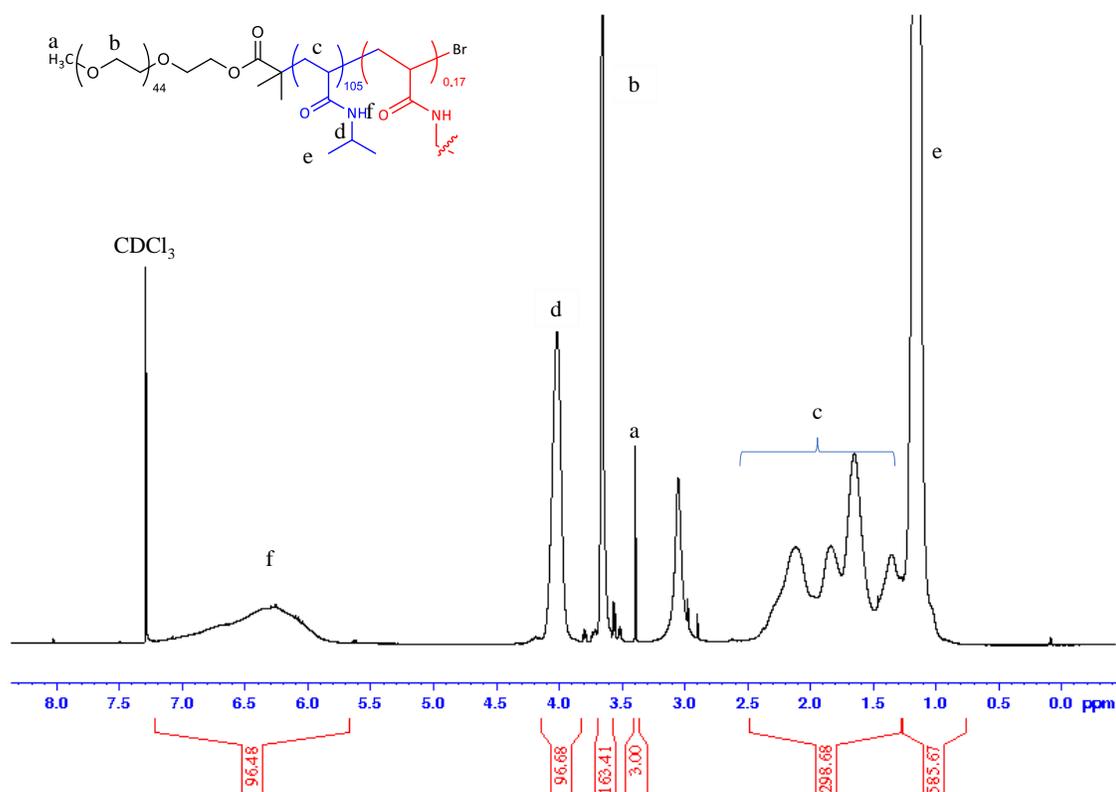
Complejo catalítico= CuBr<sub>2</sub>/HMTETA; ([M]<sub>0</sub>/[RX]<sub>0</sub>) = 100; Temperatura= 30°C; Tiempo= 24 horas.  
<sup>a,c</sup> y <sup>d</sup> <sup>1</sup>H-RMN

$${}^b M_{n \text{ teórico}} = \left[ \left( \frac{[M]_0}{[RX]_0} \right) * (M_{n \text{ NIPAM}}) \right] * \text{conversión} + M_{n \text{ RX}} \dots \dots \dots \text{(Ecuación 4)}$$

En el caso del peso molecular promedio experimental determinado por RMN (M<sub>n</sub> experimental RMN), no se observó un crecimiento proporcional con la adición de agente entrecruzante, sin embargo, se observó un incremento en comparación el copolímero sin entrecruzar, excepto en el nanohidrogel **R2** (0.10 % mol MBA). Para los nanohidrogeles con cadenas de MPEG más largas (**R5-R9**), los valores de conversión y peso molecular teórico presentaron un comportamiento inversamente proporcional con la adición de agente entrecruzante y estos valores (conversión y M<sub>n</sub> teórico) fueron menores a los obtenidos para los nanohidrogeles con menor fracción de MPEG (**R1-R4**).

El espectro de RMN del nanohidrogel **R4** [P(MPEG<sub>44</sub>)-b-P(NIPAM<sub>105</sub>-co-MBA<sub>0.17</sub>)] se muestran en la **Figura 7.34**. Donde, <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ<sub>H</sub> (ppm) = 6.4 (s, 1H, -CONHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.0 (s, 1H, -CONHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.6 (m, 4H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.38 (s, 3H,

$-\text{CH}_3$ ), 1.2-2.4 (m, 3H,  $-\text{CH}_2\text{CH}-$ ), 1.1 (m, 6H,  $(\text{CH}_3)_2$ ). Es necesario mencionar que la estructura química de la N,N'-metilenbisacrilamida solo contiene grupos acrilamida, mismo grupo presente en el PNIPAM, por lo que para evaluar su concentración molar en el nanohidrogel mediante RMN se requeriría realizarla en forma indirecta [121].



**Figura 7.34.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN del nanohidrogel **R4** [P(MPEG44)-b-pPNIPAM<sub>105</sub>-co-MBA<sub>0.17</sub>] en  $\text{CDCl}_3$ .

La caracterización de los nanohidrogeles **R10-R21** derivados del PEG [P(NIPAM<sub>m</sub>-co-MBA<sub>x</sub>)-b-PEG<sub>n</sub>-b-P(NIPAM<sub>m</sub>-co-MBA<sub>x</sub>)] se presenta en la **Tabla 7.12**. En estos materiales la composición química se determinó mediante la relación de integración entre la señal correspondiente al metino del grupo isopropilo del bloque de NIPAM ( $-\text{CONHCH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $\delta=4.0$  ppm) que se tomó como referencia y la señal de los protones del óxido de etileno del PEG ( $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2-)_n$ ,  $\delta=3.6$  ppm), también considerando el grado de polimerización ( $DP$ ) obtenido previamente por MALDI-TOF ( $DP_{\text{PEG}}=43, 74$  y  $131$ ).

Para determinar el peso molecular de los bloques de PNIPAM se asumió que los dos bloques tienen la misma composición, tal como lo realizó Filippov y cols., [21] para copolímeros tribloque similares (PNIPAM-b-PEG-b-PNIPAM). En los copolímeros tribloque entrecruzados con diferentes proporciones de MBA y que contienen cadenas de PEG<sub>43</sub> (**R10-R13**) y PEG<sub>131</sub> (**R18-R21**), los pesos moleculares (teórico y experimental) siempre fueron mayores comparados con los valores obtenidos para los copolímeros tribloque sin entrecruzar (**R0-C** y **R0-E**). En los nanohidrogeles preparados con cadenas de PEG<sub>74</sub> no se observó esta tendencia.

**Tabla 7.12.** Conversión, composición química y pesos moleculares de los nanohidrogeles obtenidos por ATRP-AGET en medio acuoso, utilizado diferente % molar de MBA y longitud de bloque hidrófilo de macroiniciadores bifuncionales de PEG.

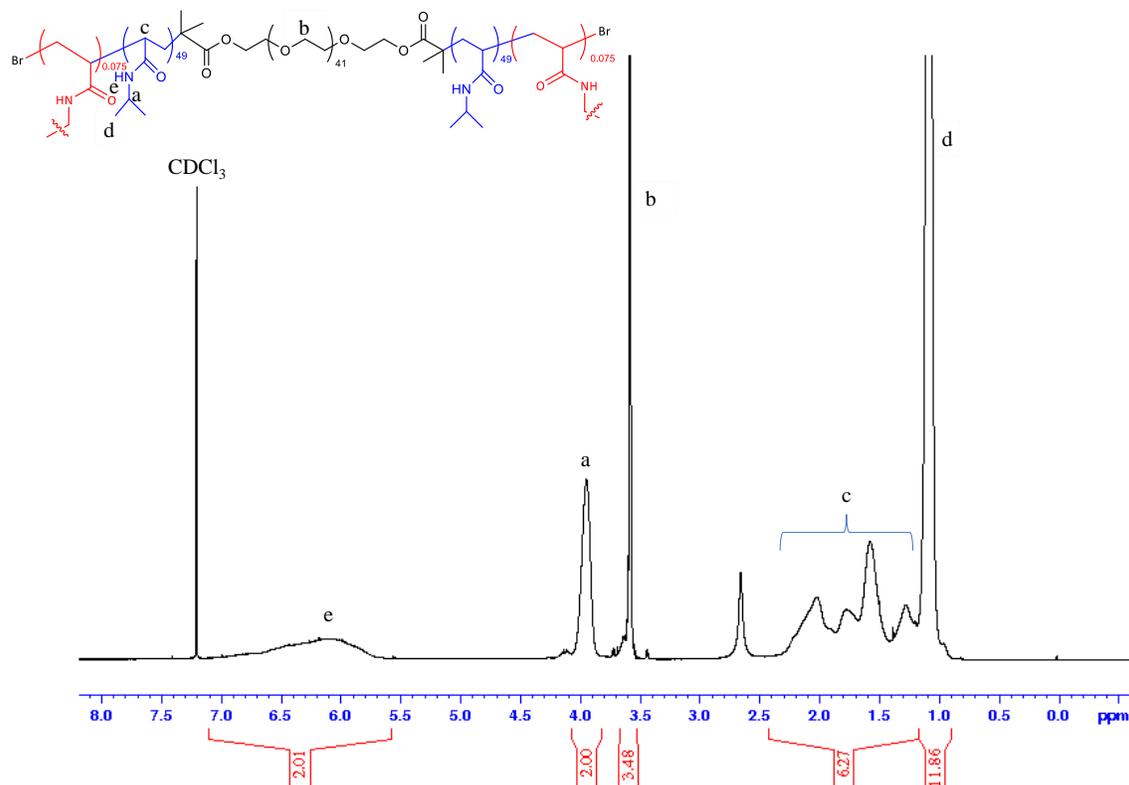
Bloque hidrófilo	Nanohidrogel	% molar de MBA	Conversión RMN (%) <sup>a</sup>	M <sub>n</sub> teórico (Da) <sup>b</sup>	M <sub>n</sub> experimental RMN (Da) <sup>c</sup>	DP <sub>NIPAM</sub> <sup>d</sup>	Φ <sub>vol</sub> PEG	Sólidos al final (%)
PEG <sub>43</sub>	R0-C	0.00	60.50	9,001.31	11,956.10	88	0.20	8.08
	R10	0.05	88.34	12,152.07	13,615.62	102	0.18	13.61
	R11	0.10	82.77	11,521.14	13,598.27	102	0.18	12.63
	R12	0.15	81.88	11,420.70	13,192.50	98	0.18	12.56
	R13	0.17	73.31	10,450.36	13,334.67	99	0.18	10.94
PEG <sub>74</sub>	R0-D	0.00	55.70	9,906.42	13,565.30	88	0.29	8.43
	R14	0.05	60.59	10,459.63	13,530.27	89	0.29	9.07
	R15	0.10	45.34	8,734.16	15,074.48	103	0.27	6.95
	R16	0.15	41.16	8,260.65	13,540.78	89	0.29	6.35
	R17	0.17	38.56	7,966.66	13,488.44	79	0.30	5.85
PEG <sub>131</sub>	R0-E	0.00	38.20	10,500.26	13,289.80	64	0.50	5.78
	R18	0.05	46.40	11,428.46	14,923.45	79	0.45	7.14
	R19	0.10	44.77	11,244.07	14,584.52	76	0.46	6.71
	R20	0.15	40.25	10,732.73	14,265.16	73	0.47	6.10
	R21	0.17	39.32	10,626.47	13,705.73	68	0.49	6.03

Complejo catalítico= CuBr<sub>2</sub>/HMTETA; ([M]<sub>0</sub>/[RX]<sub>0</sub>) =100; Temperatura= 30°C; Tiempo= 24 horas.

<sup>a,c</sup> y <sup>d</sup> <sup>1</sup>H RMN

<sup>b</sup> M<sub>n</sub> teórico = [[M]<sub>0</sub>/[RX]<sub>0</sub>\*UR]\*a]+M<sub>n</sub> RX

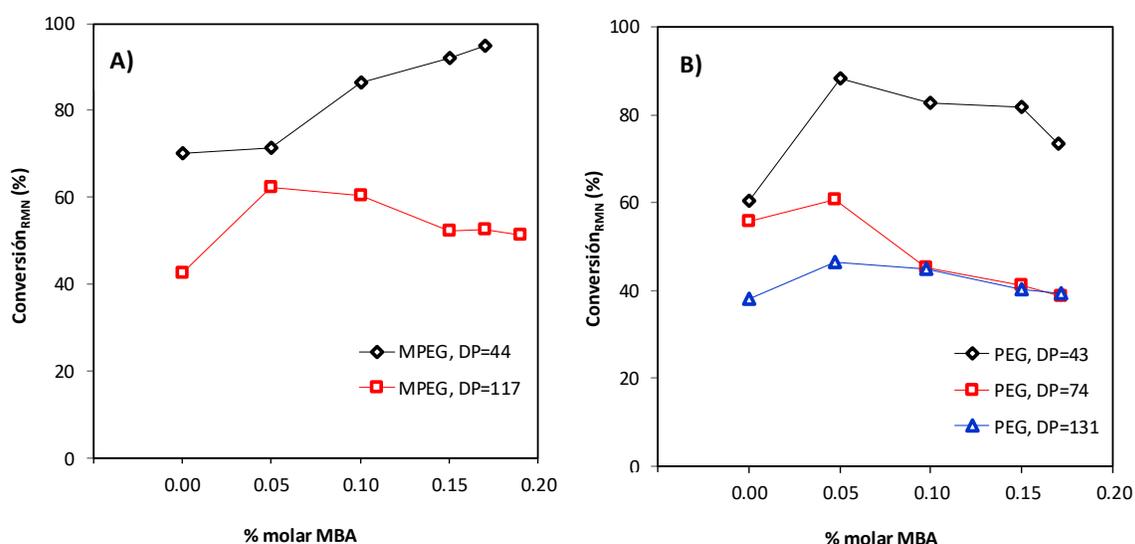
Como ejemplo, el espectro de RMN del nanohidrogel **R12** [p(NIPAM<sub>49</sub>-co-MBA<sub>0.075</sub>)-b-PEG<sub>43</sub>-b-p(NIPAM<sub>49</sub>-co-MBA<sub>0.075</sub>)] se muestran en la **Figura 7.35**. Donde, <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ<sub>H</sub> (ppm) =5.6-7.1 (s, 1H, -CONHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.0 (s, 2H, -CONHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.6 (m, 4H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.2-2.3 (m, 3H, -CH<sub>2</sub>CH-), 1.0 (m, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).



**Figura 7.35.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN del nanohidrogel **R12** [P(NIPAM<sub>49</sub>-co-MBA<sub>0.075</sub>)-b-PEG<sub>43</sub>-b-P(NIPAM<sub>49</sub>-co-MBA<sub>0.075</sub>)] en CDCl<sub>3</sub>.

Los valores de conversión de todos los nanohidrogeles alcanzados después de 24 horas de reacción se ilustran en la **Figura 7.36**. Al comparar el efecto del tipo de macroiniciador (MPEG o PEG) fue claro que en los iniciadores monofuncionales, poli(MPEG)-Br, los valores de conversión fueron mayores comparados con las conversiones obtenidas para los iniciadores bifuncionales Br-(PEG)<sub>n</sub>-Br. En cuanto al efecto del tamaño de la cadena hidrófila en el parámetro de conversión, se observa que cadenas de MPEG o PEG de menor longitud (*DP*=44 y 43, respectivamente) proporcionan una mayor conversión del monómero

hidrófobo. Específicamente en los nanohidrogeles que contienen cadenas de MPEG con  $DP=44$ , la conversión se incrementó conforme aumentaba la concentración molar de MBA, alcanzándose conversiones entre 71.49 y 94.95%, resultado mostrado en la **Figura 7.36A**. En los demás nanohidrogeles (MPEG y PEG), la conversión se incrementó al inicio (0.05% molar de MBA) y luego presentó una disminución, siendo más evidente esta disminución en los nanohidrogeles preparados con PEG (**Figura 7.36B**). Este comportamiento ya ha sido reportado por Sayed y cols., [64], estos autores mencionan que cadenas más largas del bloque hidrófilo disminuye la reactividad del NIPAM y MBA.



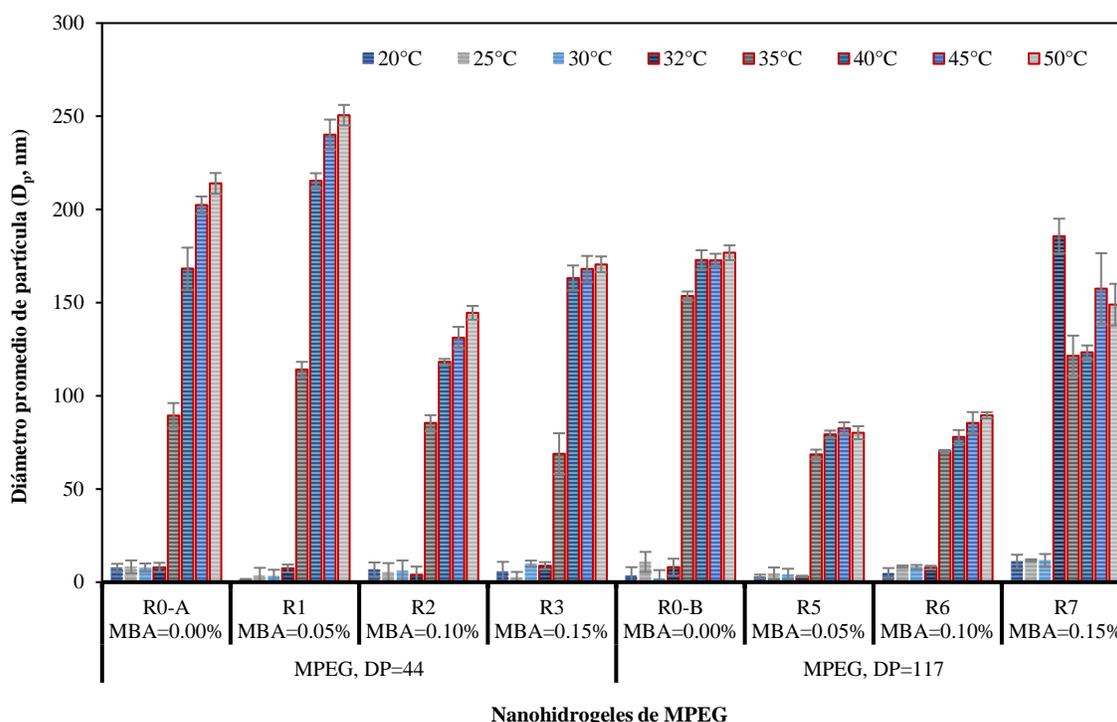
**Figura 7.36.** Conversión determinada por  $^1\text{H}$  RMN de los nanohidrogeles (R1-R21) dependiente del porcentaje molar de N, N'-metilenbisacrilamida (MBA), después de 24 horas de reacción.

### 7.3.1. Efecto del contenido de MBA y tamaño de cadena de bloque hidrófilo en la temperatura de transición de fase en volumen y diámetro promedio de nanohidrogeles

Una de las características más importantes de los nanohidrogeles basados en NIPAM es su capacidad de responder a la temperatura. Para estos sistemas entrecruzados el valor de temperatura en el cual se presenta un cambio en la red interna, se denomina temperatura de transición de fase en volumen (VPTT, por sus siglas en inglés) [12] [52], que se ha reportado está muy cercana a  $32^\circ\text{C}$  [122]. Para determinar el efecto de la concentración molar de agente

entrecruzante sobre la variación de este parámetro y también sobre el diámetro de partícula promedio ( $D_p$ , nm) de los nanohidrogeles sintetizados, se prepararon dispersiones acuosas 0.1% p/v y se caracterizaron por dispersión de luz dinámica (DLS) a diferentes temperaturas (20-50°C).

En la **Figura 7.37** se presentan los resultados para los nanohidrogeles preparados con macroiniciadores hidrófilos de MPEG de diferente longitud ( $DP=44$  y  $117$ ) y variación en la concentración de agente entrecruzante (0.00-0.15% molar), los datos de diámetro promedio de los nanohidrogeles preparados con 0.17% molar de agente entrecruzante no se pudieron determinar por DLS ya que, al alcanzar temperaturas por encima de los 30°C, la dispersión presentaba una apariencia turbia y de viscosidad elevada y el equipo marcaba un error. El valor de VPTT se consideró en la temperatura donde se presentó un cambio importante en el diámetro promedio.



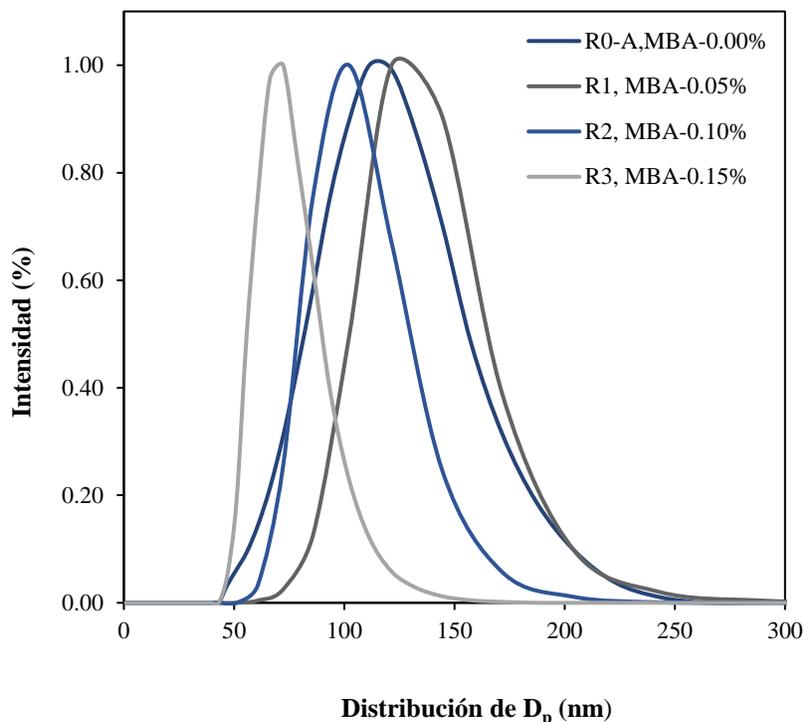
**Figura 7.37.** Diámetro promedio en nm evaluado de 20 a 50°C de los nanohidrogeles preparados con cadenas hidrófilas de MPEG con  $DP=44$  y  $117$  y concentración de MBA de 0.00-0.15% molar.

En la figura anterior se puede apreciar que, todos los nanohidrogeles presentaron un incremento en su diámetro de partícula promedio cuando alcanzan los 35°C, especial atención tiene del nanohidrogel **R7** que presentó un incremento en diámetro de partícula en 32°C, muy similar a lo observado previamente con el copolímero MPEG-b-PNIPAM en donde se observó que este material de mayor longitud de poli(MPEG<sub>117</sub>) presenta valores de LCST cercanos a la del PNIPAM (homopolímero). Un dato adicional es que la longitud de la cadena de MPEG ( $DP=44$  y  $117$ ), no influye considerablemente en el diámetro promedio de los nanohidrogeles, la concentración de MBA es el parámetro de mayor influencia ya que conforme se aumentaba la concentración de MBA, se obtuvieron nanohidrogeles de menor tamaño, esto, comparado con los copolímeros que no contienen MBA (**R0-A** y **R0-B**) y con los nanohidrogeles preparados con bloques de MPEG de menor longitud (**R1**, **R2** y **R3**). Este resultado se atribuye a que el MBA presente en la estructura del nanohidrogel, evita la aglomeración de los homobloques que colapsan de la solución polimérica.

La disminución en el diámetro promedio en nanohidrogeles que contienen una mayor proporción de bloque hidrófilo ya ha sido sustentado por Forooqi y cols., [63], estos autores mencionan que una mayor proporción de bloque hidrófilo en la microestructura de nanohidrogeles de metil éter metacrilato de polietilenglicol (PEGMA) y PNIPAM obtenidos mediante polimerización en precipitación, estabiliza mejor el núcleo de PNIPAM proporcionando mayor estabilidad y se evita la formación de aglomerados y/o disminución del diámetro. Recientemente este resultado también ha sido reportado por Agnihotri y cols., [122] en microgeles de PNIPAM y cadenas de oligo(etilenglicol) (OEG) preparados por copolimerización en precipitación libre de tensoactivo y MBA como agente entrecruzante.

En cuanto al efecto de la concentración de agente entrecruzante utilizado fue claro que, el diámetro promedio obtenido a la temperatura de transición de fase en volumen, que fue de 35°C en todos los materiales preparados con MPEG, se observa que conforme aumenta la concentración de MBA, disminuye el diámetro promedio y la distribución de tamaño es más estrecha. Como evidencia, en la **Figura 7.38** se presentan las curvas de distribución de

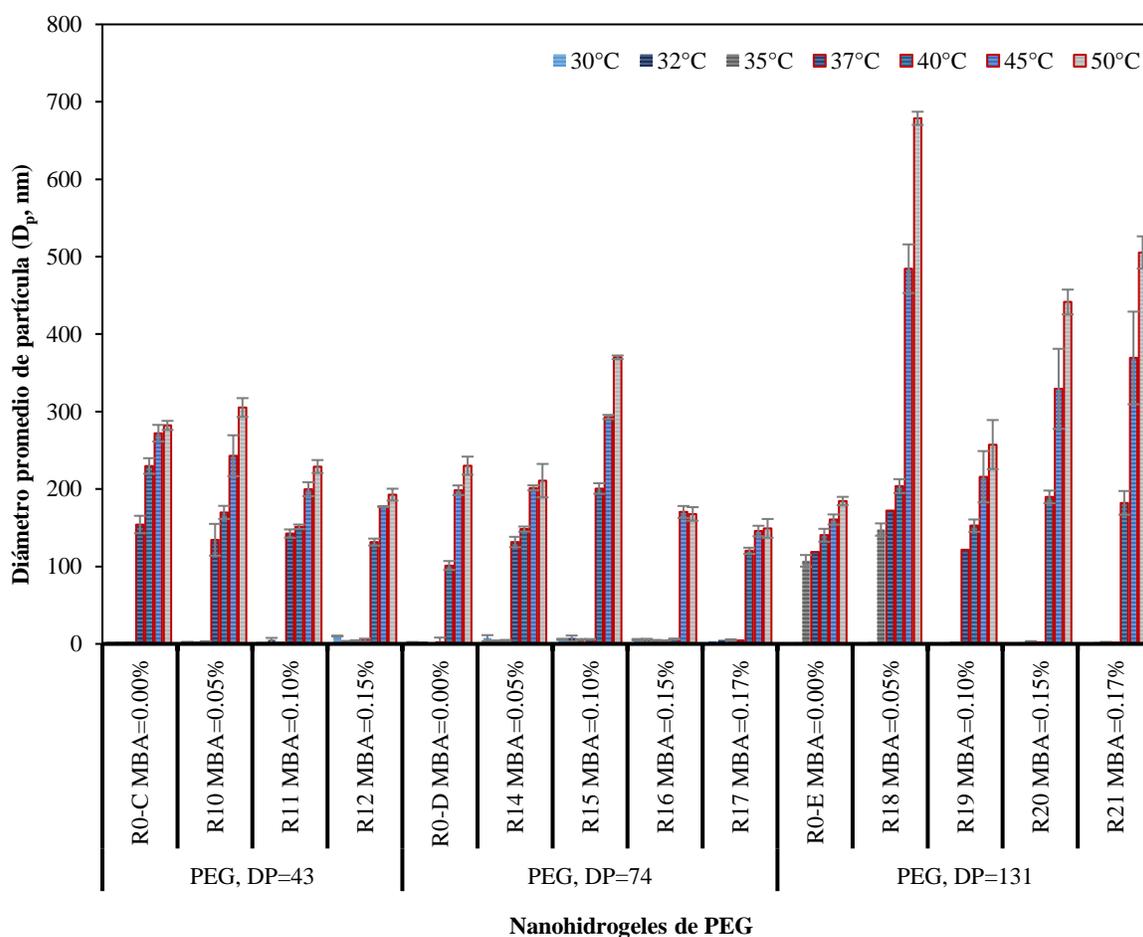
tamaño de los nanohidrogeles preparados con el macroiniciador de MPEG de menor longitud ( $DP=44$ ) y diferentes concentraciones de MBA.



**Figura 7.38.** Distribución de diámetro de promedio evaluado a  $35^\circ\text{C}$  (VPTT) en los nanohidrogeles preparados con cadenas hidrófilas de MPEG con  $DP=44$  y concentraciones de MBA de 0.00-0.15% molar.

En el caso de los nanohidrogeles preparados con cadenas hidrófilas de PEG, los resultados de diámetro promedio se presentan en la **Figura 7.39**, cuando se utilizaron cadenas de menor longitud ( $DP=43$ ) y concentraciones más bajas de MBA (0.00-0.10 % molar) la temperatura de transición de fase en volumen (VPTT) observada fue de  $37^\circ\text{C}$  (**R0-C**, **R10** y **R11**), mientras que, cuando se usó la mayor concentración de MBA (0.15% molar) este valor se desplazó hasta  $40^\circ\text{C}$  (**R12**), el material que contenía 0.17% molar de MBA no se pudo evaluar por DLS. En el caso de los nanohidrogeles preparados con el bloque de PEG de  $DP=74$ , no se observó una tendencia lógica, el material que no contiene MBA (0.00% molar, **R0-D**) presentó una transición de fase en  $40^\circ\text{C}$  y el que contiene la menor concentración de MBA (0.05% molar, **R14**) en  $37^\circ\text{C}$ . En los materiales preparados con mayores concentraciones de MBA (0.10, 0.15 y 0.17% molar) la transición de fase en volumen se presentó en 40 y  $45^\circ\text{C}$ ,

respectivamente. Finalmente, en el caso de los nanohidrogeles preparados con el bloque de PEG de mayor longitud ( $DP=131$ ), se observó que el valor de VPTT presentó una tendencia directamente proporcional, es decir, cuando se aumentaba la concentración molar de MBA, también aumentaba el valor de VPTT desde 35, 37 y 40°C para las concentraciones de MBA más altas.



**Figura 7.39.** Diámetro promedio en nm evaluado de 30 a 50°C de los nanohidrogeles preparados con cadenas hidrófilas de PEG con  $DP=43$ , 74 y 131 y concentración de MBA de 0.00-0.17% molar.

En cuanto al efecto del tamaño de la cadena de bloque hidrófilo de PEG en la temperatura de transición de fase en volumen, todos los nanohidrogeles presentaron un diámetro promedio menor a 200 nm, a excepción del nanohidrogel **R15** que presentó un  $D_p$  de 200.68 nm. Cuando se midió el diámetro después de la temperatura de transición de fase en volumen (40

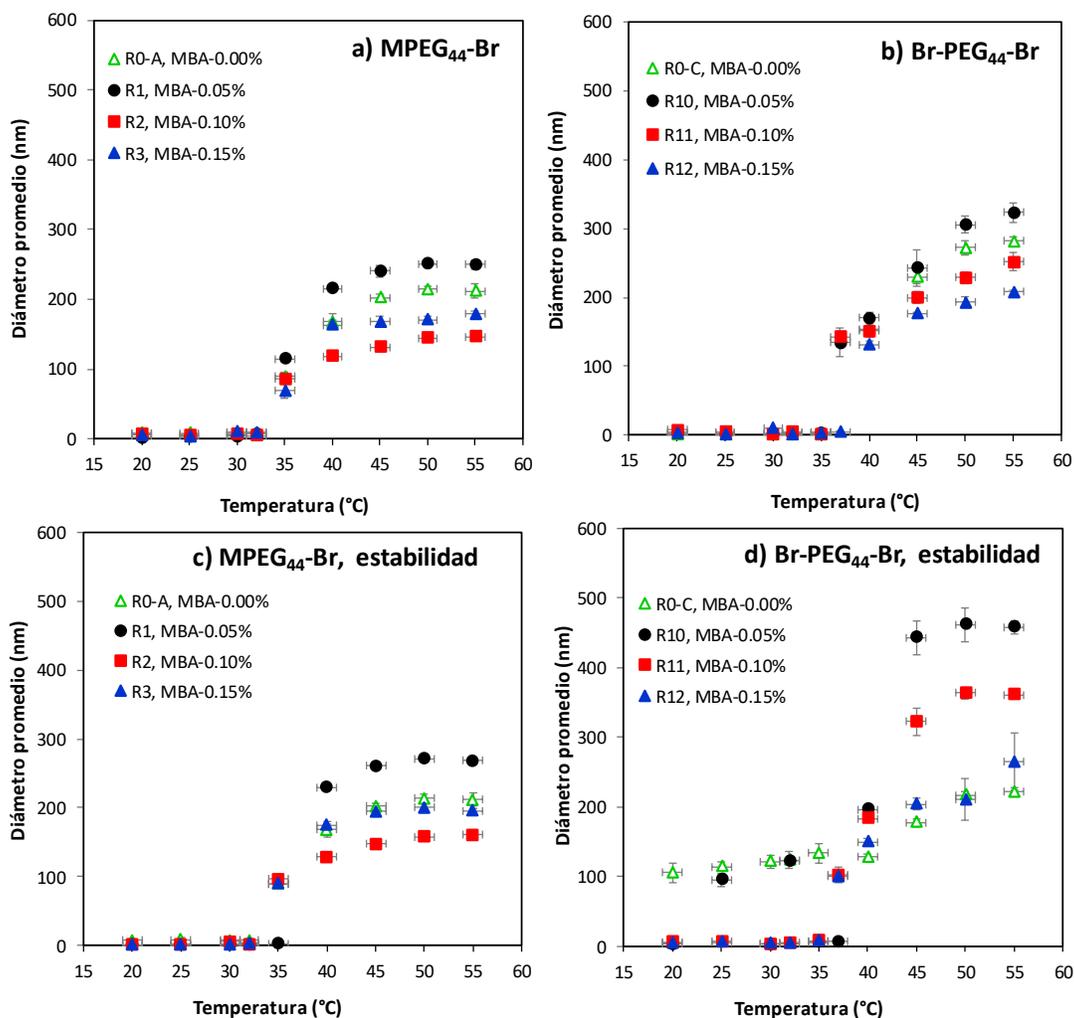
y 45°C) los nanohidrogeles preparados con el bloque de PEG de mayor longitud ( $DP=131$ ) presentaron un  $D_p > 400$  nm, a excepción del nanohidrogel **R19** y que contiene 0.10% molar de MBA. Finalmente, en la **Tabla 7.13** se presenta un resumen de la temperatura de transición de fase en volumen de los nanohidrogeles al variar la concentración molar de agente entrecruzante (MBA), así como el tamaño y naturaleza del bloque hidrófilo.

**Tabla 7.13.** Temperatura de transición de fase en volumen (VPTT) y diámetro promedio de los nanohidrogeles sintetizados con diferente concentración molar de agente de entrecruzamiento, longitud de y naturaleza de bloque hidrófilo.

Bloque hidrófilo	Nanohidrogel	% molar de MBA	VPTT (°C) <sup>a</sup>	$D_p$ (nm) <sup>b</sup>
CH <sub>3</sub> -PEG <sub>44</sub>	R0-A	0.00	35.0	89.45
	R1	0.05	35.0	114.10
	R2	0.10	35.0	85.38
	R3	0.15	35.0	68.90
	R4	0.17*	---	---
CH <sub>3</sub> -PEG <sub>117</sub>	R0-B	0.00	35.0	153.63
	R5	0.05	35.0	68.53
	R6	0.10	35.0	70.48
	R7	0.15	35.0	185.75
	R8	0.17*	---	---
PEG <sub>43</sub>	R0-C	0.00	37.0	154.15
	R10	0.05	37.0	134.45
	R11	0.10	37.0	142.48
	R12	0.15	40.0	131.48
	R13	0.17*	---	---
PEG <sub>74</sub>	R0-D	0.00	40.0	101.25
	R14	0.05	37.0	131.59
	R15	0.10	40.0	200.68
	R16	0.15	45.0	170.43
	R17	0.17	40.0	12.20
PEG <sub>131</sub>	R0-E	0.00	35.0	107.30
	R18	0.05	35.0	147.67
	R19	0.10	37.0	121.43
	R20	0.15	40.0	189.80
	R21	0.17	40.0	182.15

VPTT (°C)<sup>a</sup> = Temperatura de transición de fase en volumen determinada por DLS.  $D_p$ , nm<sup>b</sup>=Diámetro promedio obtenido a la temperatura de transición de fase en volumen.\*El valor no se pudo determinar por DLS ya que la viscosidad del nanohidrogel a esa temperatura era tan alta que el equipo arrojaba un error.

Para evaluar la estabilidad de los materiales entrecruzados, estos se dejaron en almacenamiento por 10 días y después se analizaron por DLS bajo las mismas condiciones que habían sido evaluados inicialmente. En la **Figura 7.40** se presentan los resultados de diámetro de partícula al inicio (**Figura 7.40 a y b**) y después de 10 días de almacenamiento (**Figura 7.40 c y d**) de los nanohidrogeles preparados con poli(MPEG<sub>44</sub>) y con poli(PEG<sub>43</sub>).



**Figura 7.40.** Diámetros promedio obtenidos por DLS de los nanohidrogeles preparados con los macroiniciadores de a) MPEG<sub>44</sub> y b) PEG<sub>43</sub>) con diferente grado de entrecruzamiento (MBA=0.00-0.15% molar) en un rango de temperatura de 20-55°C y c) dispersión de nanohidrogeles de MPEG<sub>44</sub> y d) PEG<sub>43</sub> después de 10 días almacenamiento.

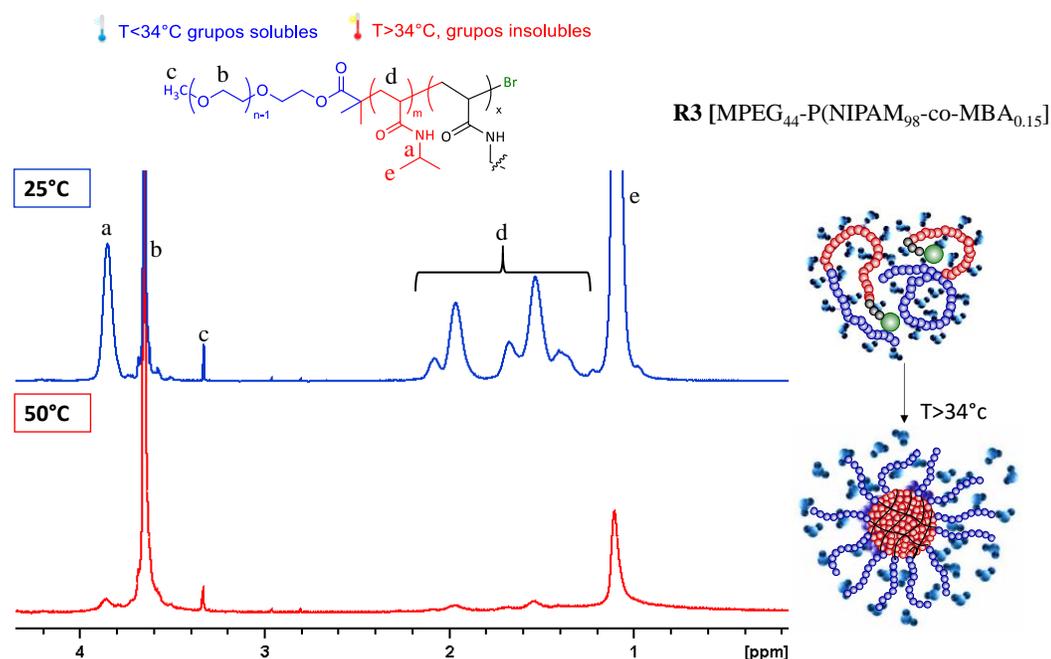
En general, se pudo determinar que los nanohidrogeles de MPEG no presentaron un cambio significativo en su diámetro promedio con respecto al diámetro inicial. Mientras que, los nanohidrogeles que contienen bloques hidrófilos de PEG, presentaron menor estabilidad, observándose diámetros promedio mayores, sobre todo en los que contienen una menor cantidad de agente entrecruzante (0.05 y 0.10 % mol). Este resultado indica que los nanohidrogeles de MPEG presentan mejor estabilidad y que la concentración de agente entrecruzante también podría contribuir en la estabilidad de los materiales.

En resumen de esta sección, el tamaño de la cadena de MPEG ( $DP=43$  y  $117$ ) no presentó una influencia en la temperatura de transiciones de fase de estos materiales, ya que todos presentaron una  $VPTT$  en  $35^{\circ}\text{C}$ ; sin embargo, con el macroiniciador de mayor longitud ( $DP=117$ ) se obtuvieron  $D_p < 100$  nm cuando se utilizó una concentración de MBA de 0.05 y 0.10% molar y cuando se empleó la mayor concentración de MBA (0.15% molar) los diámetros de partícula estaban por encima de los 100 nm y de distribución más amplia, este nanohidrogel presentó un valor de  $VPTT$  de  $32^{\circ}\text{C}$ . En el caso de los materiales obtenidos con macroiniciadores de PEG, en todos los casos se obtuvieron  $D_p$  mayores a 100 nm, independientemente de la concentración de MBA y del  $DP$  del poli(PEG<sub>n</sub>-Br) utilizado en la reacción ATRP-AGET. Sin embargo, se observó que para el macroiniciador de mayor  $DP$ , poli(PEG<sub>131</sub>-Br), los diámetros obtenidos fueron mayores y los más altos se obtuvieron con el mayor grado de entrecruzamiento (0.15 y 0.17 % molar, respectivamente). Los nanohidrogeles preparados con los macroiniciadores monofuncionales (poli(MPEG<sub>n</sub>-Br), siempre presentaron mayor estabilidad que los preparados con poli(PEG<sub>n</sub>-Br).

### 7.3.1.2. Separación de fases por efecto de la temperatura

Con la finalidad de obtener más información sobre el comportamiento termosensible de los nanohidrogeles, se evaluó por  $^1\text{H}$  RMN en solución de óxido de deuterio ( $\text{D}_2\text{O}$ ) la transición de fase de estos materiales al aumentar progresivamente la temperatura, puesto que, derivado del colapso del bloque de NIPAM por efecto de la temperatura, se debe observar la desaparición de las señales correspondientes a este bloque [114]. La evolución del espectro de  $^1\text{H}$  RMN en  $\text{D}_2\text{O}$  desde  $25$ - $50^{\circ}\text{C}$  para el nanohidrogel **R3** [MPEG<sub>44</sub>-P(NIPAM)<sub>98</sub>-co-

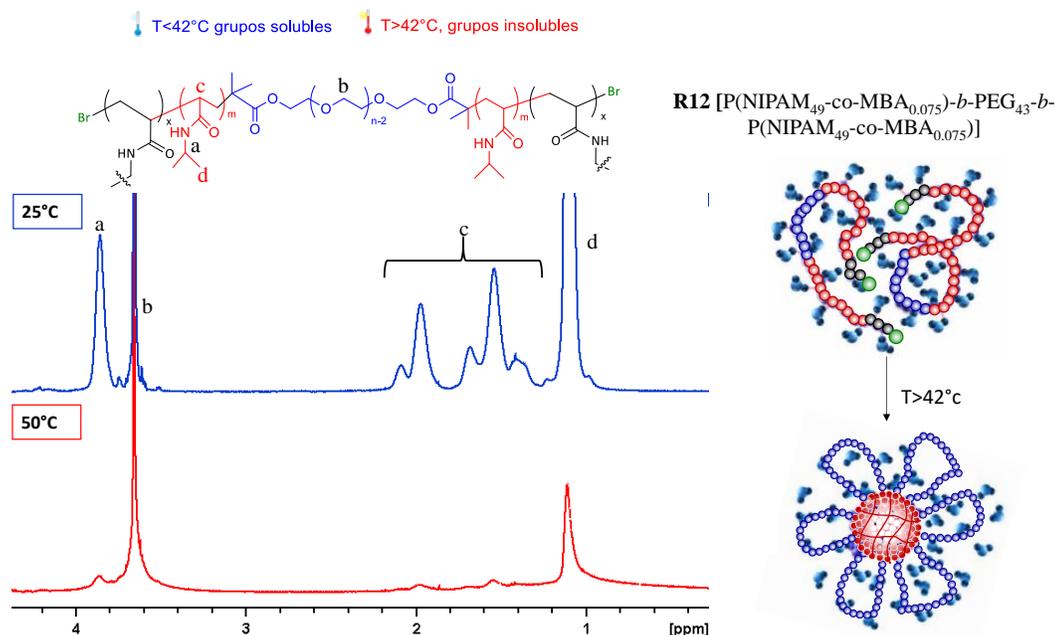
MBA<sub>0.15</sub>] se muestra en la **Figura 7.41** y del nanohidrogel **R12** [P(NIPAM<sub>49</sub>-co-MBA<sub>0.075</sub>)-*b*-PEG<sub>43</sub>-*b*-P(NIPAM<sub>49</sub>-co-MBA<sub>0.075</sub>)] en la **Figura 7.42**. En ambos espectros se puede observar que a 25°C las señales de los protones asignados al bloque de PNIPAM –CH<sub>2</sub>–CH–,  $\delta=1.5-2.2$  ppm) y (–CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,  $\delta=3.3$  ppm, están bien definidas y la relación de integración es muy cercana a la que se obtuvo cuando se utilizó CDCl<sub>3</sub> como disolvente y que también se determinaron a la misma temperatura (25°C), esto indica que tanto el PNIPAM como el MPEG son solubles a esta temperatura. Sin embargo, cuando se aumentó progresivamente la temperatura hasta 50°C, las señales características del bloque de MPEG y PEG se mantuvieron casi sin cambios, mientras que las señales asociadas al PNIPAM disminuyeron considerablemente, esto indica una transición de fase de soluble a insoluble.



**Figura 7.41.** Espectros de <sup>1</sup>H RMN del nanohidrogel **R3** [MPEG<sub>44</sub>-P(NIPAM<sub>98</sub>-co-MBA<sub>0.15</sub>)] obtenidos a 25°C y 50°C en D<sub>2</sub>O.

Considerando lo anterior, se infiere que las señales asociadas a los protones de la cadena principal del copolímero (–CH<sub>2</sub> y CH–) y el protón metino del grupo isopropilo (CH–CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> no son detectadas a 50°C. Mientras que el pico correspondiente a los protones de las cadenas

de MPEG y PEG todavía muestran una contribución, indicando que al menos una parte de las unidades de MPEG y PEG aún son lo suficientemente móviles para ser observados.



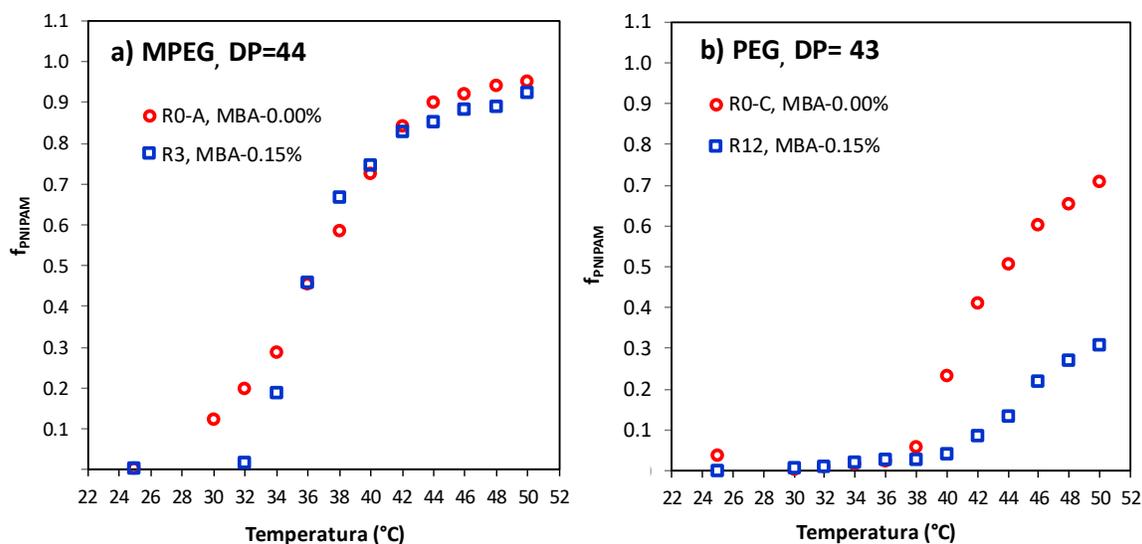
**Figura 7.42.** Espectros de  $^1\text{H}$  RMN del nanohidrogel **R12** [P(NIPAM<sub>49</sub>-co-MBA<sub>0.075</sub>)-b-PEG<sub>43</sub>-b-P(NIPAM<sub>49</sub>-co-MBA<sub>0.075</sub>)] a 25°C y 50°C en D<sub>2</sub>O.

Sun y cols., [123] mencionan que por encima de la VPTT los picos relacionados con las unidades de NIPAM muestran una significativa ampliación resultante de la disminución de la movilidad de los segmentos  $-\text{CH}_2\text{CH}-$  y  $(\text{CH}-\text{CH}_3)_2$  presentes a lo largo de las cadenas de nanohidrogeles de poli(N-acrilóilglicinamida) entrecruzado con ácido metacrílico y un segundo bloque de PNIPAM entrecruzado con N,N'-metilenbisacrilamida [P(NAGA-co-MAA)-b-P(NIPAM-co-MBA)]. Esto sustenta el resultado obtenido en el presente estudio.

En los nanohidrogeles **R3** [MPEG<sub>44</sub>-P(NIPAM<sub>98</sub>-co-MBA<sub>0.15</sub>)] y **R12** [P(NIPAM<sub>49</sub>-co-MBA<sub>0.15</sub>)-PEG<sub>44</sub>-P(NIPAM<sub>49</sub>-co-MBA<sub>0.15</sub>)] también se determinó cuantitativamente la transición térmica al incrementar la temperatura desde 25-50°C. Esto, a partir de la relación de integración entre las señales de cada bloque, siguiendo los grupos termosensibles del bloque de PNIPAM,  $-\text{CH}_2-\text{CH}-$ , ( $\delta=1.5\text{-}2.2$  ppm, 3H) de la cadena principal y de los grupos

metilos colgantes del isopropilo ( $(-\text{CH}_3)_2$ ,  $\delta=3.3$  ppm, 6H), para ello se utilizó la Ecuación 3, mostrada en la sección anterior.

En la **Figura 7.43** se presentan los resultados de separación de fases de los copolímeros sin entrecruzar, así como de los nanohidrogeles de MPEG y PEG preparados con  $DP=44$  y  $43$ , respectivamente. En el caso del nanohidrogel de MPEG preparado con 0.15% molar de agente entrecruzante (**R3**), se observa en la **Figura 7.43a** que la separación de la fracción de NIPAM empieza a los  $34^\circ\text{C}$  y a la temperatura mayor evaluada ( $50^\circ\text{C}$ ) ya se había separado la totalidad del PNIPAM presente; mientras que en el copolímero de la misma naturaleza (**R0-A**), la separación de la fracción de PNIPAM empieza a partir de  $30^\circ\text{C}$  y también a los  $50^\circ\text{C}$  se había separado la totalidad del PNIPAM presente en la estructura. Esto indica que el contenido de MBA (0.15% molar) influye en el comportamiento de transición de fase de este nanohidrogel, es decir, la VPTT de este material se presentó a temperaturas más altas en comparación con el material sin entrecruzar, tal como lo reporta Agnihotri y cols., [122].



**Figura 7.43.** Fracción de PNIPAM ( $f_{\text{NIPAM}}$ ) dependiente de la temperatura ( $25\text{-}50^\circ\text{C}$ ) de los copolímeros sin entrecruzar (**R0-A** y **R0-C**) y de los nanohidrogeles con 0.15% mol de MBA obtenidos con macroiniciadores de a) MPEG,  $DP=44$  (**R3**) y b) PEG,  $DP=43$  (**R12**) esta fracción fue determinada a partir del seguimiento de la relación de integración del grupo  $-\text{CH}_2-\text{CH}-$ , ( $\delta=1.5\text{-}2.2$  ppm, 3H) de la cadena principal de NIPAM.

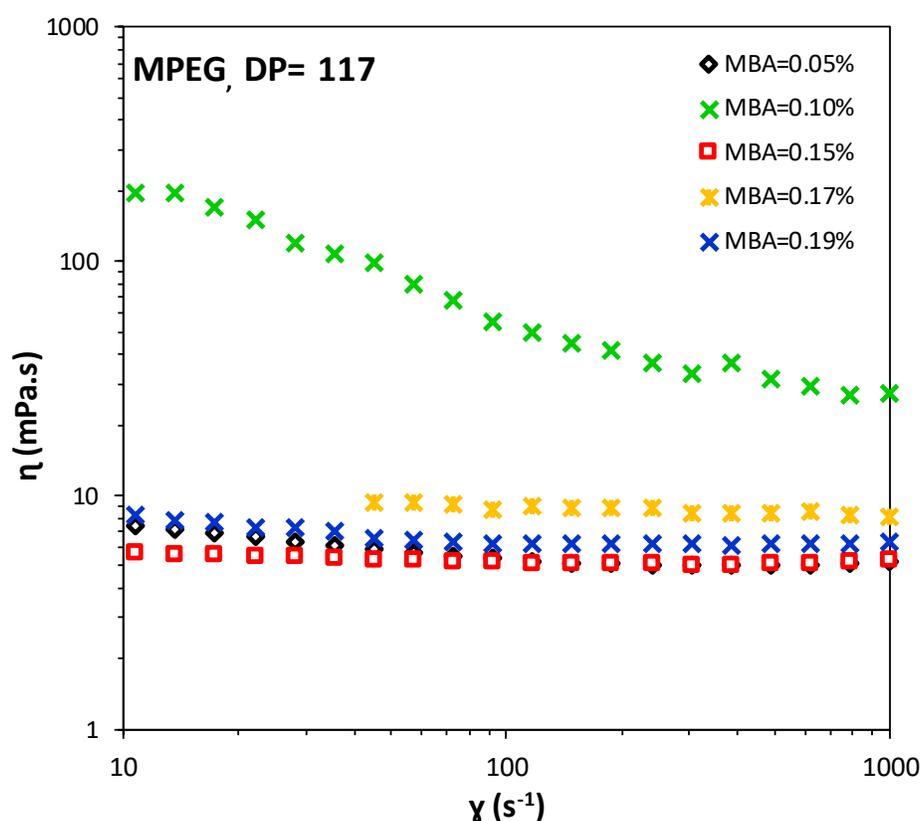
Por otra parte, en los materiales obtenidos a partir de macroiniciadores de PEG (**Figura 7.43b**), se observa que tanto en el nanohidrogel (**R12**) como en el copolímero sin entrecruzar (**R0-C**), la transición de fase de la fracción de PNIPAM empieza a los 40°C, pero en el caso del copolímero la fracción de PNIPAM que se separó fue mayor, por ejemplo, a los 50°C se había separado cerca del 70% de la fracción de PNIPAM presente en la composición del copolímero, mientras que en el nanohidrogel a los 50°C sólo se había separado cerca del 30%. Esto indica que el entrecruzamiento con 0.15% de MBA disminuye la separación de la fracción PNIPAM por efecto de la temperatura. Este resultado se atribuye a un mayor impedimento estérico para separarse de la fracción soluble por su conformación ABA (PNIPAM-b-PEG-PNIPAM).

En el caso de los nanohidrogeles preparados con MPEG, el entrecruzamiento de las cadenas de PNIPAM con 0.15% molar de MBA no disminuye la fracción de PNIPAM que se separa en una temperatura final de 50°C. Sin embargo, la temperatura de inicio de la separación de esta fase se desplazó a temperaturas mayores en comparación con el copolímero sin entrecruzar. Por otra parte, una menor fracción de PNIPAM se separa en los nanohidrogeles preparados con PEG como macroiniciador al calentarlo hasta 50°C. La temperatura de inicio de la separación de la fracción de PNIPAM se desplaza hasta 40°C, mientras que en los materiales derivados del MPEG fue de 30 y 32°C, respectivamente. Esto es consistente con lo observado en DLS.

### 7.3.2. Estudio reológico

Este estudio reológico se realizó antes de empezar las reacciones de entrecruzamiento y se realizó con la finalidad de mantener el sistema ATRP-AGET en condiciones homogéneas, aún con la adición de un agente entrecruzante de alta reactividad en agua como el N,N'-metilenbisacrilamida (MBA), se realizó un estudio reológico en estado estacionario que permitió encontrar la relación molar de PNIPAM/MBA donde el sistema de reacción a 30°C se mantuviera homogéneo y sin problemas de separación de fases al trabajar con 15% en sólidos iniciales. Además, es conocido que utilizar porcentajes molares muy altos de MBA pueden aumentar la rigidez de hidrogel y en consecuencia se disminuyen las propiedades de

hinchamiento de este. Lo anterior, es ocasionado principalmente por su estructura de red más densa, afectando directamente la capacidad para encapsular o atrapar compuestos bioactivos durante la etapa de cargado y subsecuente liberación [121]. Para realizar este estudio se eligió el macroiniciador de MPEG,  $DP=117$ . Las relaciones molares de PNIPAM/MBA fueron: 0.95/0.05, 0.90/0.10, 0.85/0.15, 0.83/0.17, 0.81/0.19. La medición de viscosidad se determinó a cada mezcla sin purificar después de 24 horas de reacción a una temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$ , los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 7.44**.



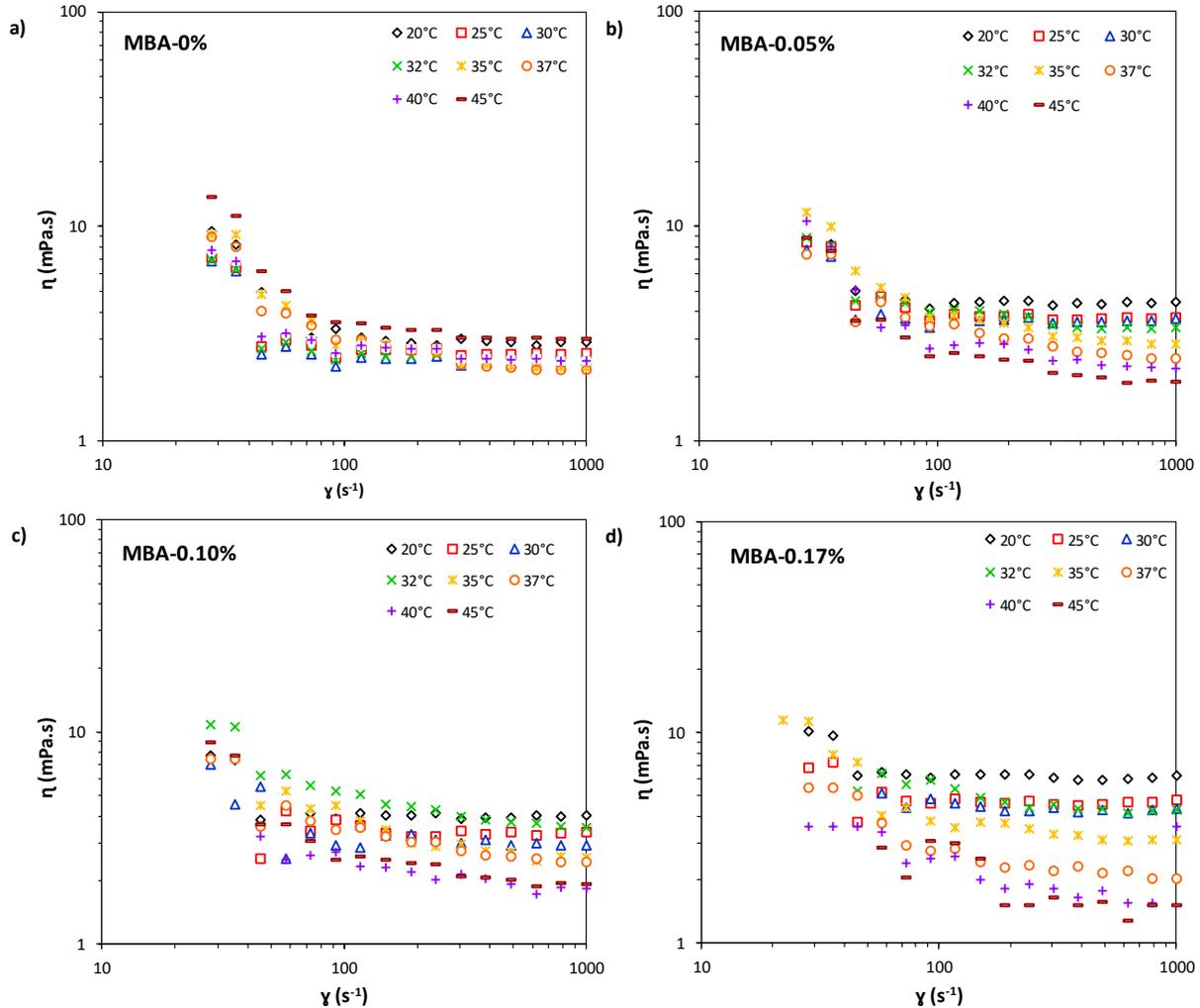
**Figura 7.44.** Viscosidad aparente ( $\eta$ ) en función de la velocidad de corte ( $\gamma$ ) de nanohidrogeles sintetizados a partir del macroiniciador MPEG,  $DP=117$  y diferentes concentraciones molares de MBA.

En la reacción con 0.10% de MBA se observó cualitativamente una separación de fases y al medir la viscosidad aparente de esta muestra, el valor de este parámetro fue mucho mayor comparado con las otras reacciones que incluso contenían una mayor cantidad de agente

entrecruzante. Esto podría deberse a que este nanohidrogeles es el que contiene la mayor fracción volumen de PNIPAM en su composición química ( $\phi_{\text{vol PNIPAM}} = 0.54$ ) y la viscosidad está determinada por las condiciones termodinámicas del sistema. Para las otras muestras evaluadas, la viscosidad aparente se encontraba entre 5.19 y 8.70 mPa.s y no se observó una tendencia directamente proporcional con la concentración de MBA, esto se atribuye también a la fracción volumen de PNIPAM presente en su composición.

Para evaluar las propiedades reológicas de los nanohidrogeles purificados se eligieron los obtenidos a partir de MPEG<sub>44</sub>, estos nanohidrogeles contienen fracciones volumen de PNIPAM entre 0.78 y 0.82 %, respectivamente. Esto se realizó con la finalidad de evaluar el comportamiento de los bloques de PNIPAM al aumentar la temperatura (20-45°C) y la influencia de la concentración de agente entrecruzante (MBA=0, 0.05, 0.10 y 0.17% molar) en las propiedades reológicas de estos nanohidrogeles. Los análisis reológicos para estos materiales se llevaron a cabo a una concentración de 5% p/v. Se eligió esta concentración ya que está por encima de la concentración crítica de agregación. Es sabido que la concentración de polímero en una solución se relaciona directamente con las interacciones hidrófobas que se establecen en el sistema y si la concentración de polímero es menor que la concentración crítica de agregación, la interacción hidrófoba se dará únicamente al interior de una misma molécula y si la concentración aumenta se favorecen las interacciones intra e intermoleculares. En la **Figura 7.45** se muestra la viscosidad en función de la velocidad de corte de los materiales obtenidos con MPEG,  $DP = 44$ . Los resultados obtenidos evidencian que en el copolímero sin entrecruzar (**Figura 7.45a**) la viscosidad disminuyó desde 2.90-2.17 mPa.s al aumentar la temperatura desde 20 hasta 37°C. Sin embargo, después de esta temperatura la viscosidad incrementó y las muestras analizadas adquirieron una apariencia vítrea (rígida). En los copolímeros entrecruzados (nanohidrogeles), la viscosidad siempre disminuyó al aumentar la temperatura de la muestra desde 20 hasta 50°C y mantenían una apariencia blanca. Este comportamiento se puede atribuir a las diferencias en la estructura química de un copolímero que tiene bloques de PNIPAM sin entrecruzar y otro entrecruzado con N,N'-metilenbisacrilamida. Sin embargo, al comparar los copolímeros que contienen diferente grado de entrecruzamiento no se observaron diferencias importantes entre el

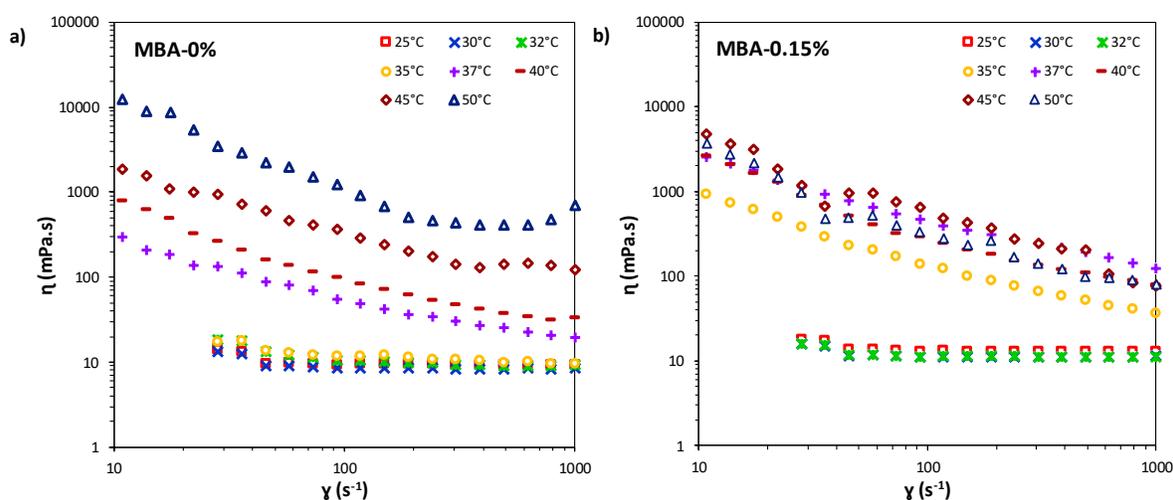
nanohidrogel que contiene 0.05 y 0.10% mol de MBA, pero el que contiene una mayor cantidad de MBA (0.17% mol) presentó valores de viscosidad mayores.



**Figura 7.45.** Viscosidad aparente ( $\eta$ ) en función de la velocidad de corte ( $\dot{\gamma}$ ) evaluada a diferentes temperaturas (20-45°C) de nanohidrogeles de MPEG,  $DP=44$  con una concentración de 5% p/v y con diferentes concentraciones molares de agente entrecruzante (MBA).

Debido a que con una concentración de 5% p/v no se observó un cambio importante en el comportamiento reológico de los nanohidrogeles evaluados, se prepararon soluciones del copolímero sin entrecruzar (MBA= 0%) y del nanohidrogel que contiene 0.15% molar de agente entrecruzante a una concentración dos veces mayor (15% p/v). Los resultados

obtenidos se muestran en la **Figura 7.46**. En el copolímero sin entrecruzar se observó que hasta 35°C la viscosidad disminuía con el aumento de la temperatura, pero después esta temperatura la viscosidad se incrementó gradualmente en respuesta a cambio de temperatura (**Figura 7.46a**). Este comportamiento se atribuye a interacciones intra e intermoleculares por un cambio en la hidrofobicidad del bloque de PNIPAM que conducen a un autoensamblaje de las cadenas de copolímero para formar morfologías micelares. En el caso del copolímero entrecruzado (nanohidrogel con 0.15% molar de MBA) se observó un comportamiento similar, sin embargo, este incremento de viscosidad se presentó después de 32°C.

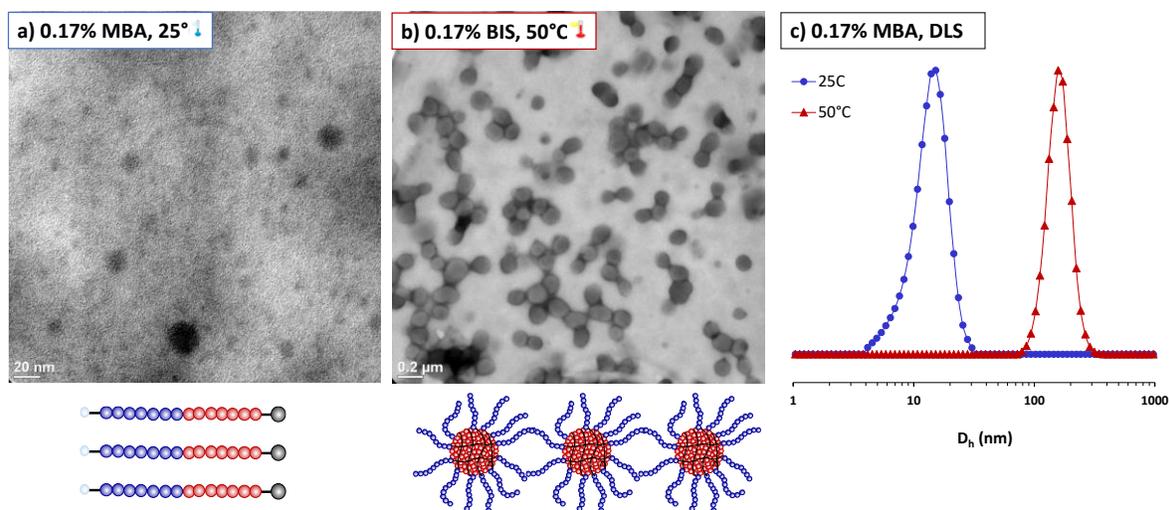


**Figura 7.46.** Viscosidad aparente ( $\eta$ ) en función de la velocidad de corte ( $\dot{\gamma}$ ) evaluada a diferentes temperaturas (25-50°C) y a una concentración de 15% p/v, del a) copolímero sin entrecruzar y b) entrecruzado con 0.15 % molar de MBA obtenidos del macroiniciador MPEG,  $DP=44$ .

En general, hasta antes de la temperatura de transición de fase en volumen los dos sistemas presentaron un comportamiento newtoniano, es decir, no se observó una variación de la viscosidad con la velocidad de corte, pero después de esta temperatura 32 y 35°C, respectivamente, los sistemas presentan un comportamiento pseudoplástico, observado como una disminución de la viscosidad en función de la velocidad de corte. Este comportamiento ya se ha reportado en algunos hidrogeles y lo atribuyen a un cambio en la termodinámica del sistema y formación de nanoestructuras formadas mediante autoensamblaje termoinducido [124].

### 7.3.3. Morfología

La arquitectura de los nanohidrogeles es un parámetro clave que tiene una gran influencia en las propiedades físicas del mismo y por lo tanto una gran importancia en cuanto a sus aplicaciones. En general, la morfología de un nanohidrogel esta influenciada por consideraciones termodinámicas y cinéticas. Así, en el presente estudio se evaluó la morfología de los nanohidrogeles obtenidos a partir de copolímeros dibloque (MPEG-b-PNIPAM) y tribloque (PEG-b-PNIPAM-b-PEG). Las imágenes de TEM del nanohidrogel **R4** de MPEG<sub>44</sub>-P(NIPAM<sub>105</sub>-co-MBA<sub>0.17</sub>) a) 25°C y b) 50°C se muestra en la **Figura 7.47**. Estas imágenes revelaron que las partículas a 25°C (**Figura 7.47a**) eran relativamente regulares y de morfología esférica. El diámetro promedio obtenido por TEM fue de 16.23 nm, que era un poco más pequeño que el obtenido por DLS, 19.03 nm (**Figura 7.47c**).



**Figura 7.47.** Micrografías de TEM del nanohidrogel **R4** de MPEG<sub>44</sub>-P(NIPAM<sub>105</sub>-co-MBA<sub>0.17</sub>) a) 25°C, b) 50°C y c)  $D_p$  obtenido por DLS a 25 y 50°C, respectivamente.

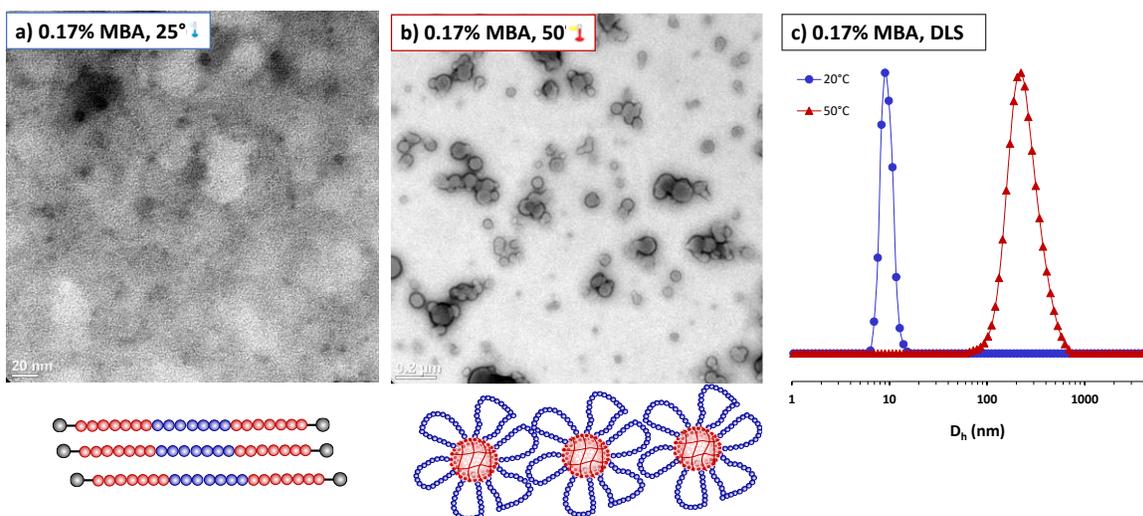
Con la finalidad de evaluar la morfología del nanohidrogel **R4** al aumentar la temperatura, una solución acuosa de este material se calentó por encima de su VPTT (50°C) y posteriormente se depositó en rejillas de *Lacy-carbon* previamente calentadas a esta misma temperatura y tratadas para su análisis por TEM. En la micrografía obtenida (**Figura 7.47b**) se observa que, en respuesta al cambio de temperatura, el bloque termosensible de PNIPAM experimenta una transición de fase de hidrófilo a hidrófobo (como ya se demostró por RMN)

y, en consecuencia, los unimeros con diámetro  $<20$  nm observados a  $25^{\circ}\text{C}$ , se autoensamblan para formar agregados de aproximadamente 152.75 nm. El diámetro promedio obtenido por DLS fue de 149.3 nm y con una distribución de tamaño más estrecha que la obtenida a  $25^{\circ}\text{C}$  (**Figura 7.47c**).

El nanohidrogel obtenido a partir de copolímeros tribloque (ABA) **R13** [P(NIPAM<sub>49</sub>-co-MBA<sub>0.085</sub>)-*b*-PEG<sub>43</sub>-*b*-P(NIPAM<sub>49</sub>-co-MBA<sub>0.085</sub>)] consiste en dos bloques hidrófobos de PNIPAM y un bloque hidrófilo de PEG,  $DP=43$  (**Figura 7.48**). Es conocido que a temperaturas por debajo de la VPTT los puentes de hidrógeno permiten que el material permanezca en solución en forma de unimeros [117], tal como se muestra en la **Figura 7.48a**, donde se observan diámetros muy pequeños ( $<20$  nm) y que fueron muy similares a los obtenidos por DLS a  $25^{\circ}\text{C}$  (**Figura 7.48c**).

Graaf y cols., [125] reportaron la síntesis de geles de PNIPAM<sub>152</sub>-*b*-PEG<sub>131</sub>-*b*-PNIPAM<sub>152</sub> y PNIPAM<sub>304</sub>-*b*-PEG<sub>131</sub>-*b*-PNIPAM<sub>304</sub> obtenidos mediante ATRP-SARA, en una mezcla de agua y acetonitrilo. Parten del supuesto de que los copolímeros tribloque pueden autoensamblarse en morfologías similares a micelas tipo flor, dependiendo de varios factores termodinámicos. Sin embargo, no demostraron mediante microscopía electrónica las morfologías antes mencionadas.

En el presente estudio el nanohidrogel **R13** también derivado de un copolímero tribloque (ABA) y que contiene una composición química diferente a la reportada por Graaf y cols., y que además se entrecruzó con MBA, se analizó mediante TEM a  $50^{\circ}\text{C}$  (por encima de su VPTT), la micrografía mostrada en la **Figura 7.48b** evidencia que las cadenas del copolímero presentan un autoensamblaje termoinducido para formar agregados con morfologías micelares tipo flor con un diámetro promedio  $<200$  nm. Mientras que por DLS se obtuvo un diámetro promedio de 221.2 nm. Esta diferencia podría deberse a que en DLS las muestras están en dispersión acuosa y pudieron haberse hinchado por la absorción de



**Figura 7.48.** Micrografías de TEM del nanohidrogel **R13**  $P(\text{NIPAM}_{49}\text{-co-MBA}_{0.085})\text{-}b\text{-PEG}_{43}\text{-}b\text{-}P(\text{NIPAM}_{49}\text{-co-MBA}_{0.085})$  a)  $25^{\circ}\text{C}$ , b)  $50^{\circ}\text{C}$  y c)  $D_p$  obtenido por DLS a  $25$  y  $50^{\circ}\text{C}$  respectivamente.

agua.

## VIII. CONCLUSIONES

Se obtuvieron ésteres de 2-bromo-2-metilpropanoato con altos rendimientos ( $\geq 93.0\%$ ) a partir de polímeros de poli(oxialquileno). El halógeno adicionado al final de la cadena se caracterizó detalladamente por MALDI-TOF MS y se determinó el peso molecular promedio ( $M_n$ , MALDI) exacto de los polímeros cuando se utilizó una sal de sodio como agente cationizante (NaTFA), estos materiales se utilizaron como macroiniciadores en las reacciones ATRP-AGET en agua. Adicionalmente, se estableció que cuando se utilizan iones de plata como agentes cationizantes (AgTFA y AgTFS), estos reaccionan con el compuesto  $\alpha$ -bromo carbonilo debido a su característica similar blanda, potenciando la pérdida del átomo de bromo y contribuyendo a reacciones de eliminación o sustitución. Esta reacción fue confirmada por experimentos de  $^1\text{H}$  NMR a partir de los cuales se encontró que la pérdida del halógeno es desencadenada cuando se aplica una fuente de energía y no durante el proceso de preparación de la muestra como se había establecido en estudios previos.

El empleo de la técnica ATRP-AGET en solución homogénea utilizando agua como medio de reacción y complejos catalíticos de  $\text{CuBr}_2/\text{HMTETA}$ , condujo a la obtención de copolímeros dibloque y tribloque con fracciones volumen de MPEG ( $\phi_{\text{MPEG}}$ ): 0.07, 0.20 y 0.43 o de PEG ( $\phi_{\text{PEG}}$ ): 0.20, 0.30 y 0.50, conversiones entre 38.2 y 92% y dispersidad  $\leq 1.3$ . Estos copolímeros muestran cambios en su comportamiento de asociación dependientes de la temperatura y de su composición. Los valores de LCST determinados mediante RMN sugieren que los copolímeros dibloque se asocian a temperaturas menores ( $32.5\text{-}36.0^\circ\text{C}$ ) comparados con los copolímeros tribloque ( $34.8\text{-}38.5^\circ\text{C}$ ) y que el  $DP$  del bloque hidrófilo tiene alta influencia en la modulación de los valores de LCST, ya que, cuando se utilizaban cadenas más cortas de  $\text{MPEG}_{44}$  o  $\text{PEG}_{43}$ , el valor de LCST fue mayor comparado con los preparados con los macroiniciadores de MPEG o PEG de mayor  $DP$ . Por DLS se determinó que conforme se aumentaba la fracción de MPEG se disminuía el diámetro promedio de partícula ( $D_p$ ), indicando una mayor estabilización estérica por las cadenas hidrófilas de mayor tamaño. Por micro

En los materiales entrecruzados con MBA se obtuvieron nanohidrogeles con fracciones volumen de MPEG ( $\phi_{\text{MPEG}}$ ): 0.18-0.50 o de PEG ( $\phi_{\text{PEG}}$ ): 0.18-0.49. La conversión de monómero (NIPAM) determinada mediante  $^1\text{H}$  RMN fue de 51.0-94.0% para los nanohidrogeles derivados de MPEG y entre 39.0-88.0% para los de PEG. Mediante DLS,  $^1\text{H}$  RMN y reometría, se evaluó la respuesta de los nanohidrogeles al incrementar la temperatura (25 a 50°C). Se determinó que al incrementar la concentración de agente entrecruzante el diámetro del nanohidrogel disminuye y esto también depende del tamaño de la cadena de bloque de MPEG o PEG y de la composición. Mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) se observaron nanoestructuras autoensambladas por efecto de la temperatura con diámetros promedio  $<200$ .

## IX. PERSPECTIVAS A FUTURO

---

A partir de los estudios y discusiones presentados en la Tesis Doctoral, las perspectivas de trabajos futuros se orientan a utilizar los nanomateriales sintetizados y caracterizados para cargar fármacos hidrófobos como ubiquinol, curcumina, ácido dihidrolipoico (DHLA), entre otros y evaluar la eficiencia de encapsulación y subsecuente liberación *in vitro* de estos ingredientes activos de la red del nanohidrogel al aumentar la temperatura hasta valores cercanos a la LCST. Por sus características (diferente balance hidrófilo/lipófilo) se evaluará la posibilidad de encapsular también ingredientes activos hidrófilos.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W. & Ichikawa, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2000, **50**, 27–46.
2. Caló, E. & Khutoryanskiy, V. V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *Eur. Polym. J.*, 2015, **65**, 252–267.
3. Hoffman, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, **54**, 3–12.
4. Yim, H., Park, S. jung, Bae, Y. H. & Na, K. Biodegradable cationic nanoparticles loaded with an anticancer drug for deep penetration of heterogeneous tumours. *Biomaterials*, 2013, **34**, 7674–7682.
5. Xiong, M.-H., Bao, Y., Du, X.-J., Tan, Z.-B., Jiang, Q., Wang, H.-X., Wang, J. Differential Anticancer Drug Delivery with a Nanogel Sensitive to Bacteria-Accumulated Tumor Artificial Environment. *ACS Nano*, 2013 **7**(12), 10636–10645.
6. Chen, W., Achazi, K., Schade, B. & Haag, R. Charge-conversional and reduction-sensitive poly(vinyl alcohol) nanogels for enhanced cell uptake and efficient intracellular doxorubicin release. *J. Controlled Release*, 2015, **205**, 15–24.
7. Sasaki, Y. & Akiyoshi, K. Nanogel engineering for new nanobiomaterials: From chaperoning engineering to biomedical applications. *Chem. Rec.*, 2010, **10**, 366–376.
8. Molina, M., Asadian-Birjand M., Balach J., Bergueiro J., Miceli E., & Calderón M. Stimuli-responsive nanogel composites and their application in nanomedicine. *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**(17), 6161–6186.
9. Wu, H. Q. & Wang, C. C. Biodegradable smart nanogels: A new platform for targeting drug delivery and biomedical diagnostics. *Langmuir*, 2016, **32**, 6211–6225.
10. Mittal Vikas. (2011). *Advanced polymer nanoparticles: synthesis and surface modifications*. Sound Parkway NW: *Taylor and Francis Group*.
11. Wu, Z., Liang, H. & Lu, J. Synthesis of Poly (N-isopropylacrylamide)-Poly(ethylene glycol) Miktoarm Star Copolymers via RAFT Polymerization and Aldehyde-Aminoxy Click Reaction and Their Thermoinduced Micellization. *Macromolecules*, 2010, **43**, 5699-5799.
12. Gandhi, A., Paul, A., Sen, S. O. & Sen, K. K. Studies on thermoresponsive polymers: Phase behaviour, drug delivery and biomedical applications. *Asian J. of Pharma. Sci.*, 2015, **10**(2), 99-107.
13. Neamtu, I., Rusu, A. G., Diaconu, A., Nita, L. E. & Chiriac, A. P. Basic concepts and recent advances in nanogels as carriers for medical applications. *Drug Delivery*, 2017, **24**(1), 539–557.
14. Chen, J., Liu, M., Gong, H., Huang, Y. & Chen, C. Synthesis and Self-Assembly of Thermoresponsive PEG-b-PNIPAM-b-PCL ABC Triblock Copolymer through the Combination

- of Atom Transfer Radical Polymerization, Ring-Opening Polymerization, and Click Chemistry. *J. Phys. Chem. B.*, 2011, **115**, 14947–14955.
15. Bischofberger, I. & Trappe, V. New aspects in the phase behaviour of poly(N-isopropylacrylamide): systematic temperature dependent shrinking of PNIPAM assemblies well beyond the LCST. *Sci. Rep.*, 2015, **5**, 15520.
  16. Jain, K., Vedarajan, R., Watanabe, M., Ishikiriya, M. and Matsumi, N. Tunable LCST behavior of poly(N-isopropylacrylamide/ionic liquid) copolymers. *Polym. Chem.*, 2015, **6**(38), 6819–6825.
  17. Teodorescu, M., Negru, I., Stanescu, P. O., Draǵhici, C., Lungu, A. y Sârbu A. Thermogelation properties of poly (N-isopropylacrylamide)–block–poly(ethylene glycol)– block–poly(N-isopropylacrylamide) triblock copolymer aqueous solutions. *Reactive & Functional Polymers*, 2010, **70**, 790–797.
  18. Lutz, J. F., Akdemir Ö and. Hoth, A. Point by point comparison of two thermosensitive polymers exhibiting a similar LCST: Is the age of poly(NIPAM) over?. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**(40), 13046–13047.
  19. Stenzel, M. H, y Barner-Kowollik, C. The living dead–common misconceptions about reversible deactivation radical polymerization. *Materials Horizons*, 2016, **3**, 471–477.
  20. Simakova, A., Averick, S. E., Konkolewicz, D. y Matyjaszewski, K. Aqueous ARGET ATRP. *Macromolecules*, 2012, **45**, 6371–6379.
  21. Filippov, S. K., Bogomolova, A., Kabarov, L., Velychkivska, N., Starovoytova, S., Cernochova, S., Rogers, S. E., Lau, W. M., Khutoryanskiy, V. V. y Cook, M. T. Internal Nanoparticle Structure of Temperature-Responsive Self- Assembled PNIPAM-b-PEG-b-PNIPAM Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: NMR, SANS, and Light Scattering Studies. *Langmuir*, 2016, **32**, 5314–5323.
  22. Oh, J. K., Min, K. y Matyjaszewski, K. Preparation of Poly (oligo (ethylene glycol) monomethyl ether methacrylate) by Homogeneous Aqueous AGET ATRP. *Macromolecules*, 2006, **39**, 3161-3167.
  23. Horn, M. y Matyjaszewski, K. Solvent Effects on the Activation Rate Constant in Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules*, 2013, **46**, 3350–3357.
  24. Coessens, V. M.C. y Matyjaszewski, K. Fundamentals of Atom Transfer Radical Polymerization. *Journal of Chemical Education*, 2010, **87**(9), 916-919.
  25. Krys, P. y Matyjaszewski, K. Kinetics of Atom Transfer Radical Polymerization. *European Polymer Journal*, 2017, **89**, 482–523.
  26. Jones, G. R., Anastasaki, A., Whitfield, R., Engelis, N., Liarou, E., y Haddleton, D.M. Copper-Mediated Reversible Deactivation Radical Polymerization in Aqueous Media. *Angew. Chem. Int.*, 2018, **57**, 10468-10482.

27. Fantin, M., Isse, A. A., Gennaro, A. y Matyjaszewski, K. Understanding the Fundamentals of Aqueous ATRP and Defining Conditions for Better Control. *Macromolecules*, 2015, **48**, 6862–6875.
28. Fantin, M., Isse, A. A., Matyjaszewski, K. y Gennaro, A. ATRP in Water: Kinetic Analysis of Active and Super-Active Catalysts for Enhanced Polymerization Control. *Macromolecules*, 2017, **50**, 2696–2705.
29. Tsarevsky, N. V., Pintauer, T. y Matyjaszewski, K. Deactivation Efficiency and Degree of Control over Polymerization in ATRP in Protic Solvents. *Macromolecules*, 2004, **37**, 9768-9778.
30. Jewrajka, S. K. y Mandal, B. M. Living radical polymerization. 1. The Case of Atom Transfer Radical Polymerization of Acrylamide in Aqueous-Based Medium. *Macromolecules*, 2003, **36**, 311–317.
31. Jewrajka, S. K. y Mandal, B. M. Living Radical Polymerization. II. Improved Atom Transfer Radical Polymerization of Acrylamide in Aqueous Glycerol Media with a Novel Pentamethyldiethylenetriamine-Based Soluble Copper (I) Complex Catalyst System. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 2004, **42**, 2483–2494.
32. Wever, D. A. Z., Raffa, P., Picchioni, F. y Broekhuis, A. A. Acrylamide Homopolymers and Acrylamide-N-isopropylacrylamide block copolymers by Atomic Transfer Radical Polymerization in water. *Macromolecules*, 2012, **45**, 4040–4045.
33. Chmielarz, P., Kryszewski, P., Park, S. y Matyjaszewski, K. PEO-b-PNIPAM copolymers via SARA ATRP and eATRP in aqueous media. *Polymer*, 2015, **71**, 143-147.
34. Yao, Z. L., Grishkewich N. and Tam K.C. Swelling and shear viscosity of stimuli-responsive colloidal systems. *Soft Matter*, 2013, **9**, 5319.
35. Xu, Y., Li, Y., Cao, X. Chen Q. and An, Z. Versatile RAFT dispersion polymerization in cononsolvents for the synthesis of thermoresponsive nanogels with controlled composition, functionality and architecture. *Polym. Chem.*, 2014, **5**, 6244-6255.
36. Li, Y., Ye, Z., Shen, L., Xu, Y., Zhu, A., Wu, P. and An Z. Formation of Multidomain Hydrogels via Thermally Induced Assembly of PISA-Generated Triblock Terpolymer Nanogels. *Macromolecules* 2016, **49**(8), 3038–3048.
37. Ekkelenkamp, A., Elzes, M.R., Engbersen, J.F. Paulusse, J.M.J. Responsive crosslinked polymer nanogels for imaging and therapeutics delivery. *J. Mater. Chem. B*, 2018, **6**, 210-235.
38. Ahmed, S. Alhareth, K. and Mignet, N. Advancement in nanogel formulations provides controlled drug release. *Int. J. Pharm.*, 2020, **548**, 119435.
39. Neamtu I, Rusu AG, Diaconu A, Nita LE, Chiriac AP. Basic concepts and recent advances in nanogels as carriers for medical applications. *Drug Deliv.* 2017, **24**(1), 539-557.
40. Wang X, Niu D, Wu Q, Bao S, Su T, Liu X, Zhang S, Wang Q. Iron oxide/manganese oxide co-loaded hybrid nanogels as pH-responsive magnetic resonance contrast agents. *Biomaterials*.

- 2015, **53**, 349-57.
41. Chan, M., Lux, J., Nishimura, T., Akiyoshi, K. & Almutairi, A. Long-lasting and efficient tumor imaging using a high relaxivity polysaccharide nanogel magnetic resonance imaging contrast agent. *Biomacromolecules* **16**, 2015, 2964–2971.
  42. Yang P, Li D, Jin S, Ding J, Guo J, Shi W, Wang C. Stimuli-responsive biodegradable poly(methacrylic acid) based nanocapsules for ultrasound traced and triggered drug delivery system. *Biomaterials*. 2014, **35**(6), 2079-2088.
  43. Eckmann, D. M., Composto, R. J., Tsourkas, A. & Muzykantov, V. N. R. Nanogel Carrier Design for Targeted Drug Delivery. *J. Mater. Chem. B*. 2014, **2**, 8085–8097.
  44. Soni, K. S., Desale, S. S. & Bronich, T. K. Nanogels: An overview of properties, biomedical applications and obstacles to clinical translation. *J. Control. Release*, 2016, **240**, 109–126.
  45. Zha, L., Banik, B. & Alexis, F. Stimulus responsive nanogels for drug delivery. *Soft Matter*, 2011, **7**, 5908-5916.
  46. Molina, M., Asadian-Birjand, M., Balach, J., Bergueiro, J., Miceli, E. and Calderon, M. Stimuli-responsive nanogel composites and their application in nanomedicine. *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 6161–6186.
  47. Zhang, Q. Weber, C. Schubert U. S. and Hoogenboom R.. Materials Horizons Thermoresponsive polymers with lower critical solution temperature: from fundamental aspects turbidimetry conditions. *Mater. Horiz.*, 2017, **4**, 109-116.
  48. Chen, J., Liu, M., Gong, H., Huang, Y. & Chen, C. Synthesis and self-assembly of thermoresponsive PEG-b-PNIPAM-b-PCL ABC triblock copolymer through the combination of atom transfer radical polymerization, ring-opening polymerization, and click chemistry. *J. Phys. Chem. B.*, 2011, **115**, 14947–14955.
  49. Taylor M.J, Tomlins P., Sahota T.S. Thermoresponsive Gels. *Gels*. 2017, **3**, 4.
  50. Canmugam A, Langemo D, Thomason K, Haan J, Altenburger EA, Tippet A, Henderson L, Zortman TA. Relative Temperature Maximum in Wound Infection and Inflammation as Compared with a Control Subject Using Long-Wave Infrared Thermography. *Adv Skin Wound Care*. 2017, **30**(9), 406-414.
  51. Qureshi, M. A., Khatoon F. Different types of smart nanogel for targeted delivery. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices.*, 2019, **4**(2), 201-212.
  52. Bandyopadhyay S., Sharma A., Alvi M. A. A., Raju R., Glomm W. R. A robust method to calculate the volume phase transition temperature (VPTT) for hydrogels and hybrids. *RSC Adv.*, 2017, **7**, 53192-53202.
  53. Zhang, H., Zhai, Y., Wang, J. & Zhai, G. New progress and prospects: The application of nanogel in drug delivery. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 2016, **60**, 560–568.
  54. Oh, J. K., Drumright, R., Siegwart, D. J. & Matyjaszewski, K. The development of

- microgels/nanogels for drug delivery applications. *Prog. Polym. Sci.* 2008, **33**, 448–477.
55. Bearat, H. H., Lee, B. H. & Vernon, B. L. Comparison of properties between NIPAAm-based simultaneously physically and chemically gelling polymer systems for use in vivo. *Acta Biomater.* 2012, **8**, 3629–3642.
  56. Theune, L. E., Charbaji, R., Kar, M., Wedepohl, S., Hedtrich, S., Calderón, M. Critical parameters for the controlled synthesis of nanogels suitable for temperature-triggered protein delivery. *Materials Science and Engineering: C*, 2019, **100**, 141-151.
  57. Kardos, A., Gilányi T., Varga I. How small can poly(N-isopropylacrylamide) nanogels be prepared by controlling the size with surfactant?, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2019, **557**, 793-806.
  58. Zhu, X., Gu, X., Zhang, L. Preparation and characterization of nanosized P(NIPAM-MBA) hydrogel particles and adsorption of bovine serum albumin on their surface. *Nanoscale Res Lett*, 2012, **7**, 519.
  59. Arleth, L., Xia, X., Hjelm, R. P., Wu, J., & Hu, Z. Volume transition and internal structures of small poly(N-isopropylacrylamide) microgels. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 2005, **43**(7), 849–860.
  60. Alexander, A., Ajazuddin, Khan, J., Saraf, S., & Saraf, S. Polyethylene glycol (PEG)–Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) based thermosensitive injectable hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2014, **88**(3), 575–585.
  61. Lutz, J.-F. Polymerization of oligo(ethylene glycol) (meth)acrylates: Toward new generations of smart biocompatible materials. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2008, **46**(11), 3459–3470.
  62. Gan, D., & Lyon, L. A. Synthesis and Protein Adsorption Resistance of PEG-Modified Poly(N-isopropylacrylamide) Core/Shell Microgels. *Macromolecules*, 2002, **35**(26), 9634–9639.
  63. Motlaq, V. F., Knudsen, K. D., & Nyström, B. Effect of PEGylation on the stability of thermoresponsive nanogels. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2018, **524**, 245–255.
  64. Sayed, E. J., Lorthioir, C., Perrin, P., and Sanson, N. PEGylated PNIPAM Microgels : Synthesis, Characterization and Colloidal Stability. *Soft Matter*. 2019, **15**(5) 963–972.
  65. Szwarc, M. Living' Polymers. *Nature*, 1956, **178**(4543) 1168–1169.
  66. Charleux, B., Delaittre, G., Rieger, J., & D'Agosto, F. Polymerization-Induced Self-Assembly: From Soluble Macromolecules to Block Copolymer NanoObjects in One Step. *Macromolecules*, 2012, **45**(17), 6753–6765.
  67. Warren, N. J., & Armes, S. P. Polymerization-Induced Self-Assembly of Block Copolymer Nanoobjects via RAFT Aqueous Dispersion Polymerization. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, **136**(29), 10174–10185.
  68. Zhou, W., Qu, Q., Xu, Y., & An, Z. Aqueous Polymerization-Induced Self-Assembly for the

- Synthesis of Ketone-Functionalized NanoObjects with Low Polydispersity. *ACS Macro Letters*, 2015, **4**(5), 495–499.
69. Yu, Y., & Eisenberg, A. Control of Morphology through Polymer–Solvent Interactions in Crew-Cut Aggregates of Amphiphilic Block Copolymers. *Journal of the American Chemical Society*, 1997, **119**(35), 8383–8384.
70. Discher, B. M. Polymersomes: Tough Vesicles Made from Diblock Copolymers. *Science*, 1999, **284**(5417), 1143–1146.
71. Kataoka, K., Harada, A., & Nagasaki, Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, **47**(1), 113–131.
72. Jain S. and Bates F.S. On the Origins of Morphological Complexity in Block Copolymer Surfactants. *Science, New Series*, 2003, **300**(5618), 460–464
73. Ahmed, F., & Discher, D. E. Self-porating polymersomes of PEG–PLA and PEG–PCL: hydrolysis-triggered controlled release vesicles. *Journal of Controlled Release*, 2004, **96**(1), 37–53.
74. Zhou, H., Liu, C., Gao, C., Qu, Y., Shi, K., & Zhang, W. Polymerization-induced self-assembly of block copolymer through dispersion RAFT polymerization in ionic liquid. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2015, **54**(11), 1517–1525.
75. Karagoz, B., Esser, L., Duong, H. T., Basuki, J. S., Boyer, C., & Davis, T. P. Polymerization-Induced Self-Assembly (PISA) – control over the morphology of nanoparticles for drug delivery applications. *Polym. Chem.*, 2014, **5**(2), 350–355.
76. Canning, S. L., Smith, G. N., & Armes, S. P. A Critical Appraisal of RAFT-Mediated Polymerization-Induced Self-Assembly. *Macromolecules*, 2016, **49**(6), 1985–2001.
77. Figg, C. A., Carmean, R. N., Bentz, K. C., Mukherjee, S., Savin, D. A., & Sumerlin, B. S. Tuning Hydrophobicity To Program Block Copolymer Assemblies from the Inside Out. *Macromolecules*, 2017, **50**(3), 935–943.
78. Rieger, J., Stoffelbach, F., Bui, C., Alaimo, D., Jérôme, C., & Charleux, B. Amphiphilic Poly(ethylene oxide) Macromolecular RAFT Agent as a Stabilizer and Control Agent in ab Initio Batch Emulsion Polymerization. *Macromolecules*, 2008, **41**(12), 4065–4068.
79. Liu, C., Hong, C.-Y., & Pan, C.-Y. Polymerization Techniques in Polymerization-Induced Self-Assembly (PISA). *Polym. Chem.*, 2022, **13**, 4018.
80. Derry, M. J., Fielding, L. A., & Armes, S. P. Polymerization-induced self-assembly of block copolymer nanoparticles via RAFT non-aqueous dispersion polymerization. *Progress in Polymer Science*, 2016, **52**, 1–18.
81. Sugihara, S., Blanazs, A., Armes, S. P., Ryan, A. J., & Lewis, A. L. Aqueous Dispersion Polymerization: A New Paradigm for in Situ Block Copolymer Self-Assembly in Concentrated

- Solution. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, **133**(39), 15707–15713.
82. Warren, N. J., Mykhaylyk, O. O., Mahmood, D., Ryan, A. J., & Armes, S. P. RAFT Aqueous Dispersion Polymerization Yields Poly(ethylene glycol)-Based Diblock Copolymer NanoObjects with Predictable Single Phase Morphologies. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, **136**(3), 1023–1033.
  83. Fu, W., Luo, C., Morin, E. A., He, W., Li, Z., & Zhao, B. UCST-Type Thermosensitive Hairy Nanogels Synthesized by RAFT Polymerization-Induced Self-Assembly. *ACS Macro Letters*, 2017, **6**(2), 127–133.
  84. Patten T. E. and Matyjaszewski K. Atom Transfer Radical Polymerization and the Synthesis of Polymeric Materials. *Adv. Mater.* 1998, **10**(12), 901-915.
  85. Jakubowski, W., & Matyjaszewski, K. Activator Generated by Electron Transfer for Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules*, 2005, **38**(10), 4139–4146.
  86. Xu, Z., Hu, X., Li, X., & Yi, C. Monodispersed PEG-b-PSt nanoparticles prepared by atom transfer radical emulsion polymerization under microwave irradiation. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2007, **46**(2), 481–488.
  87. Kim, K. H., Kim, J., & Jo, W. H. Preparation of hydrogel nanoparticles by atom transfer radical polymerization of N-isopropylacrylamide in aqueous media using PEG macro-initiator. *Polymer*, 2005, **46**(9), 2836–2840.
  88. Min, K., & Matyjaszewski, K. Atom Transfer Radical Dispersion Polymerization of Styrene in Ethanol. *Macromolecules*, 2007, **40**(20), 7217–7222.
  89. Sugihara, S., Sugihara (nee Nishikawa), K., Armes, S. P., Ahmad, H., & Lewis, A. L. Synthesis of Biomimetic Poly(2-(methacryloyloxy)ethyl phosphorylcholine) Nanolatexes via Atom Transfer Radical Dispersion Polymerization in Alcohol/Water Mixtures. *Macromolecules*, 2010, **43**(15), 6321–6329.
  90. Wang, G., Schmitt, M., Wang, Z., Lee, B., Pan, X., Fu, L., Matyjaszewski, K. Polymerization-Induced Self-Assembly (PISA) Using ICAR ATRP at Low Catalyst Concentration. *Macromolecules*, 2016, **49**(22), 8605–8615.
  91. Min, K., Gao, H., & Matyjaszewski, K. Preparation of Homopolymers and Block Copolymers in Miniemulsion by ATRP Using Activators Generated by Electron Transfer (AGET). *Journal of the American Chemical Society*, 2005, **127**(11), 3825–3830.
  92. Raemdonck, K., Demeester, J., & De Smedt, S. Advanced nanogel engineering for drug delivery. *Soft Matter*, 2009 **5**(4), 707–715.
  93. Manchun, S., Cheewatanakornkool, K., Dass, C. R., & Sriamornsak, P. Novel pH-responsive dextrin nanogels for doxorubicin delivery to cancer cells with reduced cytotoxicity to cardiomyocytes and stem cells. *Carbohydrate Polymers*, 2014, **114**, 78–86.
  94. Manchun, S., Dass, C. R., Cheewatanakornkool, K., & Sriamornsak, P. Enhanced anti-tumor

- effect of pH-responsive dextrin nanogels delivering doxorubicin on colorectal cancer. *Carbohydrate Polymers*, 2015, **126**, 222–230.
95. Karnoosh-Yamchi, J., Mobasseri, M., Akbarzadeh, A., Davaran, S., Ostad-Rahimi, A. R., Hamishehkar, H., Rahmati-Yamchi, M. Preparation of pH sensitive insulin-loaded nano hydrogels and evaluation of insulin releasing in different pH conditions. *Molecular Biology Reports*, 2014, **41**(10), 6705–6712.
  96. Abandansari, H. S., Nabid, M. R., Rezaei, S. J. T., & Niknejad, H. pH-sensitive nanogels based on Boltorn ® H40 and poly(vinylpyridine) using mini-emulsion polymerization for delivery of hydrophobic anticancer drugs. *Polymer*, 2014, **55**(16), 3579–3590.
  97. Gupta, P., Jordan, C. T., Mitov, M. I., Butterfield, D. A., Hilt, J. Z., & Dziubla, T. D. Controlled curcumin release via conjugation into PBAE nanogels enhances mitochondrial protection against oxidative stress. *International Journal of Pharmaceutics*, 2016, **511**(2), 1012–1021.
  98. Owens III, D.E. Peppas, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006, **307**(1), 93–102.
  99. Hamidi, M., Azadi, A., & Rafiei, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, **60**(15), 1638–1649.
  100. Miyata, T., Uragami, T., & Nakamae, K. Biomolecule-sensitive hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, **54**(1), 79–98.
  101. Güven, O. Size Exclusion Chromatography of Poly(ethylene glycol). *British Polymer Journal*, 1986, **18**(6), 391–393.
  102. Knochenmuss, R., Karbach, V., Wiesli, U., Breuker, K., & Zenobi, R. The matrix suppression effect in matrix-assisted laser desorption/ionization: application to negative ions and further characteristics. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1998, **12**(9), 529–534.
  103. Le Grogne, E., Claverie, J., & Poli, R. Radical Polymerization of Styrene Controlled by Half-Sandwich Mo(III)/Mo(IV) Couples: All Basic Mechanisms Are Possible. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, **123**(39), 9513–9524.
  104. Matyjaszewski, K., Jo, S. M., Paik, H., & Shipp, D. A. An Investigation into the CuX/2,2'-Bipyridine (X = Br or Cl) Mediated Atom Transfer Radical Polymerization of Acrylonitrile. *Macromolecules*, 1999, **32**(20), 6431–6438.
  105. Kemptner, J., Marchetti-Deschmann, M., Siekmann, J., Turecek, P. L., Schwarz, H. P., & Allmaier, G. GEMMA and MALDI-TOF MS of reactive PEGs for pharmaceutical applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010, **52**(4), 432–437.
  106. Kooijman, P. C., Kok, S., & Honing, M. Independent assessment of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) sample preparation quality: Effect of sample preparation on MALDI-MS of synthetic polymers. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2017, **31**(4), 362–370.

107. Wood, T. D. Mass Spectrometry in Polymer Chemistry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 2012, **23**(11), 2048–2048.
108. Tintaru, A., Chendo, C., Phan, T. N. T., Rollet, M., Giordano, L., Viel, S., Charles, L. End-Group Cleavage in MALDI of ATRP-Made Polystyrene: A Silver-Catalyzed Reaction during Sample Preparation. *Analytical Chemistry*, 2013, **85**(11), 5454–5462.
109. Lin, H.-Y., Dyakov, Y. A., Lee, Y. T., & Ni, C.-K. Temperature Dependence of Desorbed Ions and Neutrals and Ionization Mechanism of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2021, **32**, 1, 95–105.
110. Sasaki, S., Okabe, S., & Miyahara, Y. Thermodynamic Properties of N-Isopropylacrylamide in Water: Solubility Transition, Phase Separation of Supersaturated Solution, and Glass Formation. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2010, **114**(46), 14995–15002.
111. Tsarevsky, N. V., & Matyjaszewski, K. “Green” Atom Transfer Radical Polymerization: From Process Design to Preparation of Well-Defined Environmentally Friendly Polymeric Materials. *Chemical Reviews*, 2007, **107**(6), 2270–2299.
112. Matyjaszewski, K. Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP): Current Status and Future Perspectives. *Macromolecules*, 2012, **45**(10), 4015–4039.
113. Maleki, A., Zhu, K., Pamies, R., Schmidt, R. R., Kjøniksen, A.-L., Karlsson, G., Nyström, B. Effect of polyethylene glycol (PEG) length on the association properties of temperature-sensitive amphiphilic triblock copolymers (PNIPAAm-b-PEGn-b-PNIPAAm) in aqueous solution. *Soft Matter*, 2011, **7**(18), 8111.
114. Spěváček, J., Konefał, R., & Čadová, E. NMR Study of Thermoresponsive Block Copolymer in Aqueous Solution. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2016, **217**(12), 1370–1375.
115. Zhao, J., Zhang, G., & Pispas, S. Morphological transitions in aggregates of thermosensitive poly(ethylene oxide)-b-poly(N-isopropylacrylamide) block copolymers prepared via RAFT polymerization. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2009, **47**(16), 4099–4110.
116. Qin, S., Geng, Y., Discher, D. E., & Yang, S. Temperature-Controlled Assembly and Release from Polymer Vesicles of Poly(ethylene oxide)-block- poly(N-isopropylacrylamide). *Advanced Materials*, 2009, **18**(21), 2905–2909.
117. Seidi, F., & Heshmati, P. Synthesis of a PEG-PNIPAm thermosensitive dendritic copolymer and investigation of its self-association. *Chinese Journal of Polymer Science*, 2014, **33**(1), 192–202.
118. Flory, P. J., & Rehner, J. Statistical Mechanics of Cross-Linked Polymer Networks I. Rubberlike Elasticity. *The Journal of Chemical Physics*, 1943 **11**(11), 512–520.
119. Truong, V., Blakey, I., & Whittaker, A. K. Hydrophilic and Amphiphilic Polyethylene Glycol-Based Hydrogels with Tunable Degradability Prepared by “Click” Chemistry. *Biomacromolecules*, 2012, **13**(12), 4012–4021.

120. Borges, F. T. P., Papavasiliou, G., & Teymour, F. Characterizing the Molecular Architecture of Hydrogels and Crosslinked Polymer Networks beyond Flory–Rehner—I. Theory. *Biomacromolecules*, 2020, **21**(12), 5104–5118.
121. Milster, S., Chudoba, R., Kanduč, M., & Dzubiella, J. Cross-linker effect on solute adsorption in swollen thermoresponsive polymer networks. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2019, **21**, 6588–6599.
122. Agnihotri, P., Raj, R., Kumar, D., & Dan, A., Short oligo(ethylene glycol) chain incorporated thermoresponsive microgels: from structural analysis to modulation of solution properties. *Soft Matter*, 2020, **16**, 845–7859.
123. Sun, W., An, Z., & Wu, P. Hydrogen bonding reinforcement as a strategy to improve upper critical solution temperature of poly(N-acryloylglycinamide-co-methacrylic acid). *Polymer Chemistry*, 2018, **9**(26), 3667–3673.
124. Pelton R. Temperature-sensitive aqueous microgels. *Adv Colloid Interface Sci.* 2000, **85**(1), 1-33.
125. De Graaf, A. J., Azevedo Próspero dos Santos, I. I., Pieters, E. H. E., Rijkers, D. T. S., van Nostrum, C. F., Vermonden, T., Mastrobattista, E. A micelle-shedding thermosensitive hydrogel as sustained release formulation. *Journal of Controlled Release*, 2012, **162**(3), 582–590.