

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Química Orgánica

Laboratorio de Materiales Poliméricos

Instituto de investigación y desarrollo en ingeniería de  
Procesos y Química Aplicada (IPQA – CONICET)

**SÍNTESIS DE POLÍMEROS  
DENDRONIZADOS. OBTENCIÓN DE  
MATERIALES PARA RECONOCIMIENTO  
MOLECULAR ESPECÍFICO**

TESIS DOCTORAL

Sergio David García Schejtman

Córdoba, 2018



Esta Tesis se presenta para optar al grado académico  
de Doctor en Ciencias Químicas



**Directora**

Prof. Dra. Marisa Martinelli

**Comisión Evaluadora**

Prof. Dra. Elba I. Bujan

Prof. Dra. María Cecilia Sánchez

Prof. Dr. Álvaro Jiménez Kairuz

Prof. Dr. Roque Javier Minari



**A mi amor, Yael.**

Nada de esto sería posible sin vos.



En honor a mi viejo.  
Gracias por todo, **chichito**





Soy lo que me enseñó mi padre  
El que no quiere a su patria no quiere a su madre  
Soy América Latina  
Un pueblo sin piernas pero que camina

*Calle 13. América Latina*



## AGRADECIMIENTOS

La mejor forma de empezar estos agradecimientos es, sin duda, recordando la gran oportunidad que tenemos en nuestro país de poder formarnos mediante la educación pública y gratuita. Hoy y siempre estaré más que agradecido con la Universidad Nacional de Córdoba y con la Facultad de Ciencias Químicas por hacer posible el desarrollo de mis estudios.

A mi directora de tesis, Marisa (la Mari, la Bruja o la Jefa). Me abriste un camino de posibilidades, me dejaste divagar y soñar, y me bajaste a tierra cuando era necesario. Me diste muchas herramientas y me enseñaste algo más que solo ciencia. Me escuchaste, me aconsejaste mil veces y la piloteamos juntos cuando fue necesario. Gracias a ello hoy hicimos este trabajo de Tesis. Muchas gracias por todo y ojalá que no todo termine aquí.

Ceci, la flaca, fuiste una directora más!! Estuviste siempre a mi lado y me ayudaste un montón. Muchas gracias por todo.

A los miembros de mi Comisión de Tesis, Dras. Elba Bujan y Ceci Sánchez, y al Dr. Álvaro Jiménez Kairuz, por su ayuda y aporte durante estos años y en particular, en la última etapa de escritura. Un especial saludo al Dr. Roque Minari por haber aceptado evaluar esta Tesis.

Muchas gracias a las instituciones que financiaron este trabajo de Tesis, CONICET, FONCyT y SECyT-UNC, y en especial a CONICET por la beca otorgada.

Al Laboratorio de Materiales Poliméricos (LaMaP). Un grupo muy especial, con el cual hemos compartido mucho más que mesada y seminarios. Gracias Marce, Cesar y Facu por estar siempre dispuestos a darme una mano. Gracias Miriam, a la madre superiora, por preocuparte tanto por mí y por ayudarme siempre. A todos lxs cumpas con quienes compartí estos años, Ariel, Gabi, Flor G, Agus G, Agus A, Cin, Guido, Jime, Flor T, Gas, Cata, Ale, Nana, Fer, Giuli, Mati, Mica, Esteban, Martín y Pancho.

Gracias Nana, Flor, Guido y Santi por haber compartido mesa conmigo y por aportado a este trabajo de Tesis. Ustedes son parte de esto también.

Un saludo muy grande a los miembros del Instituto de Cosas, el cual no tiene nada de académico, solo a sus integrantes: Jime, Cin y Guido, siempre fueron y siempre serán un norte para mí. Los admiro y los quiero muchísimo. Muchas gracias por todo.

Al grupo Comidas, con quienes compartimos una particular patología de desear alimentos extremadamente elaborados, luego de haber terminado de comer. ¡¡Gracias por las juntadas y los buenos momentos!!

Al Departamento de Química Orgánica y a todos sus miembros. Con café y mates de por medio, se han generado millones de charlas y gracias a eso logré aprender muchísimo.

Cats y Lurix, ¿qué decir? Todos estos años de su amistad, buenos momentos y su apoyo incondicional, me han dado las fuerzas para llegar hasta acá. Todo es más fácil a su lado. Gracias por todo, las quiero un montón.

A mis amigxs de la vida y del mundo. A esos hermanos y hermanas incondicionales que nos da la vida, con quienes uno crece, y que, sin importar el tiempo y la distancia, siempre están.

A mis padres. Ellos siempre creyeron en mí, siempre me apoyaron y me dejaron elegir mi camino. A mis hermanas y cuñados, por acompañarme y confiar en mí siempre. A mis suegros por brindarme tanto apoyo y contención, y a Consu, Pili, Maca y Facu por su cariño incondicional. Ustedes son mi familia también.

Finalmente, a Yael, mi compañera, mi amiga, mi sostén, mi aspiración a seguir y mi razón para siempre soñar. Gracias por tu compañía diaria, tu sabiduría, por compartir tu forma bella de ver al mundo, pero por sobre todas las cosas, gracias por tanto amor. Hoy el camino sigue y lo seguiremos recorriendo juntos. Quizás no sepamos hacia dónde vamos, capaz que nos terminemos perdiendo, pero el viaje junto a vos es y será lo más lindo.



2.1.1. Dendrímeros y dendrones	22
2.1.1.1. Metodologías de obtención	23
2.1.2. Efecto multivalente	25
2.2. Híbridos dendríticos: dendronización	26
2.3. Aplicaciones de estructuras dendríticas	30
2.3.1. Híbridos dendríticos utilizados como soporte	32
2.3.2. Alcances y futuras aplicaciones de híbridos dendríticos en la purificación de sustancias	33
2.4. Referencias	34

### **CAPÍTULO 3**

<b>OBJETIVOS GENERALES</b>	<b>43</b>
----------------------------	-----------

---

## **Sección II – Moléculas dendríticas**

---

### **CAPÍTULO 4**

<b>SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MOLÉCULAS DENDRÍTICAS CON DIVERSAS FUNCIONALIDADES</b>	<b>47</b>
4.1. Objetivos específicos	47
4.2. Resultados y discusión	47
4.2.1. Obtención de MDs a partir de un dendrón comercial con punto focal amino	47
4.2.1.1. Síntesis de di- <i>t</i> -butil 4-acriloilamino-4-(2- <i>t</i> -butoxicarboniletil)heptanodioato, amina de Behera acrilada (ABA)	48
4.2.1.2. Síntesis de dendrón nitro de segunda generación, NPD	50
4.2.1.3. Síntesis de dendrón amino de segunda generación, G2-NH <sub>2</sub>	52

4.2.1.4.	Síntesis de amina de Behera acrilada hidrolizada, ABAh	52
4.2.2.	Obtención de monómeros dendríticos a partir de un dendrón con punto focal isocianato	53
4.2.2.1.	Síntesis de di- <i>t</i> -butil-4-[3-( <i>t</i> -butoxi)-3-oxopropil]-4-(((2-(metacriloiloxy)etoxi)carbonil)ureido)hepanodiato (AEMA-Weis)	54
4.2.2.2.	Síntesis de di- <i>t</i> -butil-4-[3-( <i>t</i> -butoxi)-3-oxopropil]-4-(((2-(metacriloiloxy)etoxi)carbonil)amino) hepanodiato (HEMA-Weis)	57
4.3.	Conclusiones parciales	58
4.4.	Referencias	58

---

### Sección III - Polímeros dendronizados porosos

---

#### CAPÍTULO 5

#### POLÍMEROS DENDRONIZADOS MACROPOROSOS TIPO BARRAS

<b>MONOLÍTICAS</b>	<b>61</b>
5.1. Objetivos específicos	61
5.2. Resultados y discusión	61
5.2.1. Obtención de polímeros dendronizados macroporosos	62
5.2.2. Factores que determinan las características de las barras monolíticas	65
5.2.2.1. Monómero dendrítico	65
5.2.2.2. Mezcla porogénica: Solvente y agentes co-porógenos	68
5.2.2.3. Efecto de la funcionalidad y concentración de monómeros	70
5.3. Conclusiones parciales	78
5.4. Referencias	78

#### CAPÍTULO 6

#### CRIOGELES SUPERMACROPOROSOS DENDRONIZADOS OBTENIDOS

<b>MEDIANTE FOTOPOLIMERIZACIÓN</b>	<b>81</b>
------------------------------------	-----------

6.1.	Objetivos específicos	82
6.2.	Resultados y discusión	82
6.2.1.	Condiciones de polimerización. Análisis de distintas variables	84
6.2.1.1.	Efecto del tiempo de irradiación	84
6.2.1.2.	Efecto del co-monómero	85
6.2.1.3.	Incorporación del monómero dendrítico ABAh	88
6.3.	Conclusiones parciales	92
6.4.	Referencias	93

---

## Sección IV – Aplicación

---

### CAPÍTULO 7

<b>INMOVILIZACIÓN DE IONES METÁLICOS SOBRE SOPORTES</b>		<b>99</b>
7.1.	Objetivos específicos	100
7.2.	Resultados y discusión	101
7.2.1.	Inmovilización de iones Cu(II) y Zn(II)	101
7.2.1.1.	Barras monolíticas macroporosas	102
7.3.	Conclusiones parciales	106
7.4.	Referencias	106

### CAPÍTULO 8

<b>RETENCIÓN DE PROTEÍNAS: APLICACIÓN COMO SOPORTES EN CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD DE METAL INMOVILIZADO (IMAC)</b>		<b>109</b>
8.1	Objetivos específicos	112
8.2	Resultados y discusión	112
8.2.1	Selección del método de cuantificación	113
8.2.2	Retención de IgG	113
8.2.2.1.	Barras monolíticas macroporosas	114

8.2.2.2. Criogeles supermacroporosos	117
8.2.3 Retención de $\alpha_2M$	117
8.2.3.1 Metodología en <i>batch</i>	118
8.2.3.2 Metodología en flujo	118
8.3 Conclusiones parciales	120
8.4 Referencias	120

---

## Sección V – Consideraciones finales

---

### CAPÍTULO 9

<b>CONSIDERACIONES FINALES</b>	<b>127</b>
9.1. Conclusiones generales	127
9.2. Proyecciones	130
9.3. Producción científica	131

---

## Sección VI - Parte experimental

---

### CAPÍTULO 10

<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>137</b>
10.1. Materiales y equipos	137
10.1.1. Materiales	137
10.1.2. Equipamiento y metodologías de caracterización	138
10.1.2.1 Resonancia magnética nuclear (RMN)	138
10.1.2.2 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)	138
10.1.2.3 Microscopia electrónica de barrido (SEM)	138
10.1.2.4 Porosimetría por intrusión de nitrógeno	139
10.1.2.5 Análisis termogravimétrico (TGA)	139
10.1.2.6 Estudios de índice de hinchamiento	139
10.1.2.7 Determinación de porosidad ( $\Phi$ )	139

10.1.2.8	Absorción atómica (AA)	140
10.1.2.9	Espectrofotometría UV-Vis	140
10.1.2.10	Liofilizado de muestras	141
10.2.	Procedimientos	141
10.2.1.	Síntesis de estructuras dendríticas	141
10.2.1.1.	Formación de cloruro de acrililoilo, AcCl	141
10.2.1.2.	Síntesis de ABA	141
10.2.1.3.	Síntesis de NPD	142
10.2.1.4.	Síntesis de G2-NH <sub>2</sub>	142
10.2.1.5.	Síntesis de ABAh	143
10.2.1.6.	Síntesis de AEMA-Weis	143
10.2.1.7.	Síntesis de HEMA-Weis	144
10.2.2.	Obtención de barras monolíticas macroporosas	144
10.2.2.1.	Síntesis de barras monolíticas	144
10.2.2.2.	Determinación de tamaños de poros	145
10.2.3.	Obtención de criogeles supermacroporosos	145
10.2.3.1.	Síntesis de criogeles supermacroporosos	145
10.2.3.2.	Determinación de tamaños de poros	146
10.2.4.	Inmovilización de iones metálicos	146
10.2.5.	Estudio de adsorción de proteínas	147
10.2.5.1.	Adsorción y Cuantificación de IgG	147
10.2.5.2.	Adsorción y Cuantificación de $\alpha$ 2M	148
10.2.5.2.1.	Metodología en <i>batch</i>	148
10.2.5.2.2.	Metodología en flujo	148
10.3.	Referencias	149

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>AA</b>	Absorción atómica
<b>AAc</b>	Ácido acrílico
<b>AAc-ABA-BIS</b>	Polímero basado en AAc, ABA y BIS
<b>AAc-BIS</b>	Polímero basado en AAc y BIS
<b>AAM</b>	Acilamida
<b>AAM-ABA-BIS</b>	Polímero basado en AAM, ABA y BIS
<b>AAM-BIS</b>	Polímero basado en AAM y BIS
<b>AB</b>	Amina de Behera
<b>ABA</b>	Amina de Behera acrilada
<b>ABA-BIS</b>	Polímero basado en ABA y BIS
<b>ABAh</b>	Amina de Behera acrilada hidrolizada
<b>AC</b>	Cromatografía de afinidad
<b>AcCl</b>	Cloruro de aciloilo
<b>AEC</b>	Cromatografía de intercambio aniónico
<b>AEMA</b>	2-aminoetil metacrilato
<b>AEMA-Weis</b>	Dendron basado en AEMA y Weis
<b>AIBN</b>	2,2'-Azobis(2-metilpropionitrilo)
<b>ATRP</b>	Polimerización radicalaria por transferencia electrónica
<b>BDDE</b>	1,4-butanodiolglicidil éter
<b>BET</b>	Área Brunauer-Emmet-Teller
<b>bFGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblasto
<b>BIS</b>	<i>N,N'</i> -metilenbisacrilamida
<b>Boltorn H30</b>	Poliéster hiperramificado de ácido 2,2-bis(hidroximetil) propiónico
<b>CQ</b>	Canforquinona
<b>CSP</b>	Fase estacionaria quirál
<b>DMA</b>	Dimetilformamida
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DVB</b>	Divinil benceno
<b>EDMAB</b>	4-(dimetilamino)benzoato
<b>EDTA</b>	Etilendiamina tetraacético
<b>EGDMA</b>	Etilenglicol dimetacrilato
<b>Et<sub>3</sub>N</b>	Trietil amina
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>G</b>	Generación dendrítica

<b>G2-NH<sub>2</sub></b>	Dendrón amino de segunda generación
<b>GLU</b>	Glucosa
<b>GMA</b>	Glicidil metacrilato
<b>HEMA</b>	2-hidroxietil metacrilato
<b>HEMA-Weis</b>	Dendron basado en HEMA y Weis
<b>HILIC</b>	Cromatografía líquida de interacciones hidrofílicas
<b>IDA</b>	Ácido iminodiacético
<b>IEC</b>	Cromatografía por intercambio iónico
<b>IEX</b>	Intercambio iónico
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IL-1b</b>	Interleucina-1b
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IMAC</b>	Cromatografía de afinidad de metal inmovilizado
<b>K<sub>a</sub></b>	Constante de asociación
<b>LOD</b>	Límite de detección
<b>LOQ</b>	Límite de cuantificación
<b>MD</b>	Macromonomero dendrítico
<b>Me</b>	Ion metálico
<b>MEHQ</b>	Metil hidroquinona
<b>M<sub>n</sub></b>	Peso molecular promedio
<b>NAT</b>	<i>N</i> -tris(hidroximetil)metilacrilamida
<b>NAT-ABA-BIS</b>	Polímero basado en NAT, ABA y BIS
<b>NAT-BIS</b>	Polímero basado en NAT y BIS
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento nervioso
<b>NPD</b>	Dendrón nitro de segunda generación
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poli(acrilamida)
<b>PAMAM</b>	Dendrímero poliamidoamina
<b>Pd/C</b>	Catalizador de paladio sobre carbono
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento de plaquetas
<b>PdI</b>	Índice de polidispersidad
<b>PEEK</b>	Poliéter éter cetona
<b>PEG6000</b>	Polietilenglicol (M <sub>n</sub> = 6000)
<b>PEGDMA</b>	Polietilenglicol dimetacrilato
<b>PEI</b>	Dendrímero polietilenimina
<b>PGd</b>	Poliglicerol dendrítico
<b>Phe</b>	1,10-fenantrolina

<b>PPI-G4</b>	Dendrímero de polipropilenimina de generación 4
<b>RPC</b>	Cromatografía de Fase Reversa
<b>SEC</b>	Cromatografía de exclusión por tamaño
<b>SEM</b>	Microscopia electrónica de barrido
<b>St</b>	Estireno
<b>TGA</b>	Análisis termogravimétrico
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano
<b>TMG</b>	Tetrametil guanidina
<b>UF</b>	Urea formaldehído
<b>UFLMP</b>	Microfase líquida no congelada
<b>Weis</b>	Di- <i>t</i> -butil-4-[2-( <i>t</i> -butoxicarbonil)etil]-4-isocianato-1,7-heptanodicarboxilato, Weisocianato
<b>α<sub>2</sub>M</b>	Alfa-2-macroglobulina



## RESUMEN

Uno de los desafíos más importantes en la ciencia de los materiales poliméricos es generar estructuras capaces de cumplir funciones específicas. Para ello, el diseño, la síntesis e ingeniería de estos materiales busca inspirarse en la naturaleza misma, lo que requiere de un estricto control de sus propiedades. La Cromatografía de Afinidad (AC) es uno de los métodos de separación más poderosos utilizados en la purificación de biomoléculas debido a la capacidad de generar interacciones específicas. El desafío en los materiales para soportes en AC consiste en obtener un sistema con buenas propiedades de transporte de masa, lo cual se genera mediante materiales altamente porosos, y además con capacidad de interactuar específicamente con una biomolécula de interés.

En línea con esto, las moléculas dendríticas constituyen una alternativa prometedora en cuanto a la separación de biomoléculas. Esto es debido a la gran densidad de grupos funcionales presentes, capaces de generar interacciones multivalentes. Además, la dendronización permite modificar polímeros convencionales, para lograr materiales híbridos con propiedades dendríticas en toda la red polimérica.

En este contexto, se ubica el trabajo de Tesis Doctoral, titulado: **SÍNTESIS DE POLÍMEROS DENDRONIZADOS. OBTENCIÓN DE MATERIALES PARA RECONOCIMIENTO MOLECULAR ESPECÍFICO**. El mismo, se enfocó en la búsqueda de nuevos materiales porosos para su posterior aplicación como soportes en Cromatografía de Afinidad, preparados a partir de diferentes monómeros clásicos y estructuras dendríticas, que le aportarían nuevas propiedades (multifuncionalidad) al material final para favorecer interacciones biospecíficas del soporte.

Los materiales obtenidos se basaron en dos tipos de sistemas porosos: a) barras monolíticas macroporosas, obtenidas por polimerización en solución con solventes orgánicos, a partir de diferentes monómeros convencionales y un monómero dendrítico; b) criogeles supermacroporosos obtenidos por polimerización en soluciones acuosas e iniciada fotoquímicamente. En ambos materiales la dendronización fue eficiente, lográndose sinergismo entre las propiedades aportadas por cada tipo de monómero utilizado, lo que dio como resultado un material con potenciales aplicaciones como soporte.

El trabajo de investigación fue desarrollado en diferentes etapas. En primera instancia, se realizó la síntesis y caracterización de nuevos macromonómeros dendríticos (MD), es decir, moléculas dendríticas de diferente generación, capaces de polimerizar mediante polimerización radicalaria, con diversas funcionalidades en la

periferia (grupos amino, ácido o *t*-butilo). En una segunda etapa, se planteó el diseño, preparación y caracterización de los materiales macroporosos combinando monómeros clásicos, como acrilamida (AAM), ácido acrílico (AAc) y *N*-tris(hidroximetil) metilacrilamida (NAT), con las estructuras dendríticas previamente sintetizadas. Posteriormente, estos materiales dendronizados fueron empleados como soportes para la inmovilización de iones metálicos como ligandos específicos, tales como Cu(II) y Zn(II), para llevar a cabo finalmente el estudio de adsorción de diferentes proteínas séricas (Inmunoglobulina G y alfa-2-macroglobulina).

El desarrollo de esta Tesis Doctoral destaca la importancia del diseño sintético de nuevos materiales y la capacidad de las estructuras dendríticas para gobernar las interacciones específicas. El trabajo presentado ha sido posible gracias a la labor interdisciplinaria y al aporte realizado por investigadores de distintas áreas. Debido a la relevancia de los resultados, se esperan desarrollos futuros en trabajos multidisciplinarios que posibiliten finalmente, la transferencia al sector productivo.

## ABSTRACT

Polymer science has a prominent role in different areas and various identified challenges. These challenges include both specific properties and functions of polymers. The design, synthesis and engineering of the materials requires a great control of their properties, being many of them inspired by nature.

Affinity chromatography (AC) is one of the most powerful separation methods used in the purification of biomolecules due to the ability to generate specific interactions. The challenge is to yield a system with good mass transport properties and with ability to interact specifically with a biomolecule. The highly porous materials are the major alternative.

Furthermore, dendritic molecules are hyperramified structures with high density of functional groups and they are a promising alternative to form part of a support for AC, due to its capacity for multivalent interactions. In addition, the dendronization of conventional polymers generates hybrid materials which have the dendritic properties throughout the network.

In this context, the present Thesis entitled: ***SYNTHESIS OF DENDRONIZED POLYMERS. OBTAINING MATERIALS FOR SPECIFIC MOLECULAR RECOGNITION*** was developed. The goal of this work was to rationally design dendritic polymer-based monoliths that can be used as affinity chromatography supports. Thus, the monoliths could show optimal selectivity and affinity constant to the ligands, due to the cooperative effect of the dendritic moiety.

These materials constitute novel and alternative dendritic-based hybrid polymers that synergistically combine the benefits and properties of macroporous polymer monoliths and hyperbranched molecules. The yielded materials were based on two types of porous systems: a) macroporous monoliths by polymerization in organic medium; b) supermacroporous cryogels by polymerization in aqueous solutions and photochemical initiated. Both systems were obtained from dendritic and classical monomers. In all cases, the dendronization process was efficient and some of the materials resulted with potential application as supports.

Initially, a dendritic macromonomer (DM) from a commercial dendron was synthesized and characterized. The DM with different functional groups in the periphery (amino, acid or *t*-butyl) and of different generation, was polymerized in conditions of radical polymerization. Then, macroporous polymers (monoliths) were synthesized and

characterized. Classical monomers, such as acrylamide (AAm), acrylic acid (AAc) and *N*-tris (hydroxymethyl) methylacrylamide (NAT), and MD were combined. Finally, these dendronized materials were tested as supports of immobilized-metal affinity chromatography (IMAC). Metal ions ( $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ ) were chelated on the matrix to evaluate the adsorption of the serum proteins (immunoglobulin G and alpha-2-macroglobulin).

The development of the Thesis highlights the importance of the synthetic design of new materials and the promising characteristics of dendritic structures with respect to specific interactions.

The highlights of the Thesis were the synthetic design of new dendronized materials as support of AC where MD governed the specific interactions. The interdisciplinary work and the collaboration between investigators of different areas, allowed the developed of the research. Due to the relevance of the results, future researches are expected to allow the transference to the productive sector.



# SECCIÓN I

---

## Introducción y objetivos generales



# CAPÍTULO 1

## POLÍMEROS MACROPOROSOS COMO SOPORTES PARA SU APLICACIÓN EN CROMATOGRAFÍA

### 1.1. Conceptos generales

Los avances en los últimos años referidos a la síntesis en fase sólida, catálisis y distintos tipos de metodologías de extracción y/o separación, han despertado el interés en cuanto al desarrollo de nuevos materiales poliméricos para ser utilizados como soportes. Precisamente, en los últimos 60 años los materiales poliméricos utilizados como soportes, han pasado de ser simples cadenas poliméricas tridimensionales [1] a productos con un control estricto de las propiedades del soporte, tanto químicas como morfológicas [2].

Los primeros materiales poliméricos utilizados efectivamente consistían en polímeros entrecruzados covalentemente que formaban redes tridimensionales, con un bajo grado de entrecruzamiento. Esto permitía la solvatación del material en contacto con un solvente o solventes específicos (dependiendo de las características polares o apolares de la red), generando así la expansión de las cadenas del polímero (hinchamiento) [3]. En consecuencia, los poros se forman a partir de la interacción de las cadenas con el solvente, por lo que dichos materiales no presentaban una porosidad al menos que se encuentren en estado hinchado, lo cual significa que la porosidad es temporal, debido a que las cadenas podían colapsar en ausencia del agente solvatante. Estos polímeros hinchables son generalmente fáciles de deformar bajo presión, lo que en esencia limita su posible utilización en ciertas aplicaciones que involucran flujo continuo.

Los polímeros macroporosos, en cambio, son estructuras que se caracterizan por una porosidad permanente, formada durante la preparación del material, que se mantiene incluso en estado seco. Su estructura interna consiste en agregados de microglóbulos de polímeros interconectados por poros y su rigidez se debe al alto grado de entrecruzamiento. Si bien dichos materiales pueden ser preparados por diferentes vías de polimerización [4], la mezcla de reacción siempre debe poseer al menos un monómero entrecruzante en altas concentraciones y un solvente inerte (cuya función es la formación de poros) o mezcla porogénica [5,6]. En este sentido, la presencia del solvente inerte es de vital importancia en la preparación de polímeros macroporosos, los cuales pueden consistir en solventes o no solventes, siendo estos últimos aquellos

que no solvaten las cadenas en formación; además, solventes en estado supercrítico (como el dióxido de carbono supercrítico), moléculas o polímeros lineales que sean líquidos a la temperatura de trabajo (generalmente alcoholes lineales solubles), o bien una combinación de los anteriormente mencionados.

A modo simplificado, los materiales macroporosos utilizados como soportes se pueden clasificar en dos grandes familias: (i) polímeros macroporosos tipo esferas (*beads*), los cuales son obtenidos a partir de una polimerización en suspensión, o bien (ii) polímeros macroporosos tipo barras monolíticas a partir de una solución, los cuales se desarrollarán en detalle en este capítulo.

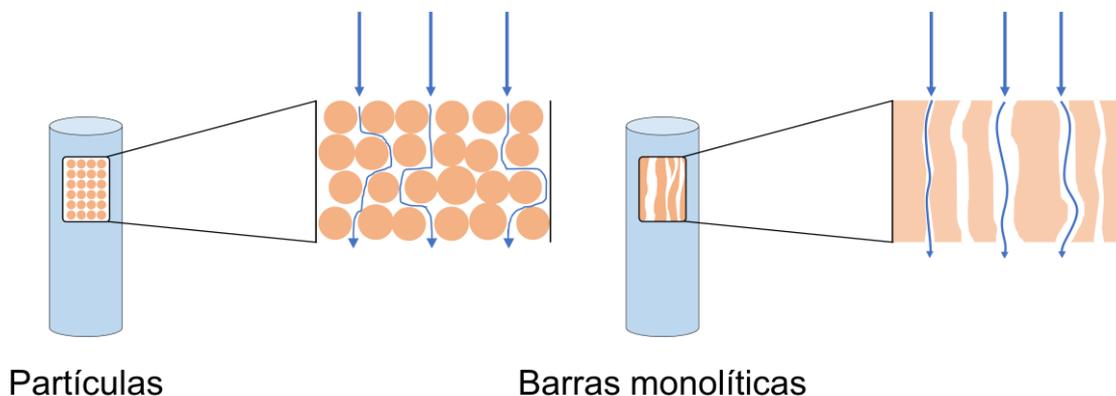
## 1.2. Polímeros macroporosos tipo barras monolíticas

### 1.2.1. Partículas vs. barras monolíticas

Actualmente, se distribuyen de manera comercial distintos tipos de materiales particulados porosos para ser utilizados como rellenos de columnas empaquetadas y aplicadas en diferentes procesos, tanto de extracción/purificación como en soportes catalíticos, entre otros, de composición química, tamaño de partícula y porosidad variable. Más allá de las ventajas que poseen dichos soportes, existen principalmente dos limitaciones muy importantes: (i) el gran volumen interpartícula y (ii) la lenta difusión de solutos de alto peso molecular dentro de los poros de las partículas. Efectivamente, este último genera un inconveniente muy importante en procesos cromatográficos, en donde la velocidad de la transferencia de masa es la variable determinante de la velocidad del proceso global. Esto puede explicarse en función del movimiento de solutos a través de la columna empaquetada, donde solutos de bajo peso molecular son capaces de moverse relativamente rápido, mientras que aquellos de alto peso molecular (proteínas o polisacáridos por ejemplo) se mueven más lento presentando coeficientes de difusión mucho menores [7].

A principios de la década del 90 se comenzaron a desarrollar distintos sistemas poliméricos continuos en donde se lograba optimizar el flujo a través de los espacios interpartícula. Estos materiales consistieron en barras monolíticas porosas [8] y la principal ventaja que tienen es la de incrementar la transferencia de masa por un transporte convectivo, ya que en este caso la fase móvil es forzada a atravesar por todo el medio de separación, a diferencia de lo que ocurre en los soportes particulados en donde lo hace preferentemente por los espacios interpartículas (Fig. 1.1). Como su nombre lo indica, los polímeros porosos tipo barras monolíticas (*monoliths*) consisten fundamentalmente en materiales (orgánicos) entrecruzados, y que califican dentro de la

categoría de materiales blandos. Además, los poros se pueden clasificar en función de su tamaño, donde los poros formados en las diferentes escalas se pueden distinguir en (i) microporos (<2 nm), (ii) mesoporos (entre 2 y 50 nm) y (iii) macroporos (>50 nm) [9]. Es importante destacar que formación y tamaño depende de distintos factores, que serán descritos a continuación.



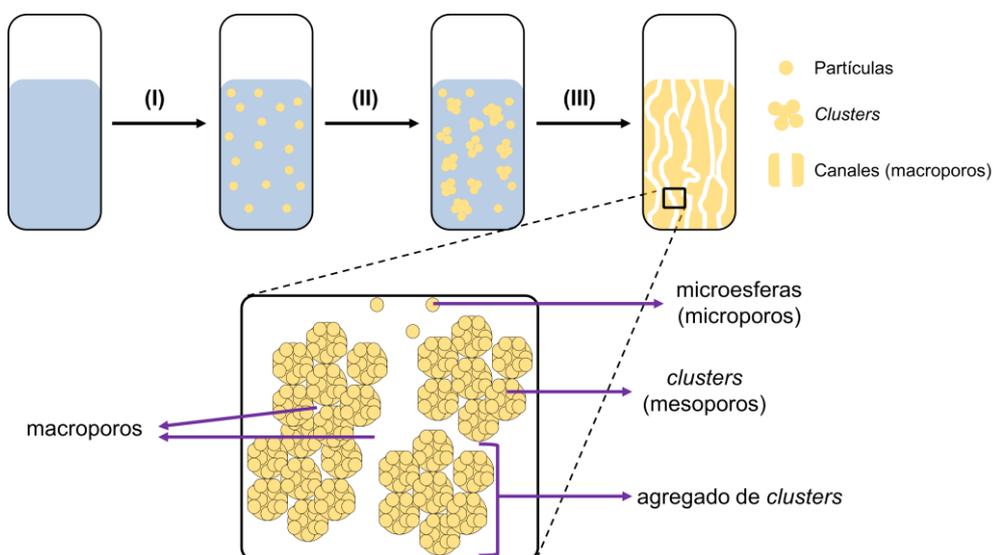
**Fig. 1.1.** Representación del comportamiento de un fluido a través de dos tipos de estructuras macroporosas.

### 1.2.2. Síntesis y mecanismo de obtención

Con respecto a la vía sintética, es evidente la ventaja de las barras monolíticas en relación con la obtención de los polímeros porosos tipo partículas, ya que las barras pueden obtenerse mediante una polimerización radicalaria en solución, es decir, a partir de una solución que contenga los monómeros, el iniciador radicalario y la combinación de solventes y agentes porógenos. Los monómeros seleccionados consisten en uno o más monómeros vinílicos y monómeros polifuncionales (dos o más grupos vinílicos) que actúan como agente entrecruzante. Generalmente, las reacciones ocurren por un incremento de la temperatura la cual descompone al iniciador radicalario y genera radicales libres que dan lugar a la polimerización, por lo que es común utilizar diferentes iniciadores térmicos y temperaturas entre 50-80 °C [10–12]. No obstante, existen otras metodologías de polimerización que involucran iniciadores por reacciones de óxido-reducción [13,14], por radiación UV [15,16] o incluso por polimerización radicalaria por transferencia electrónica (ATRP) [17,18], que se utilizan para la obtención de polímeros macroporosos tipo barras monolíticas. Las reacciones de obtención de estos polímeros macroporosos continuos se realizan utilizando distintos moldes de reacción (los cuales determinarán la forma final del material) en ausencia de agitación mecánica. Los moldes de reacción generalmente consisten en tubos de vidrio, acero inoxidable, poliéter éter

cetona (PEEK), polipropileno, o sílica, los cuales son llenados con la mezcla de reacción. Dicho molde es luego llevado a la temperatura de reacción correspondiente.

El mecanismo generalmente aceptado para la formación de poros durante una reacción de polimerización en solución, en presencia de solvente/s inerte/s se muestra en la Fig 1.2 [19].



**Fig. 1.2.** Esquema del mecanismo de reacción de barras monolíticas macroporosas, donde (I) corresponde a la formación de las cadenas poliméricas, (II) separación de fase y formación de *clusters*, (III) formación de la matriz interconectada.

La fase orgánica, en un principio, contiene los monómeros, agentes porogénicos y el iniciador radicalario el cual descompone térmicamente. Las cadenas poliméricas en formación precipitan a medida que se vuelven insolubles en el medio de reacción (esta etapa de la reacción de polimerización es determinante en la formación de poros del material). En este estadio, el monómero resulta termodinámicamente mejor solvente de las cadenas que el solvente o mezcla porogénica misma. Entonces, los núcleos o micropartículas precipitadas son principalmente solvatadas por el monómero presente. Subsecuentemente, la reacción continúa en (a) la solución, o bien (b) dentro de los núcleos hinchados en monómeros; no obstante, la polimerización (b) es cinéticamente más favorable debido a la alta concentración local de monómeros dentro de los núcleos, a diferencia de la solución (a) [20]. Además, aquellas cadenas poliméricas formadas en solución son atrapadas por los núcleos formados, incrementando su tamaño. La naturaleza entrecruzada de los núcleos previene la posible penetración entre ellos, pero sí se generan asociaciones de los mismos a través de cadenas que los entrecruzan, formando *clusters* de gran tamaño. En los últimos estadios de polimerización, el tamaño

de los *clusters* es suficientemente grande como para permitir el contacto entre varios de sus vecinos, formando finalmente una matriz interconectada a través de todo el sistema, mediante cadenas poliméricas que aún siguen reaccionando, generando un crecimiento interglobular.

Con respecto al polímero obtenido, se pueden distinguir ciertos aspectos en cuanto a las propiedades porosas: por un lado, la fracción de poros (porosidad) resulta ser similar a la fracción del volumen de solvente utilizado en la mezcla inicial de polimerización, mientras que el o los porógenos permanecen atrapados dentro de los poros del polímero. Por otro lado, los poros formados en las diferentes escalas se pueden distinguir en microporos correspondientes a los lugares generados por el entrecruzamiento de las cadenas, los mesoporos generados durante la asociación de los núcleos en *clusters*, y por último los macroporos los cuales resultan de los espacios vacíos que existen entre los *clusters* dentro de la red polimérica.

Debido a que la separación de fase es determinante de la estructura final del material, la elección de los parámetros de reacción que afecten a dicha separación será de suma importancia. Ciertas condiciones experimentales utilizadas, tales como temperatura de reacción, o tipo y proporción de la mezcla porogénica, modifican diversas características porosas (tamaño y volumen de poro, y superficie específica) en hasta incluso varios órdenes de magnitud.

#### 1.2.2.1. Efecto de la temperatura de reacción

La temperatura es una variable por considerar, ya que puede determinar la distribución de los tamaños de poro sin necesidad de cambiar la composición de la mezcla de reacción. Generalmente, a mayor temperatura, menor es el tamaño de poro del polímero obtenido [21]. A mayor temperatura de reacción, se incrementa el número de radicales libres generados (por unidad de tiempo), por lo que mayor será el número de núcleos y microsferas formados, lo que necesariamente disminuye sus tamaños y también el espacio entre ellos. Contrariamente, si la temperatura es baja, la velocidad de polimerización es lenta y da lugar a una transferencia eficiente de los monómeros desde la solución hacia los núcleos ya formados, lo que genera un mayor crecimiento de dichos núcleos y un aumento de la distribución de tamaños de poros. En este punto, es importante considerar la temperatura necesaria para una reacción radicalaria iniciada térmicamente – si así fuese el caso – es decir, seleccionar criteriosamente el iniciador radicalario. Utilizando otra metodología de iniciación es mucho más factible variar la temperatura en un mayor rango y generar un mayor efecto en los tamaños de poro del material.

### 1.2.2.2. Efecto de la mezcla porogénica: solvente y agente/s co-porógeno/s

En este tipo de reacciones se pueden distinguir tres clases de solventes: buenos solventes, malos solventes y polímeros lineales. Esto significa que se pueden obtener una gran diversidad de mezclas porogénicas que, según su tipo y proporciones de componentes, permiten controlar las propiedades de los sistemas producidos. Por ejemplo, si se busca obtener un sistema basado en acrilamidas, la mayoría de estos monómeros son cristalinos; por lo tanto, el uso de solventes se restringe a aquellos capaces de disolver a sus monómeros en las concentraciones deseadas, a una temperatura en la cual la polimerización no ocurra. Si bien acrilamida (AAm) se disuelve en diversos tipos de solventes, el monómero *N,N'*-metilenbisacrilamida (BIS) utilizado como entrecruzante, posee una solubilidad muy baja en solventes polares (0,8 g/100 mL en H<sub>2</sub>O). Xie y colaboradores [22] realizaron un estudio detallado sobre la disolución de BIS en distintos solventes, incluyendo etanol, 2-propanol, butanol, ciclohexanol, ácido acético, acetona, dioxano, tetrahidrofurano (THF), acetato de etilo, acetonitrilo, dimetilformamida (DMA) y dimetilsulfóxido (DMSO), observando que el DMSO fue el mejor solvente para BIS a 50 °C. Sin embargo, la obtención de un sistema AAm-BIS (70:30) en DMSO formó preferentemente barras monolíticas macroporosas con poros cercanos a 100 nm [21], lo cual coincide además con estudios previos sobre polimerizaciones de acrilamidas *N*-sustituídas y metacrilamidas.

Por otra parte, varios autores desarrollaron estudios sobre la combinación de diferentes clases de solventes, observando una mejora en las propiedades porosas. Por ejemplo, Arrua y colaboradores [23] prepararon barras monolíticas de *N*-tris(hidroximetil)metilacrilamida (NAT) y BIS utilizando distintas mezclas porogénicas, y demostraron que la mayor porosidad y tamaños de poro se formaron cuando se utilizó una combinación de DMSO y tetradecanol:polietilenglicol 6000 en relación 1:1. Cuando se utilizan alcoholes como agentes porógenos, el largo de la cadena alquílica es de gran importancia. Si los alcoholes son de cadena corta, la polaridad dentro de los núcleos en formación y en la solución es semejante. De esta manera, los monómeros no son forzados a ingresar en los núcleos y la polimerización ocurre a través de la formación de pequeños núcleos individualizados. Una vez que se agregan, forman un gran número de pequeños microglóbulos, lo que se puede entender como un producto de polimerización con características poco porosas. En contraste, si se disminuye la solubilidad de la cadena polimérica en formación empleando un alcohol de cadena larga, se favorecerá la separación (nucleación) en estadios más tempranos. Entonces, cuando la cadena alquílica del alcohol utilizado es mayor, será también mayor la diferencia de

polaridad entre la solución y el polímero formado, y esta separación de fase será temprana.

### 1.3. Criogeles supermacroporosos

Los polímeros tipo geles han sido estudiados desde hace más de 60 años, como materiales para la separación de biomoléculas. Los mismos consisten en redes poliméricas tridimensionales, es decir, cadenas poliméricas con puntos de entrecruzamiento. Durante este período, el avance de la ciencia se encargó de producir nuevos tipos de geles que minimizarán los problemas y ampliarán las alternativas de uso. Particularmente, los hidrogeles son geles con un alto contenido de agua en su interior; si un hidrogel es sintetizado a temperaturas por debajo de la temperatura de fusión del solvente, entonces se obtiene lo que se define como criogel. En esencia, los criogeles son sistemas obtenidos bajo un tratamiento criogénico, es decir, por debajo del punto de fusión del solvente o mezcla de solventes utilizados. Esto es de gran importancia debido a que las propiedades finales del material cambian significativamente, tal como se discutió en el efecto de la temperatura sobre las propiedades del material final. Variaciones en las propiedades estructurales del criogel, como la distribución de tamaños de poro y el espesor de las paredes del polímero son posibles gracias al cambio en las condiciones de reacción: relación de solvente/co-solvente, fuerza iónica, pH, temperatura de reacción (definida comúnmente como temperatura de congelamiento), velocidad de enfriamiento, gradiente de temperatura, concentración de solutos, entre otros factores [24].

Como ya se mencionó anteriormente, un polímero macroporoso es aquel que posee una estructura con poros entre 50 nm y 1  $\mu\text{m}$ . No obstante, el reciente interés por estructuras con mayores tamaños de poro obligó a definir el concepto de “polímeros supermacroporosos” como aquellos polímeros con tamaños de poro superiores a 1  $\mu\text{m}$  y hasta incluso superiores a 100 – 200  $\mu\text{m}$ , dependiendo de los autores [24–27]. De manera simplificada, se puede decir que el gran interés por los criogeles en el área biotecnológica se debe principalmente a su estructura supermacroporosa, permitiendo así un transporte de masa efectivo, alta biocompatibilidad y buenas propiedades mecánicas [27].

Para realizar la síntesis de estos criogeles, generalmente se utilizan soluciones o dispersiones dependiendo de la polaridad de los monómeros, con los precursores adecuados para cada caso. En una primera etapa, la solución/dispersión se somete a bajas temperaturas, donde provoca la solidificación y formación de cristales del solvente (o sistema de solventes) utilizado. Debido a que ocurre una polimerización en

condiciones criogénicas (criogelación), la morfología obtenida en el producto final es significativamente diferente a un gel obtenido en condiciones de gelación, tanto en condiciones ambientales como procesos de gelación a bajas temperaturas [28].

### 1.3.1. Mecanismo de obtención de criogeles

Generalmente, las criogelaciones ocurren entre  $-10$  y  $-30$  °C. Varios autores han demostrado que en soluciones congeladas a dichas temperaturas, parte del solvente mantiene su estado líquido (lo que se conoce como microfase líquida no congelada, o UFLMP por sus siglas en inglés) [29–31]; cuando la solución que contiene a los monómeros e iniciador está congelada, las moléculas de soluto son expulsadas de los cristales de solvente en formación y son concentradas en la microfase no congelada (crio-concentración) [32], permitiendo así reacciones químicas quizás no esperables a bajas temperaturas, aun cuando toda la muestra pareciera ser un bloque sólido. Es posible entonces distinguir en el sistema dos fases: el solvente policristalino congelado y la microfase líquida, conteniendo esta última a todos los componentes disueltos de la solución original [27]. Los cristales del solvente actúan como formadores de poro (porógeno) y, durante el congelamiento, estos cristales crecen y se unen para dar finalmente canales interconectados. No obstante, el tamaño y la forma de los poros (y el volumen de la UFLMP) dependerá de varios factores, entre ellos la concentración y naturaleza del iniciador y monómero/s, naturaleza del solvente, tipo de tratamiento criogénico (temperatura final, gradiente, etc), entre otros [33]. Al descongelar el sistema en el polímero formado, se obtienen grandes canales (supermacroporos) donde antes ocuparon el espacio los cristales de solvente. La Fig. 1.3 muestra la representación de la formación de un criogel, obtenido a partir de una solución acuosa.

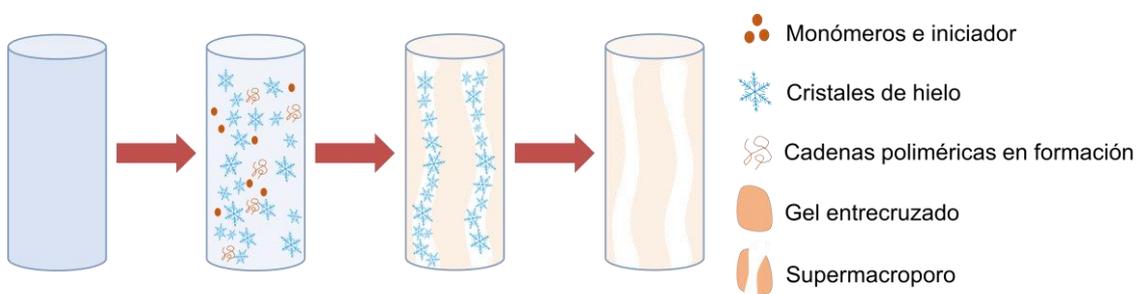


Fig. 1.3. Esquema de obtención de criogeles supermacroporosos.

#### 1.4. Aplicaciones de barras monolíticas en metodologías de separación

El potencial uso de polímeros tipo barras monolíticas como materiales en metodologías de separación ha sido estudiado por mucho tiempo. Diferentes materiales con determinadas propiedades, de acuerdo con su aplicación específica, han sido desarrollados. Esto ha permitido el estudio de un amplio espectro de metodologías de separación de moléculas y además diferentes modos de interacción cromatográfica, como fase reversa (RPC), interacciones hidrofóbicas, hidrofílicas (HILIC), cromatografía por intercambio iónico (IEC) o bien, cromatografía de afinidad (AC) [34].

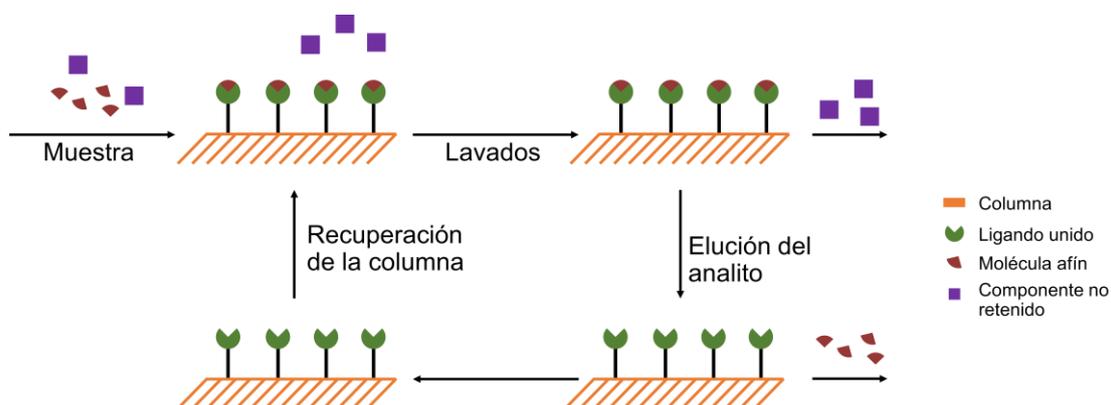
Actualmente, y a pesar de que el uso de polímeros tipo barras monolíticas en cromatografía se encuentra bien establecido, es comúnmente aceptado que una fase estacionaria basada en sílice posee una alta eficiencia de separación de moléculas pequeñas, tanto en modos de elución isocráticos (en equilibrio) como en gradientes (no-equilibrio). Sin embargo, la mayoría de los polímeros macroporosos tipo *monoliths* juegan un papel crucial en la separación de biomoléculas de alto peso molecular (principalmente proteínas) [35]. Se sabe que hay una gran dependencia entre la retención/elución de biomoléculas con la composición de la fase móvil [36], por lo que generalmente las separaciones de dichos analitos se realizan por medio de gradientes de elución.

##### 1.4.1. Principios de la cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad es una metodología muy importante al momento de separar y analizar compuestos específicos desde muestras complejas, o bien para profundizar en el estudio de interacciones biológicas [37]. La AC es un tipo de cromatografía líquida que aprovecha la capacidad de sistemas biológicos de producir interacciones selectivas y reversibles, como por ejemplo las uniones de un anticuerpo con un antígeno o el acoplamiento de una enzima a un sustrato. Básicamente, esta metodología utiliza dichas interacciones tomando a una de las partes implicadas en el enlace dentro de la columna (fase estacionaria) y aplicando en la fase móvil la parte complementaria (analito de interés) [38]. Además, los experimentos pueden orientarse a la obtención de información más detallada relacionada con la estequiometría, termodinámica, y estudios de cinética de interacción entre analito-agente inmovilizado [39]. Estas propiedades hacen de la AC una metodología muy popular en cuanto a la separación de proteínas, enzimas y anticuerpos, aplicada en diferentes campos de la ciencia y la tecnología, tales como la química, bioquímica, biología molecular, farmacia,

biotecnología, análisis medioambientales y biofísica [34,37–39], así como sectores productivos a los que estos tienen alcance.

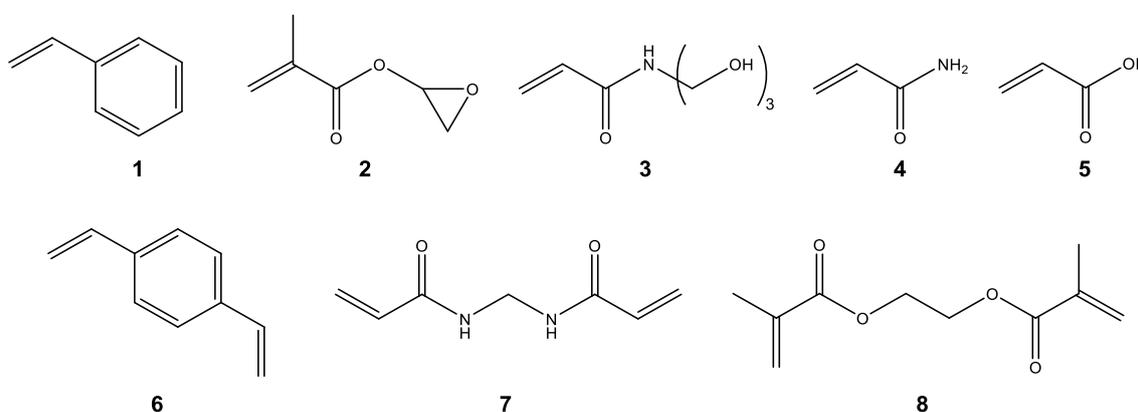
La Fig. 1.4 ilustra el formato de la aplicación de una muestra y su elución que generalmente se lleva a cabo en una cromatografía de afinidad. Este método, al cual frecuentemente se lo denomina modo “encendido/apagado” en AC, involucra a más de una fase móvil (por ejemplo, un buffer de cargado y un buffer de elución) para unir y separar el analito de interés de otros componentes de la mezcla. De esta manera, un analito contenido en una muestra determinada es inyectada dentro de la columna-agente inmovilizado, en presencia de un buffer de aplicación, el cual posee un valor de pH y fuerza iónica determinado para promover la unión [37]. Durante la etapa de cargado de la fase móvil, el analito comienza a interactuar con el agente inmovilizado sobre la columna, mientras que los otros componentes de la muestra tenderán a lavarse (componentes no retenidos). Luego de que estos últimos han sido eliminados de la columna, una segunda fase móvil conocida como “buffer de elución” es utilizado para liberar al analito retenido – romper la interacción entre analito y columna – donde este buffer se diferencia del anterior por un valor de pH o de fuerza iónica diferente, o bien puede contener un agente que compita con los centros de unión de la columna; a partir de este punto, el analito que finalmente eluyó de la columna puede ser recolectado o ingresado a través de un detector para análisis. Por último, la columna puede ser regenerada a partir del buffer inicial, lo que permite su reutilización [40].



**Fig. 1.4.** Funcionamiento de una columna de cromatografía de afinidad.

A partir de lo mencionado anteriormente, se puede comprender que tanto la naturaleza y las propiedades de la columna, como el agente inmovilizado (ligando específico) son factores de gran importancia a la hora de un mejor desarrollo de una AC. En cuanto a la columna – y enfocándose sólo en polímeros macroporosos – existe un gran número de monómeros que pueden ser utilizados para la obtención del material

final, permitiendo así variar la naturaleza química del *monolith*. Generalmente, se obtienen barras monolíticas basadas en acrilamidas, metacrilatos o bien estirenos. Algunos monómeros convencionales utilizados se muestran en la Fig. 1.5. No obstante, la funcionalización del material es muy importante al momento de su utilización en AC. El grupo funcional presente luego servirá para la inmovilización del ligando, y es por esta razón que la elección de los monómeros es un factor fundamental en la obtención de este tipo de soportes. Para ello, existen diferentes vías de funcionalización: (1) la incorporación de la funcionalidad final en el monómero y/o post-modificación química (activación, derivatización, etc.) de un grupo funcional del polímero para que interactúe con el ligando [41,42]; (2) un injerto superficial el cual incrementa el número de sitios activos en el soporte [43]; y (3) la síntesis de materiales conocidos como *imprinted* [44].



**Fig. 1.5.** Monómeros convencionales: (1) estireno (St), (2) glicidil metacrilato (GMA), (3) NAT, (4) AAm y (5) ácido acrílico (AAc); entrecruzantes convencionales: (6) divinil benceno (DVB), (7) BIS y (8) etilenglicol dimetacrilato (EGDMA).

Con respecto al ligando específico, en AC generalmente se utilizan tanto aquellos derivados de fuentes biológicas (anticuerpos, enzimas, proteínas y lectinas) como otros denominados sintéticos (quelatos de metales y tintes biomiméticos) [45]. El tipo de ligando entonces permite dividir a la cromatografía de afinidad en distintas subcategorías: cromatografía de bioafinidad, cromatografía de inmuoafinidad y cromatografía de metal inmovilizado (IMAC). Con respecto al IMAC, se desarrollará con más profundidad durante este trabajo de tesis (ver *Sección IV – Aplicación*).

## 1.5. Referencias

- [1] R.B. Merrifield, Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 2149–2154.
- [2] C. Acquah, C.K.S. Moy, M.K. Danquah, C.M. Ongkudon, Development and characteristics of polymer monoliths for advanced LC bioscreening applications: A review, *J. Chromatogr. B.* 1015–1016 (2016) 121–134.
- [3] F. Svec, J.M.J. Frechet, New Designs of Macroporous Polymers and Supports: From Separation to Biocatalysis, *Science* (80-. ). 273 (1996) 205–211.
- [4] T. Qi, A. Sonoda, Y. Makita, H. Kanoh, K. Ooi, T. Hirotsu, Synthesis and Borate Uptake of Two Novel Chelating Resins, *Ind. Eng. Chem. Res.* 41 (2002) 133–138.
- [5] R. Arshady, Beaded polymer supports and gels. II. Physico-chemical criteria and functionalization, *J. Chromatogr. A.* 586 (1991) 199–219.
- [6] F. Svec, Porous polymer monoliths: Amazingly wide variety of techniques enabling their preparation, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 902–924.
- [7] F. Svec, C.G. Huber, Monolithic materials: Promises, challenges, achievements, *Anal. Chem.* 78 (2006) 2100–2107.
- [8] F. Svec, J.M.J. Frechet, Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media, *Anal. Chem.* 64 (1992) 820–822.
- [9] K. Horie, M. Báron, R.B. Fox, J. He, M. Hess, J. Kahovec, T. Kitayama, P. Kubisa, E. Maréchal, W. Mormann, R.F.T. Stepto, D. Tabak, J. Vohlídal, E.S. Wilks, W.J. Work, Definitions of terms relating to reactions of polymers and to functional polymeric materials (IUPAC Recommendations 2003), *Pure Appl. Chem.* 76 (2004) 889–906.
- [10] Y. Lv, F.M. Alejandro, J.M.J. Frechet, F. Svec, Preparation of porous polymer monoliths featuring enhanced surface coverage with gold nanoparticles, *J. Chromatogr. A.* 1261 (2012) 121–128.
- [11] C.T. Desire, R.D. Arrua, M. Talebi, N.A. Lacher, E.F. Hilder, Poly(ethylene glycol)-based monolithic capillary columns for hydrophobic interaction chromatography of immunoglobulin G subclasses and variants, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 2782–2792.
- [12] Preparation and evaluation of 400  $\mu\text{m}$  I.D. polymer-based hydrophilic interaction chromatography monolithic columns with high column efficiency, *J. Chromatogr. A.* 1509 (2017) 83–90.
- [13] A. Cantó-Mirapeix, J.M. Herrero-Martínez, C. Mongay-Fernández, E.F. Simó-

- Alfonso, Preparation and evaluation of butyl acrylate-based monolithic columns for CEC using ammonium peroxodisulfate as a chemical initiator, *Electrophoresis*. 29 (2008) 3858–3865.
- [14] A. Cantó-Mirapeix, J.M. Herrero-Martínez, D. Benavente, C. Mongay-Fernández, E.F. Simó-Alfonso, Peroxodisulfate as a chemical initiator for methacrylate-ester monolithic columns for capillary electrochromatography, *Electrophoresis*. 29 (2008) 910–918.
- [15] S. Abele, F.-Q. Nie, F. Foret, B. Paull, M. Macka, UV-LED photopolymerised monoliths, *Analyst*. 133 (2008) 864–866.
- [16] J.A. Deverell, T. Rodemann, J.A. Smith, A.J. Canty, R.M. Guijt, UV initiated formation of polymer monoliths in glass and polymer microreactors, *Sensors Actuators, B Chem*. 155 (2011) 388–396.
- [17] N. Li, W. Zheng, Y. Shen, L. Qi, Y. Li, J. Qiao, F. Wang, Y. Chen, Preparation of a novel polymer monolith with functional polymer brushes by two-step atom-transfer radical polymerization for trypsin immobilization, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 3411–3417.
- [18] R. Guo, D. Zhang, X. Zhu, L. Tang, X. Zhang, L. Bai, H. Liu, Preparation of a Polymer Monolithic Column Using Ionic Liquid as Porogen and Its Application in Separations of Proteins and Small Molecules, *Chromatographia*. 80 (2017) 23–30.
- [19] R.D. Arrua, M.C. Strumia, C.I. Alvarez Igarzabal, Macroporous Monolithic Polymers: Preparation and Applications, *Materials (Basel)*. 2 (2009) 2429–2466.
- [20] O. Okay, Macroporous copolymer networks, *Prog. Polym. Sci.* 25 (2000) 711–779.
- [21] S. Xie, F. Svec, J.M.J. Frechet, Preparation of porous hydrophilic monoliths: effect of the polymerization conditions on the porous properties of poly (acrylamide-co-*N,N*-methylenebisacrylamide) monolithic rods, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 35 (1997) 1013–1021.
- [22] K.J. Shea, G.J. Stoddard, D.M. Shavelle, F. Wakui, R.M. Choate, Synthesis and Characterization of Highly Cross-Linked Polyacrylamides and Polymethacrylamides. A New Class of Macroporous Polyamides, *Macromolecules*. 23 (1990) 4497–4507.
- [23] R.D. Arrua, J.S.R. del Barrio, A.G. Ruiz, M. Strumia, C.I.A. Igarzabal, Preparation of polymeric macroporous rod systems: Study of the influence of the reaction parameters on the porous properties, *Mater. Chem. Phys.* 112 (2008) 1055–1060.
- [24] B. Mattiasson, A. Kumar, Igor Yu. Galaev, *Macroporous Polymers. Production*

- Properties and Biotechnological/Biomedical Applications, 1st ed., CRC Press, Lund University, Sweden, 2009.
- [25] V.M. Gun'ko, I.N. Savina, S. V. Mikhalovsky, Cryogels: Morphological, structural and adsorption characterisation, *Adv. Colloid Interface Sci.* 187–188 (2013) 1–46.
- [26] X. Chen, W. Sui, D. Ren, Y. Ding, X. Zhu, Z. Chen, Synthesis of Hydrophobic Polymeric Cryogels with Supermacroporous Structure, *Macromol. Mater. Eng.* 301 (2016) 659–664.
- [27] O. Okay, *Polymeric Cryogels: Macroporous Gels with Remarkable Properties*, 1st ed., Springer International Publishing, Switzerland, 2014.
- [28] B.M.A. Carvalho, S.L. Da Silva, L.H.M. Da Silva, V.P.R. Minim, M.C.H. Da Silva, L.M. Carvalho, L.A. Minim, Cryogel Poly(acrylamide): Synthesis, Structure and Applications, *Sep. Purif. Rev.* 43 (2014) 241–262.
- [29] R.E. Pincock, Reactions in frozen systems, *Acc. Chem. Res.* 2 (1969) 97–103.
- [30] R.E. Pincock, T.E. Kiovsky, Kinetics of reactions in frozen solutions, *J. Chem. Educ.* 43 (1966) 358.
- [31] A.R. Butler, T.C. Bruice, Catalysis in Water and Ice. A Comparison of the Kinetics of Hydrolysis of Acetic Anhydride, 6-Propiolactone, and p-Nitrophenyl Acetate and the Dehydration of 5-Hydro-6-hydroxy- deoxyuridine in Water and in Ice, *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964) 313–319.
- [32] H. Kirsebom, G. Rata, D. Topgaard, B. Mattiasson, I.Y. Galaev, Mechanism of cryopolymerization: Diffusion-controlled polymerization in a nonfrozen microphase. An NMR study, *Macromolecules.* 42 (2009) 5208–5214.
- [33] V.I. Lozinsky, F.M. Plieva, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, The potential of polymeric cryogels in bioseparation, *Bioseparation.* 10 (2001) 163–188.
- [34] R.D. Arrua, C.I. Alvarez Igarzabal, Macroporous monolithic supports for affinity chromatography, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1974–1987.
- [35] T.J. Causon, I. Nischang, Critical differences in chromatographic properties of silica- and polymer-based monoliths, *J. Chromatogr. A.* 1358 (2014) 165–171.
- [36] I. Nischang, Impact of biomolecule solute size on the transport and performance characteristics of analytical porous polymer monoliths, *J. Chromatogr. A.* 1354 (2014) 56–64.
- [37] E.L. Pfaunmiller, M.L. Paulemond, C.M. Dupper, D.S. Hage, Affinity monolith chromatography: A review of principles and recent analytical applications, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 2133–2145.
- [38] D.S. Hage, J. Cazes, eds., *Handbook of affinity chromatography*, 2nd Ed, CRC Press, Boca Raton, 2006.

- [39] J.E. Schiel, R. Mallik, S. Soman, K.S. Joseph, D.S. Hage, Application of silica support in affinity chromatography, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 719–737.
- [40] A.C.A. Roque, C.R. Lowe, Application and Elution in Affinity Chromatography, in: D.S. Hage, J. Cazes (Eds.), *Handb. Affin. Chromatogr.*, 2nd Ed, CRC Press, Boca Raton, 2006: pp. 80–97.
- [41] D. Çimen, A. Denizli, Immobilized metal affinity monolithic cryogels for cytochrome c purification, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 93 (2012) 29–35.
- [42] A. Elkak, A. Hamade, N. Bereli, C. Armutcu, A. Denizli, Synthesis of hydroxyethyl-methacrylate-(L)-histidine methyl ester cryogels. Application on the separation of bovine immunoglobulin G, *Anal. Biochem.* 525 (2017) 1–7.
- [43] N.S. Bibi, N.K. Singh, R.N. Dsouza, M. Aasim, M. Fernández-Lahore, Synthesis and performance of megaporous immobilized metal-ion affinity cryogels for recombinant protein capture and purification, *J. Chromatogr. A.* 1272 (2013) 145–149.
- [44] M. Andaç, A. Denizli, Affinity-recognition-based polymeric cryogels for protein depletion studies, *RSC Adv.* 4 (2014) 31130.
- [45] S. Reichelt, ed., *Affinity chromatography: Methods and protocols*, 3rd Ed, Springer, Leipzig, Germany, 2015.



## CAPÍTULO 2

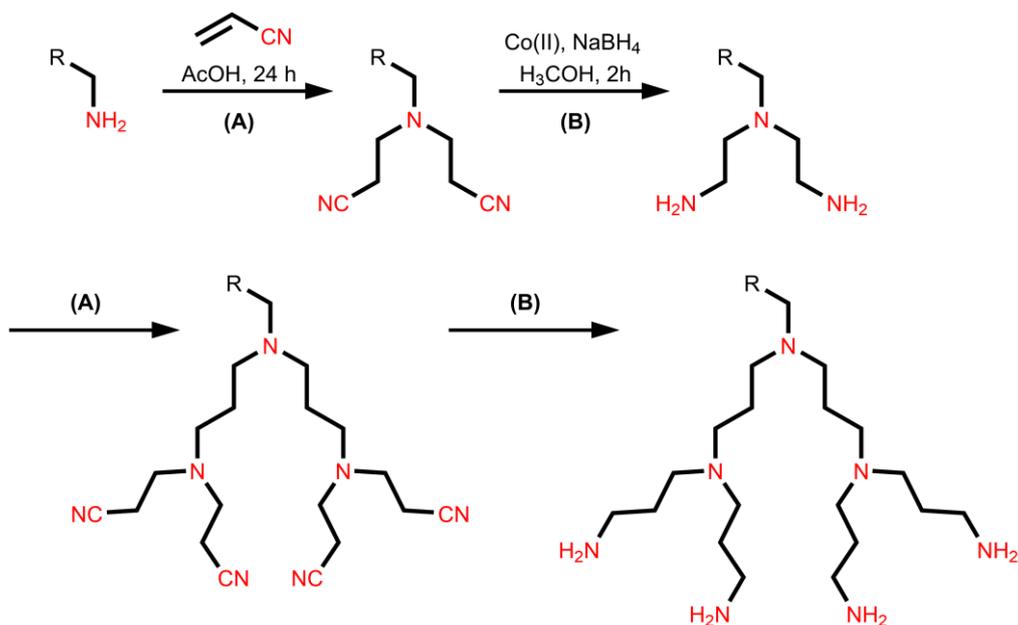
### MOLÉCULAS Y POLÍMEROS MULTIFUNCIONALES: DENDRÍMEROS, DENDRONES E HÍBRIDOS DENDRÍTICOS

#### 2.1. Moléculas dendríticas

El término dendrítico hace referencia a una estructura tipo arbórea, es decir, con una serie de ramificaciones. Diversos ejemplos pueden encontrarse con frecuencia en la naturaleza, la ciencia, la tecnología, el arte y en la vida cotidiana; la ramificación de los árboles y raíces, las dendritas que constituyen una parte de las células neuronales, los vasos sanguíneos, ríos, rayos, corales y copos de nieve, son algunos de los tantos ejemplos en donde se pueden encontrar este tipo de estructuras.

Desde una perspectiva histórica en relación con la ciencia de los polímeros, existieron varios períodos en donde se avanzó con respecto al entendimiento y control de estructuras ramificadas. A finales del siglo XIX y a principios del siglo XX, se consideraban a estas estructuras como las responsables de la insolubilidad y falta de tratamiento de algunos materiales formados en reacciones de polimerización, al margen que la posibilidad de estudio de estos “subproductos” resultaba primitivo por la época. Durante los años 1941 y 1942, Flory y colaboradores [1–3] demostraron evidencia teórica y experimental relacionada a la aparición de ramificaciones y moléculas tridimensionales. Además, se demostró la existencia de las estructuras dendríticas y se definieron varios parámetros relacionados a ellas. No obstante, no fue hasta la década del '70 que Vögtle y colaboradores [4] expusieron por primera vez la síntesis de moléculas dendríticas mediante una reacción en cascada, a partir de reacciones de alquilación y reducción, tal como se muestra en el Esquema 2.1.

Es un hecho que cada etapa de la evolución histórica referido a la ciencia de los polímeros significa un incremento en el nivel del control de la ramificación. La introducción de ramificaciones entonces involucra cambios sustanciales en las propiedades reológicas, así como el aumento de los grupos funcionales. Los polímeros ramificados pueden tener una organización altamente simétrica, con una baja polidispersidad de su peso molecular, o bien, una organización irregular con una considerable variación en la masa; esta clase de polímeros altamente ramificados constituyen uno de los pilares fundamentales de este trabajo de tesis: **las estructuras dendríticas**. La Tabla 2.1 ejemplifica el avance histórico de este tipo de moléculas.



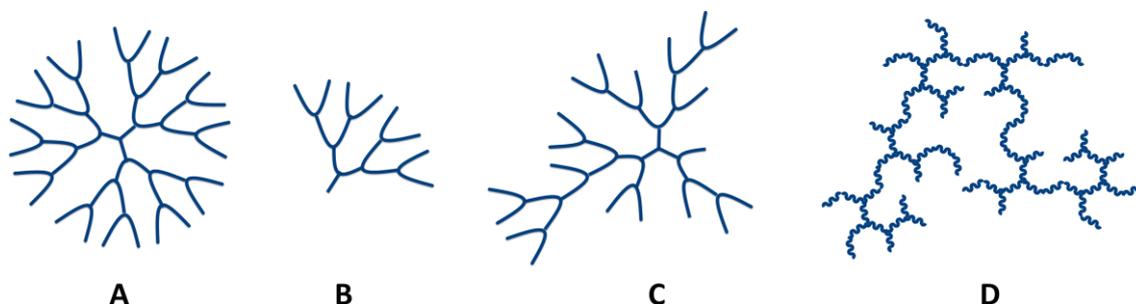
**Esquema 2.1** Reacciones de una síntesis en cascada.

**Tabla 2.1.** Primeros avances publicados sobre moléculas dendríticas (1978 – 1991).

Año	Autor principal	Referencias
<b>Dendrímeros a partir de reacciones en cascada</b>		
1978	Vöegtle	[4]
1982	Maciejewski	[5]
1983	de Gennes	[6]
1985 – 1990	Tomalia/Turro/Goddard	[7–14]
1985 – 1990	Newkome/Baker	[15–17]
1990 – 1991	Fréchet/Hawker	[18–21]
1990	Miller/Neenan	[22,23]
<b>Hiperramificados</b>		
1988	Odian/Tomalia	[24]
1990	Kim/Webster	[25]
1991	Fréchet/Hawker	[26]
<b>Dendrigraft</b>		
1991	Tomalia	[27]
1991	Gauthier/Möller	[28]

Los polímeros dendríticos representan una nueva clase de macromoléculas con propiedades más allá de los polímeros convencionales [25]; es por esta razón que en la actualidad son reconocidos como uno de los cuatro principales tipos de polímeros, junto a los lineales, ramificados y entrecruzados [29]. Estas macromoléculas pueden ser

clasificadas a su vez en distintas sub-clases: dendrímeros, dendrones, hiperramificados y *dendrigrraft*, como se muestra en la Fig. 2.1.



**Fig. 2.1.** Diferentes estructuras dendríticas: (A) dendrímero, (B) dendrón, (C) hiperramificado y (D) *dendrigrraft*.

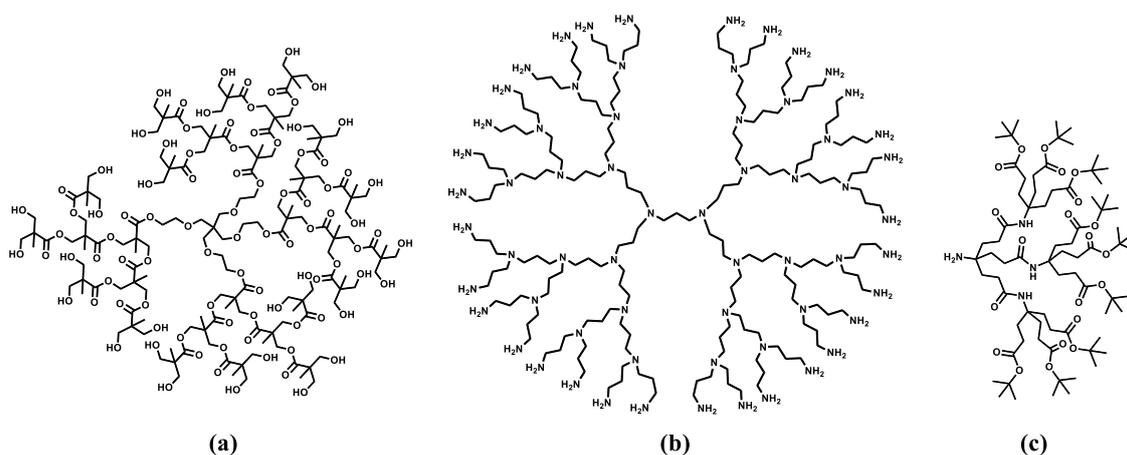
Si bien todos los subtipos de estructuras dendríticas poseen propiedades similares, tales como una alta densidad de grupos funcionales y una alta cantidad de ramificaciones (Fig. 2.2), algunas de ellas poseen estructuras más definidas (simétricas), por lo que además se pueden diferenciar en dos clases, como se indica en la Tabla 2.2.

**Tabla 2.2** Algunas diferenciaciones generales de los polímeros dendríticos.

	<b>Hiperramificado/<i>dendrigrraft</i></b>	<b>Dendrúmero/dendrón</b>
Topología	3D, irregular	3D, regular
Síntesis	Tipo <i>One-step</i> , relativamente simple	De muchos pasos, laboriosa
Purificación	Precipitación	Cromatografía
Escalado	Simple	Difícil
Peso molecular	Diverso	Idéntico
Índice de polidispersidad (Pdl)	>1,1	1,0 (<1,05)
Viscosidad	Baja	Muy baja
Solubilidad	Alta	Alta
Grupos funcionales	Unidades terminales y en el interior	En la periferia
Reactividad	Alta	Alta

Los polímeros hiperramificados y los *dendrigrraft* (desde ahora, hiperramificados en general) se caracterizan por un gran número de puntos de ramificación con numerosos grupos terminales, mediante una distribución aleatoria en términos de su peso molecular y grado de ramificación, mientras que los dendrímeros/dendrones son de un peso molecular perfectamente definido, con ramificaciones perfectas. Estas diferencias estructurales radican en el hecho de que los hiperramificados son

preparados mediante polimerización de monómeros tipo  $AB_2$  en un paso de reacción (*one-pot*), cuando los dendrímeros son preparados por una serie de pasos de síntesis orgánica, incluso demasiado laboriosos. Lederer y colaboradores, en su artículo publicado en *Angewandte Communications (2015)* [30], definieron a los polímeros hiperramificados como los “primos feos” de los dendrímeros, en comparación a la perfección estructural de estos últimos; es lógico pensar entonces que los hiperramificados no son buenos candidatos para considerarse como *building blocks* a nanoescala, a diferencia de los dendrímeros. Efectivamente, el hecho de que tanto dendrímeros como dendrones posean dimensiones hidrodinámicas en el rango de 1 – 30 nm, permite su síntesis manteniendo un control preciso sobre los Parámetros Críticos de Diseño a Nanoescala (CNDPs) [31], incluidos el tamaño, forma, química funcional, flexibilidad/rigidez y arquitectura.



**Fig. 2.2** Ejemplos de estructuras dendríticas: **(a)** un polímero hiperramificado poliéster polioli (Boltorn™ H30), **(b)** un dendrímero de polipropilenimina de generación 4 (PPI-G4), y **(c)** un dendrón amida éster *t*-butílico de generación 2.

### 2.1.1. Dendrímeros y dendrones

En este trabajo de tesis son de particular interés los dendrones, debido a varios motivos: por un lado, la obtención de estos resulta menos complicada que la de dendrímeros, lo que reduce considerablemente los tiempos y costos de síntesis. Además, a los dendrones se los puede considerar como una sección o fragmento de los dendrímeros, o bien, una “rama” de los mismos, por lo que comparten muchas de sus características estructurales, como se muestra en la Fig. 2.3 [32,33].

De esta manera, se pueden distinguir tres regiones claramente definidas en cada estructura: un corazón (dendrímero), o punto focal (dendrón), cavidades interiores

formadas por unidades repetitivas de ramificaciones (lo cual define la generación, G), y grupos funcionales terminales en la superficie [34].

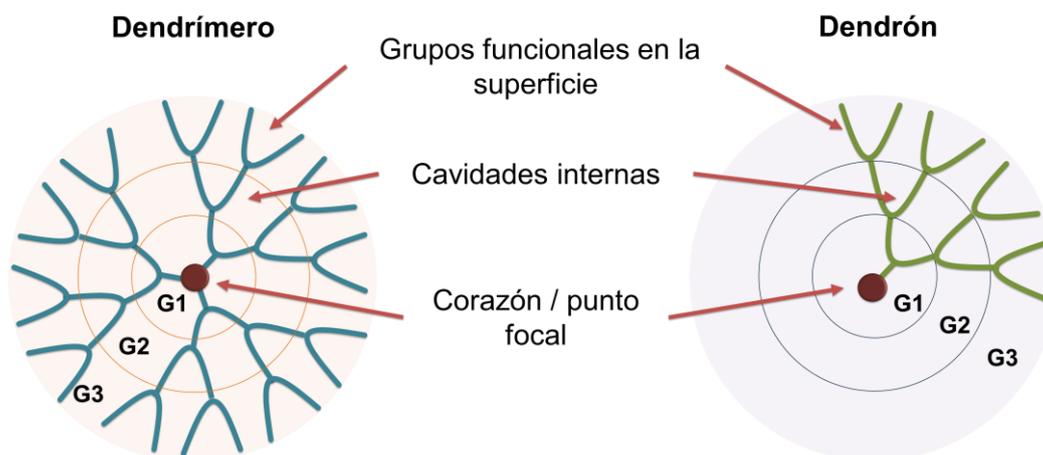


Fig. 2.3 Esquema general y partes de los dendrímoros y dendrones.

#### 2.1.1.1. Metodologías de obtención

Desde un comienzo, la investigación buscó obtener dendrímoros de alta complejidad estructural mediante el desarrollo de metodologías sintéticas con pasos sencillos de reacción. Básicamente, se pueden clasificar en dos vías de obtención: una divergente y otra convergente, como se muestra en la Fig. 2.4.

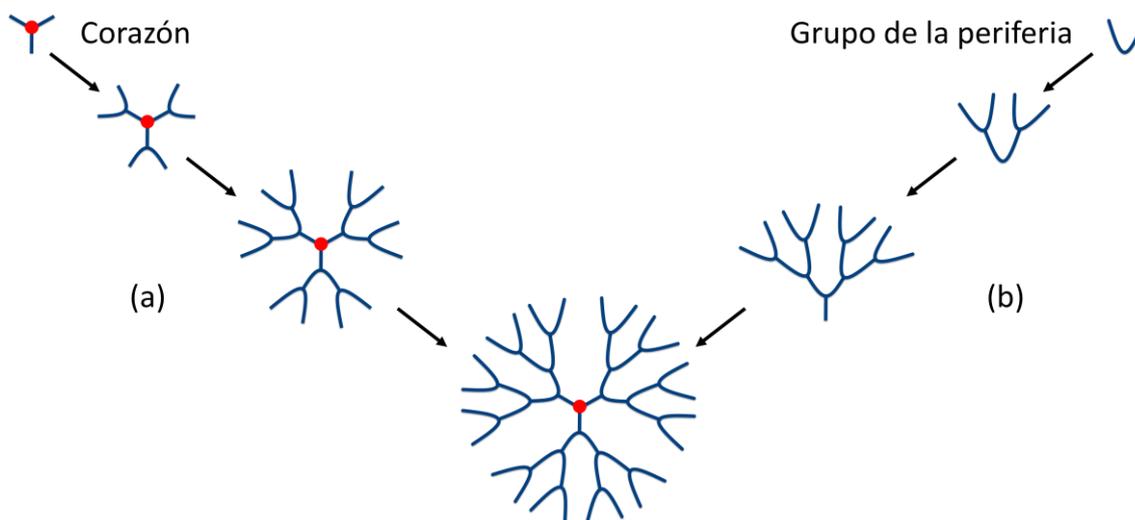


Fig. 2.4 Diferentes vías de obtención de dendrímoros y dendrones: (a) vía divergente y (b) vía convergente.

En la metodología divergente (Fig. 2.4 a) el crecimiento dendrítico se origina desde el corazón, y continua hacia la periferia a través de diversos pasos repetitivos, tanto de acoplamiento como de activación. En este caso, es necesario un estricto control

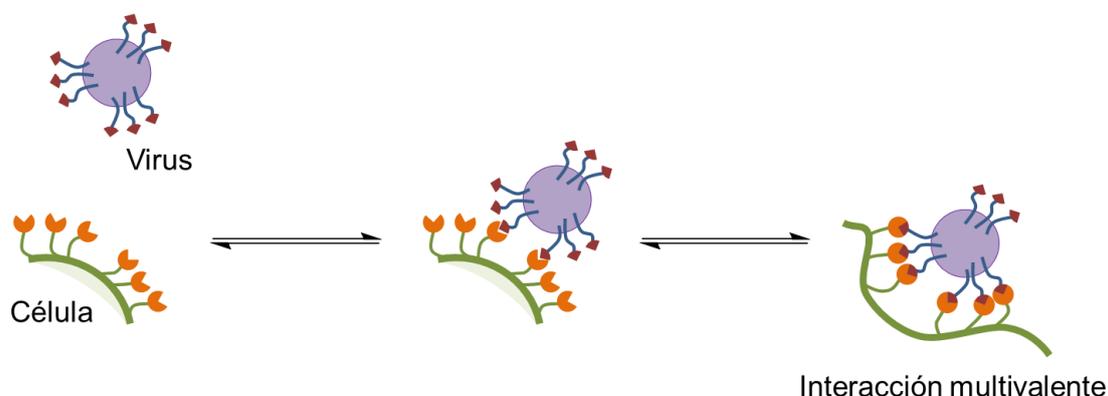
de la naturaleza y reactividad de los grupos funcionales del corazón como de los grupos de la periferia, para así evitar reacciones no deseadas entre ellos [33]. Esta metodología presenta las siguientes ventajas: permite la síntesis de dendrímeros y dendrones de altas generaciones y admite la posible automatización del proceso, lo cual lo convierte en la actualidad en el método elegido para la síntesis de estructuras comerciales como ocurre con el PAMAM y el PEI [35]. Sin embargo, se pueden presentar limitaciones en altas generaciones relacionadas a defectos estructurales, debido al crecimiento exponencial de los grupos funcionales de la periferia y originando así la formación de más de un producto; esto se traduce en complicaciones al momento de la separación y purificación de la estructura deseada.

En cuanto a la vía convergente (Fig. 2.4 b), el dendrímero crece desde la periferia hacia el centro, siendo necesarios también reacciones repetitivas tanto de acoplamiento como de activación. La diferencia radica en que ahora la reacción se origina a partir de grupos funcionales que serán la periferia de la molécula y se procede hacia el interior mediante el acoplamiento de dichos grupos, y como paso final, el acople a un corazón multifuncional para generar el dendrímero correspondiente [33]. Se pueden distinguir diferentes ventajas relacionadas con esta metodología respecto a la divergente, entre ellas: involucra menos pasos de reacción, lo que disminuye la probabilidad de generar estructuras defectuosas y aumenta el control estructural; presentan mayores probabilidades de que los productos de reacción difieran en sus estructuras y propiedades, lo que genera una ventaja al momento de su separación. No obstante, cuando se busca obtener una molécula de gran tamaño ( $G > 6$ ) utilizando la vía convergente, existen limitaciones del tipo estéricas, lo cual genera una disminución del rendimiento y además dificulta la posibilidad de escalar la reacción a procesos industriales [33].

Paralelamente a estas dos vías, también han sido descritas numerosas metodologías de síntesis de dendrímeros, enfocados principalmente en la disminución de las etapas involucradas y, en consecuencia, tiempos de síntesis y *work-up*. Entre las diversas estrategias estudiadas se encuentran la síntesis ortogonal [36,37], convergente de doble etapa o *double-stage* [38], el método convergente de crecimiento doble exponencial [39] o bien la vía del hipermonómero [40], entre mucha otras [35,41,42]. Cada una de ellas, sin embargo, presentan tanto ventajas como desventajas, pero estos avances no dejan de demostrar que la química y la obtención de estructuras dendríticas sigue siendo un desafío [43].

### 2.1.2. Efecto multivalente

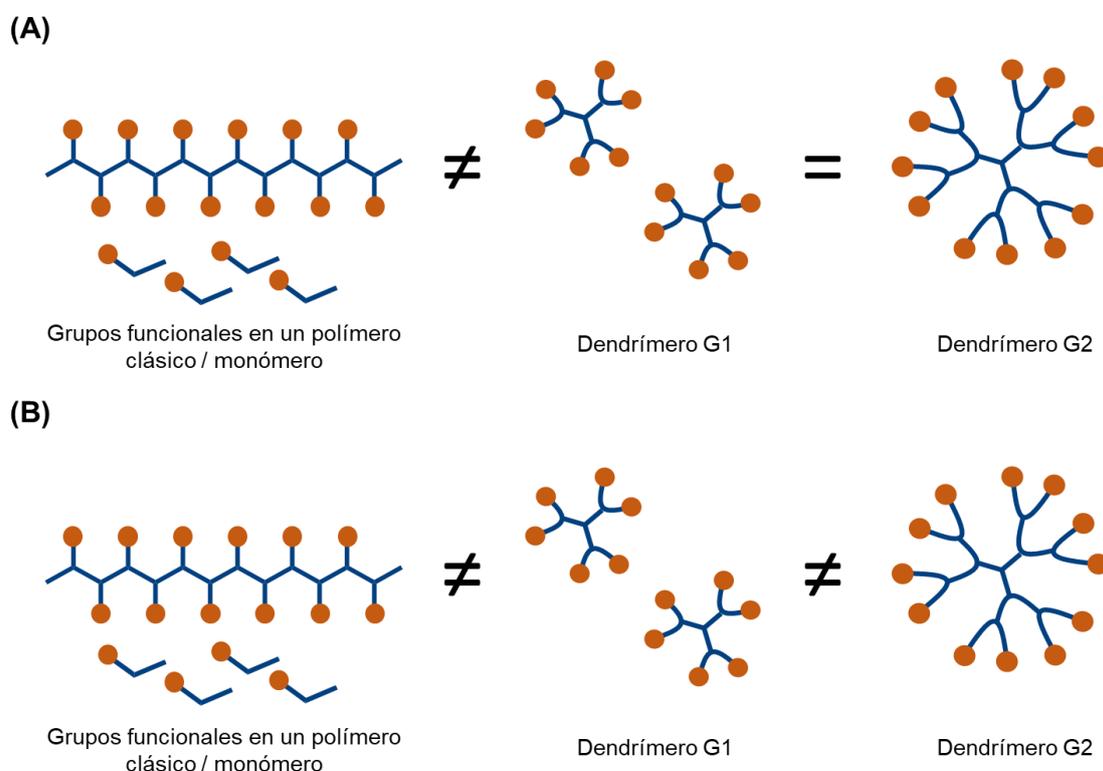
En el campo de la biología, se entiende como interacciones multivalentes (o polivalentes) a la unión simultánea de múltiples ligandos en una molécula (o una superficie) a múltiples receptores en otra, es decir, al efecto causado cuando un agente interactúa con otro por medio de múltiples uniones ligando-receptor. Lo destacable de este fenómeno es que, si se midiese la fuerza (constante) de asociación ( $K_a$ ) del conjunto podría resultar mayor a la sumatoria del valor de cada constante de asociación ligando-receptor individual; la propia unión puede ser colectivamente mucho más fuerte que la suma correspondiente de interacciones monovalentes. En otras palabras, se observa un sinergismo en dichas interacciones multivalentes [43,44]. La Fig. 2.5 muestra un ejemplo esquemático de la interacción de un virus con una célula; a nivel químico, las uniones covalentes ocurren a través de grupos funcionales presentes en receptores y ligandos, tales como las hemaglutininas en la superficie de un virus influenza y el ácido siálico presente en la membrana plasmática de la célula huésped [45]. Entonces, un aspecto importante a destacar en este tipo de uniones es la funcionalidad y disponibilidad en el espacio para provocar multivalencia.



**Fig. 2.5** Ejemplo de una interacción multivalente entre una célula y un virus [44].

Las moléculas dendríticas poseen la capacidad de interactuar con otra molécula o superficie por medio de múltiples uniones debido a la gran funcionalidad y disposición de su estructura, para finalmente causar un fenómeno similar al observado en la naturaleza. Esto se conoce como **efecto dendrítico**. Este efecto puede clasificarse de dos formas, como se observa en la Fig. 2.6: (i) si la interacción de la estructura dendrítica difiere de la del monómero (o de la del polímero clásico correspondiente) entonces el efecto se conoce como efecto multivalente; (ii) ahora, si dicha interacción es diferente cuando la generación de la estructura incrementa, entonces el efecto

producido es un efecto generacional [43,46]. El efecto dendrítico puede ser observado tanto en dendrímeros, dendrones y en hiperramificados, y en muchos tipos de aplicación, principalmente en catálisis, biología, nanomedicina y mucho menos extenso en el campo de los materiales funcionales, los cuales serán explicados más adelante. El primer efecto dendrítico informado está relacionado con la interacción de pireno con dendrímeros PAMAM G1 a G9, observándose que la intensidad de las señales de fluorescencia de pireno incrementó cuando la generación del dendrímero aumentó, indicando un aumento de la polaridad de la estructura interna [14]. Es importante destacar que el efecto dendrítico puede ser positivo o negativo, es decir, que el resultado de las interacciones puede ser tanto mejorado como empeorado.



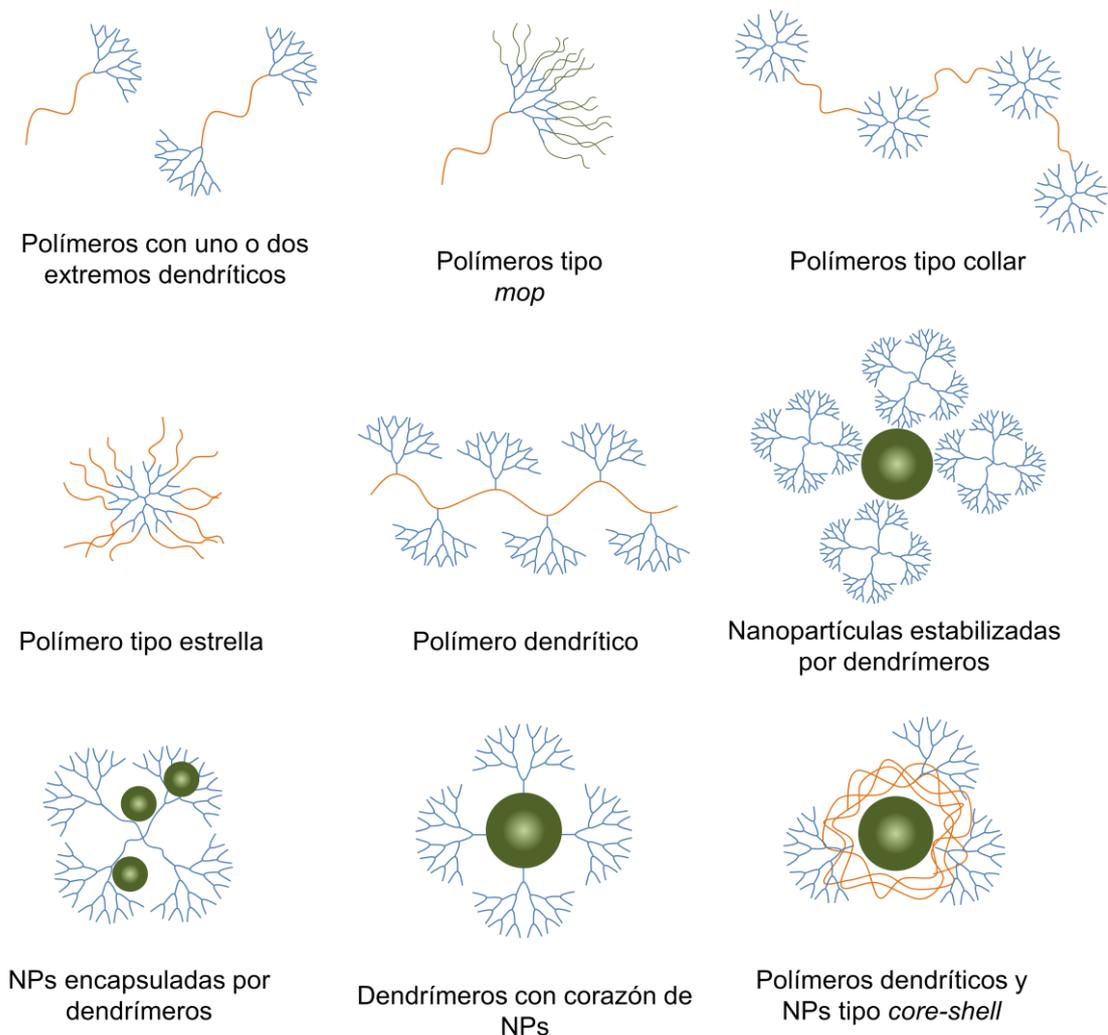
**Fig. 2.6** Dos tipos de efecto dendrítico: (A) efecto multivalente y (B) efecto generacional.

## 2.2. Híbridos dendríticos: dendronización

La demanda de materiales complejos y altamente específicos en el terreno del desarrollo tecnológico ha crecido considerablemente en estos últimos años. El diseño, la síntesis e ingeniería detrás de dichos materiales ha buscado inspirarse en la naturaleza misma. Sin embargo, para lograr este cometido, es necesario un elevado control sobre las propiedades de un material sintético, el cual involucra múltiples conceptos y disciplinas. De esta manera, la habilidad para predecir (y controlar) la

relación estructura/propiedad a partir de la utilización de diferentes *building blocks*, constituye un enfoque meramente multidisciplinario en relación con la preparación de materiales – los cuales se definen a partir de ahora como materiales híbridos – con novedosas funcionalidades.

Se ha definido a un material híbrido [43] como el resultado no sólo de la combinación de un componente orgánico e inorgánico, comúnmente denominado compuesto (*composite*), sino además como la combinación de materiales de distinta clase, basado en sus propiedades estructurales. La Fig. 2.7 muestra diferentes formas de materiales híbridos a partir de la combinación de fragmentos como polímeros lineales-dendríticos, sistemas nanoestructurados, los cuales incluyen sustratos inorgánicos, entre otros [47,48]. Muchos de los productos sintéticos utilizados cotidianamente se basan en estructuras híbridas, desarrollados incluso hace mucho tiempo. Por lo tanto, los materiales híbridos representan una unión directa entre las tecnologías presentes y sus potenciales aplicaciones.



**Fig. 2.7** Diferentes polímeros híbridos.

El único y complejo propósito detrás del diseño de materiales híbridos es lograr propiedades funcionales nuevas o específicas, ya sea utilizando estructuras disponibles o mediante modificación química de estructuras existentes. Por lo tanto, la combinación o adaptación de cada componente de un material híbrido en una disposición deseada se convierte en la clave para comprender las propiedades y aplicaciones finales.

Algunas metodologías recientemente publicadas han surgido a partir del avance de la nanociencia y de esta manera proporcionan herramientas poderosas para la preparación de nuevos materiales híbridos, lo que permite un control estricto del tamaño, la forma y la precisión en la generación de una funcionalidad química deseada [49]. La innovación y el conocimiento colectivo de la arquitectura y la estructura en la química macromolecular ha sido uno de los avances más importantes en el abordaje de nuevas aplicaciones potenciales en diferentes áreas, incluyendo la biología [50], el almacenamiento de energía [51], recubrimientos auto-cicatrizantes [52] y administración de fármacos [53].

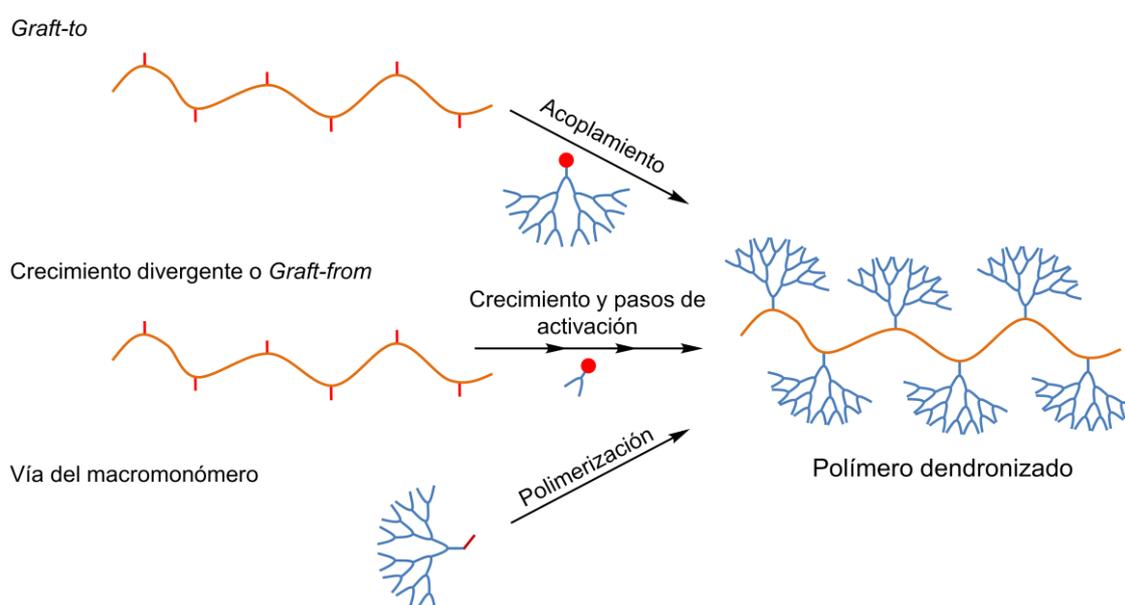
Estudios recientes han demostrado cómo la unión de moléculas multiramificadas (ya sea por interacciones covalentes como no covalentes) producen un cambio significativo en las propiedades de un material híbrido [54–56]; un ejemplo de esto son las moléculas dendríticas (dendrímeros y/o dendrones) las cuales se han utilizado en diversos campos de aplicación [57].

Como ya se mencionó, la obtención de dendrímeros es un proceso complejo, siendo así la utilización de dendrones una alternativa más ventajosa. No obstante, las propiedades dendríticas, en adición a las propiedades fisicoquímicas de los dendrones, queda limitado a su tamaño/peso molecular y solubilidad, entre otros, quedando así su aplicación bastante limitada. Por esta razón, la metodología de **dendronización** constituye una ruta interesante para la síntesis de moléculas con propiedades dendríticas, a lo largo de toda una estructura convencional, como un polímero lineal/entrecruzado o una superficie metálica, por ejemplo. De esta manera, la combinación de las propiedades dendríticas (incluyendo el efecto multivalente) con otras estructuras, genera un valor agregado importante en el material híbrido final [58].

Con respecto a la dendronización, las estrategias sintéticas más utilizadas (Fig. 2.8) consisten en: (a) acomplamiento de fragmentos multifuncionales (*graft-to*); (b) crecimiento de una molécula dendrítica desde la cadena polimérica (crecimiento divergente o *graft-from*); (c) crecimiento de una cadena polimérica desde el punto focal/corazón y posterior polimerización del monómero, conteniendo un bloque dendrítico y lineal (vía del macromonómero dendrítico) [47].

Con respecto a la vía del macromonómero dendrítico (MD), los dendrones son unidos a un monómero que contiene un grupo polimerizable, tanto por una metodología

convergente como divergente. Posteriormente el MD es polimerizado, formando así un polímero dendronizado. Los principales beneficios de esta ruta radican en que los dendrones son colocados con precisión a lo largo del polímero formado. Se han empleado diferentes métodos de polimerización, no sólo la polimerización por radicales libres [56,59–61], sino por ejemplo polimerización por adición, fragmentación y transferencia de cadena reversible (RAFT) [62–64], polimerización por metátesis de apertura de anillos (ROMP) [65–68], polimerización por apertura de anillo (ROP) [69], policondensación de Suzuki (SPC) [70–72], polimerización de inserción [73], acoplamiento de Stille [74,75], acoplamiento de Heck [76] y polimerización radicalaria controlada por transferencia atómica (ATRP) [77–79].



**Fig. 2.8** Diferentes rutas sintéticas para la obtención de polímeros dendronizados.

Sin embargo, el inconveniente principal de la vía del MD es que los dendrones más grandes pueden llegar a proteger al grupo polimerizable, y por este motivo inhibir finalmente la polimerización, dando como resultado polímeros de bajo peso molecular (cadenas poliméricas cortas) o ninguna reacción en absoluto. Sobre este punto existen diferentes posturas; por un lado, se propone que al aumentar la distancia entre el dendrón y el grupo polimerizable, aumentará la disponibilidad del grupo reactivo, pero también existen estudios que indican que el problema de la inhibición puede estar relacionado solo con la concentración del monómero, siendo lo suficientemente alta como para alcanzar altos grados de polimerización [60,80,81].

La síntesis de dendrones y su combinación con otros componentes orgánicos / inorgánicos facilita y acelera la obtención de materiales con propiedades dendríticas. La metodología de dendronización es un buen ejemplo de síntesis de material híbrido, e

idealmente como una herramienta sintética para lograr estructuras dendríticas interesantes. La utilización de dendrones como bloques de construcción permite acelerar la síntesis, reducir el número de etapas de reacción y facilitar los tediosos procedimientos de purificación, mientras que al mismo tiempo disminuye la necesidad de niveles excesivos de reactivos. Esto podría conducir a su uso en nuevas aplicaciones y a mejorar los niveles de comercialización.

Los dendrones, por su parte, ya han sido utilizados en diferentes ocasiones como bloques de construcción, brazos espaciadores o agentes de funcionalización [82–85]. Efectivamente, estas estructuras ramificadas generalmente se pueden unir a un punto, una línea o una superficie específica, dando así lugar a dendrímeros, polímeros dendronizados y/o superficies dendronizadas [86]. Ciertos aspectos del comportamiento de los dendrones están dominados por características estructurales y geométricas, ya que los grupos funcionales en la periferia (polar o no polar) y su arquitectura o tamaño definen su disposición espacial y sus propiedades finales.

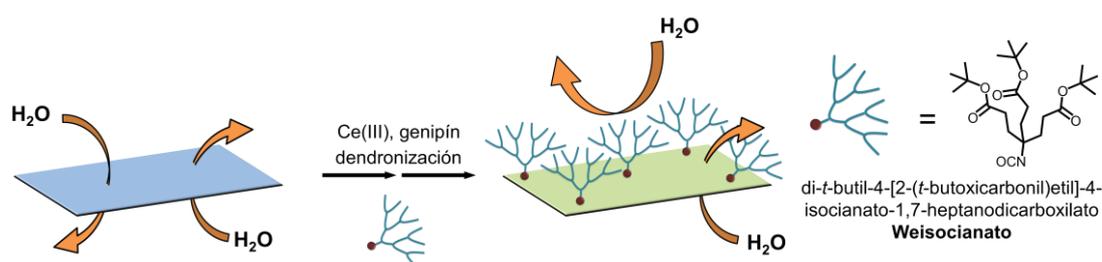
### 2.3. Aplicaciones de estructuras dendríticas

Como en otras áreas de la ciencia y de la tecnología, en la química de las estructuras dendríticas resulta complicado la posible distinción entre aplicaciones ya establecidas y potenciales aplicaciones altamente prometedoras. Esto también es causante de los campos de (posible) aplicación de estos materiales, como por ejemplo la biomedicina, enfocado en el tratamiento de alguna enfermedad, lo cual requiere de exhaustivas etapas de prueba (fases preclínicas y clínicas) para finalmente ser considerado un producto con una aplicación final, más allá de conocerse todas las potenciales ventajas relacionadas a su estudio en el área antes mencionada. Es por ello, por lo que en este Capítulo y en este trabajo de tesis, ambos aspectos son considerados de igual manera.

Las moléculas dendríticas son caracterizadas por zonas de diferente densidad, dependiendo de la rigidez o de la movilidad conformacional de su estructura, pueden combinar áreas más y menos densas. Además, al poseer cavidades internas, pueden albergar moléculas de solvente, modificando la solubilidad de un material, o bien actuar como *hosting* (selectivo) de una sustancia de interés. La modificación de los grupos funcionales, tanto de la periferia como del corazón o punto focal, también permite una variedad de efectos en la estructura final del material y en las propiedades fisicoquímicas, permitiendo una mayor versatilidad en su aplicación.

Anteriormente se han realizado sistemas híbridos basados en *films* de biopolímeros como gelatina y/o quitosan, modificados superficialmente con dendrones

[87–89], mostrando por un lado un eficiente grado de dendronización y por el otro nuevas propiedades y cambios en aquellas del material original, atribuido a la estructura dendrítica presente. Entre estos sistemas, se desarrolló una película basada en gelatina, iones cerio(III) y modificada sobre una cara con un dendrón con punto focal isocianato (NCO) y grupos *t*-butilo en la periferia (Weisocianato) (Fig. 2.9), donde la estructura dendrítica otorgó mayor hidrofobicidad al lado modificado y mejores propiedades de permeabilidad, solubilidad e hinchamiento, sin modificar las propiedades antimicrobianas y permitiendo así su potencial aplicación como apósito para heridas.



**Fig. 2.9.** Modificación superficial sobre una cara de películas basadas en gelatina, genipín y cerio(III), utilizando un dendrón comercial [88].

Con respecto a las aplicaciones de sistemas dendríticos en biomedicina, Haag y colaboradores [90] sintetizaron una plataforma de poliglicerol dendrítico (PGd) modificada con grupos  $\text{SO}_4^{2-}$  que mostró una fuerte inhibición de partículas de Orthopoxvirus, lo cual fue atribuido al efecto multivalente (positivo) generado por los grupos sulfato de la estructura; además, este material no mostró citotoxicidad y en el ensayo de infección, el potencial antiviral del nanosistema resultó similar al de la heparina. Por otra parte, los hidrogeles de PGd obtenidos por Wu y colaboradores [91] resultaron biocompatibles, no citotóxicos, y capaces de encapsular fibroblastos vivos como modelo de células terapéuticas, resultando ser sistemas con potenciales aplicaciones en ingeniería de tejidos, además de que dichos hidrogeles de PGd puede ser sintetizados también en entornos biológicos. Zheng y colaboradores [92,93] estudiaron micelas poliméricas compuestas de Boltorn®, polietilenglicol y grupos fluorescentes en líneas celulares de cáncer de mama humano MDA-MB468. Estos híbridos dendríticos ofrecieron protección a los fármacos transportados (como la doxorrubicina) frente a la biodegradación y se logró una exitosa liberación sostenida; adicionalmente, no se encontró señal de toxicidad ni excreción de citocinas en macrófagos primarios.

### 3.1.1. Híbridos dendríticos utilizados como soporte

Los híbridos dendríticos son una alternativa a los polímeros convencionales, mientras que al mismo tiempo mantienen las propiedades dendríticas. Esto está relacionado a la versatilidad funcional y el control estructural que permite finalmente obtener sustratos híbridos con propiedades mejoradas [35] para un gran número de aplicaciones [47].

Como ya se mencionó en el Capítulo anterior, existe un gran interés respecto a la ciencia de los polímeros como soporte, para distintos campos de aplicación tales como purificación/separación, catálisis en síntesis orgánica, sensores, entre muchos otros. Cada material para soporte deberá tener propiedades específicas de acuerdo con su aplicación, pero la interacción entre la matriz y la muestra, la solubilidad (balance de grupos polares y apolares en la estructura) y la morfología (rugosidad, porosidad) son algunas de las propiedades más críticas en este tipo de materiales. Distintos autores demostraron que dichas propiedades pueden ser mejoradas utilizando híbridos dendríticos, frente a soportes convencionales [35]. A continuación, se explicarán algunos ejemplos de este tipo de materiales, enfocados en la obtención de soportes para purificación y separación de moléculas de interés.

En general, los polímeros para soporte son porosos debido a la mejora en cuanto la difusión, interacción y presión que soportaría el material. La modificación de sílica porosa con moléculas dendríticas ha sido una buena alternativa para la obtención de soportes con propiedades mejoradas. Buszewski y colaboradores [94] prepararon un soporte a partir de sílica silanizada, metilamina y 1,4-butanodiolglicidil éter (BDDE) [95], donde la presencia de grupos amonio cuaternarios permitió la retención de aniones en un sistema cromatográfico. Este material posee potenciales aplicaciones como soporte en cromatografía de intercambio aniónico (AEC) de muchos aniones ( $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $Br^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $SO_4^{2-}$  y  $ClO_4^-$ ) con una buena resolución y estabilidad de la fase móvil.

Por otra parte, Lei y colaboradores [96] obtuvieron un hidrogel de zirconia y urea formaldehído ( $ZrO_2 - UF$ ) pero en este caso con propiedades no porosas, modificado en la superficie mediante una vía divergente utilizando PAMAM de generación 3, para obtener finalmente un soporte híbrido con un dendrímero. Este material se utilizó para reconocimiento molecular, utilizando ARN como ligando específico; así, la fase estacionaria [ARN – (PAMAM) – (zirconia – UF)] fue utilizada como soporte en Cromatografía de Afinidad, mostrando potencial habilidad de separación de ácidos nucleicos unidos a proteínas y ácidos nucleicos peptídicos.

Otros sistemas orgánicos han sido reportados, como esferas macroporosas basadas en poli(2-hidroxietil metacrilato-co-etilendimetacrilato) y en un dendrón

poliéster, obtenidas por Ling y colaboradores [97]. Este material fue utilizado como fase estacionaria quiral (CSP) para separación enantioselectiva. El objetivo de dicho trabajo fue en primera instancia elaborar un selector quiral para L-prolina; luego, mediante una vía divergente y convergente se adicionó al soporte poroso un dendrón para obtener así distintos híbridos dendríticos. Se realizó la separación del racemato *N*-(3,5-dinitrobenzoil)-*R*-amino ácidos dialquil amidas, utilizando esta novedosa CSPs bajo condiciones normales de HPLC, la cual mostró mejores resultados en función de la disposición espacial del selector quiral, siendo mejor sobre el dendrón que sobre el CSP monovalente. Sin embargo, el factor de separación disminuye cuando la generación del dendrón incrementa de G1 a G4, encontrando así un efecto multivalente positivo pero un efecto generacional negativo en generaciones mayores.

Martinelli y colaboradores [98] obtuvieron diversos soportes orgánicos de poli(hidroxietilmetacrilato – polibutadieno hidroxilado) funcionalizados con un dendrón G1 con un punto focal amino y glucosa (GLU) en la periferia; la dendronización mejoró las propiedades fisicoquímicas del material y además permitió la retención de concanavalina A, lo cual demostró que dichos soportes modificados con glicodendrones poseen un potencial aplicación en metodologías de cromatografía de afinidad.

### *3.1.2. Alcances y futuras aplicaciones de híbridos dendríticos en la purificación de sustancias*

La Cromatografía de Fase Reversa (RPC) es uno de los sistemas más ampliamente utilizados para la retención eficaz de analitos no polares. Sin embargo, dado que existen ciertas limitaciones asociadas con esta técnica, tales como la dificultad para retener / resolver iones y moléculas polares usando RPC, se pueden usar métodos de cromatografía en modo mixto y cromatografía líquida de interacciones hidrofílicas (HILIC). Generalmente, los materiales que se utilizan en RPC como fase estacionaria son formados por cadenas alquílicas y/o fenólicas; no obstante, cualquier funcionalidad polar presente en la estructura es capaz de formar regiones afines al agua, es decir, puntos hidrofílicos, lo que permite que el material también pueda ser utilizado como soporte en HILIC [99,100]. Básicamente, el mecanismo de una retención en la HILIC depende de las propiedades químicas de la fase estacionaria (disposición de zonas polares), del analito y de la fase móvil. Además, dependiendo de las propiedades finales de una columna simple, se pueden llevar a cabo múltiples separaciones a partir de solo una fase estacionaria (multimodo), como RPC, intercambio iónico (IEX), exclusión por tamaño (SEC), y la HILIC. La funcionalización de soportes convencionales con moléculas dendríticas provee una perfecta alternativa para obtener híbridos dendríticos

con potenciales aplicaciones en fases estacionarias, incluso multimodo. Adicionalmente, el efecto multivalente y generacional causado por las estructuras dendríticas generan la posibilidad de diferentes uniones bioespecíficas con moléculas biológicas, tales como proteínas, aminoácidos y/o enzimas de interés, o bien la unión de distintos tipos de ligandos afines a dichas biomoléculas, favoreciendo así una separación selectiva en procedimientos cromatográficos como AC, por ejemplo.

Como se mencionó anteriormente, existen antecedentes donde se modificaron esferas macroporosas con dendrones, pero ya se ha explicado que los soportes monolíticos poseen mejores propiedades que los anteriores, en términos de empaquetamiento, una distribución de tamaños de poro más homogénea, tamaños de poro mayores, entre otras ventajas. De esta manera, en busca de mejores propiedades finales para la aplicación como soporte cromatográfico, la alternativa de híbridos dendríticos entre la combinación de polímeros macroporosos monolíticos y estructuras dendríticas, resulta de gran interés.

#### 2.4. Referencias

- [1] P.J. Flory, Molecular Size Distribution in Three Dimensional Polymers. I. Gelation, *J. Am. Chem. Soc.* 63 (1941) 3083–3090.
- [2] P.J. Flory, Molecular size distribution in three dimensional polymers. II. Trifunctional branching units, *J. Am. Chem. Soc.* 63 (1941) 3091–3096.
- [3] P.J. Flory, Molecular size distribution in three dimensional polymers. III. Tetrafunctional branching units, *J. Am. Chem. Soc.* 63 (1941) 3096–3100.
- [4] E. Buhleier, W. Wehner, F. Vögtle, “Cascade”- and “Nonskid-Chain-like” Syntheses of Molecular Cavity Topologies, *Synthesis (Stuttg)*. 1978 (1978) 155–158.
- [5] M. Maciejewski, Concepts of Trapping Topologically by Shell Molecules, *J. Macromol. Sci. Part A - Chem.* 17 (1982) 689–703.
- [6] de Gennes, P.G., Hervet, H., Statistics of « starburst » polymers, *J. Phys. Lett.* 44 (1983) 351–360.
- [7] D. Tomalia, J. Dewald, M. Hall, S. Martin, P. Smith, Reprints of the 1st SPSJ International Polymer Conference, *Soc Polym Sci.* 65 (1984).
- [8] P.B. Smith, S.J. Martin, M.J. Hall, D.A. Tomalia, A characterization of the structure and synthetic reactions of polyamidoamine “Starburst” polymers, *Appl. Polym. Anal. Charact.* (1987) 357–385.
- [9] A.B. Padias, H.K. Hall Jr, D.A. Tomalia, J.R. McConnell, Starburst polyether dendrimers, *J. Org. Chem.* 52 (1987) 5305–5312.

- [10] A.M. Naylor, W.A. Goddard III, G.E. Kiefer, D.A. Tomalia, Starburst dendrimers. 5. Molecular shape control, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 2339–2341.
- [11] S.E. Friberg, M. Podzimek, D.A. Tomalia, D.M. Hedstrand, A non-aqueous lyotropic liquid crystal with a starburst dendrimer as a solvent, *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Inc. Nonlinear Opt.* 164 (1988) 157–165.
- [12] M.C. Moreno-Bondi, G. Orellana, N.J. Turro, D.A. Tomalia, Photoinduced electron-transfer reactions to probe the structure of starburst dendrimers, *Macromolecules.* 23 (1990) 910–912.
- [13] D.A. Tomalia, A.M. Naylor, W.A. Goddard, Starburst dendrimers: Molecular-level control of size, shape, surface chemistry, topology, and flexibility from atoms to macroscopic matter, *Angew. Chemie Int. Ed.* 29 (1990) 138–175.
- [14] G. Caminati, N.J. Turro, D.A. Tomalia, Photophysical investigation of starburst dendrimers and their interactions with anionic and cationic surfactants, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 8515–8522.
- [15] G.R. Newkome, Z. Yao, G.R. Baker, V.K. Gupta, Micelles. Part 1. Cascade molecules: a new approach to micelles. A [27]-arborol, *J. Org. Chem.* 50 (1985) 2003–2004.
- [16] G.R. Newkome, G.R. Baker, M.J. Saunders, P.S. Russo, V.K. Gupta, Z. Yao, J.E. Miller, K. Bouillion, Two-directional cascade molecules: synthesis and characterization of [9]-n-[9] arborols, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1986) 752–753.
- [17] G.R. Newkome, Z. Yao, G.R. Baker, V.K. Gupta, P.S. Russo, M.J. Saunders, Chemistry of micelles series. Part 2. Cascade molecules. Synthesis and characterization of a benzene [9]3-arborol, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 849–850.
- [18] K.L. Wooley, C.J. Hawker, J.M.J. Fréchet, Polymers with controlled molecular architecture: control of surface functionality in the synthesis of dendritic hyperbranched macromolecules using the convergent approach, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* (1991) 1059–1076.
- [19] C.J. Hawker, J.M.J. Fréchet, Control of surface functionality in the synthesis of dendritic macromolecules using the convergent-growth approach, *Macromolecules.* 23 (1990) 4726–4729.
- [20] C. Hawker, J.M.J. Fréchet, A new convergent approach to monodisperse dendritic macromolecules, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1990) 1010–1013.
- [21] C.J. Hawker, J.M.J. Fréchet, Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 7638–7647.

- [22] T.M. Miller, T.X. Neenan, Convergent synthesis of monodisperse dendrimers based upon 1, 3, 5-trisubstituted benzenes, *Chem. Mater.* 2 (1990) 346–349.
- [23] E.W. Kwock, T.X. Neenan, T.M. Miller, Convergent synthesis of monodisperse aryl ester dendrimers, *Chem. Mater.* 3 (1991) 775–777.
- [24] P.A. Gunatillake, G. Odian, D.A. Tomalia, Thermal polymerization of a 2-(carboxyalkyl)-2-oxazoline, *Macromolecules.* 21 (1988) 1556–1562.
- [25] Y.H. Kim, O.W. Webster, Water-Soluble Hyperbranched Polyphenylene: “A Unimolecular Micelle”?, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 4592–4593.
- [26] C.J. Hawker, R. Lee, J.M.J. Fréchet, J.M.J. Frechet, One-step synthesis of hyperbranched dendritic polyesters, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 4583–4588.
- [27] D.A. Tomalia, D.M. Hedstrand, M.S. Ferritto, Comb-burst dendrimer topology: new macromolecular architecture derived from dendritic grafting, *Macromolecules.* 24 (1991) 1435–1438.
- [28] M. Gauthier, M. Moeller, Uniform highly branched polymers by anionic grafting: arborescent graft polymers, *Macromolecules.* 24 (1991) 4548–4553.
- [29] D.A. Tomalia, J.M.J. Fréchet, Discovery of dendrimers and dendritic polymers: A brief historical perspective, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 40 (2002) 2719–2728.
- [30] A. Lederer, W. Burchard, T. Hartmann, J.S. Haataja, N. Houbenov, A. Janke, P. Friedel, R. Schweins, P. Lindner, Dendronized hyperbranched macromolecules: Soft matter with a novel type of segmental distribution, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 54 (2015) 12578–12583.
- [31] J. Canceill, J.C. Chambron, A. Collet, C. Dietrich-Buchecker, H.D. Durst, J.P. Dutasta, F.H. Kohnke, B. Lozach, J.P. Mathias, S. Misumi, *Supramolecular Chemistry I-Directed Synthesis and Molecular Recognition*, Springer Berlin Heidelberg, 1993.
- [32] G.M. Dykes, Dendrimers: a review of their appeal and applications, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76 (2001) 903–918.
- [33] S.M. Grayson, J.M.J. Frechet, Convergent dendrons and dendrimers: from synthesis to applications, *Chem. Rev.* 101 (2001) 3819–3868.
- [34] D.A. Tomalia, Dendrons/dendrimers: quantized, nano-element like building blocks for soft-soft and soft-hard nano-compound synthesis, *Soft Matter.* 6 (2010) 456–474.
- [35] F. Vögtle, G. Richardt, N. Werner, *Dendrimer Chemistry: Concepts, Syntheses, Properties, Applications*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany, 2009.
- [36] C.-H. Wong, S.C. Zimmerman, Orthogonality in organic, polymer, and supramolecular chemistry: from Merrifield to click chemistry, *Chem. Commun.* 49

- (2013) 1679–1695.
- [37] X.-X. Deng, F.-S. Du, Z.-C. Li, Combination of Orthogonal ABB and ABC Multicomponent Reactions toward Efficient Divergent Synthesis of Dendrimers with Structural Diversity, *ACS Macro Lett.* 3 (2014) 667–670.
- [38] D. Jishkariani, C.M. MacDermaid, Y.N. Timsina, S. Grama, S.S. Gillani, M. Divar, S.S. Yadavalli, R.-O. Moussodia, P. Leowanawat, A.M. Berrios Camacho, R. Walter, M. Goulian, M.L. Klein, V. Percec, Self-interrupted synthesis of sterically hindered aliphatic polyamide dendrimers, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114 (2017) E2275–E2284.
- [39] T. Kawaguchi, K.L. Walker, C.L. Wilkins, J.S. Moore, Double exponential dendrimer growth, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 2159–2165.
- [40] K.L. Wooley, C.J. Hawker, J.M.J. Fréchet, A “Branched-Monomer Approach” for the Rapid Synthesis of Dendrimers, *Angew. Chemie Int. Ed.* 33 (1994) 82–85.
- [41] M. Sowinska, Z. Urbanczyk-Lipkowska, Advances in the chemistry of dendrimers, *New J. Chem.* 38 (2014) 2168.
- [42] Z. Huang, J. Zhao, Z. Wang, F. Meng, K. Ding, X. Pan, N. Zhou, X. Li, Z. Zhang, X. Zhu, Combining Orthogonal Chain-End Deprotections and Thiol–Maleimide Michael Coupling: Engineering Discrete Oligomers by an Iterative Growth Strategy, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 56 (2017) 13612–13617.
- [43] S.D. Garcia Schejtman, V. Brunetti, M. Martinelli, M.C. Strumia, Chapter 3 – Chemistry of hybrid multifunctional and multibranched composites, in: *Hybrid Polym. Compos. Mater.*, 2017: pp. 31–63.
- [44] M. Mammen, S.-K. Choi, G.M. Whitesides, Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors, *Angew. Chemie Int. Ed.* 37 (1998) 2754–2794.
- [45] J.E. Stencel-baerenwald, K. Reiss, D.M. Reiter, T. Stehle, T.S. Dermody, The sweet spot : defining virus – sialic acid interactions, *Nat. Rev. Microbiol.* 12 (2014) 739–749.
- [46] A. Caminade, A. Ouali, The dendritic effect illustrated with phosphorus dendrimers, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 3890–3899.
- [47] J.I. Paez, M. Martinelli, V. Brunetti, M.C. Strumia, Dendronization: A useful synthetic strategy to prepare multifunctional materials, *Polymers (Basel)*. 4 (2012) 355–395.
- [48] Y. Zheng, S. Li, Z. Weng, C. Gao, Hyperbranched polymers: advances from synthesis to applications, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 4091–4130.
- [49] F.L. Hatton, P. Chambon, T.O. McDonald, A. Owen, S.P. Rannard, Hyperbranched polydendrons: a new controlled macromolecular architecture

- with self-assembly in water and organic solvents, *Chem. Sci.* 5 (2014) 1844–1853.
- [50] G. Zan, Q. Wu, Biomimetic and Bioinspired Synthesis of Nanomaterials/Nanostructures, *Adv. Mater.* 28 (2016) 2099–2147.
- [51] M.B. Sassin, J.W. Long, J.M. Wallace, D.R. Rolison, Routes to 3D conformal solid-state dielectric polymers: electrodeposition versus initiated chemical vapor deposition, *Mater. Horiz.* 2 (2015) 502–508.
- [52] M. Scheiner, T.J. Dickens, O. Okoli, Progress towards self-healing polymers for composite structural applications, *Polym. (United Kingdom)*. 83 (2016) 260–282.
- [53] Y. Zhuang, H. Deng, Y. Su, L. He, R. Wang, G. Tong, D. He, X. Zhu, Aptamer-Functionalized and Backbone Redox-Responsive Hyperbranched Polymer for Targeted Drug Delivery in Cancer Therapy, *Biomacromolecules*. 17 (2016) 2050–2062.
- [54] R. Soleyman, M. Adeli, Impact of dendritic polymers on nanomaterials, *Polym. Chem.* 6 (2015) 10–24.
- [55] M. Calderón, M.A. Quadir, M. Strumia, R. Haag, Functional dendritic polymer architectures as stimuli-responsive nanocarriers, *Biochimie*. 92 (2010) 1242–1251.
- [56] J.C. Cuggino, M. Calderon, C.I. Alvarez, M.C. Strumia, K.N. Silva, E.K. Penott-Chang, A.J. Muller, New dendronized polymers from acrylate Behera amine and their ability to produce visco-elastic structured fluids when mixed with CTAT worm-like micelles, *J. Colloid Interface Sci.* 357 (2011) 147–156.
- [57] R. Dong, Y. Zhou, X. Zhu, Supramolecular dendritic polymers: From synthesis to applications, *Acc. Chem. Res.* 47 (2014) 2006–2016.
- [58] M. Calderón, M. Strumia, Hyperbranched and hiperfunctionalized materials from dendritic chemistry, *Rev. Latinoam. Metal. Y Mater.* 33 (2013) 2–14.
- [59] X. Sun, J.-P. Lindner, B. Bruchmann, A.D. Schlüter, Synthesis of Neutral, Water-Soluble Oligo–Ethylene Glycol-Containing Dendronized Homo- and Copolymers of Generations 1, 1.5, 2, and 3, *Macromolecules*. 47 (2014) 7337–7346.
- [60] H. Esen, Synthesis and characterization of linear dendritic homo and copolymers acrylated behera amine, *Des. Monomers Polym.* 18 (2015) 745–752.
- [61] G.N. Rimondino, E. Miceli, M. Molina, S. Wedepohl, S. Thierbach, E. Rühl, M. Strumia, M. Martinelli, M. Calderón, Rational design of dendritic thermoresponsive nanogels that undergo phase transition under endolysosomal conditions, *J. Mater. Chem. B*. 5 (2017) 866–874.
- [62] A. Zhang, L. Okrasa, T. Pakula, A.D. Schlüter, Homologous series of dendronized polymethacrylates with a methyleneoxycarbonyl spacer between

- the backbone and dendritic side chain: Synthesis, characterization, and some bulk properties, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 6658–6666.
- [63] A. Zhang, B. Zhang, E. Wächtersbach, M. Schmidt, A.D. Schlüter, Efficient Synthesis of High Molar Mass, First- to Fourth-Generation Distributed Dendronized Polymers by the Macromonomer Approach, *Chem. - A Eur. J.* 9 (2003) 6083–6092.
- [64] A. Zhang, L. Wei, A.D. Schlüter, Narrowly distributed dendronized polymethacrylates by reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization, *Macromol. Rapid Commun.* 25 (2004) 799–803.
- [65] K.O. Kim, T.-L. Choi, Synthesis of Rod-Like Dendronized Polymers Containing G4 and G5 Ester Dendrons via Macromonomer Approach by Living ROMP, *ACS Macro Lett.* 1 (2012) 445–448.
- [66] A. Nyström, M. Malkoch, I. Furó, D. Nyström, K. Unal, P. Antoni, G. Vamvounis, C. Hawker, K. Wooley, E. Malmström, A. Hult, Characterization of Poly(norbornene) Dendronized Polymers Prepared by Ring-Opening Metathesis Polymerization of Dendron Bearing Monomers, *Macromolecules.* 39 (2006) 7241–7249.
- [67] S. Rajaram, T.-L. Choi, M. Rolandi, J.M.J. Fréchet, Synthesis of Dendronized Diblock Copolymers via Ring-Opening Metathesis Polymerization and Their Visualization Using Atomic Force Microscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 9619–9621.
- [68] H. Jung, T.P. Carberry, M. Weck, Synthesis of First- and Second-Generation Poly(amide)-Dendronized Polymers via Ring-Opening Metathesis Polymerization, *Macromolecules.* 44 (2011) 9075–9083.
- [69] Z.T. Ball, K. Sivula, J.M.J. Fréchet, Well-Defined Fullerene-Containing Homopolymers and Diblock Copolymers with High Fullerene Content and Their Use for Solution-Phase and Bulk Organization, *Macromolecules.* 39 (2006) 70–72.
- [70] Y. Fu, Y. Li, J. Li, S. Yan, Z. Bo, High Molecular Weight Dendronized Poly(fluorene)s with Peripheral Carbazole Groups: Synthesis, Characterization, and Properties, *Macromolecules.* 37 (2004) 6395–6400.
- [71] Z. Fei, Y. Han, Z. Bo, Synthesis of porphyrin-Embedded dendronized polymers by Suzuki polycondensation, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 46 (2008) 4030–4037.
- [72] Y. Lyu, D. Cui, H. Sun, Y. Miao, H. Duan, K. Pu, Dendronized Semiconducting Polymer as Photothermal Nanocarrier for Remote Activation of Gene Expression, *Angew. Chemie.* 56 (2017) 9155–9159.

- [73] T. Kaneko, T. Horie, M. Asano, T. Aoki, E. Oikawa, Polydendron: Polymerization of Dendritic Phenylacetylene Monomers, *Macromolecules*. 30 (1997) 3118–3121.
- [74] P.R.L. Malenfant, J.M.J. Fréchet, Dendrimers as Solubilizing Groups for Conducting Polymers: Preparation and Characterization of Polythiophene Functionalized Exclusively with Aliphatic Ether Convergent Dendrons, *Macromolecules*. 33 (2000) 3634–3640.
- [75] R.C. Advincula, Hybrid organic-inorganic nanomaterials based on polythiophene dendronized nanoparticles, *Dalt. Trans.* (2006) 2778–2784.
- [76] Z. Bao, K.R. Amundson, A.J. Lovinger, Poly(phenylenevinylene)s with Dendritic Side Chains: Synthesis, Self-Ordering, and Liquid Crystalline Properties, *Macromolecules*. 31 (1998) 8647–8649.
- [77] A. Nyström, A. Hult, Dendronized polymers with tailored surface groups, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 43 (2005) 3852–3867.
- [78] H. Kim, K.-T. Bang, I. Choi, J.-K. Lee, T.-L. Choi, Diversity-Oriented Polymerization: One-Shot Synthesis of Library of Graft and Dendronized Polymers by Cu-Catalyzed Multicomponent Polymerization, *J. Am. Chem. Soc.* 138 (2016) 8612–8622.
- [79] H. Yang, R. Tang, W. Wu, W. Liu, Q. Guo, Y. Liu, S. Xu, S. Cao, Z. Li, A series of dendronized hyperbranched polymers with dendritic chromophore moieties in the periphery: convenient synthesis and large nonlinear optical effects, *Polym. Chem.* 7 (2016) 4016–4024.
- [80] A. Zhang, L. Shu, Z. Bo, A.D. Schlüter, Dendronized polymers: Recent progress in synthesis, *Macromol. Chem. Phys.* 204 (2003) 328–339.
- [81] A. Dahan, M. Portnoy, Pd catalysis on dendronized solid support: Generation effects and the influence of the backbone structure, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 5860–5869.
- [82] B. Huang, D.A. Tomalia, Poly(ether) dendrons possessing phosphine focal points for stabilization and reduced quenching of luminescent quantum dots, *Inorganica Chim. Acta.* 359 (2006) 1961–1966.
- [83] T. Joon Cho, R.A. Zangmeister, R.I. MacCuspie, A.K. Patri, V.A. Hackley, Newkome-type dendron-stabilized gold nanoparticles: Synthesis, reactivity, and stability, *Chem. Mater.* 23 (2011) 2665–2676.
- [84] C. Ozawa, H. Hojo, Y. Nakahara, H. Katayama, K. Nabeshima, T. Akahane, Y. Nakahara, Synthesis of glycopeptide dendrimer by a convergent method, *Tetrahedron.* 63 (2007) 9685–9690.
- [85] S. Han, T. Yoshida, T. Uryu, Synthesis of a new polylysine-dendritic

- oligosaccharide with alkyl spacer having peptide linkage, *Carbohydr. Polym.* 69 (2007) 436–444.
- [86] M. Kröger, O. Peleg, A. Halperin, From dendrimers to dendronized polymers and forests: Scaling theory and its limitations, *Macromolecules*. 43 (2010) 6213–6224.
- [87] A.A. Aldana, A. González, M.C. Strumia, M. Martinelli, Preparation and characterization of chitosan/genipin/poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) films for controlled release drugs, *Mater. Chem. Phys.* 134 (2012) 317–324.
- [88] S.D. Garcia Schejtman, R. Toselli, M.C. Strumia, M. Martinelli, Gelatin films dendronized selectively on one side: enhancing antimicrobial properties and water repellence, *Polym. Bull.* 72 (2015) 3043–3062.
- [89] A.A. Aldana, B. Barrios, M. Strumia, S. Correa, M. Martinelli, Dendronization of chitosan films: Surface characterization and biological activity, *React. Funct. Polym.* 100 (2016) 18–25.
- [90] B. Ziem, H. Thien, K. Achazi, C. Yue, D. Stern, K. Silberreis, M.F. Gholami, F. Beckert, D. Gröger, R. Mülhaupt, J.P. Rabe, A. Nitsche, R. Haag, Highly Efficient Multivalent 2D Nanosystems for Inhibition of Orthopoxvirus Particles, *Adv. Healthc. Mater.* 5 (2016) 2922–2930.
- [91] C. Wu, C. Böttcher, R. Haag, Enzymatically crosslinked dendritic polyglycerol nanogels for encapsulation of catalytically active proteins., *Soft Matter*. 11 (2015) 972–80.
- [92] X. Zeng, Y. Zhang, A.M. Nyström, Endocytic uptake and intracellular trafficking of bis-MPA-based hyperbranched copolymer micelles in breast cancer cells, *Biomacromolecules*. 13 (2012) 3814–3822.
- [93] X. Zeng, Y. Zhang, Z. Wu, P. Lundberg, M. Malkoch, A.M. Nyström, Hyperbranched copolymer micelles as delivery vehicles of doxorubicin in breast cancer cells, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 50 (2012) 280–288.
- [94] M. Jaćkowska, S. Bocian, B. Buszewski, Dendrimer modified silica gel for anion exchange chromatography: synthesis, characterization and application, *Analyst*. 137 (2012) 4610.
- [95] B. Buszewski, M. Jezierska, B. Ostrowska-Gumkowska, Silicon dioxide surface modified with cholesterol derivatives, *Mater. Chem. Phys.* 72 (2001) 30–41.
- [96] S. Lei, S. Yu, C. Zhao, Preparation of a Ribonucleic Acid –( Polyamidoamine )– ( Zirconia – Urea-Formaldehyde Resin ) High-Performance Liquid Affinity Chromatographic Stationary Phase, 39 (2001) 280–286.
- [97] F.H. Ling, V. Lu, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Effect of multivalency on the performance of enantioselective separation media for chiral HPLC prepared by

- linking multiple selectors to a porous polymer support via aliphatic dendrons, *J. Org. Chem.* 67 (2002) 1993–2002.
- [98] M. Martinelli, M. Calderón, C.I. Alvarez I, M.C. Strumia, Functionalised supports with sugar dendritic ligand, *React. Funct. Polym.* 67 (2007) 1018–1026.
- [99] B. Buszewski, S. Noga, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 231–247.
- [100] M. Godejohann, Hydrophilic interaction chromatography coupled to nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectroscopy-A new approach for the separation and identification of extremely polar analytes in bodyfluids, *J. Chromatogr. A.* 1156 (2007) 87–93.

## CAPÍTULO 3

### OBJETIVOS GENERALES

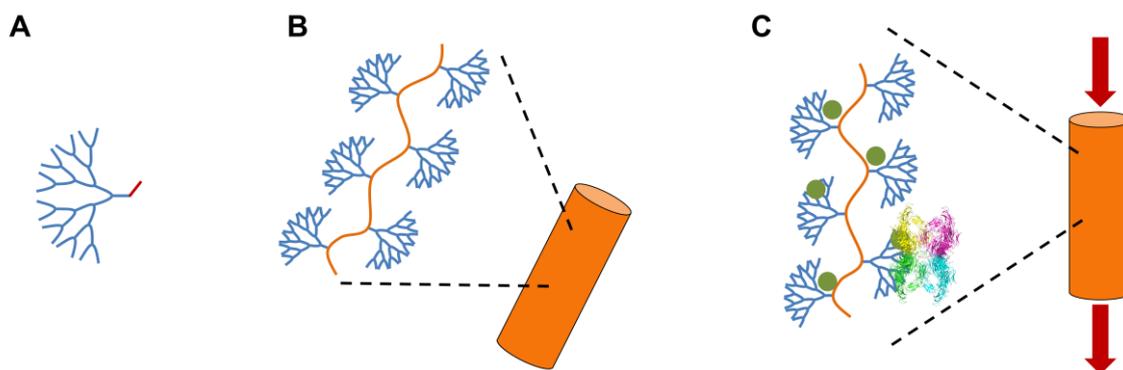
Uno de los desafíos más importantes en la ciencia de los materiales poliméricos es generar estructuras capaces de cumplir funciones específicas. Para ello, el diseño, la síntesis e ingeniería detrás de dichos materiales busca inspirarse en la naturaleza misma, lo cual además requiere de un elevado control de sus propiedades. En la ciencia de los soportes poliméricos, uno de los desafíos más importantes consiste en obtener un material con buenas propiedades de transporte de masa, lo cual se genera mediante materiales altamente porosos. Por otra parte, cuando el material final requiere de propiedades de interacción específica (por ejemplo, un ligando), las estructuras dendríticas resultan en una potencial alternativa.

En línea con esto, las moléculas dendríticas poseen distintas propiedades fisicoquímicas, pero entre ellas una destacable es el fenómeno de la multivalencia, lo cual mejora las posibles interacciones debido a su multifuncionalidad.

El *Objetivo general* de este trabajo de Tesis Doctoral fue desarrollar nuevos materiales porosos para su aplicación como soportes en Cromatografía de Afinidad, formados por polímeros convencionales y por estructuras dendríticas, que le confieran nuevas propiedades (multifuncionalidad) al material final, para así favorecer las posibles interacciones bioespecíficas del futuro soporte.

Para ello, se propusieron para esta Tesis Doctoral los siguientes *objetivos específicos*:

1. Adquirir destreza en la síntesis y caracterización de moléculas dendríticas convenientemente funcionalizadas para ser empleadas como posibles candidatos en la preparación de materiales macroporosos (Fig. 3.1A).
2. Obtener y caracterizar nuevos materiales porosos dendronizados, mediante distintas metodologías sintéticas (Fig. 3.1B): (i) barras monolíticas macroporosas mediante polimerización en solución y (ii) criogeles dendronizados supermacroporosos.
3. Evaluar los materiales sintetizados como soportes en Cromatografía de Afinidad.



**Fig. 3.1.** (A) esquema general de un macromonomero dendrítico; (B) polímero dendronizado formando un *monolith*; (C) soporte poroso interactuando con un ligando afín y capaz de retener una proteína de estudio.

El abordaje de los distintos objetivos se realizó en etapas. En primera instancia se realizó la síntesis de nuevos macromonomeros dendríticos (MD), con diversas funcionalidades, tanto en la periferia como en el punto focal. Luego se planteó el diseño y preparación de los materiales macroporosos combinando monómeros clásicos con las estructuras dendríticas sintetizadas. Estos materiales fueron empleados como soportes para la inmovilización de iones metálicos como ligandos específicos, para estudiar finalmente la capacidad de adsorción de dos proteínas modelo: Inmunoglobulina G (IgG) y alfa-2-macroglobulina ( $\alpha$ 2M).

En base a esto, en este trabajo de Tesis se desarrollaron los objetivos descriptos mediante tres pilares fundamentales: (i) Síntesis de monómeros dendríticos (*Sección II*); (ii) Síntesis de polímeros dendronizados macroporosos (*Sección III*) y (iii) aplicación de los materiales obtenidos (*Sección IV*).



# SECCIÓN II

---

## Moléculas dendríticas



# CAPÍTULO 4

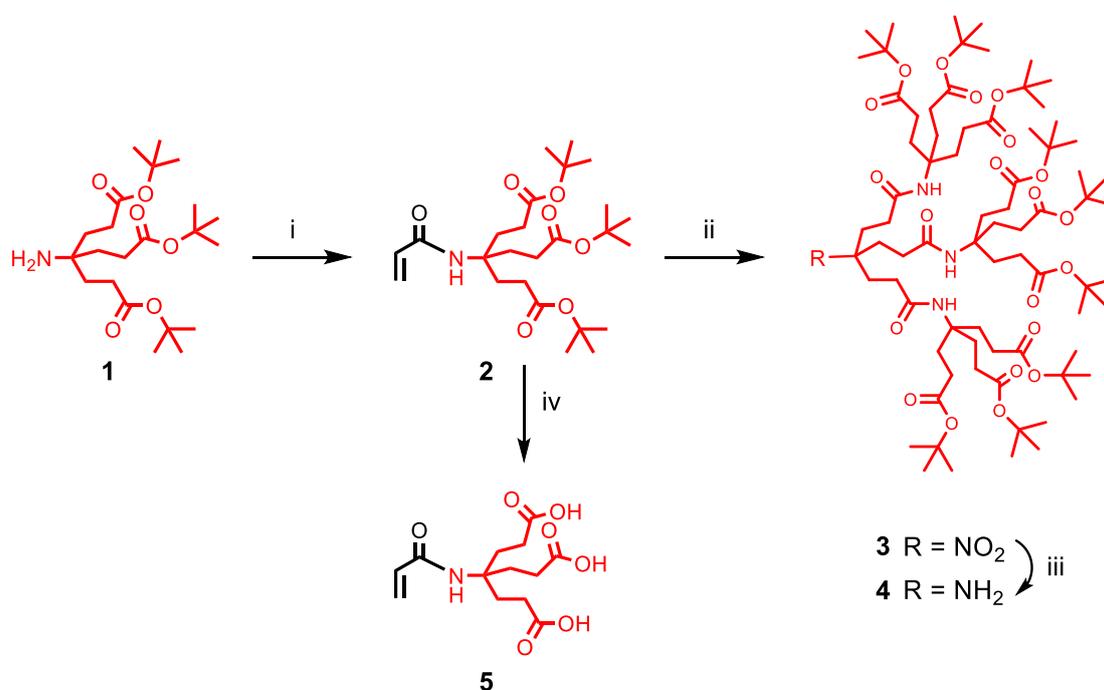
## SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MOLÉCULAS DENDRÍTICAS CON DIVERSAS FUNCIONALIDADES

### 4.1. Objetivos específicos

Basándose en lo anteriormente dicho, se planteó como objetivo específico sintetizar y caracterizar moléculas dendríticas con un punto focal polimerizable (monómero dendrítico), a partir de distintos dendrones comerciales, como amina de Behera (AB) y Weisocianato (Weis). Para ello se utilizaron moléculas con grupos reactivos como ácido acrílico (AAc), 2-hidroxiethyl metacrilato (HEMA) y 2-aminoethyl metacrilato (AEMA). La caracterización de todas las moléculas obtenidas se realizó mediante diferentes metodologías espectroscópicas.

### 4.2. Resultados y discusión

#### 4.2.1. Obtención de macromonómeros dendríticos (MDs) a partir de un dendrón comercial con punto focal amino

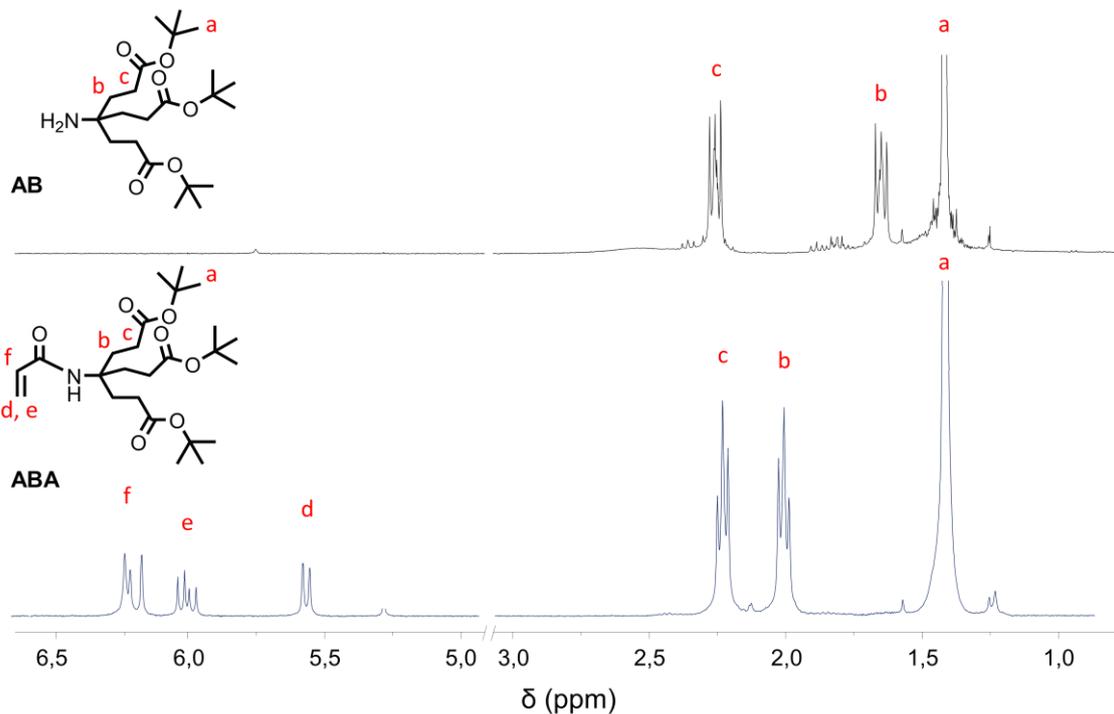
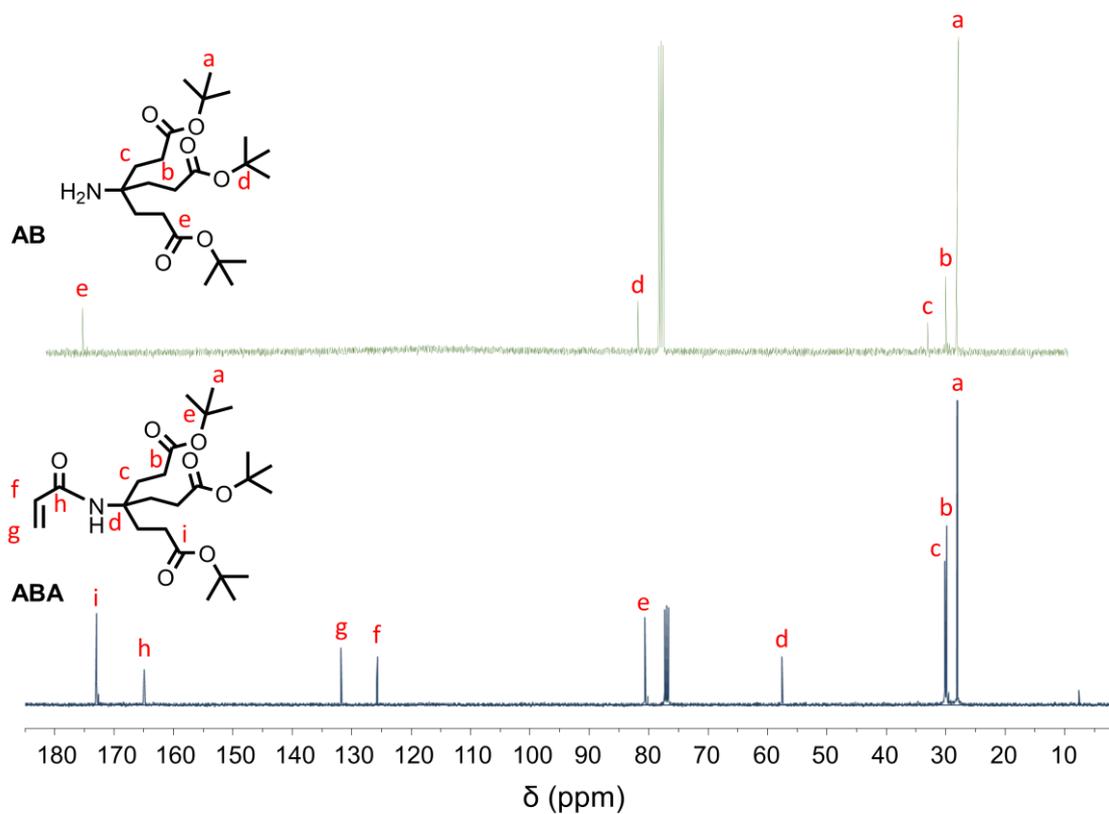


**Esquema 4.1** Obtención de diferentes estructuras dendríticas; **(i)**  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CH}_2=\text{CHCOCl}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 4 h; **(ii)**  $\text{CH}_3\text{NO}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$ , tetrametil guanidina (TMG),  $50^\circ\text{C}$ , 24 h; **(iii)**  $\text{EtOH}$ ,  $\text{H}_2/\text{Pd}$  (65 psi),  $50^\circ\text{C}$ , 12h; **(iv)** ácido fórmico, 24 h.

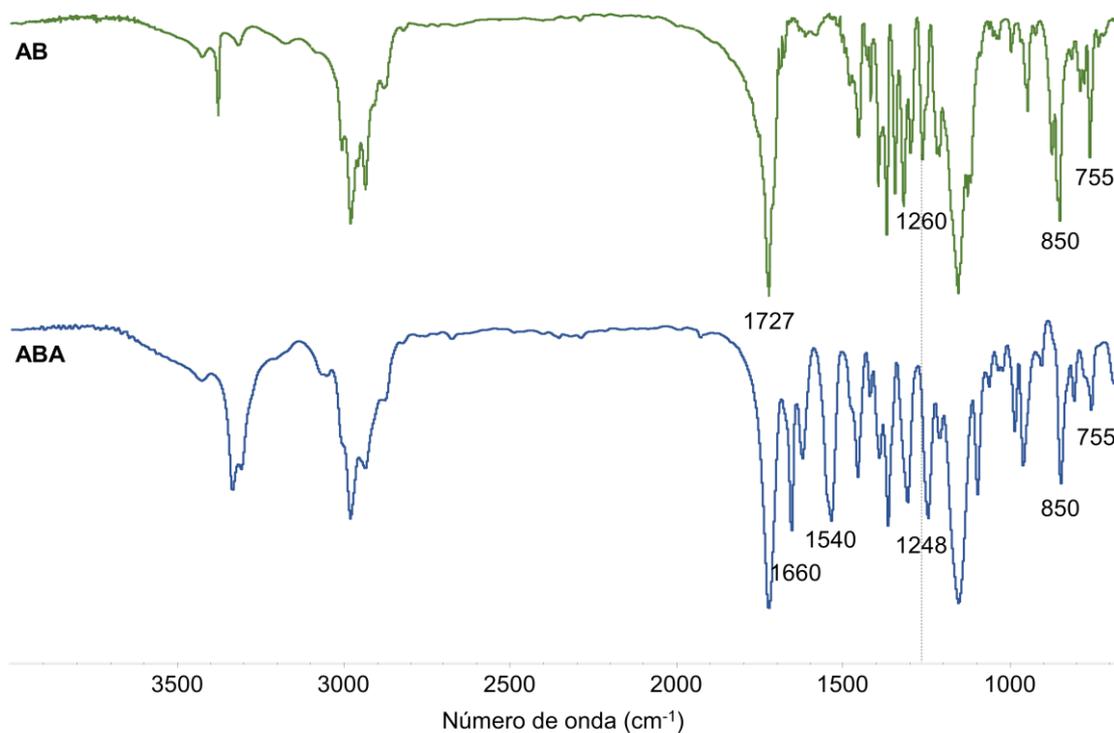
#### 4.2.1.1. Síntesis de di-*t*-butil 4-acriloilamino-4-(2-*t*-butoxicarboniletil)heptanodioato, amina de Behera acrilada, ABA

La metodología llevada a cabo consistió en reacciones químicas sencillas, con pocos pasos sintéticos; la síntesis se basó en el trabajo reportado por Newkome y colaboradores [1], con modificaciones. Las reacciones consistieron en la modificación de un grupo amino para formar una acrilamida. Para ello, se realizó una acrilación de amina de Behera (**1**) con un equivalente de cloruro de acilo (obtenido *in situ*, a partir de ácido acrílico y cloruro de benzoilo), para dar una amida *N*-sustituida (**2**) con altos rendimientos, como se muestra en el Esquema 4.1. Debido a que la reacción entre un cloruro de acilo o cloruro de ácido con un nucleófilo libera HCl al medio, fue necesario utilizar un agente neutralizador, como trietilamina (TEA), que posee características ligeramente básicas generando cloruro de trietilamonio. Una vez finalizada la reacción y secado el producto, se observó una coloración rojiza causada efectivamente por la presencia de la sal de la amina cuaternaria que permanece soluble en el solvente de trabajo (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Para eliminar éste y otros posibles subproductos (por ejemplo, dendrón sin reaccionar), posteriormente se realizó una purificación con una columna de SiO<sub>2</sub>, obteniéndose finalmente el producto **2** (sólido blanco, con un 95 % de rendimiento).

Mediante espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H (Fig. 4.1) se confirmó la formación de acrilamida (**2**) por la aparición de los picos correspondientes al grupo vinilo a 5,58; 6,03 y 6,21 ppm (H<sub>2</sub>C=CHR). En comparación con el espectro de AB, también se observó un corrimiento (acercamiento) de las señales correspondiente a los grupos metileno (b y c de cada ramificación) del dendrón (de 1,65 a 2,03 ppm) debido al efecto producido por la modificación del punto focal. El espectro de RMN <sup>13</sup>C (Fig. 4.2) también confirmó la acrilación por la aparición del carbono carbonílico de la amida formada a 165,1 ppm y la presencia del grupo vinilo por las señales de carbono a 126,2 y 132,0 ppm. Análogamente, a los espectros de protones, se observó un acercamiento de las señales de los grupos metileno en C<sub>b</sub> y C<sub>c</sub>, debido a la influencia del nuevo grupo funcional.

Fig. 4.1. Espectros RMN  $^1\text{H}$  de AB y ABA.Fig. 4.2 Espectros RMN  $^{13}\text{C}$  de AB y ABA.

Otra manera de corroborar la obtención del producto es mediante espectroscopia FT-IR (Fig 4.3). La molécula AB posee señales características de una amina primaria, estiramiento N-H a  $3400-3300\text{ cm}^{-1}$ , estiramiento C=O de un grupo éster a  $1727\text{ cm}^{-1}$ , estiramiento C-N a  $1260\text{ cm}^{-1}$ , y dos bandas intensas a  $850$  y  $755\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a vibraciones de enlace de los grupos *t*-butilo de la periferia del dendrón. La modificación del punto focal a amida generó cambios muy marcados en el espectro del producto; las nuevas señales observadas se correspondieron al estiramiento N-H de amida a  $3300\text{ cm}^{-1}$ , estiramiento NHC=O (amida I) a  $1660\text{ cm}^{-1}$  y la deformación NH y N-C=O (amida II) a  $1540\text{ cm}^{-1}$ . Además, se observó el corrimiento de la señal de estiramiento C-N a  $1248\text{ cm}^{-1}$ , lo que correspondió a un cambio en el entorno químico de dicho enlace, indicando así la formación del producto amida (**2**). Los valores observados de número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) en ambos espectros IR, se corresponden con lo esperado para aminas y amidas que presentan interacciones de puente hidrógeno [7].

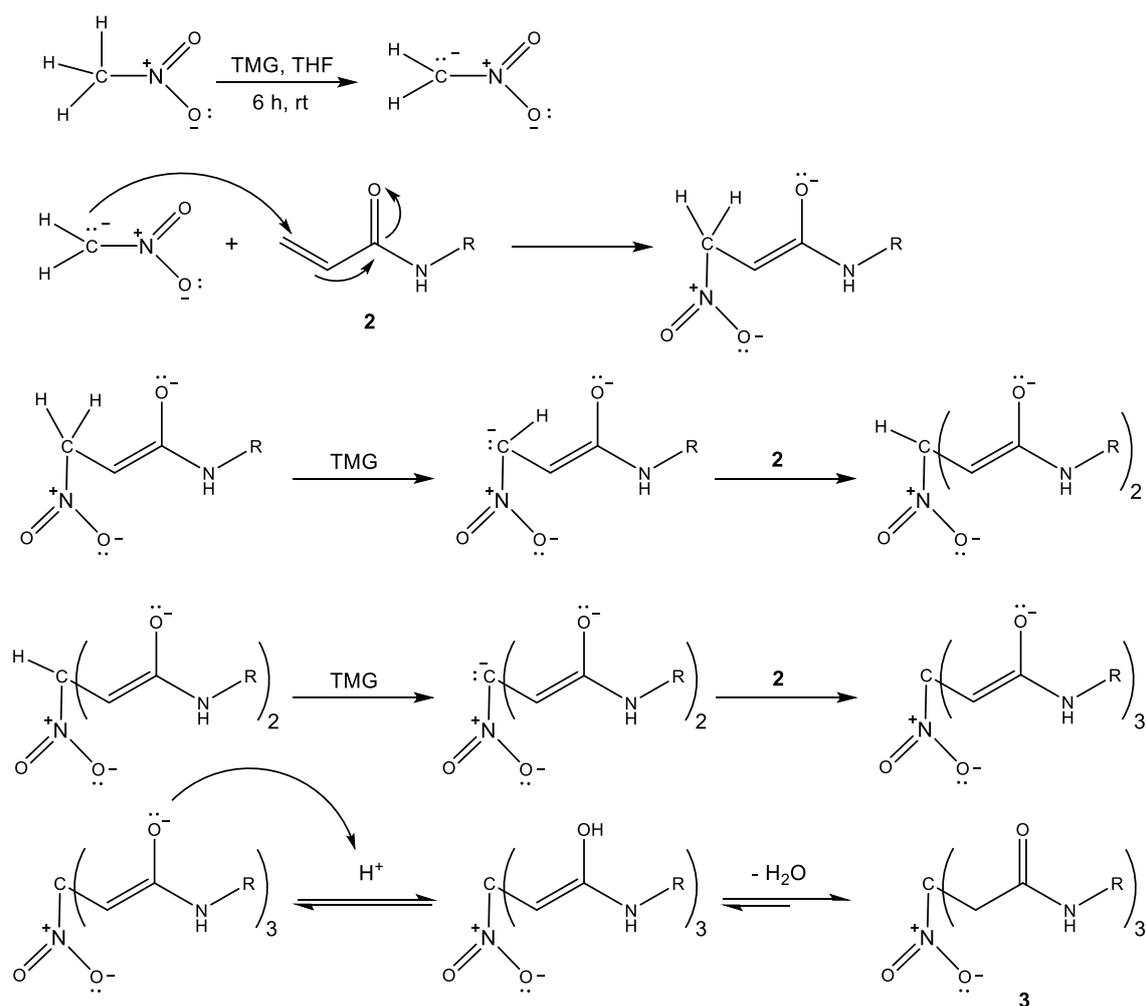


**Fig. 4.3** Espectros FT-IR de AB y ABA.

#### 4.2.1.2. Síntesis de dendrón nitro de segunda generación, NPD

Con el objeto de aumentar la generación dendrítica (G) del monómero previamente obtenido, se llevó a cabo una adición 1,4 (adición conjugada o adición de Michael) de un equivalente de  $\text{MeNO}_2$  a tres equivalentes de la acrilamida **2**, en presencia de TMG (base), en THF. La reacción consistió en la formación del anión

nitronato en una primera etapa, por efecto de un exceso de base fuerte. Luego, al adicionarse el producto (2), ocurre la adición al doble enlace del anión previamente formado y consecutivas desprotonaciones sobre el carbono unido al grupo nitro, para generar en total tres adiciones 1,4 sobre la acrilamida. En una etapa posterior, el agregado de medio ácido (HCl 5%) protona los aniones enolato, donde su forma ceto es finalmente el producto nitro dendrón de segunda generación (NPD, 3), obtenido como un sólido amarillento (86 % de rendimiento). El mecanismo aquí mencionado se muestra en el Esquema 4.2.



**Esquema 4.2** Reacción de obtención del NPD 3 por adición 1,4 de nitrometano al reactante 2;  $\text{R}=\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOC}(\text{CH}_3)_3)_3$ .

La formación del producto final fue comprobada mediante RMN  $^{13}\text{C}$  (Fig. 4.4), donde se observa un corrimiento de la señal carbono carbonílico de amida a valores superiores (de 165,1 ppm en ABA a 170,1 ppm en NPD) y la aparición de una nueva señal a 87,4 ppm correspondiente a un carbono cuaternario ( $\text{R}_3\text{CNO}_2$ ). Cabe destacar que el espectro correspondiente muestra una señal a 74,7 ppm característica del

MeNO<sub>2</sub>, indicando restos del reactivo sin reaccionar, el cual no se pudo eliminar durante la purificación correspondiente.

#### 4.2.1.3. Síntesis de dendrón amino de segunda generación, G2-NH<sub>2</sub>

La hidrogenación catalítica del producto nitro dio como resultado una estructura dendrítica de segunda generación con un punto focal amino. Se confirmó su obtención mediante RMN <sup>13</sup>C, observándose el corrimiento del carbono cuaternario (R<sub>3</sub>CNO<sub>2</sub>) de 87,4 ppm a 54,0 ppm (R<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>), como se observa en la Fig. 4.4. Cabe mencionar que los espectros de protones y de IR de los compuestos antes (**3**) y después (**4**) de la hidrogenación, no presenta diferencias significativas que permitan un análisis comparativo entre ambos.

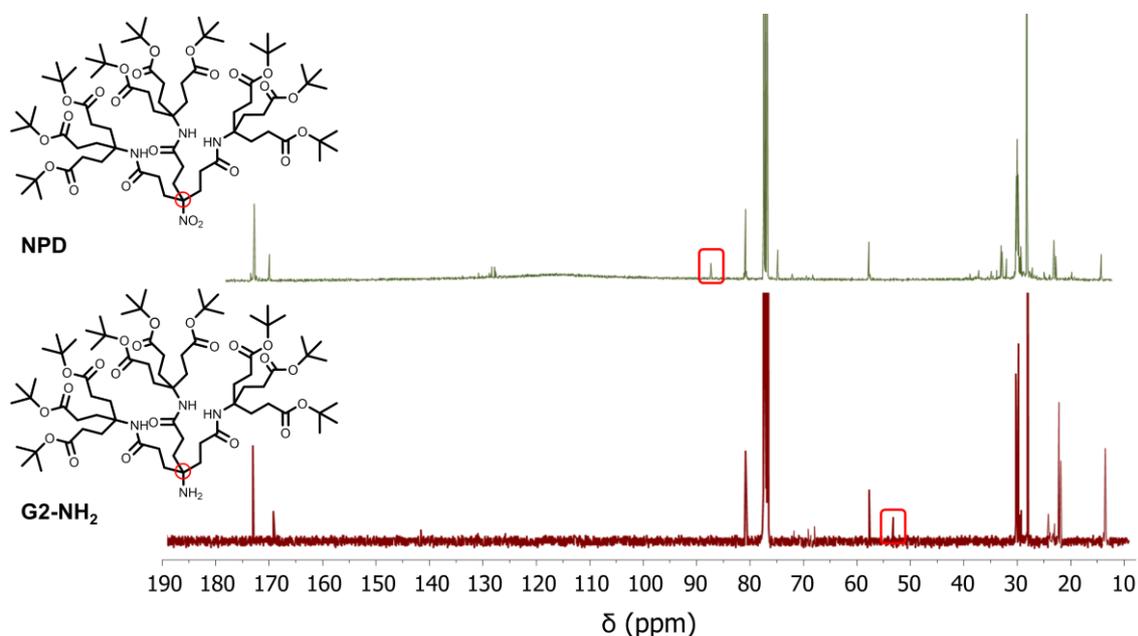


Fig. 4.4. Espectro de RMN <sup>13</sup>C de NPD y G2-NH<sub>2</sub>.

#### 4.2.1.4. Síntesis de amina de Behera acrilada hidrolizada, ABAh

A partir del monómero dendrítico ABA, se llevó a cabo la hidrólisis de los grupos *t*-butilo con el fin de obtener ahora grupos hidrofílicos en la periferia. Mediante resonancia magnética nuclear, se observó la desaparición de las señales correspondientes a los grupos *t*-butilo en el producto (**5**), a 1,43 ppm en RMN <sup>1</sup>H como la desaparición de una de las señales entre 28-30 ppm en RMN <sup>13</sup>C, tal como se muestra en la Fig. 4.5. Los espectros además mostraron que las señales del grupo vinilo no

presentó cambios, lo que indica que las condiciones de hidrólisis no afectan al doble enlace.

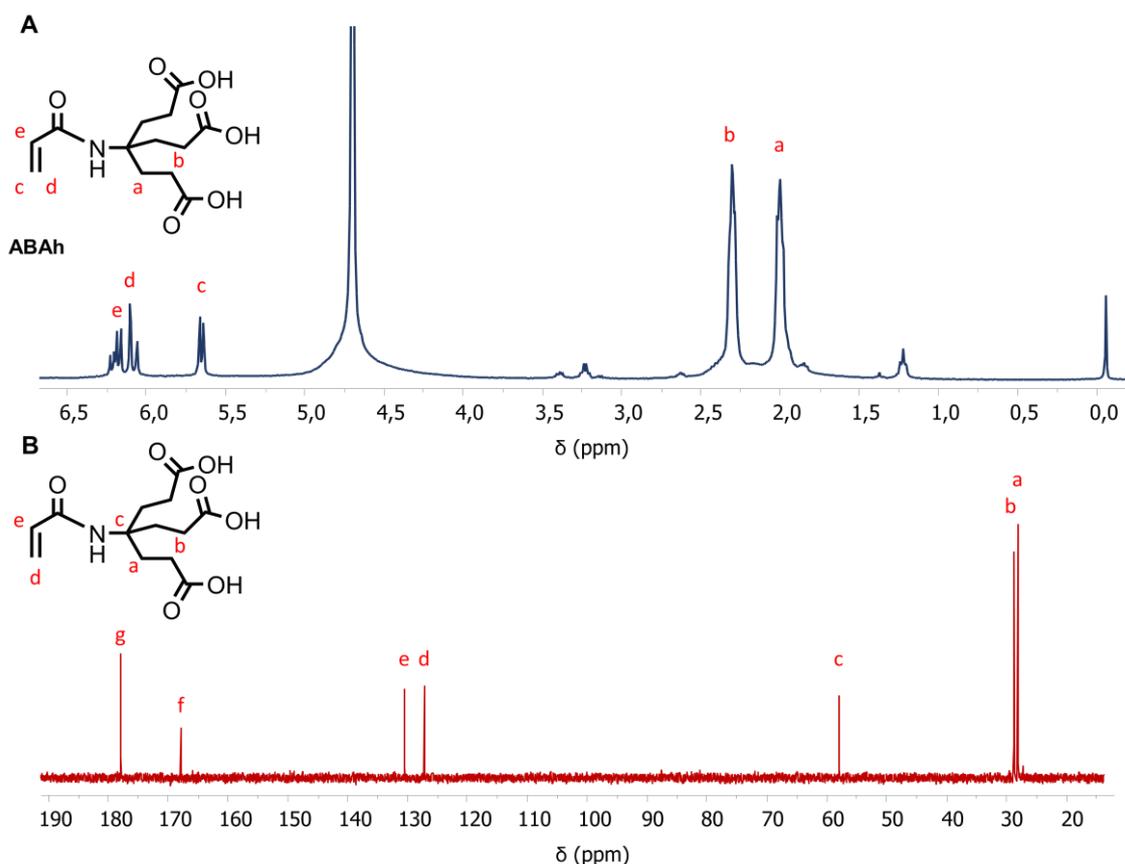
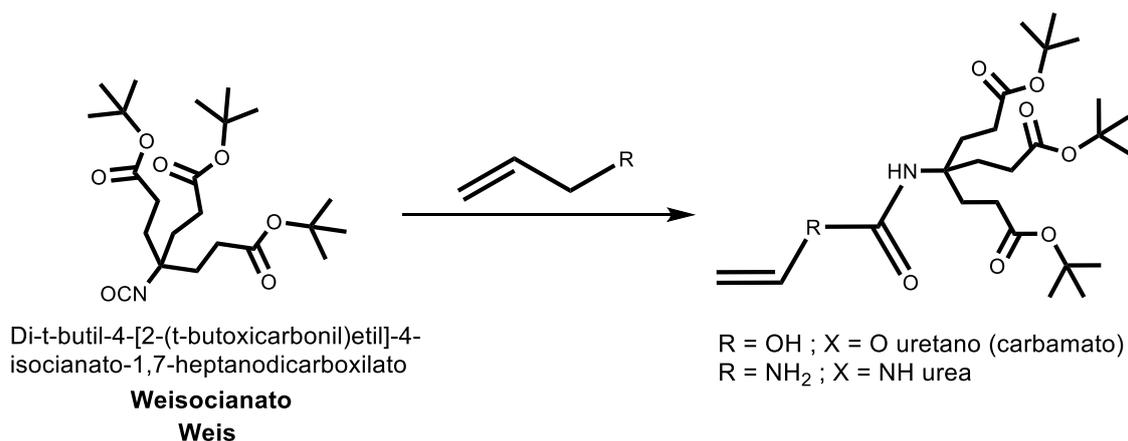


Fig. 4.5. (A) Espectro RMN  $^1\text{H}$  y (B) RMN  $^{13}\text{C}$  de ABAh.

#### 4.2.2. Obtención de monómeros dendríticos a partir de un dendrón con punto focal isocianato

El grupo funcional isocianato (NCO) contiene un átomo de carbono altamente electrofílico que puede ser atacado por diferentes nucleófilos como por ejemplo grupos hidroxilo y amina, es decir, grupos con hidrógenos lábiles (Esquema 4.3) [2]. La formación de enlaces uretano (-OCONH-) o urea (-NHCONH-) a partir de Weis bajo distintas condiciones de reacción, ya ha sido estudiada en nuestro grupo [3,4]. Generalmente, las reacciones con isocianatos son catalizadas por laurato de dibutilestaño. Debido a que la reactividad frente a otras moléculas depende de la nucleofiliidad del sustrato, las aminas primarias son en general mucho más reactivas que los alcoholes primarios [2,5,6]. Se llevó a cabo la síntesis de diferentes estructuras a partir de Weis y de distintos alcoholes y aminas primarias, evaluando las mejores condiciones de reacción.

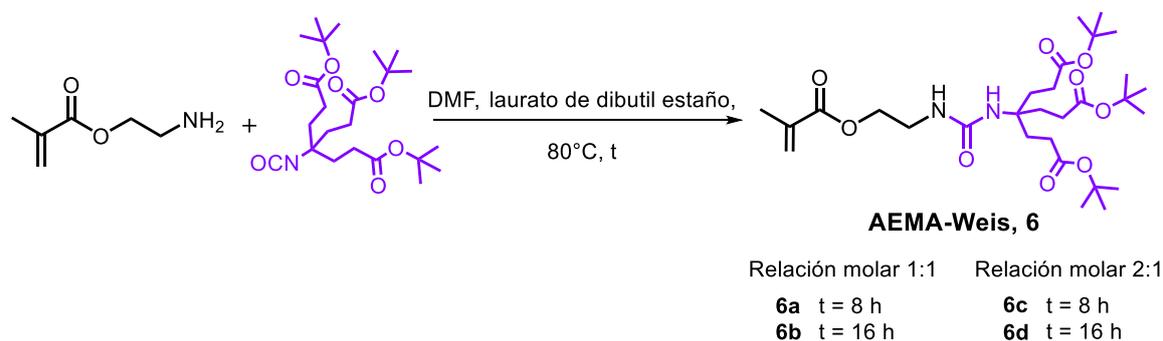
La principal diferencia entre esta serie de productos y los previamente descritos (2 y 5) es la inclusión de un grupo etilenoxi ( $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ). Este grupo actúa como espaciador entre las ramificaciones del dendrón y el grupo vinílico (polimerizable), ya que en principio este espaciador podría facilitar la polimerización del monómero dendrítico, permitiendo un mayor largo de cadena y por consiguiente mayores masas moleculares. Esto también permitiría generar más centros de libre rotación en la molécula por la presencia de más átomos de carbono con hibridación  $\text{sp}^3$ .



**Esquema 4.3.** Reacción general de obtención de productos a partir de Weis y un alcohol o amina primaria.

#### 4.2.2.1. Síntesis de di-t-butil-4-[3-(t-butoxi)-3-oxopropil]-4-(((2-(metacrililoiloxi)etoxi)carbonil)ureido)hepanodiato, AEMA-Weis

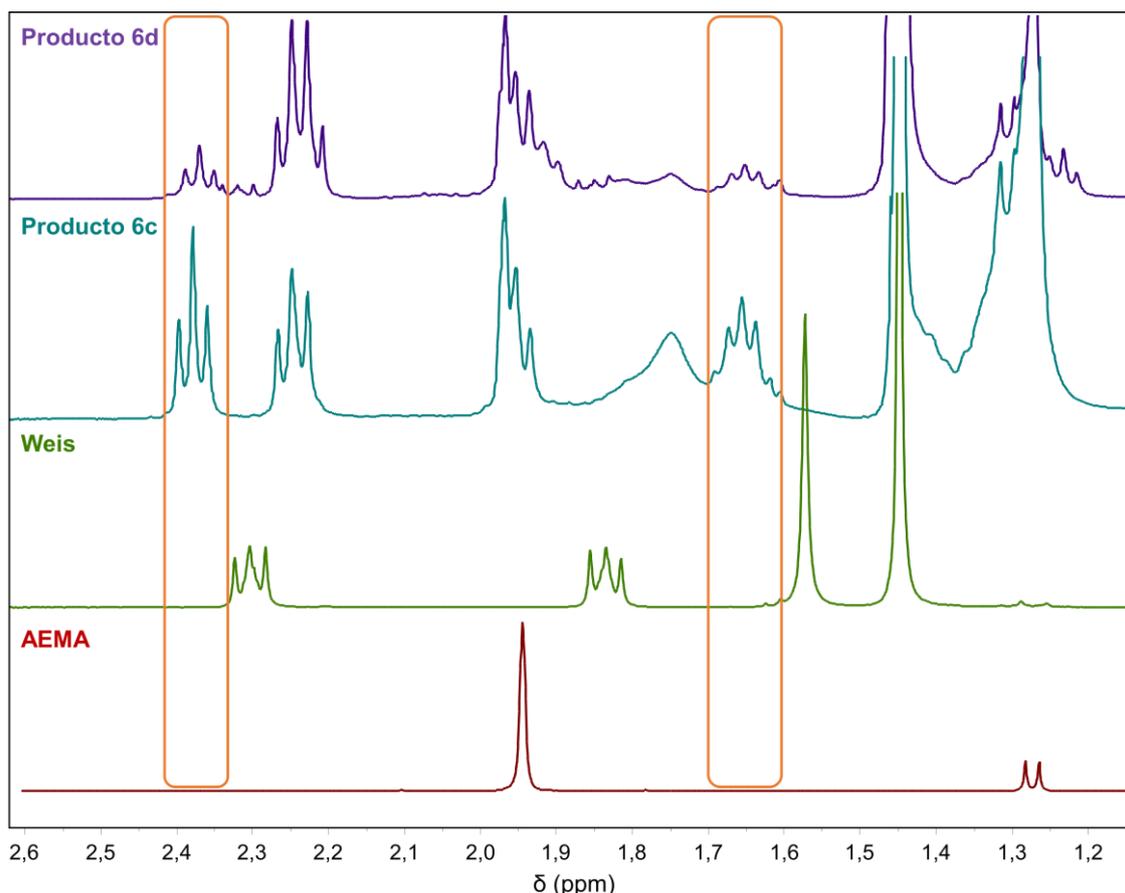
Como se observa en el Esquema 4.4, se evaluaron diferentes condiciones de reacción, variando en una primera etapa la relación molar y, luego el tiempo de reacción.



**Esquema 4.4.** Reacción de obtención de AEMA-Weis.

Para corroborar la formación del producto AEMA-Weis, la reacción se controló por cromatografía en placa delgada (TLC) empleando como fase móvil una mezcla de  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (95:5). Cuando la relación estequiométrica es 1:1, se observó que (tanto a 8 como 16 h) no hubo formación de productos. Debido a esto, se utilizó un exceso de

AEMA a partir de una relación AEMA:Weis 2:1; en este caso, a 8 y a 16 h de reacción (**6c** y **6d**, respectivamente) se observó la formación de un nuevo producto, pero no fue posible aislarlo debido a complicaciones en su purificación por columna. Analizando los espectros de resonancia magnética nuclear del crudo de reacción parcialmente purificado, se observaron señales que indicaron la formación de un nuevo producto: en el caso de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 4.6), se realizó la comparación de los correspondientes a AEMA, Weis y al crudo de reacción.



**Fig. 4.6.** Comparación de espectros RMN  $^1\text{H}$  de reactivos y los productos de reacción de obtención de AEMA-Weis a 8 y 16 h de reacción. El espectro AEMA se realizó en  $\text{D}_2\text{O}$ , mientras que los demás en  $\text{CDCl}_3$ .

La aparición de nuevas señales entre 1,5-2,4 ppm indicaron la formación de un nuevo producto. Cuando Weis reacciona con AEMA, el entorno químico de los grupos metileno propios de la estructura dendrítica se verá afectado, y por consiguiente, se modificará el corrimiento de las señales correspondientes. Además, el dendrón sin reaccionar también aparece a frecuencias distintas, debido a posibles interacciones con las demás componentes de la mezcla. De esta manera, se observan 4 señales de grupos metileno en los espectros analizados. A medida que incrementa el tiempo de

reacción, las señales a 2,38 y 1,66 ppm ( $\text{CH}_2$ ) disminuyen, por lo cual se las atribuye al dendrón sin reaccionar y a una mayor conversión de reactivos a producto. Eso indicó que la formación del producto provoca, por un lado, el acercamiento de las señales de los grupos  $\text{CH}_2$  de la estructura dendrítica (lo cual coincide con lo discutido en la sección 4.2.1.1), mientras que además la señal correspondiente al grupo  $\text{CH}_3$  del metacrilato aparece a 1,96 ppm junto con una de las señales del grupo  $\text{CH}_2$  del producto (**6**). Esto se comprobó mediante la relación entre la señal a 2,26 y 1,96 ppm, observando que esta última posee 3H más que la anterior.

Con respecto a los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (Fig. 4.7), el producto **6d** fue comparado con los reactantes, observándose la desaparición de la señal a 130,1 ppm correspondiente al átomo de carbono del grupo isocianato ( $\text{N}=\text{C}=\text{O}$ ) y, por otra parte, la aparición de una señal a 156,4 ppm ( $\text{C}_k$ ) correspondiente a un carbono que indicó la formación de un enlace urea ( $\text{NHCONH}$ ). De esta manera, a través de la comparación de los crudos de reacción con los espectros de los reactantes, se comprobó la formación de AEMA-Weis, quedando como etapas posteriores la correcta purificación y completa caracterización de una nueva molécula, lo cual no fue posible de concretar hasta el presente.

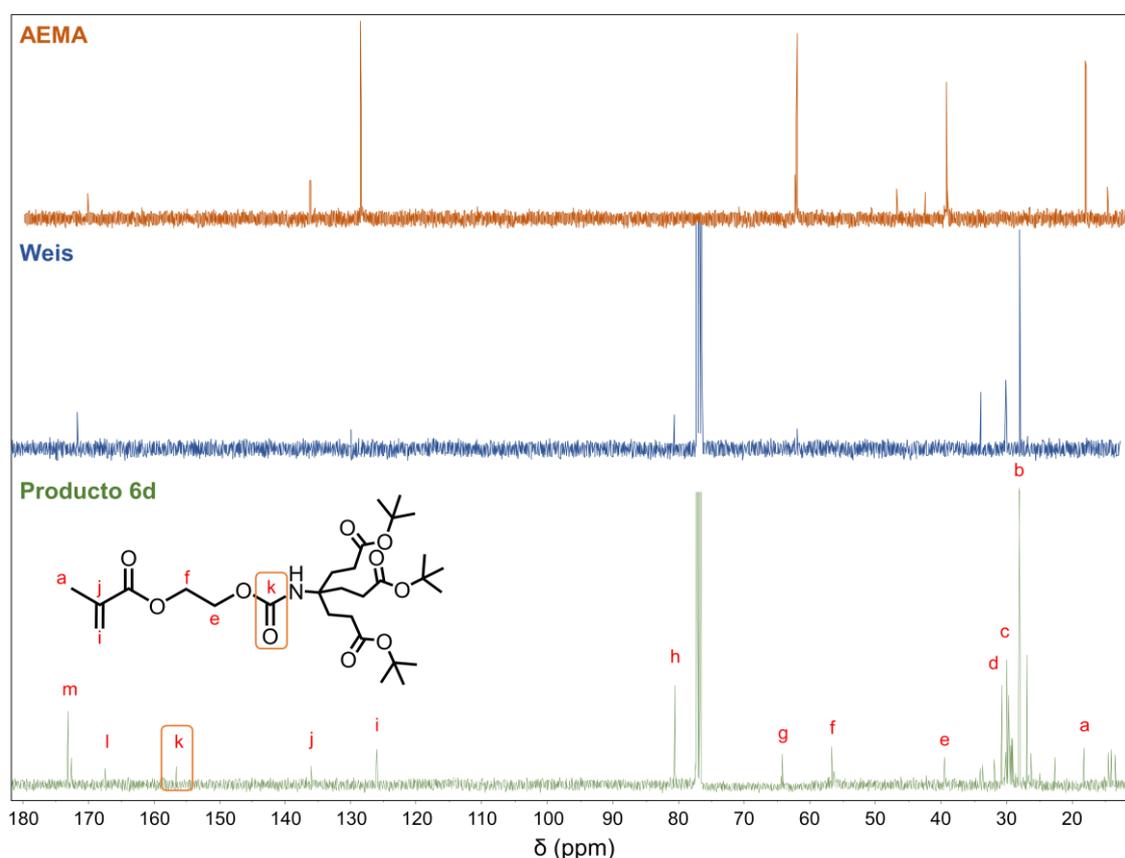
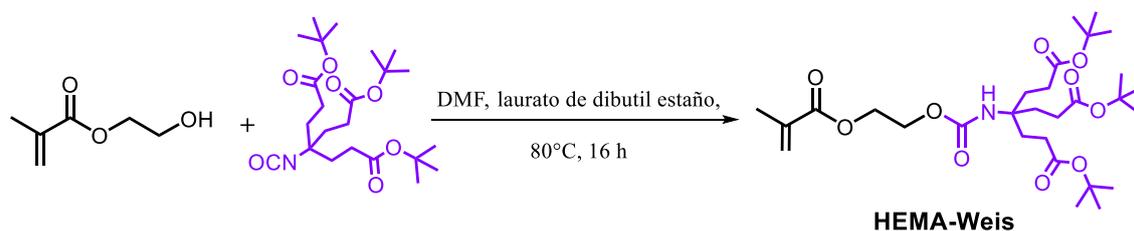


Fig. 4.7 Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  del producto obtenido a 16 h de reacción.

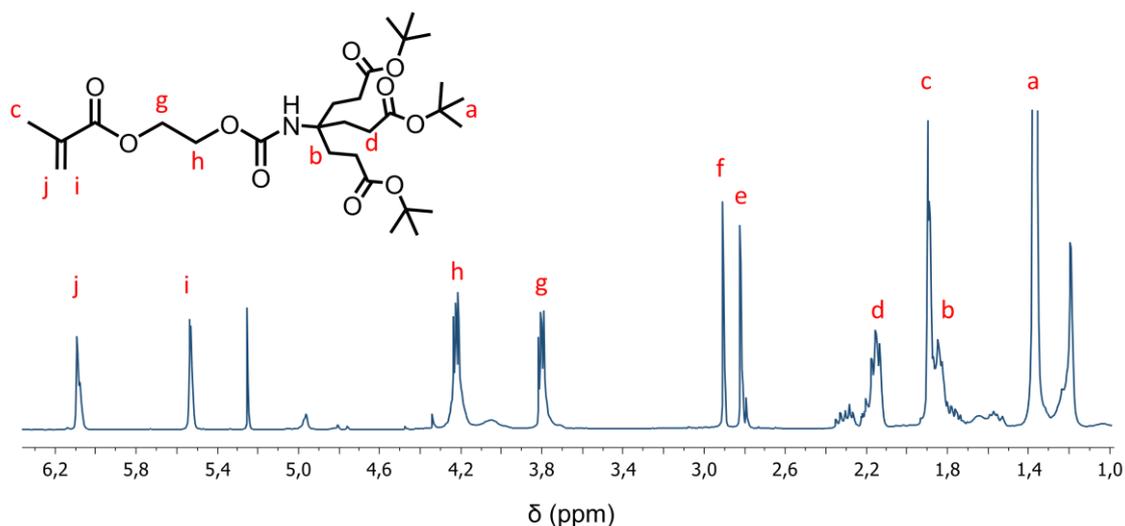
#### 4.2.2.2. Síntesis de di-*t*-butil-4-[3-(*t*-butoxi)-3-oxopropil]-4-(((2-(metacrililoxi)etoxi)carbonil)amino) hepanodiato, HEMA-Weis

Análogamente al producto anterior, la obtención de HEMA-Weis incluye la reacción de un grupo isocianato, pero en este caso, con un grupo hidroxilo para dar como resultado un grupo carbamato, como se muestra en el Esquema 4.5. Como ya se mencionó, los grupos -OH son menos reactivos frente a isocianatos, en relación con los grupos -NH<sub>2</sub>, lo cual en principio sugiere que la reacción no tendrá la misma eficiencia, bajo las mismas condiciones. No obstante, se evaluó a 16 h de reacción.



**Esquema 4.5** Reacción de obtención de HEMA-Weis.

La Fig. 4.8 muestra el espectro de RMN <sup>1</sup>H del crudo de reacción parcialmente purificado, observando la aparición de señales correspondientes a los grupos metileno a 2,16 (b) y 1,88 (d) ppm, indicando la formación HEMA-Weis con un comportamiento análogo a lo observado durante la formación de AEMA-Weis, además de otras señales correspondientes al resto de la estructura y a la presencia de impurezas (como sustrato sin reaccionar, por ejemplo). En este caso, la reactividad del grupo OH frente al isocianato dificultó la optimización de las condiciones de reacción para la obtención del producto deseado.



**Fig. 4.8.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H del producto (7).

### 4.3. Conclusiones parciales

Se logró obtener diferentes moléculas dendríticas convenientemente funcionalizadas para ser empleadas como posibles candidatos en la preparación de polímeros dendronizados. Mediante metodologías de síntesis sencillas a partir de reactivos comerciales, se definieron las condiciones óptimas de reacción para cada producto, lo que permitirá en un futuro utilizar nuevos MDs en diferentes tipos de sistemas.

### 4.4. Referencias

- [1] G.R. Newkome, K.K. Kotta, C.N. Moorefield, Convenient Synthesis of 1 → 3 C - Branched Dendrons, *J. Org. Chem.* 70 (2005) 4893–4896.
- [2] C. Six, F. Richter, Isocyanates, organic, in: *Ullmann's Encycl. Ind. Chem.*, Wiley-VCH, Weinheim, Weinheim, Germany, 2005.
- [3] A.A. Aldana, M.C. Strumia, M. Martinelli, The Cooperative Effect in Dendronized Chitosan Microbeads, *Aust. J. Chem.* 68 (2015) 1918–1925.
- [4] S.D. Garcia Schejtman, R. Toselli, M.C. Strumia, M. Martinelli, Gelatin films dendronized selectively on one side: enhancing antimicrobial properties and water repellence, *Polym. Bull.* 72 (2015) 3043–3062.
- [5] M.C. Pannone, C.W. Macosko, Kinetics of isocyanate amine reactions, *J. Appl. Polym. Sci.* 34 (1987) 2409–2432.
- [6] Q.W. Lu, T.R. Hoye, C.W. Macosko, Reactivity of common functional groups with urethanes: Models for reactive compatibilization of thermoplastic polyurethane blends, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 40 (2002) 2310–2328.
- [7] E. Pretsch, P. Bühlmann, M. Badertscher, IR Spectroscopy, in: *Struct. Determ. Org. Compd. Tables Spectr. Data*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2009: pp. 1–67.



# SECCIÓN III

---

## Polímeros dendronizados porosos



# CAPÍTULO 5

## POLÍMEROS DENDRONIZADOS MACROPOROSOS TIPO BARRAS MONOLÍTICAS

### 5.1. Objetivos específicos

Los objetivos específicos planteados para el desarrollo de este capítulo fueron:

- Sintetizar nuevas barras monolíticas macroporosas, a partir de la copolimerización de amina de Behera acrilada (ABA).
- Optimizar las propiedades de los polímeros dendronizados tipo barras variando distintos parámetros de síntesis (solvente, porógeno, concentración de monómeros).
- Evaluar el efecto de ABA sobre las propiedades fisicoquímicas del material.

### 5.2. Resultados y discusión

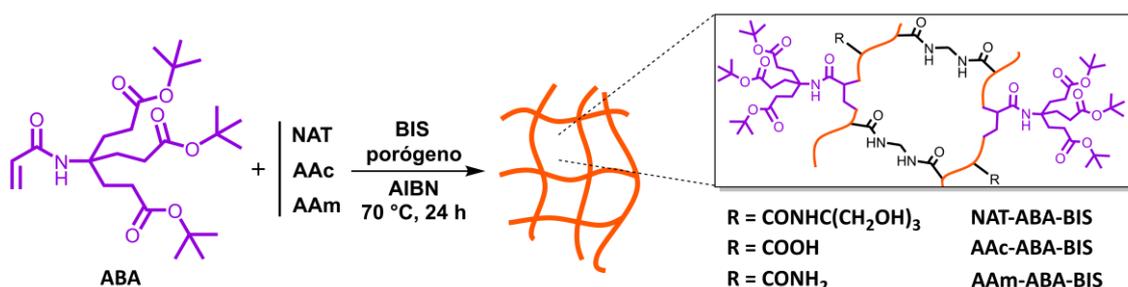
Como se mencionó en el Capítulo 1, el mecanismo de obtención de los polímeros macroporosos tipo barras monolíticas consiste en la formación de núcleos a partir de una reacción radicalaria en solución. Una vez insoluble en el medio de reacción, este particulado se agrega y precipita formando el polímero, donde la presencia de poros irregulares e interconectividades depende de la coagulación de los microglóbulos y sus agregados. La separación de fase entonces resulta determinante para optimizar las propiedades finales del material.

En una etapa previa (*Capítulo 4*), se llevó a cabo la síntesis del monómero dendrítico con un grupo polimerizable. Para esto se utilizó ABA.

Las barras monolíticas macroporosas fueron preparadas a través de reacciones de polimerización radicalaria. La naturaleza y funcionalidad de los monómeros, la relación y las condiciones de reacción utilizadas, determinarán tanto las propiedades fisicoquímicas del material, como las propiedades porosas. Por un lado, la concentración del agente entrecruzante afectará directamente el tamaño de poro, siendo menor a mayor concentración de entrecruzante, debido al incremento en las uniones covalentes de la red polimérica, aumentando así la cantidad de interconectividad entre más puntos [1,2]. De acuerdo a estudios previos realizados en nuestro laboratorio [3], la relación óptima de monómeros:entrecruzante para este tipo de matrices es 60:40.

Los diferentes polímeros obtenidos se denominaron de acuerdo con el monómero utilizado: NAT-BIS, NAT-ABA-BIS, ABA-BIS, AAm-BIS, AAm-ABA-BIS, AAc-

BIS y AAc-ABA-BIS. En todos los casos, los *monoliths* que fueron obtenidos con altos rendimientos, contienen poros mayores a 50 nm (macroporos), manteniendo su porosidad en estado seco/hinchado. Sin embargo, algunos productos presentaron bajos rendimientos y propiedades no deseadas, los cuales se discutirán más adelante. De manera general, los polímeros dendronizados fueron sintetizados como se muestra en el Esquema 5.1.



**Esquema 5.1.** Ruta sintética para la obtención de polímeros dendronizados macroporosos.

### 5.2.1. Obtención de polímeros dendronizados macroporosos

Se sintetizaron novedosas barras monolíticas con una alta densidad de grupos funcionales, basadas en NAT y BIS, y co-polimerizadas con ABA, como se muestra en la Tabla 5.1. En todos los casos, los co-polímeros de NAT, ABA y BIS se obtuvieron con rendimientos excelentes (superiores al 89%).

**Tabla 5.1.** Diferentes matrices obtenidas a partir de NAT, ABA y BIS.<sup>a</sup>

Matriz <sup>b</sup>	NAT (%)	ABA (%)	BIS (%)	Tamaño de poro (nm) <sup>c</sup>	Rendimiento (%)	Incorporación de dendrón (%) <sup>d</sup>
NAT-BIS	60	0	40	600 ± 100	98,3	---
NAT-ABA20-BIS	40	20	40	1100 ± 200	90,2	90,3
NAT-ABA30-BIS	30	30	40	1400 ± 300	98,2	88,0
NAT-ABA40-BIS	20	40	40	400 ± 100	95,3	95,1
ABA60-BIS	0	60	40	330 ± 70	89,7	90,2
ABA50-BIS	0	50	50	<300	nd	nd
ABA20-BIS	0	20	80		nd	nd

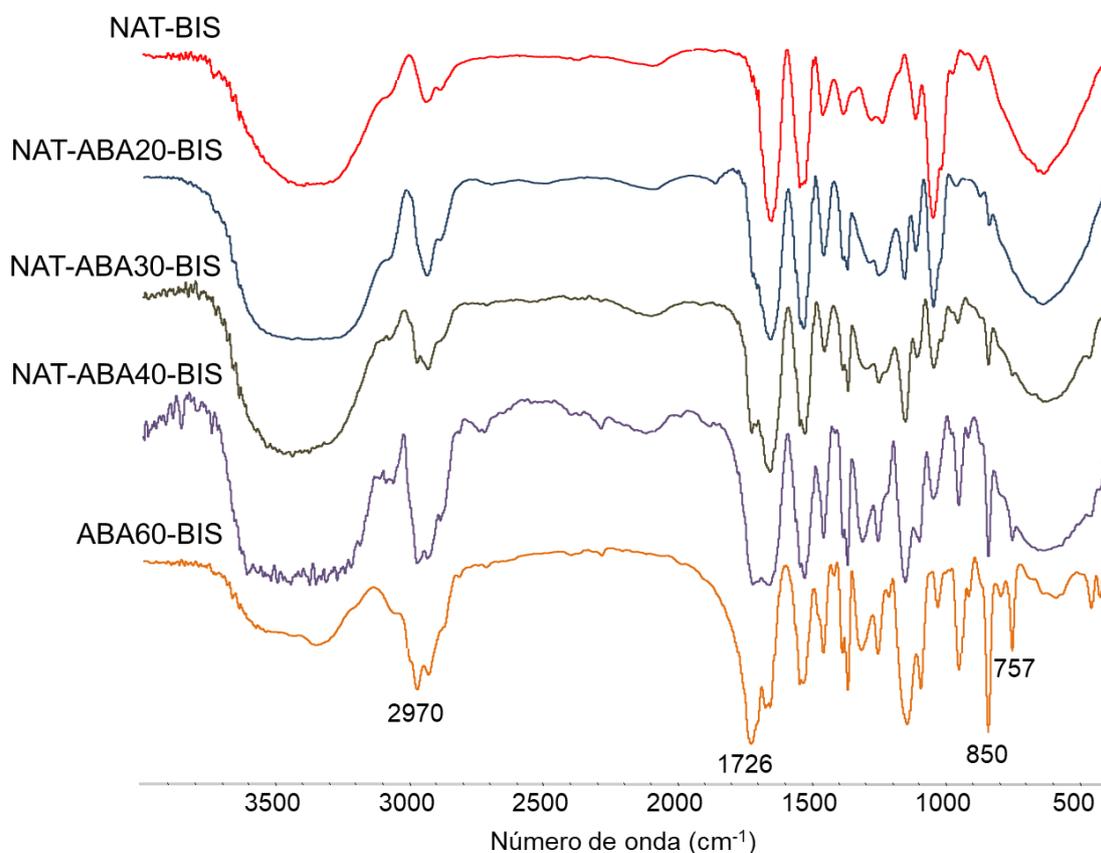
<sup>a</sup> Condiciones de polimerización: concentración de monómeros: 2,8 M. AIBN: 1% en masa respecto al total de monómeros. Tiempo de polimerización: 24 h; temperatura: 70 °C; DMSO: porógeno (% v/v): 70:30 con respecto al volumen total de la mezcla porogénica (1 mL). Co-porógenos: PEG6000:tetradecanol (50:50).

<sup>b</sup> Los números 20/30/40 y 60/50/20 indicaron el porcentaje (en moles) de ABA en la matriz.

<sup>c</sup> El tamaño de poro fue estimado a partir de las mediciones de longitudes de poro de tres diferentes imágenes SEM de cada muestra. (promedio ± SD; n = 60-100).

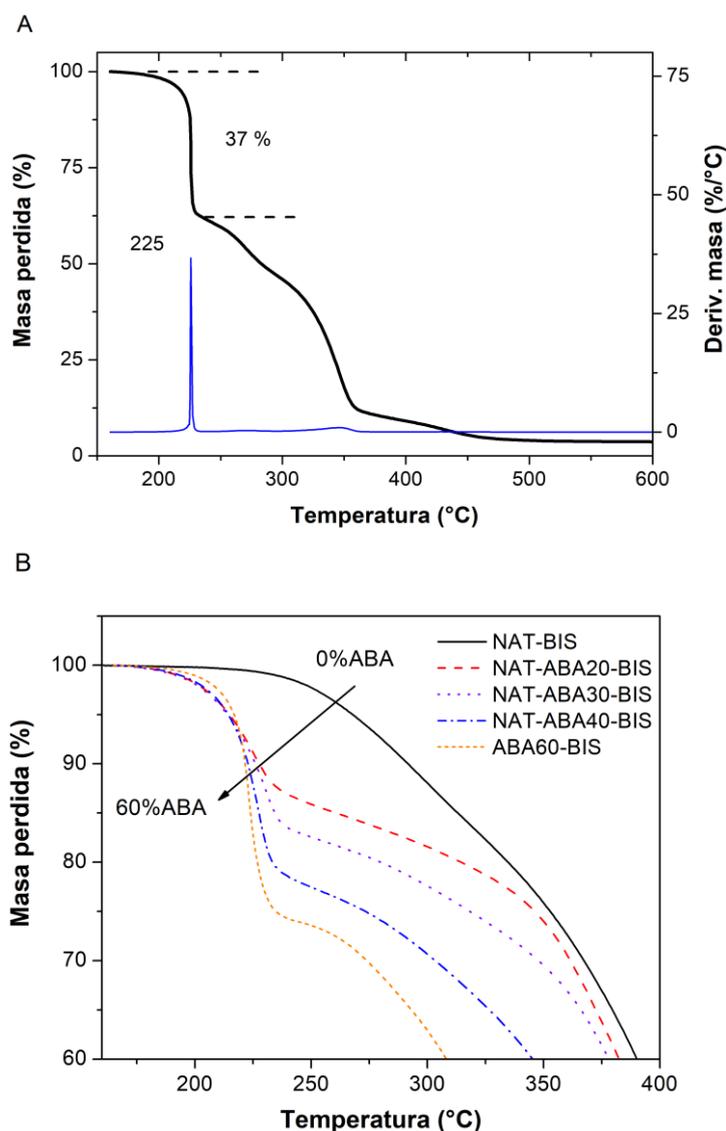
<sup>d</sup> Calculado a partir de la masa de ABA perdida en la curva del TGA correspondiente (Fig. 5.2).

Los espectros FT-IR de las matrices basadas en NAT (Fig. 5.1) muestran diferentes señales características del monómero: 3670-3580 y 3460-3420  $\text{cm}^{-1}$  (estiramiento -OH y -NH, respectivamente), 1680-1630  $\text{cm}^{-1}$  (estiramiento C-O, amida I), 1570-1515 y 1305-1200  $\text{cm}^{-1}$  (combinación de la deformación N-H y estiramiento C-N, amida II y III, respectivamente), 1280-1260  $\text{cm}^{-1}$  (deformación C-O) y la deformación fuera del plano de O-H de alcohol primario a 1075-1000  $\text{cm}^{-1}$ . La incorporación de ABA al polímero se comprobó por espectroscopia infrarroja, observando la aparición de las señales a 850 y 757  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a las vibraciones típicas del grupo *t*-butilo del dendrón, la aparición de la señal a 1726  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al grupo carbonilo de éster y otra a 2970  $\text{cm}^{-1}$  atribuida al estiramiento C-H  $\text{sp}^3$  de los grupos  $\text{CH}_3$  de la periferia del monómero dendrítico. Se observa además un incremento de la intensidad relativa de las señales del grupo *t*-butilo con el aumento de la concentración ABA. La disminución gradual de la banda a 3600  $\text{cm}^{-1}$  se atribuye a la disminución de la cantidad de grupos OH por haber una menor concentración del monómero NAT, lo que se puede entender en estos sistemas como un menor carácter hidrofílico de las barras, lo cual se discutirá más adelante.



**Fig. 5.1.** Espectro FT-IR de las matrices basadas en NAT y la matriz ABA60-BIS.

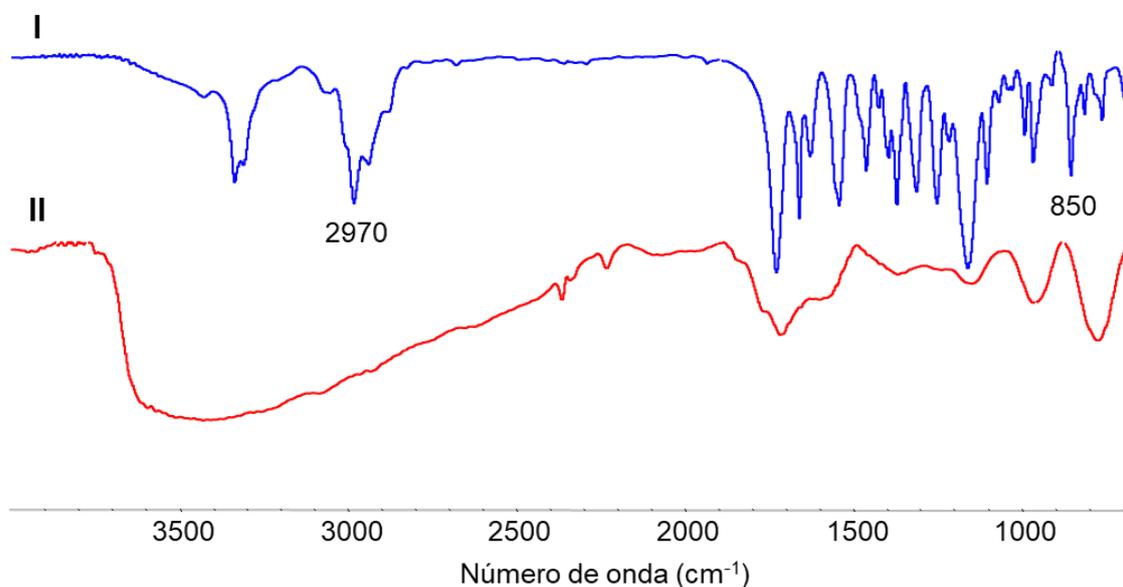
La incorporación de ABA se comprobó también por análisis termogravimétrico. En la curva TGA de ABA (Fig. 5.2A) se observa la descomposición térmica a 225 °C que corresponde a la masa perdida por el monómero dendrítico (grupos *t*-butilo), representando el 37% de la masa total de ABA [4]. Cuando la cantidad de ABA en el polímero incrementa, la masa perdida a esta temperatura también incrementa (Fig. 5.2B). Entonces, la pérdida a 225 °C es directamente proporcional a la cantidad de dendrón incorporado en la matriz final. Conociendo la masa inicial de monómeros, la masa molar del MD y el porcentaje de masa perdido de acuerdo a la curva de TGA, se estimó el grado de incorporación de ABA en la matriz (Tabla 5.1).



**Fig. 5.2.** (A) Curvas TGA-DTG de ABA; (B) curvas TGA de pérdida de masa de las diferentes matrices basadas en NAT y ABA60-BIS.

Para confirmar la desprotección de los grupos *t*-butilo, se realizó un espectro IR de una muestra de polímero dendronizado antes y después de someterlo a 250 °C (Fig. 5.3), observándose claramente la desaparición de algunas señales características de

las vibraciones de los grupos *t*-butilo ( $2970$  y  $850$   $\text{cm}^{-1}$ ). De esta manera se determinó la incorporación efectiva de ABA en todas las matrices.

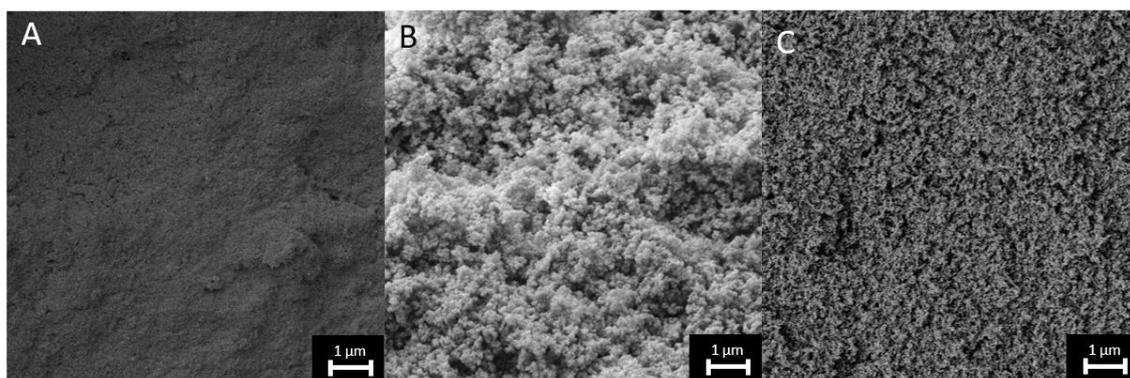


**Fig. 5.3.** Espectros FT-IR de ABA (I) antes y (II) luego de someterlo a  $250$  °C.

## 5.2.2. Factores que determinan las características de las barras monolíticas

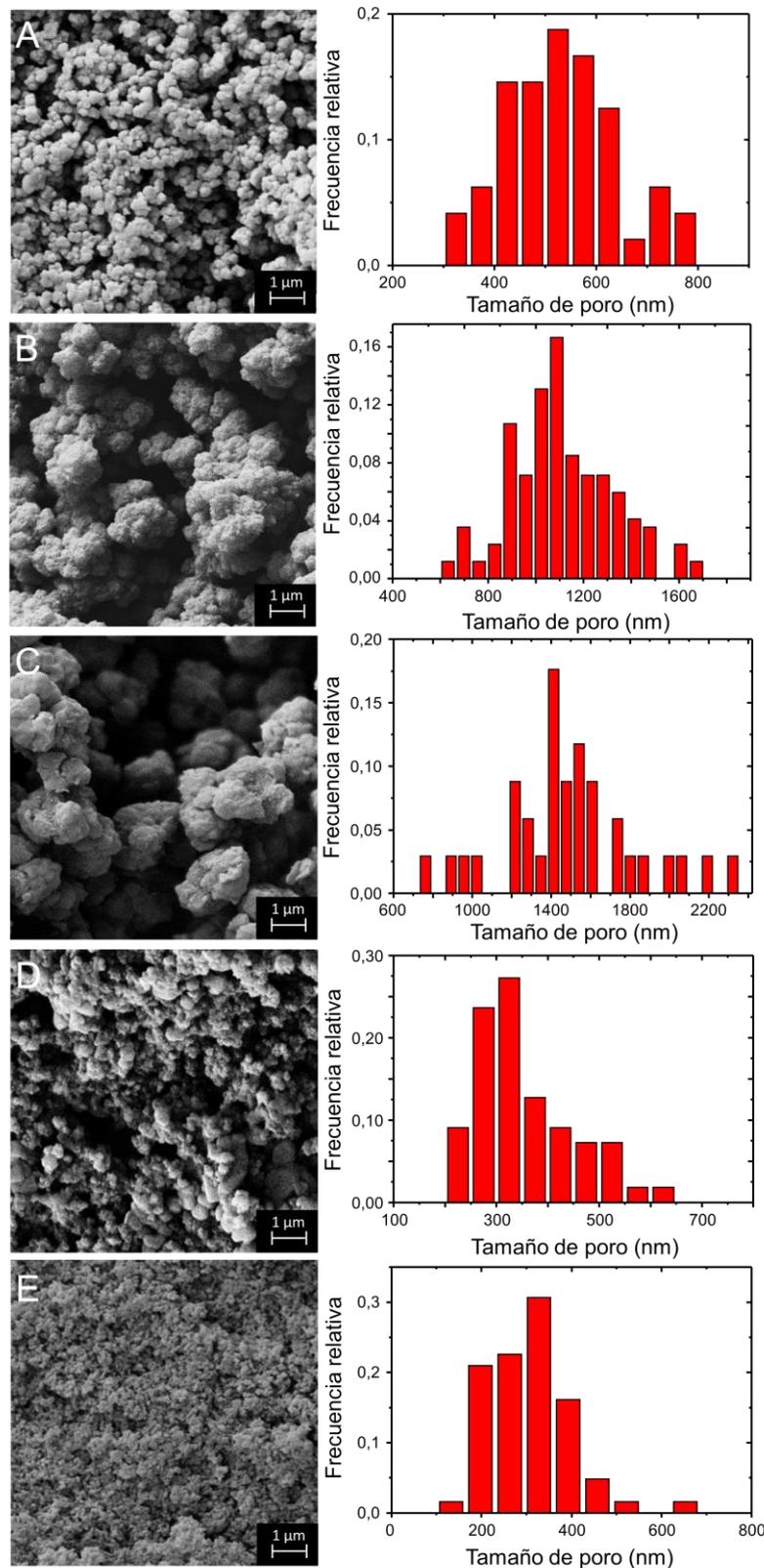
### 5.2.2.1. Monómero dendrítico

A fin de comprobar la capacidad de polimerización de ABA en las condiciones de reacción seleccionadas y las características morfológicas del material obtenido, se llevó a cabo la obtención de matrices ABA-BIS con diferentes concentraciones de entrecruzante. Las imágenes SEM se muestran en la Fig. 5.4. Los polímeros obtenidos poseen pequeños agregados y tamaños de poro inferiores a  $300$  nm. Estas matrices resultaron quebradizas y se obtuvieron con bajos rendimientos.



**Fig. 5.4.** Imágenes SEM de distintos polímeros: (A) ABA20-BIS, (B) ABA50-BIS and (C) ABA60-BIS.

Entonces, con el propósito de optimizar las propiedades se optó por incluir un co-monómero al polímero dendronizado. La Fig. 5.5 muestra la morfología superficial de las distintas matrices basadas en NAT-ABA-BIS.



**Fig. 5.5.** Micrografías SEM e histograma con la distribución de tamaños de poro de: (A) NAT-BIS, (B) NAT-ABA20-BIS, (C) NAT-ABA30-BIS, (D) NAT-ABA40-BIS, y (E) ABA60-BIS.

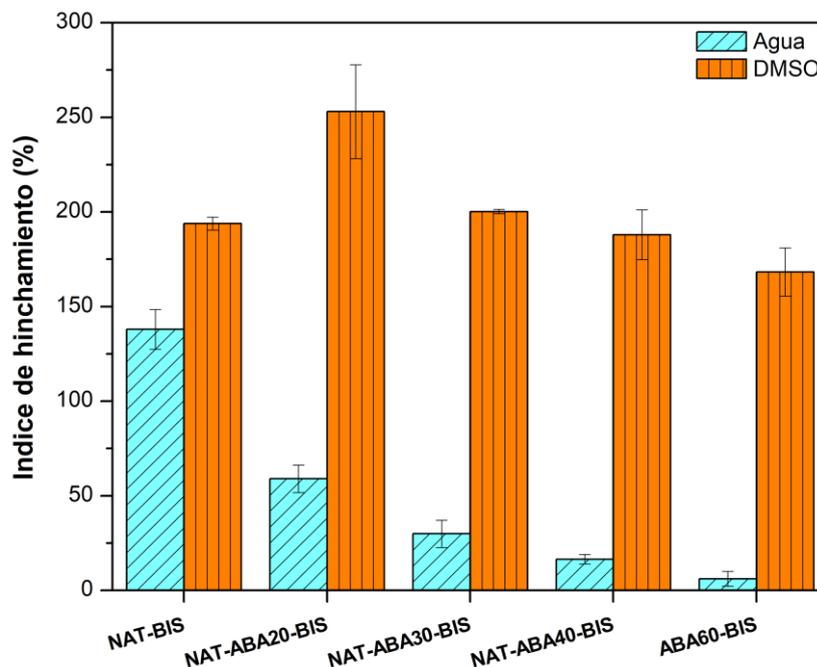
Al analizar las imágenes SEM, es importante recordar que los macroporos facilitan el flujo a través del soporte, mientras que los microporos ofrecen al material mayor área superficial para la inmovilización de un ligando de interés [5]. Por esta razón, los macroporos con diámetros cercanos o superiores a 1000 nm son recomendables para favorecer un adecuado flujo a través del *monolith*, con presiones relativamente bajas. Utilizando NAT como co-monómero se observó el agregado de microesferas en grandes *clusters*, donde además existen espacios de distintos tamaños (poros). Se observó también que el tamaño de poro incrementa cuando el porcentaje de ABA incrementa hasta un 30 %; luego, el tamaño disminuye, bajo las mismas condiciones de reacción. Este comportamiento puede indicar un compromiso entre el grado de dendronización del polímero y la dinámica en la formación de glóbulos y *clusters* durante la reacción de polimerización. Esto evidenció que la porosidad final del material es gobernada por la cantidad de dendrón. Una alta concentración de ABA (40 %) resultó en una red más densa y con tamaños de poro menores. Además, los histogramas muestran, por un lado, el cambio en la distribución de tamaños de poro a medida que cambia la composición de las matrices dendronizadas y, por otro lado, que si bien los polímeros NAT-ABA20-BIS y NAT-ABA30-BIS poseen mejores morfologías, tanto al 40 como al 60 % de ABA, los sistemas mostraron una distribución de tamaños más homogénea.

Durante la reacción, la separación de fase de los núcleos formados resulta en la etapa determinante en la formación de los poros, la cual depende del tamaño de las cadenas formadas como de la polaridad de las mismas, entre otros [6]. Se realizaron mediciones del área BET<sup>1</sup>, observando que al utilizar el monómero dendrítico, los valores disminuyen de  $11,23 \pm 0,05$  (NAT-BIS) a  $7,73 \pm 0,06$  m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> (NAT-ABA20-BIS) lo cual, en términos del mecanismo de polimerización, indica la formación de microglóbulos más densos. Este efecto puede ser causado principalmente por dos razones: (i) las cadenas poliméricas en formación (utilizando una estructura dendrítica) permanecen a distancias más cortas, o (ii) se generan como paquetes densos del dendrón anclados a la cadena formada [7,8]. Esto también puede entenderse como una contribución tanto estérica como apolar de amina de Behera [4]. De esta manera, fue posible mejorar las características porosas de la barra monolítica utilizando un monómero dendrítico con características apolares.

---

<sup>1</sup> El análisis del área superficial Brunauer-Emmett-Teller (BET) se emplea mediante la adsorción de gases (como nitrógeno, por ejemplo) sobre un material poroso, para así determinar superficie específica y distribución de tamaños de poro.

La característica no polar del MD incrementó la hidrofobicidad del polímero formado, lo cual se evidenció en las determinaciones del índice de hinchamiento (Fig. 5.6). El índice de hinchamiento en agua disminuye a medida que la concentración de ABA en la matriz incrementa. El comportamiento de las matrices en DMSO no cambió significativamente con la concentración del dendrón, siendo el cambio de masa de las mismas menos marcado en el solvente de reacción.



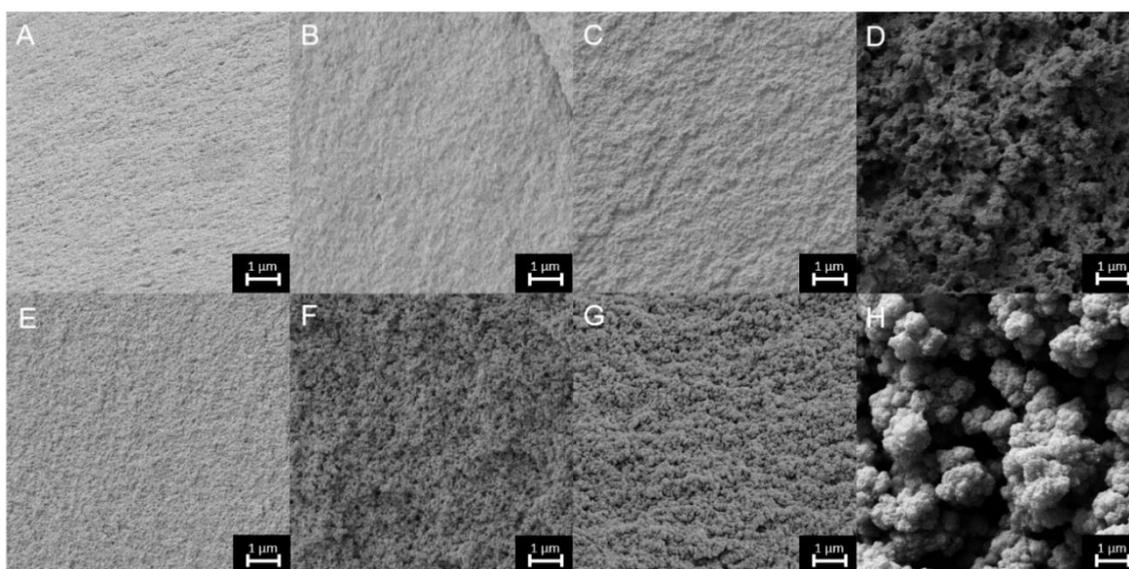
**Fig. 5.6.** Índice de hinchamiento (en %) en agua y DMSO, de las matrices basadas en NAT y ABA60-BIS.

#### 5.2.2.2. Mezcla porogénica: Solvente y agentes co-porógenos

Las características morfológicas de las barras monolíticas están principalmente gobernadas por diferentes variables de síntesis, como la naturaleza del/los solvente/s, agentes co-porógenos, tipo y concentración de monómeros [1,9]. Cuando la polimerización finaliza, se forman dos fases: una solución que consiste en el solvente y el porógeno disuelto, y una fase sólida continua que define la estructura del *monolith*. La formación de dos fases es capaz de ser controlada mediante las condiciones antes mencionadas [5,10]. Basados en esta consideración, se llevó a cabo un estudio del efecto de las diferentes variables sobre las propiedades finales de las barras monolíticas.

Las mezclas porogénicas frecuentemente utilizadas en este tipo de polimerizaciones consisten tanto en solventes, no-solventes, alcoholes, polímeros, como así también combinaciones de ellos. Generalmente, cuanto mayor es la concentración de porógenos, mayor será la distribución de tamaños de poros [11,12].

Para evaluar el efecto del agente o agentes co-porógenos, se sintetizó la matriz NAT-ABA20-BIS (Tabla 5.2) en presencia de alcoholes con diferente largo de cadena, y se analizó la morfología de los distintos polímeros obtenidos por SEM, como se muestra en la Fig. 5.7. Se emplearon algunos microporógenos como etanol y pentanol, los cuales favorecen la disolución del sistema de trabajo y el polímero en formación, generando así la separación de fase en tiempos mayores y por lo tanto tamaños de poro inferiores a 100 nm (Fig. 5.7A y 5.7B). Se evaluaron también macroporógenos como dodecanol (Fig. 5.7C) y tetradecanol (Fig. 5.7D), incrementando los tamaños de poros a valores superiores a los 600 nm, debido a desfavorecer la disolución de las cadenas en formación, y promoviendo de esta manera la rápida separación de fase. Por otra parte, se estudió el efecto de PEG6000, es decir, un polímero como agente porógeno (Fig. 5.7E), pero no se observó una optimización en las propiedades porosas. Sin embargo, al utilizar la combinación de dos agentes porógenos, como PEG6000 y tetradecanol, se observó un mejoramiento de las propiedades porosas, dando como resultado, tamaños de poros superiores a 1000 nm, como se muestra en la Fig. 5.7H.



**Fig. 5.7.** Imágenes SEM de NAT-ABA20-BIS a diferentes condiciones: usando DMSO como solvente y (A) etanol, (B) n-pentanol, (C) dodecanol, (D) tetradecanol o (E) PEG como porógeno. Utilizando PEG/tetradecanol como co-porógenos y (F) DMAc, (G) DMF o (H) DMSO como solvente.

Por otra parte, se analizó la influencia de distintos solventes en la formación de poros. Para esto, se prepararon matrices empleando PEG6000/tetradecanol como agentes co-porógenos y se utilizó DMAc, DMF y DMSO como solventes de trabajo, como se muestra en la Tabla 5.2 y la Fig. 5.7. Se observó que la matriz con propiedades porosas adecuadas fue aquella obtenida con DMSO (Fig. 5.7H) como solvente.

**Tabla 5.2.** Efecto del porógeno y solvente en las propiedades de NAT-ABA20-BIS.

Porógeno	Solvente	Tamaño de poro (nm) <sup>a</sup>	Rendimiento (%)
Etanol			
n-pentanol			
Dodecanol	DMSO	<100	80,0 – 85,0
PEG			
Tetradecanol		690 ± 20	87,4
	DMAc	160 ± 30	91,0
PEG/ tetradecanol	DMF	200 ± 80	87,6
	DMSO	1100 ± 200	90,2

<sup>a</sup> El tamaño de poro fue estimado a partir de las mediciones de longitudes de poro de tres diferentes imágenes SEM de cada muestra. (promedio ± SD; n°=50).

### 5.2.2.3. Efecto de la funcionalidad y concentración de monómeros

Para comparar el efecto de la funcionalidad de co-monómeros, se sintetizaron nuevos *monoliths* dendronizados utilizando ácido acrílico (AAc) y acrilamida (AAm) en combinación con ABA como monómero dendrítico. Bajo las mismas condiciones de reacción empleadas en la síntesis de las matrices de NAT-ABA-BIS (temperatura, concentración de iniciador, solvente y co-porógenos, y concentración de monómeros) no fue posible obtener barras monolíticas porosas, ya que en vez de eso se obtuvieron polímeros tipo geles, y además con bajos rendimientos de reacción; básicamente, el co-monómero generó una diferencia en las propiedades finales de la solución, lo cual causó un comportamiento distinto en el mecanismo de polimerización.

La concentración de monómeros en la solución es uno de los factores factible de modificar para determinar las propiedades finales del material, y para analizar esta influencia se prepararon *monoliths* por co-polimerización de ABA con NAT, AAc y AAm en diferentes proporciones, y entrecruzados con BIS, obteniéndose una concentración final en solución del 33,33 % p/p, como indica la Tabla 5.3 [6]. Las diferentes barras monolíticas con distintas relaciones de monómeros se realizaron sin modificar la concentración final. Las matrices basadas en NAT a esta concentración se obtuvieron con bajos rendimientos y características poco porosas, mientras que los polímeros basados en AAm y AAc mostraron buenos rendimientos y eficientes incorporaciones de dendrón, además de tamaños de poro superiores a 400 nm.

**Tabla 5.3.** Diferentes matrices obtenidas a partir de NAT, AAc, AAm, ABA y BIS.<sup>a</sup>

Polímero <sup>b</sup>	Co-monómero (%)	ABA (%)	Tamaño de poro (nm) <sup>c</sup>	Rendimiento (%)	Incorporación de dendrón (%) <sup>d</sup>
NAT-BIS (2)	60	---	<300	<60	<i>nd</i>
NAT-ABA20-BIS (2)	40	20			
NAT-ABA30-BIS (2)	30	30			
NAT-ABA40-BIS (2)	20	40			
AAc-BIS	60	---	800 ± 200	91,2	---
AAc-ABA20-BIS	40	20	1500 ± 400	81,6	92,3
AAc-ABA30-BIS	30	30	1200 ± 90	78,6	88,2
AAc-ABA40-BIS	20	40	310 ± 80	81,9	79,7
AAm-BIS	60	---	800 ± 100	97,8	---
AAm-ABA20-BIS	40	20	1200 ± 300	89,3	81,7
AAm-ABA30-BIS	30	30	1300 ± 400	88,1	78,1
AAm-ABA40-BIS	20	40	500 ± 100	83,8	82,9

<sup>a</sup> Condiciones de polimerización: concentración de monómeros totales: 33,33 % p/p. En todos los casos el BIS se agregó en un 40 % p/p. AIBN: 1 % respecto a la masa total de monómeros. Tiempo de reacción: 24 h; temperatura: 70 °C; DMSO:co-porógenos (% v/v): 70:30 con respecto al volumen total de la mezcla porogénica (1 mL); co-porógenos: PEG6000:tetradecanol (50:50).

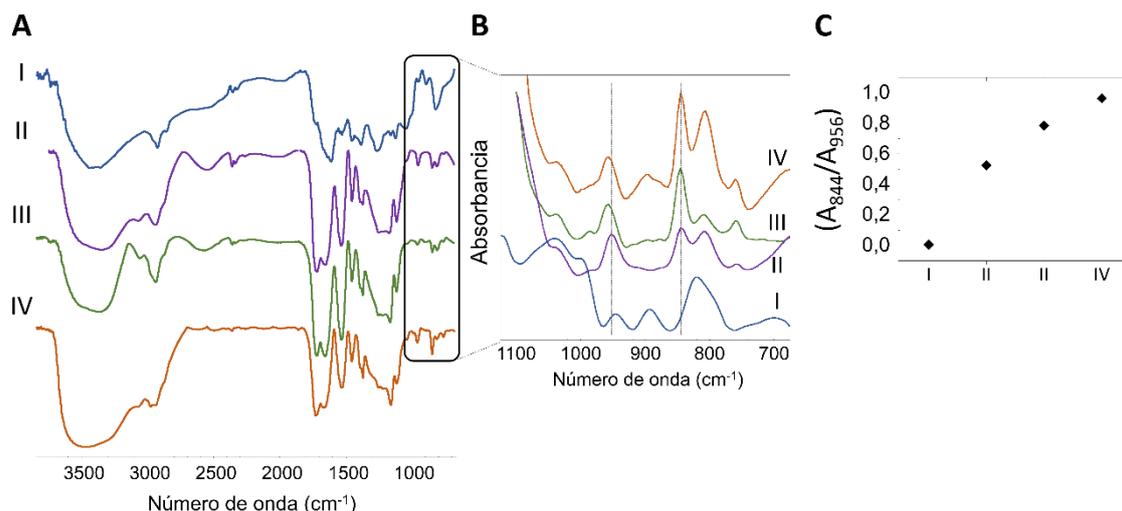
<sup>b</sup> Los números 20/30/40 y 60/50/20 indicaron el porcentaje (en p/p) de ABA en la matriz.

<sup>c</sup> El tamaño de poro fue estimado a partir de las mediciones de longitudes de poro de tres diferentes imágenes SEM de cada muestra. (promedio ± SD; n = 60-100).

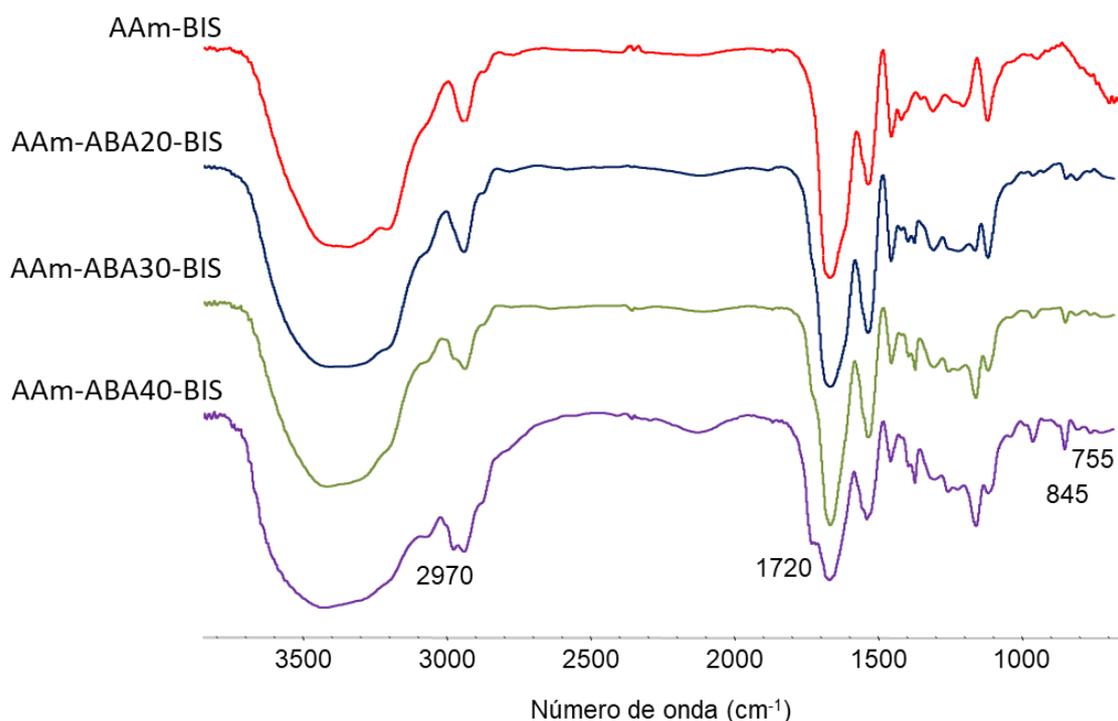
<sup>d</sup> Calculado a partir de la masa de ABA perdida en la curva del TGA correspondiente (Fig. 5.10).

Para las matrices basadas en AAc, la incorporación del MD se observó por espectroscopia IR a partir de las señales a 844 y 757 cm<sup>-1</sup> (grupos *t*-butilos), como se muestra en la Fig. 5.8. El porcentaje de dendronización se estimó a partir de la intensidad relativa de la señal a 844 cm<sup>-1</sup> y la señal a 956 cm<sup>-1</sup> correspondiente al entrecruzante BIS (Fig. 5.8B), siendo la única señal distinguible en el espectro del polímero cuya intensidad relativa permanece constante para todos los productos. Los resultados obtenidos empleando esta aproximación son coincidentes con la relación ABA:BIS calculado inicialmente (Fig. 5.8C).

La incorporación de ABA en las matrices basadas en AAm también se comprobó mediante espectroscopia FT-IR (Fig. 5.9). La aparición de las señales correspondientes a los grupos éster *t*-butilo se observó mediante las señales a 2970 cm<sup>-1</sup> (estiramiento C-H cp<sup>3</sup>), 1720 cm<sup>-1</sup> (estiramiento C=O de grupo carbonilo de éster) y las correspondientes a las vibraciones del grupo *t*-butilo a 845 y 755 cm<sup>-1</sup>.



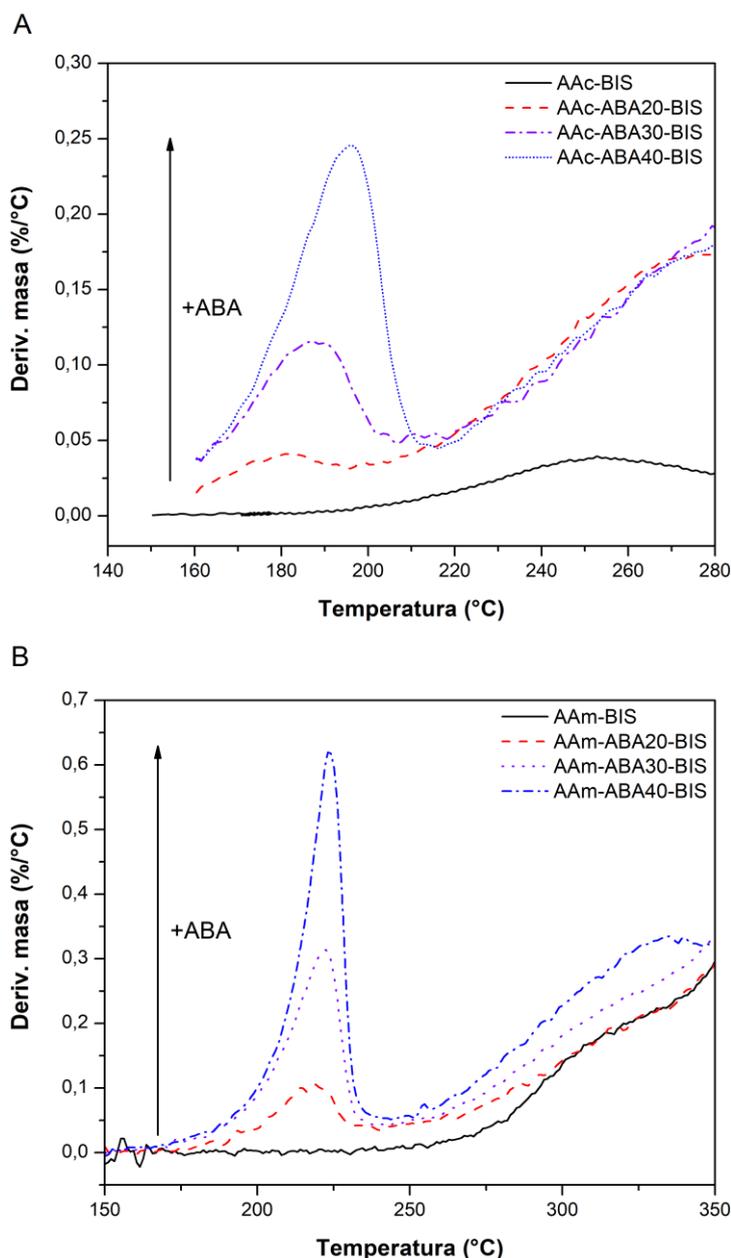
**Fig. 5.8.** (A) Espectros FT-IR de las matrices con AAc; (B) señales (en absorbancia) a 844 y 956  $\text{cm}^{-1}$  utilizadas para el cálculo de intensidades relativas; (C) relación entre las intensidades relativas en función de la matriz analizada. (I) AAc-BIS, (II) AAc-ABA20-BIS, (III) AAc-ABA30-BIS y (IV) AAc-ABA40-BIS.



**Fig. 5.9.** Espectros FT-IR para cada matriz obtenida basada en AAm.

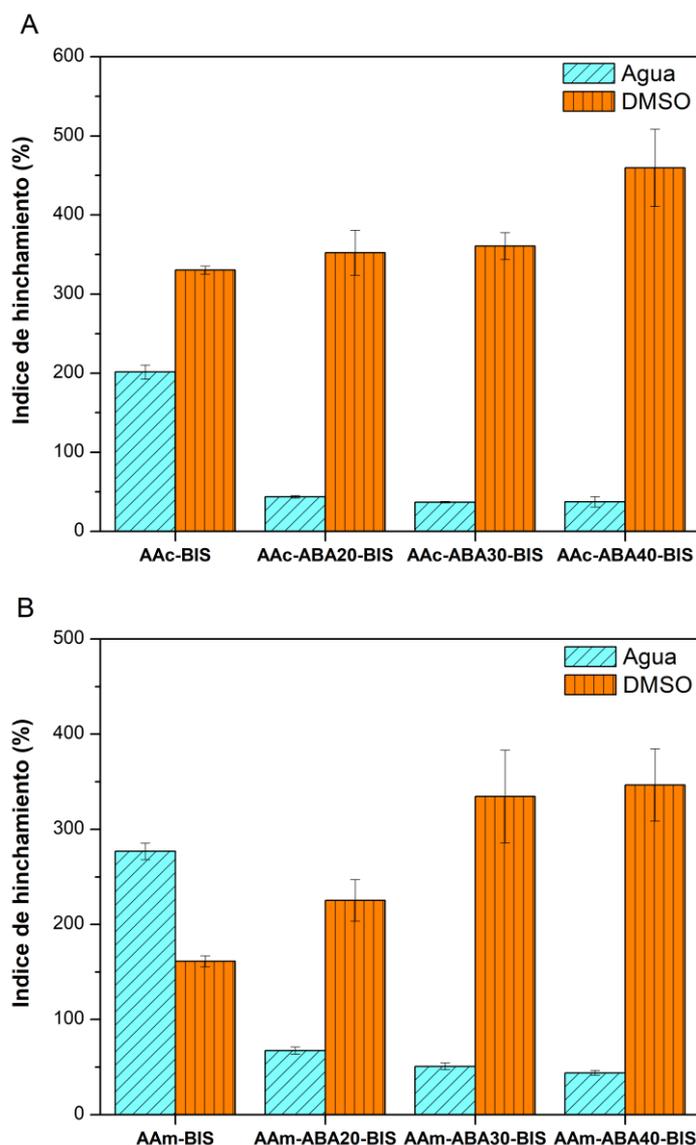
Se llevó a cabo el estudio del comportamiento térmico de cada una de las matrices, obteniendo las correspondientes curvas de TGA-DTG. En las Fig. 5.10A y 5.10B se muestra la derivada de la pérdida de masa en función de la temperatura, para las matrices basadas en AAc y AAm, respectivamente; en ambos casos se observa un incremento del pico de descomposición a 225  $^{\circ}\text{C}$  a medida que aumenta la cantidad de

dendrón presente en la matriz. Por lo tanto, la incorporación de ABA fue estimada como se muestra en la Tabla 5.3, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para las matrices basadas en NAT.



**Fig. 5.10.** Curvas de derivada de la masa de A) matrices basadas en AAc y B) matrices basadas en AAm con diferentes concentraciones de ABA.

La Fig. 5.11 muestra el comportamiento de hinchamiento de las diferentes barras monolíticas de AAc (Fig. 5.11A) y AAm (Fig. 5.11B), tanto en agua (pH = 6,5) como en el solvente de síntesis de los materiales (DMSO). El valor del índice de hinchamiento informado es en el equilibrio, alcanzado a tiempos mayores a 24 h.



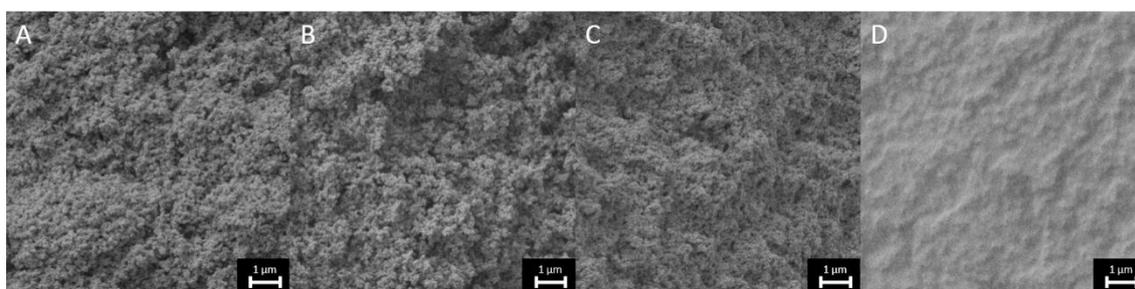
**Fig. 5.11.** Índice de hinchamiento de las matrices de (A) AAc-ABA-BIS y (B) AAm-ABA-BIS.

Si se comparan las matrices en función de la concentración del dendrón, se observa que el índice de hinchamiento en agua disminuye conforme aumenta la concentración de ABA. Inicialmente, AAc-BIS posee un hinchamiento en agua del  $200 \pm 9 \%$ , el cual disminuye considerablemente ( $44 \pm 1 \%$ ) con una concentración de ABA del 20 %. Dicho valor de índice de hinchamiento se mantiene a concentraciones de ABA del 40 %. Un efecto similar puede observarse en las matrices de AAm, donde el valor del índice de hinchamiento en agua disminuye de  $280 \pm 9 \%$  (para AAm-BIS) hasta  $44 \pm 3 \%$ , para una concentración de ABA del 40 %. Las matrices de AAc (Fig. 5.11A) poseen menor carácter polar que las matrices de AAm (Fig. 5.11B), posiblemente causado por interacciones del tipo puente hidrógeno intramoleculares, debido a los grupos ácido (COOH) presentes en el ácido acrílico. Sin embargo, la incorporación de

ABA disminuye significativamente el índice de hinchamiento en agua, resultado coincidente con los obtenidos en las matrices previamente descritas (Sección 5.2.2. 1). En ambos casos, la presencia del monómero ABA otorgó mayor carácter hidrofóbico al material, debido a la presencia de grupos apolares del dendrón, lo que se traduce en una disminución del índice de hinchamiento en agua [13]. Sin embargo, dicho comportamiento no varió significativamente con el incremento de la concentración de ABA, lo que podría indicar un acomodamiento de las cadenas poliméricas tal que mantiene la capacidad de generar interacciones con las moléculas de agua, independientemente de la concentración de ABA.

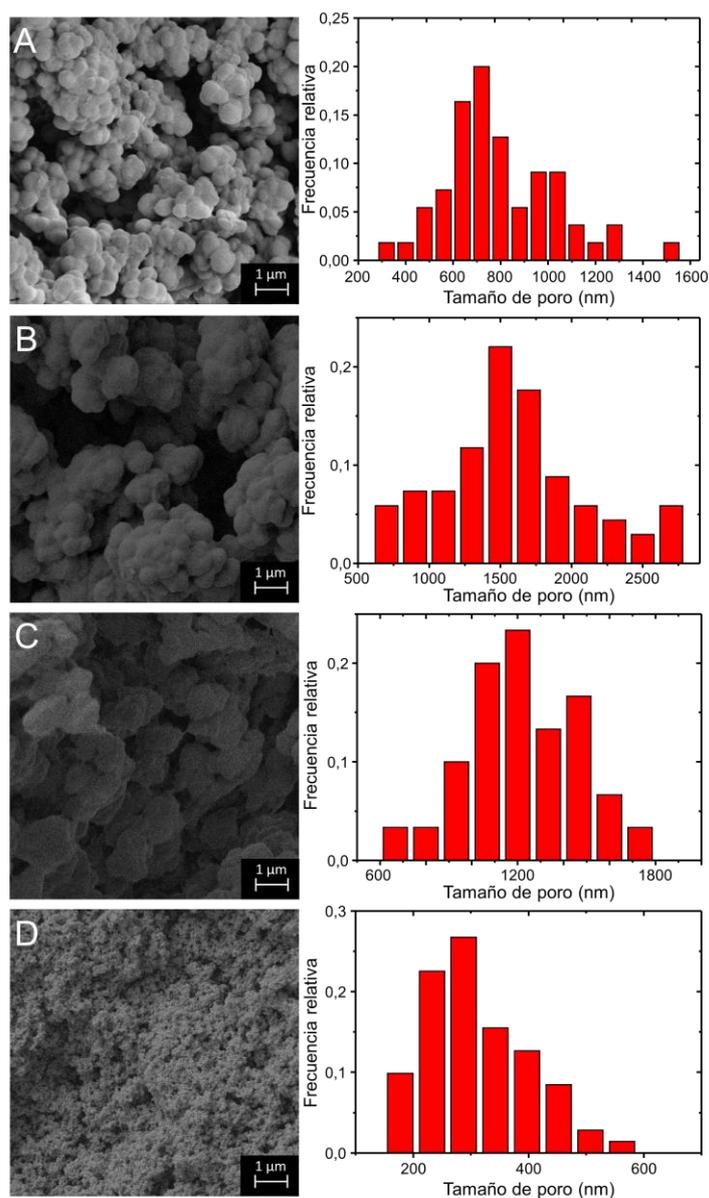
Por otra parte, se estudió el comportamiento del hinchamiento en DMSO. El agregado de ABA a las matrices provoca un incremento en el valor del índice de hinchamiento, en ambos tipos de materiales. Además, y a diferencia del comportamiento en agua, el dicho valor de hinchamiento aumenta conforme incrementa la concentración del dendrón, siendo  $460 \pm 50 \%$  para AAc-ABA40-BIS y  $350 \pm 40 \%$  para AAm-ABA40-BIS. Si bien los valores iniciales en ausencia del dendrón son diferentes, el valor final alcanzado con 40 % de ABA resulta significativamente similar debido a la mayor presencia de la estructura dendrítica en la matriz que el co-monómero. Sin embargo, en la Fig. 5.6 se mostró que el polímero ABA-BIS posee un hinchamiento en DMSO de  $168 \pm 13 \%$ ; esto significa que aún las bajas concentraciones de AAc y AAm mantienen un elevado valor de hinchamiento en las matrices. De esta manera, se evidenció nuevamente las características apolares que el dendrón aporta a las matrices de AAc y AAm.

En cuanto al estudio de la morfología de cada una de las matrices, las imágenes SEM de la serie NAT-BIS(2) (Fig. 5.12) muestran características poco porosas; esto evidenció que la síntesis de este tipo de sistemas no fue efectiva, en comparación con los demás sistemas obtenidos en este capítulo.



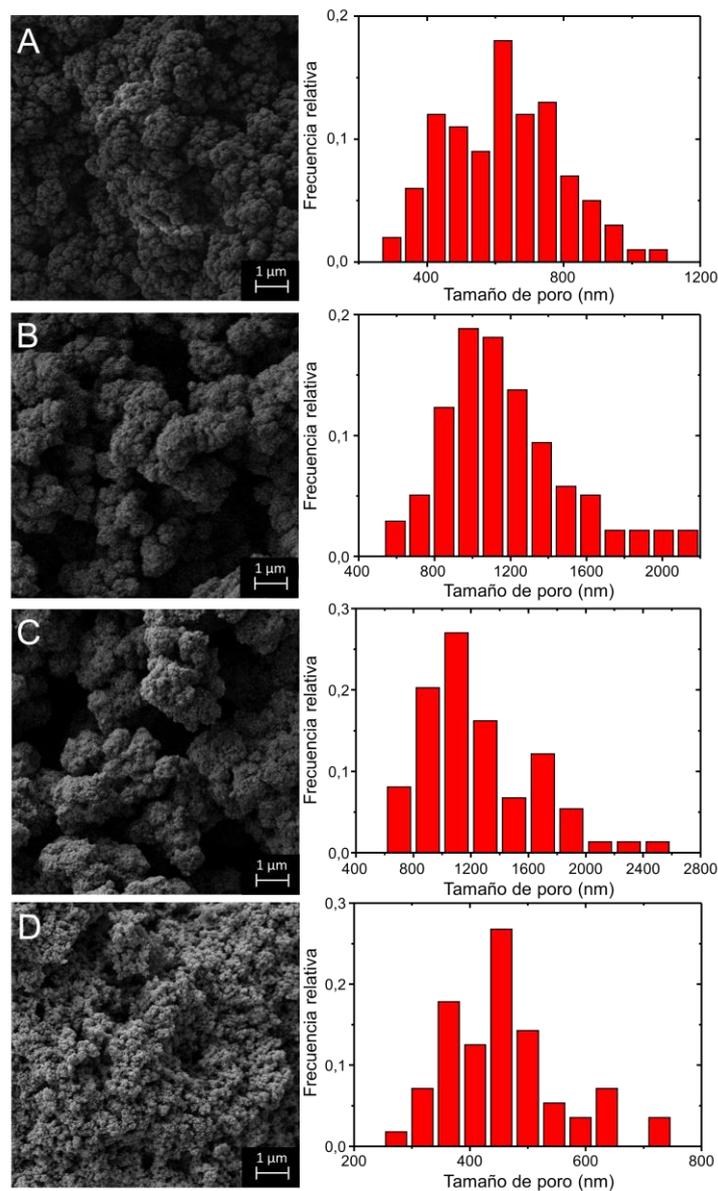
**Fig. 5. 12.** Micrografías SEM de (A) NAT-BIS(2), (B) NAT-ABA20-BIS(2), (C) NAT-ABA30-BIS(2), y (D) NAT-ABA40-BIS(2).

Por otra parte, las imágenes SEM de las matrices basadas en AAC (Fig. 5.13) evidencian la formación de microglóbulos y la generación de poros de gran tamaño. El sistema AAC-BIS posee una distribución de tamaños de poros con un máximo en 700 nm. La presencia de ABA en un 20 % incrementa significativamente los tamaños de poros, donde la distribución ahora posee un máximo en 1500 nm. Sin embargo, cuando el porcentaje de dendrón en el material es mayor, los tamaños de poro disminuyen, incluso llegando a una distribución entre 200-600 nm para el caso de AAC-ABA40-BIS; no obstante, la ventaja a altas concentraciones de dendrón está relacionada a una distribución más homogénea. Este compromiso entre la cantidad de ABA y las propiedades porosas ya ha sido discutido en la sección 5.2.2.1.



**Fig. 5.13.** Micrografías SEM y distribución de tamaños de poros de (A) AAC-BIS, (B) AAC-ABA20-BIS, (C) AAC-ABA30-BIS y (D) AAC-ABA40-BIS.

Con respecto a los polímeros basados en AAm (Fig. 5.14), el sistema AAm-BIS presenta características morfológicas similares a las descritas en los casos anteriores, con una distribución de tamaños de poros similar a AAc-BIS. En este caso, la presencia del monómero dendrítico en un 20 % genera un cambio morfológico, aumentando los tamaños de poros observados con valores de frecuencia máximos entre 1000–1500 nm. Si bien el aumento de la concentración de ABA a 30 % no produce cambios significativos en cuanto a los tamaños, sí se observa una disminución importante al utilizar un 40 % de dendrón, siendo los valores de frecuencia máximos alrededor de los 500 nm; en estos últimos dos casos, se observa además una distribución más homogénea causada por la presencia del dendrón.



**Fig. 5.14.** Micrografías SEM y distribución de tamaños de poros de (A) AAm-BIS, (B) AAm-ABA20-BIS, (C) AAm-ABA30-BIS y (D) AAm-ABA40-BIS.

De esta manera se observa una optimización de las propiedades morfológicas en función de la concentración del MD. En este sentido, es importante destacar que varios reportes indican la preparación de matrices de acrilamida entrecruzadas con BIS con propiedades morfológicas similares (tamaños de poro entre 1000-1300 nm), bajo condiciones de reacción semejantes y comparables [6,14–17]. La ventaja notoria de las matrices de AAc-ABA-BIS y AAm-ABA-BIS se relaciona principalmente por la multifuncionalidad otorgada por la estructura dendrítica, la cual en posteriores secciones se evaluará su aplicación.

### 5.3. Conclusiones parciales

Se sintetizaron barras monolíticas macroporosas por medio de una polimerización radicalaria, utilizando monómeros clásicos (NAT, AAc y AAm) en combinación con un monómero dendrítico multifuncional (ABA). Acorde con los tamaños de poros como criterio, se definieron las condiciones óptimas de reacción, utilizando DMSO como solvente, junto con PEG6000/tetradecanol como agentes co-porógenos. El estudio realizado en el desarrollo del presente capítulo permitió evaluar el efecto de diferentes variables de reacción en las propiedades finales del material. Particularmente, se evidenció la importancia de la estructura dendrítica en el manejo de las propiedades de porosidad, representando el primer reporte de barras monolíticas macroporosas con un monómero dendrítico en su estructura.

La capacidad de generar nuevos polímeros tipo barras monolíticas macroporosas utilizando una estructura dendrítica constituye un aporte importante al avance en la ciencia de los materiales, para su potencial aplicación como soportes, donde las interacciones posibles entre una matriz y un ligando de interés se vean mejoradas.

### 5.4. Referencias

- [1] B.P. Santora, M.R. Gagne, K.G. Moloy, N.S. Radu, Porogen and Cross-Linking Effects on the Surface Area, Pore Volume Distribution, and Morphology of Macroporous Polymers Obtained by Bulk Polymerization, *Macromolecules*. 34 (2001) 658–661.
- [2] R.D. Arrua, C. Moya, E. Bernardi, J. Zarzur, M. Strumia, C.I.A. Igarzabal, Preparation of macroporous monoliths based on epoxy-bearing hydrophilic terpolymers and applied for affinity separations, *Eur. Polym. J.* 46 (2010) 663–672.

- [3] R.D. Arrua, J.S.R. del Barrio, A.G. Ruiz, M. Strumia, C.I.A. Igarzabal, Preparation of polymeric macroporous rod systems: Study of the influence of the reaction parameters on the porous properties, *Mater. Chem. Phys.* 112 (2008) 1055–1060.
- [4] H. Esen, Synthesis and characterization of linear dendritic homo and copolymers acrylated behera amine, *Des. Monomers Polym.* 18 (2015) 745–752.
- [5] M.K. Danquah, G.M. Forde, Preparation of macroporous methacrylate monolithic material with convective flow properties for bioseparation: Investigating the kinetics of pore formation and hydrodynamic performance, *Chem. Eng. J.* 140 (2008) 593–599.
- [6] S. Xie, F. Svec, J.M.J. Frechet, Preparation of porous hydrophilic monoliths: effect of the polymerization conditions on the porous properties of poly (acrylamide-co-*N,N*-methylenebisacrylamide) monolithic rods, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 35 (1997) 1013–1021.
- [7] A. Zhang, L. Okrasa, T. Pakula, A.D. Schlüter, Homologous series of dendronized polymethacrylates with a methyleneoxycarbonyl spacer between the backbone and dendritic side chain: Synthesis, characterization, and some bulk properties, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 6658–6666.
- [8] R. Dong, Y. Zhou, X. Zhu, Supramolecular dendritic polymers: From synthesis to applications, *Acc. Chem. Res.* 47 (2014) 2006–2016.
- [9] R.J. Vonk, S. Wouters, A. Barcaru, G. Vivo-Truyols, S. Eeltink, L.J. de Koning, P.J. Schoenmakers, Post-polymerization photografting on methacrylate-based monoliths for separation of intact proteins and protein digests with comprehensive two-dimensional liquid chromatography hyphenated with high-resolution mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* (2015) 3817–3829.
- [10] F. Svec, J.M.J. Frechet, Kinetic Control of Pore Formation in Macroporous Polymers. Formation of “Molded” Porous Materials with High Flow Characteristics for Separations or Catalysis, *Chem. Mater.* 7 (1995) 707–715.
- [11] L. Chen, J. Ou, Z. Liu, H. Lin, H. Wang, J. Dong, H. Zou, Fast preparation of a highly efficient organic monolith via photo-initiated thiol-ene click polymerization for capillary liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1394 (2015) 103–110.
- [12] T.J. Causon, I. Nischang, Critical differences in chromatographic properties of silica- and polymer-based monoliths, *J. Chromatogr. A.* 1358 (2014) 165–171.
- [13] S.D. Garcia Schejtman, R. Toselli, M.C. Strumia, M. Martinelli, Gelatin films dendronized selectively on one side: enhancing antimicrobial properties and water repellence, *Polym. Bull.* 72 (2015) 3043–3062.
- [14] D. Hoegger, R. Freitag, Acrylamide-based monoliths as robust stationary phases for capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A.* 914 (2001) 211–222.

- [15] D.S. Peterson, T. Rohr, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Enzymatic microreactor-on-a-chip: Protein mapping using trypsin immobilized on porous polymer monoliths molded in channels of microfluidic devices, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4081–4088.
- [16] H. Seto, M. Shibuya, H. Matsumoto, Y. Hoshino, Y. Miura, Glycopolymer monoliths for affinity bioseparation of proteins in a continuous-flow system: glycomonoliths, *J. Mater. Chem. B.* 5 (2017) 1148–1154.
- [17] J.B. Qu, Y.D. Huang, G.L. Jing, J.G. Liu, W.Q. Zhou, H. Zhu, J.R. Lu, A novel matrix derivatized from hydrophilic gigaporous polystyrene-based microspheres for high-speed immobilized-metal affinity chromatography, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011) 1043–1048.

## CAPÍTULO 6

### CRIOGELES SUPERMACROPOROSOS DENDRONIZADOS OBTENIDOS MEDIANTE FOTOPOLIMERIZACIÓN

#### *Consideraciones generales*

En general, los criogeles son preparados a temperaturas comprendidas entre -15 y -30 °C, donde la solución a reaccionar contiene los monómeros y el iniciador. En los materiales sintetizados siguiendo esta metodología, los poros son formados por los cristales del solvente (si se utiliza agua, las propiedades porosas son dadas por los cristales de hielo); en este sentido, se pueden controlar los tamaños de poro entre 1-200  $\mu\text{m}$  (supermacroporos) en función de la temperatura y la velocidad de enfriamiento: cuanto menor sea la velocidad de enfriamiento y mayor la temperatura de congelamiento, mayores serán los tamaños de los cristales de hielo formados y por consiguiente el tamaño de los poros [1]. Los monómeros comúnmente utilizados en solución acuosa son AAm [2,3], *N*-isopropil acrilamida (NIPAm) [4,5], HEMA [6–8], polietilenglicol metacrilato (PEGMA) [9,10], o bien biopolímeros derivatizados [11–13].

En este tipo de reacciones, la velocidad de polimerización es controlada por la concentración de iniciador utilizada, donde generalmente se utiliza persulfato de amonio (APS) como iniciador radicalario y *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamina (TEMED) como activador, debido a que este sistema es uno de los pocos que permite una iniciación eficiente para llevar a cabo polimerizaciones a bajas temperaturas [14]. Si bien los criogeles iniciados por APS/TEMED son uno de los más comúnmente encontrados en bibliografía [15,16], algunos de los principales inconvenientes de los mismos recaen sobre los largos tiempos de reacción incluso de hasta 24 h y la disminución de tamaños de poro debido a la inmediata iniciación de la polimerización de estos sistemas [17,18]. Para contrarrestar estos efectos negativos se puede optar por otro tipo de polimerización para obtener criogeles, siendo una opción la fotopolimerización, debido a que involucra menores tiempos de reacción [19]. Sin embargo, dichas reacciones se encuentran limitadas por factores tales como el tipo de fotoiniciador, la transparencia de la solución de reacción con respecto al tipo de fuente de irradiación, o bien el dispositivo de reacción a utilizar. Además, las dimensiones de los criogeles pueden estar limitadas por la baja penetración de, por ejemplo, fotones UV.

En particular, la fotopolimerización por radicales libres de monómeros con grupos acrilato/metacrilato es una vía atractiva para la síntesis de matrices entrecruzadas, tanto a bajas temperaturas como en un ambiente húmedo [20], lo cual no sólo otorga ventajas

frente a otros mecanismos (en donde dichas condiciones limitan la eficiencia de la reacción), sino que además aporta una manera más sustentable de obtener materiales macroporosos, bajo condiciones “suaves” de reacción y hasta incluso la posibilidad de utilizar fuentes de energía de bajo consumo (LEDs).

Una de las alternativas para llevar a cabo fotopolimerizaciones es la utilización de canforquinona (CQ), una molécula capaz de absorber radiación UV entre 200-300 nm debido a la transición  $\pi-\pi^*$  con una alta absorptividad molar ( $\epsilon_{250\text{nm}}=10000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Este fotoiniciador es capaz también de absorber en la región del visible entre 400-500 nm (responsable de su color amarillo) debido a las transiciones  $n-\pi^*$  del cromóforo  $\alpha$ -dicarbonilo. Si bien lo hace con una absorptividad menor ( $\epsilon_{469\text{nm}} = 40 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), constituye un potencial candidato como iniciador con luz azul (450-500 nm), el cual se encuentra ampliamente utilizado en aplicaciones dentales [21,22].

### 6.1. Objetivos específicos

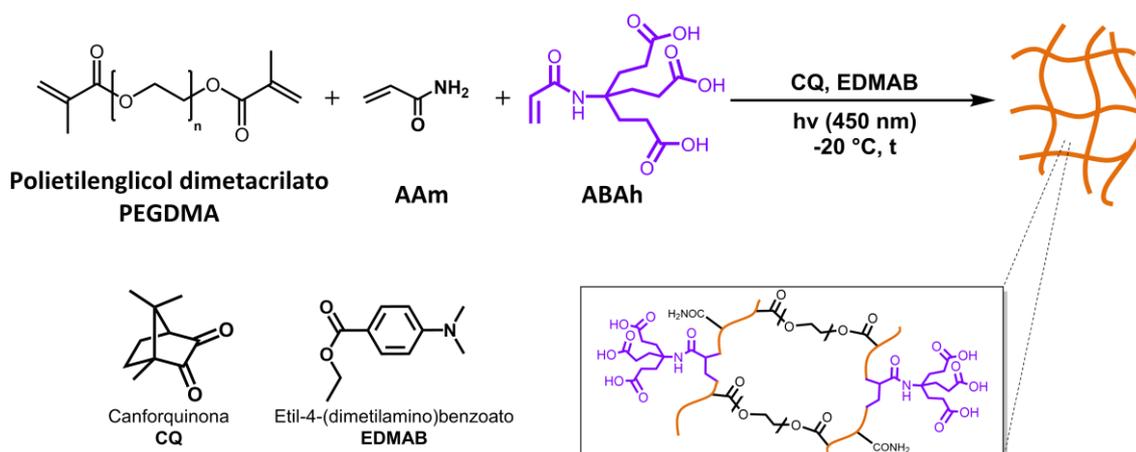
A partir de lo anteriormente descrito, y en base a la importancia de materiales dendronizados ya discutidos durante esta Tesis Doctoral, además de no encontrarse antecedentes bibliográficos sobre criogeles con moléculas dendríticas, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Obtener diferentes criogeles dendronizados, a partir de un monómero dendrítico y diferentes co-monómeros convencionales, como polietilenglicol dimetacrilato de peso molecular  $M_n = 550$  (PEGDMA) y acrilamida.
- Evaluar las condiciones de reacción sobre las propiedades finales del material.
- Estudiar el efecto de la dendronización sobre los criogeles obtenidos.

### 6.2. Resultados y discusión

La reacción de obtención general de los criogeles dendronizados se muestra en el Esquema 6.1. El monómero dendrítico utilizado corresponde al derivado hidrolizado de la amina de Behera acrilada, obtenido por hidrólisis en medio ácido (ABAh) [23,24].

Se obtuvieron criogeles basados en PEGDMA, copolimerizados con AAm y ABAh, empleando diferentes relaciones (en masa) de monómeros. El oligómero PEGDMA fue seleccionado para la preparación de criogeles debido a dos características importantes: (i) su alta solubilidad en agua y (ii) la capacidad general de los monómeros derivados de PEG (de diferente peso molecular) de polimerizar fácilmente mediante fotorreacciones, y particularmente con luz visible, a bajas temperaturas [16,25–28].



**Esquema 6.1.** Reacción de obtención de criogeles supermacroporosos.

La temperatura y velocidad de congelamiento son factores importantes en las reacciones de criogeles. Cuanto menor es la temperatura, mayor será la cantidad de cristales del solvente de menor tamaño que se formen y por lo tanto menores serán los tamaños de poro. Además, a bajas temperaturas el volumen de la microfase líquida disminuye por lo que las paredes de los poros formados disminuyen su espesor [1]. En este trabajo se optó por utilizar una temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , donde además la velocidad de congelamiento fue lenta, permitiendo un mayor tamaño de los cristales de hielo formados, para obtener finalmente mayores tamaños de poro.

La fotoiniciación con canforquinona [29–31] consiste en la irradiación con luz visible para producir la excitación de CQ a su estado singlete, el cual rápidamente se convierte a su estado triplete por un cruzamiento interno. La molécula de CQ excitada no es capaz de iniciar una polimerización debido a efectos estéricos, por lo que en presencia de un compuesto aminoalquílico ( $\text{NR}_3\text{R}'$ ), la CQ se reduce dando como resultado un radical sobre el átomo de nitrógeno, el cual es suficientemente efectivo como iniciador radicalario, adicionándose sobre el doble enlace de los monómeros. Por lo tanto, en este trabajo se utilizó etil-4-dimetil aminobenzoato (EDMAB) como coiniciador (agente reductor), y por su capacidad para estabilizar la formación del radical [29].

A fin de comparar las propiedades finales del material (porosidad, índice de hinchamiento y tamaños de poro) se prepararon criogeles a partir de PEGDMA como único monómero y a partir de PEGDMA co-polimerizado con AAm y con ABAh, empleando diferentes relaciones (en masa) de los monómeros. En todos los casos los rendimientos fueron excelentes ( $>90\%$ ). Los sistemas obtenidos bajo las condiciones óptimas de reacción se muestran en la Tabla 6.1. Todos los criogeles presentaron una alta porosidad (88-95 %) y tamaños de poro superiores a los  $30\text{ }\mu\text{m}$ .

Tabla 6.1. Diferentes criogeles obtenidos.<sup>a</sup>

Entrada	Nombre	Índice de hinchamiento (%)	Porosidad (%)	Tamaños de poro ( $\mu\text{m}$ ) <sup>b</sup>
1	PEGDMA	1600 $\pm$ 100	94,2 $\pm$ 0,4	70 – 220
2	PEGDMA60-AAm40	1300 $\pm$ 100	92,8 $\pm$ 0,8	30 – 100
3	PEGDMA40-AAm60	1460 $\pm$ 2	93,6 $\pm$ 0,1	75 – 150
4	PEGDMA30-AAm70	820 $\pm$ 30	89,1 $\pm$ 0,3	15 – 50
5	PEGDMA30-AAm65-ABAh5	1400 $\pm$ 100	93,2 $\pm$ 0,6	65 – 155
6	PEGDMA30-AAm60-ABAh10	1040 $\pm$ 80	88,4 $\pm$ 0,8	50 – 135
7	PEGDMA30-AAm55-ABAh15	770 $\pm$ 60	91,2 $\pm$ 0,6	30 – 100

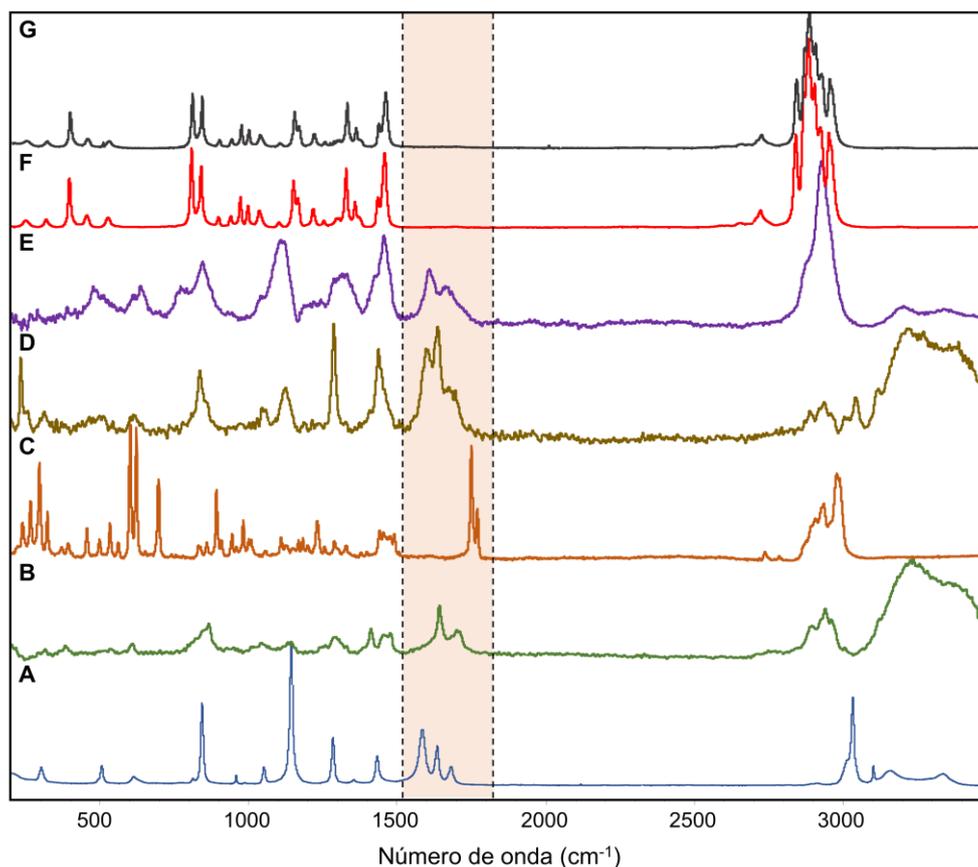
<sup>a</sup> Condiciones; Concentración final de monómeros en solución: 10% p/p. Volumen final: 1 mL. El iniciador se agregó en un 2% respecto a la masa total de monómeros. La relación CQ:EDMAB fue 1:1 (en masa). Temperatura de congelamiento y de reacción: -20 °C. Tiempo de irradiación: 45 min. Longitud de irradiación: 450-500 nm.

<sup>b</sup> Los tamaños de poro se midieron a partir de diferentes imágenes SEM para cada criogel, en estado seco.

## 6.2.1. Condiciones de polimerización. Análisis de distintas variables

### 6.2.1.1. Efecto del tiempo de irradiación

La reacción de polimerización bajo condiciones de baja energía (una fuente de luz visible) se llevó a cabo utilizando un arreglo de luces LEDs de luz azul (450-500 nm). En primera instancia, se realizó el estudio de la eficiencia de la reacción en función del tiempo de exposición a la fuente de luz, de diferentes criogeles de la misma composición (PEGDMA30-AAm70). Para ello, se llevaron a cabo reacciones de polimerización a distintos tiempos de irradiación: 30 (T1), 45 (T2), 60 (T3), 90 (T4) y 120 min (T5). El transcurso de la reacción fue controlado por espectroscopía RAMAN, observando inicialmente la disminución de la intensidad relativa y posteriormente la desaparición de las señales correspondientes a los grupos vinílicos (1500-1800  $\text{cm}^{-1}$ ). Para realizar el análisis se empleó como blanco la mezcla de reacción inicial (T0) y los distintos componentes utilizados, como se observa en la Fig. 6.1. La intensidad relativa de las señales vinílicas de PEGDMA y AAm disminuyen luego de 30 min de exposición (T1) y desaparecen a tiempos mayores a 45 min (T2), lo que indica una conversión completa de los monómeros. Entonces se estableció como tiempo de reacción 45 min para continuar con el estudio de otras variables de reacción.



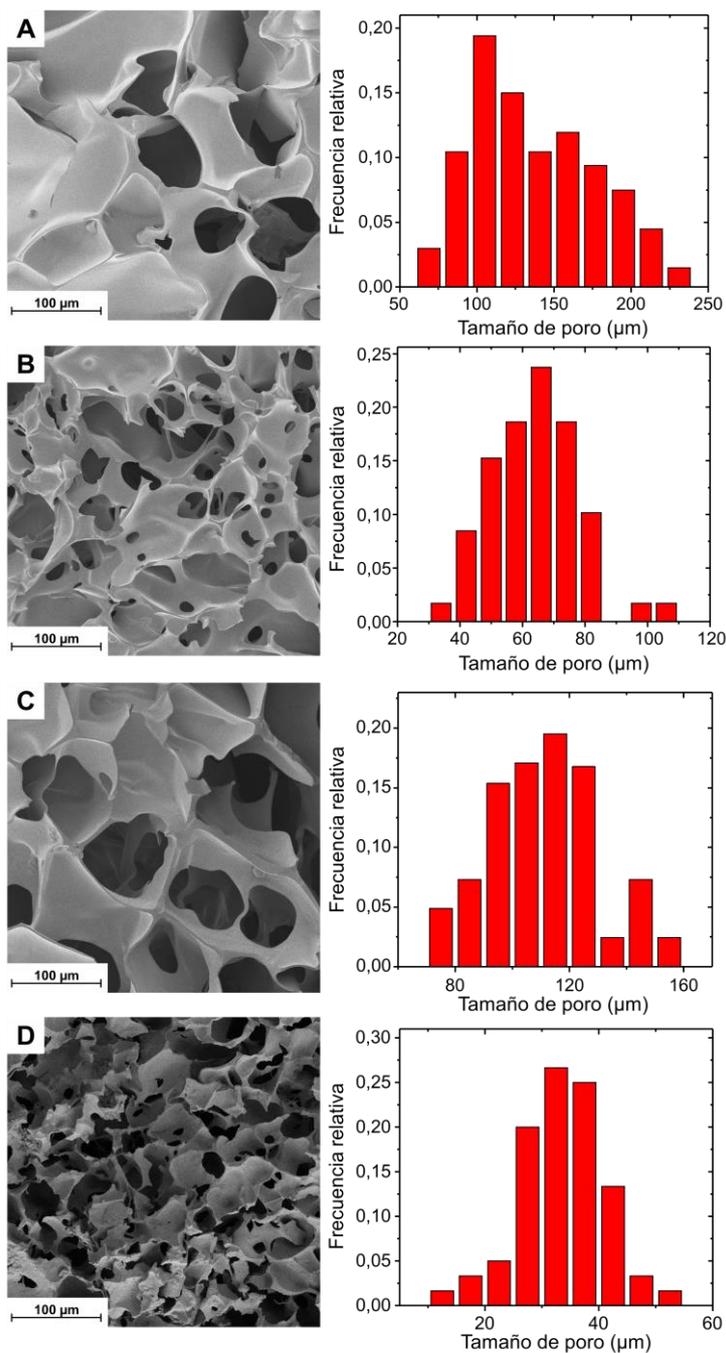
**Fig. 6.1.** Espectros RAMAN de los diferentes reactivos utilizados para la obtención de un criogel de PEGDMA-AAm: (A) AAm, (B) PEGDMA y (C) CQ; mezcla de reacción de PEGDMA-AAm a (D) T0 (blanco), (E) T1, (F) T2 y (G) T3.

#### 6.2.1.2. Efecto del co-monómero

Diferentes co-monómeros fueron utilizados para la preparación de los criogeles. Por un lado, se evaluó el efecto de un monómero convencional en diferentes relaciones, como AAm, debido a la necesidad de una mayor funcionalidad sobre el criogel y especialmente la incorporación de grupos nitrogenados para favorecer la interacción con los ligandos específicos (como se discutirá en el Capítulo 7) [32].

Para llevar a cabo un estudio sobre las propiedades porosas de los diferentes materiales basados en PEGDMA-AAm, se utilizaron micrografías obtenidas por SEM y por microscopia confocal de cada uno de los sistemas obtenidos. Generalmente, no existe una metodología específica para la determinación de los tamaños de poro en materiales blandos y altamente hidratados, en contraste con estructuras rígidas porosas, en la cual se utiliza comúnmente la porosimetría por intrusión de mercurio. Las metodologías de determinación de poros por SEM o microscopia electrónica de barrido ambiental (ESEM) constituyen una alternativa válida y ampliamente utilizada [16–18]. En este trabajo se propuso utilizar microscopia confocal para el estudio de las matrices

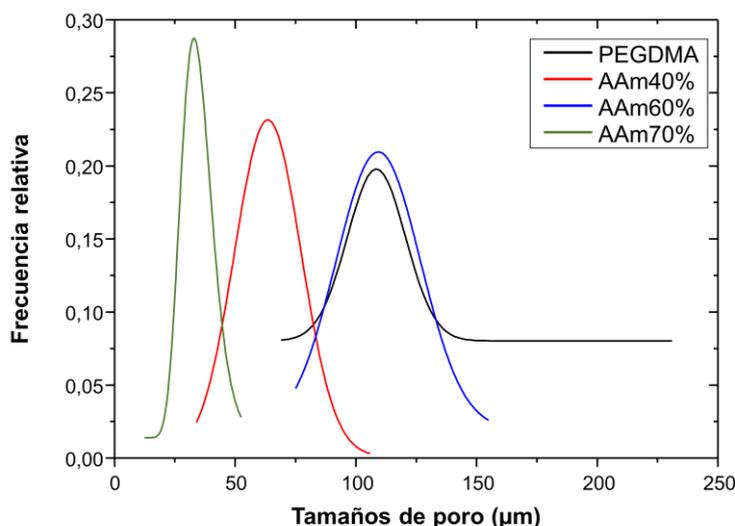
en estado hinchado, debido a que la metodología resulta más sencilla y prácticamente el material no varía de su estado natural. No obstante, es importante destacar que, como se observa en la Tabla 6.1, los materiales poseen altos índices de hinchamiento y por lo tanto los tamaños de poro varían si la red se expande o si colapsa; entonces, dependiendo de la metodología de estudio adoptada (SEM o confocal), los poros observados serán en estado seco o hinchado [18].



**Fig. 6.2.** Micrografías SEM para los criogeles de (A) PEGDMA, (B) PEGDMA60-AAm40, (C) PEGDMA40-AAm60 y (D) PEGDMA30-AAm70.

Una de las propiedades más características de los criogel es la arquitectura supermacroporosa de los mismos, ya que el tamaño de poro se puede modificar debido a diferentes factores [17,33]. La Fig. 6.2 muestra las micrografías SEM de los distintos criogel obtenidos basados en PEGDMA y AAm. En dichas imágenes se observa la naturaleza altamente porosa que poseen los productos, donde además se destaca la formación de canales interconectados, propio de una estructura tipo *monolith*, que en su aplicación como soporte permitirán altas velocidades de flujo, tanto de fluidos como de gases a través del gel, con baja resistencia o presión. Los distintos criogel estudiados variaron la relación PEGDMA:AAm.

La Fig. 6.3 muestra las curvas de ajuste gaussiano de los histogramas de tamaños de poro de cada una de las matrices. El homopolímero de PEGDMA mostró una distribución de tamaños de poro con un máximo cercano a los 110  $\mu\text{m}$ . La inclusión de un monómero pequeño y de distinta funcionalidad – lo que se traduce como un cambio en el entorno químico del material final – causó una distribución diferente, generando tamaños de poro más pequeños, llegando incluso a una reducción máxima de 30  $\mu\text{m}$  con una concentración del 70% de AAm. Además, la presencia de acrilamida generó una distribución más homogénea, como se observa en las curvas. Esto resultados demostraron que las propiedades porosas se pueden controlar variando la composición del criogel (entre PEGDMA y AAm), obteniendo en todos los casos matrices supermacroporosas.



**Fig. 6.3.** Curvas de distribución de tamaños de poro para los criogel de PEGDMA y AAm, a partir de los histogramas mostrados en la Fig. 6.2.

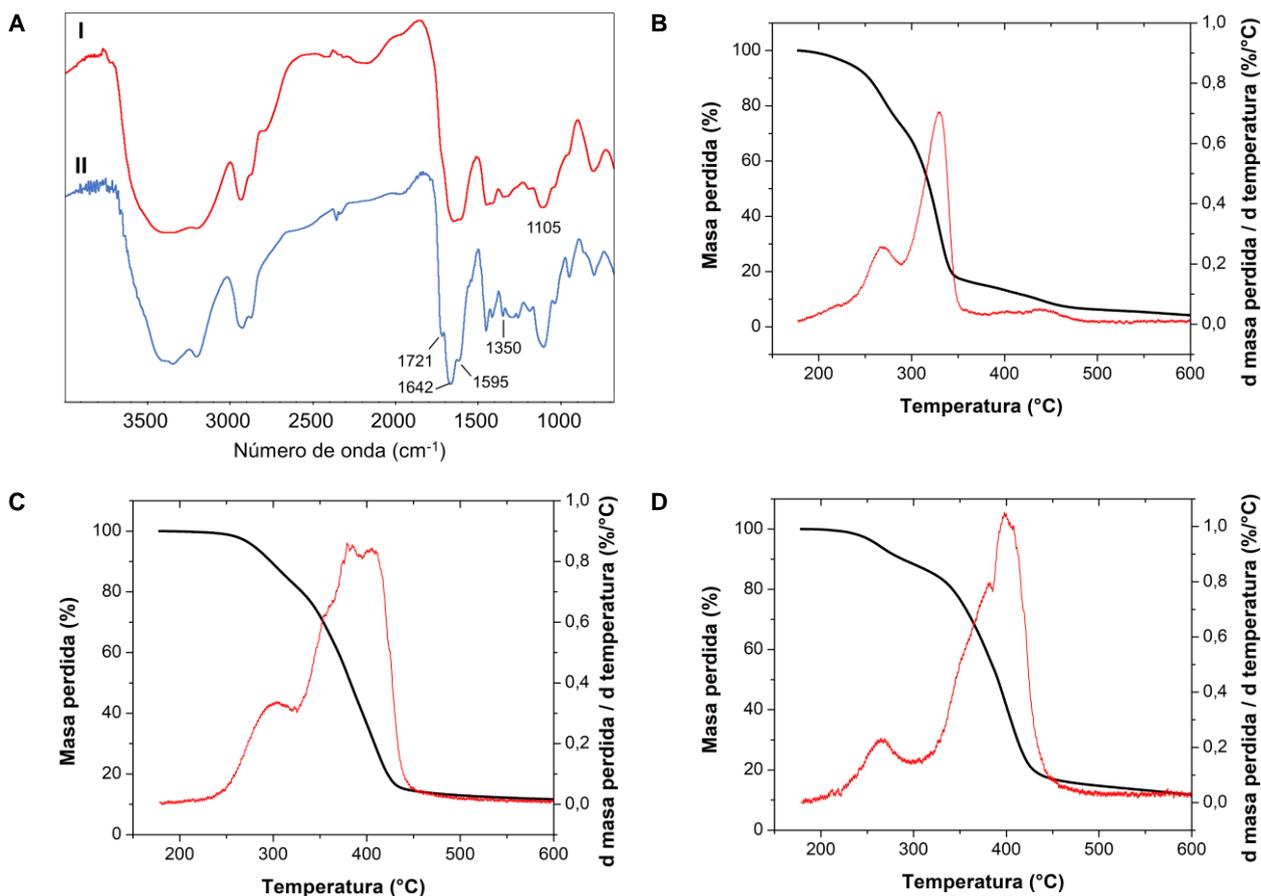
Con respecto a los valores del índice de hinchamiento mostrados en la Tabla 6.1, el homopolímero de PEGDMA muestra una capacidad de hinchamiento superior al

1600 %. En este sentido, se entiende que el PEGDMA posee una cadena larga (lo que implica puntos de entrecruzamiento alejados), otorgando mayor flexibilidad a la red entrecruzada del criogel y por consiguiente mayor capacidad de modificar su tamaño en presencia y en ausencia del solvente. La presencia del monómero AAm genera un cambio en la estructura porosa del material, modificando ligeramente ciertas propiedades tales como la capacidad de hincharse en agua. En efecto, el índice de hinchamiento disminuyó en un 50% respecto al criogel de PEGDMA atribuible al incremento de la rigidez del material; a pesar de que los puntos (densidad) de entrecruzamiento disminuyen por poseer una menor concentración de PEGDMA, la incorporación del monómero AAm podría generar interacciones del tipo puente hidrógeno entre las cadenas poliméricas, dificultando de esta manera el ingreso de agua.

#### 6.2.1.3. Incorporación del monómero dendrítico ABAh

En última instancia y habiendo encontrado las condiciones de reacción óptimas empleando monómeros clásicos, se continuó el estudio del efecto de la dendronización de criogeles. Es importante destacar que no existen antecedentes respecto al uso de estructuras dendríticas en este tipo de materiales.

Se evaluó entonces el efecto de ABAh (un macromonómero dendrítico con grupos ácido en la periferia) sobre criogeles basados en PEGDMA y AAm. En primer lugar, se confirmó la incorporación del dendrón en el criogel por espectroscopia FT-IR y análisis térmico, como se muestra en la Fig. 6.4. En el espectro del criogel PEDGMA-AAm se observó la señal característica de los grupos éter del PEGDMA a  $1105\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento C-O-C), además de las señales Amida I, II y III ( $1642$ ,  $1595$  y  $1350\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente) pertenecientes al monómero AAm. La incorporación del monómero ABAh se comprobó mediante la aparición de una señal a  $1721\text{ cm}^{-1}$  atribuida al estiramiento C=O del grupo carbonilo del ácido del dendrón. Además, se observa un incremento en la intensidad relativa de las bandas amida correspondientes a los grupos acrilamida.

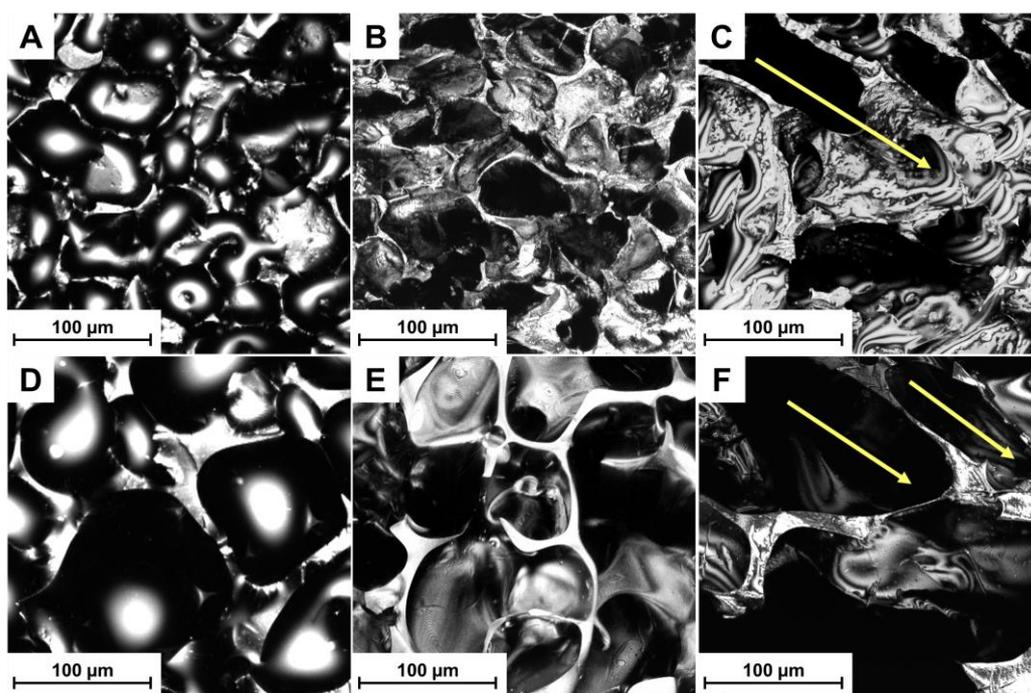


**Fig. 6.4.** (A) Espectros FT-IR de (I) PEGDMA30-AAm70 y (II) PEGDMA30-AAm55-ABAh15; curvas TGA y DTG de: (B) ABAh, (C) PEGDMA30-AAm70 y (D) PEGDMA30-AAm55-ABAh15.

Por otra parte, se llevó a cabo la comparación del comportamiento térmico, tanto del monómero ABAh como de ambos criogeles, como se muestra en la Fig. 6.4. El perfil de descomposición térmico del dendrón (Fig. 6.4B) muestra dos pérdidas de masa importantes con picos de descomposición a 267 y 329 °C, mientras que el criogel PEDMA-AAm (Fig. 6.4.C) muestra un perfil de descomposición distinto, y se observa un pico a 300 °C, entre otros a mayor temperatura. El criogel dendronizado PEGDMA-AAm-ABAh (Fig. 6.4.D) posee una primera descomposición a 263 °C, indicando la presencia del monómero dendrítico. De esta manera, tanto por FT-IR como por análisis termogravimétrico se corroboró la incorporación de ABAh a la matriz.

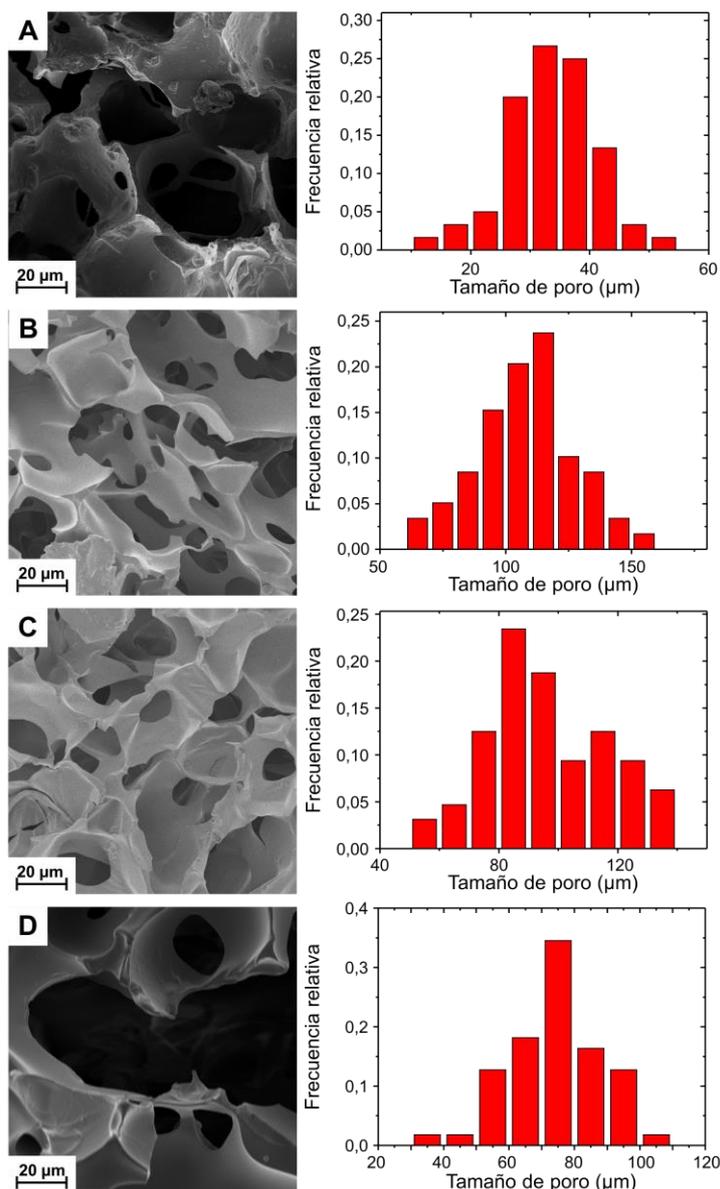
La Fig. 6.5 muestra la morfología de dos matrices, PEGDMA30-AAm70 y PEGDMA30-AAm55-ABAh15, obtenidas por microscopía confocal, con el propósito de estudiar el efecto del dendrón. Se tomaron imágenes por microscopía confocal, tanto en estado hinchado como en estado húmedo, para ambos criogeles. La matriz sin dendrón mostró tamaños de poros en estado hinchado alrededor de 60  $\mu\text{m}$  (Fig. 6.5A), mientras que al secarse los tamaños disminuyen (Fig. 6.5B), demostrando el comportamiento de la red frente al solvente, de acuerdo con lo descrito en el comportamiento del índice de

hinchamiento. Además, las imágenes por cortes longitudinales permitieron mostrar la formación de canales por toda la estructura debido a la alta porosidad (Fig. 6.5C). Por otra parte, al agregar un 15% de ABAh los tamaños de poro del criogel hinchado (Fig. 6.5D) incrementan hasta 120  $\mu\text{m}$ , mientras que en estado seco disminuyen alrededor de un 50 % (Fig. 6.5E). La presencia de los grupos COOH del dendrón genera interacciones entre ellos (puente hidrógeno), las cuales impiden la unión de moléculas de agua, por lo tanto, el índice de hinchamiento disminuye. La Fig. 6.5F muestra las cavidades en un corte longitudinal, formadas en el criogel PEGDMA30-AAm55-ABAh15, donde se demuestra que los canales son afectados por la estructura dendrítica, así como el tamaño de las paredes de la red polimérica.



**Fig. 6.5.** Imágenes por microscopía confocal de: criogel *PEGDMA30-AAm70* (A) en estado hinchado, (B) en estado seco y (C) un corte longitudinal; criogel *PEGDMA30-AAm55-ABAh15* (D) en estado hinchado, (E) en estado seco y (F) un corte longitudinal.

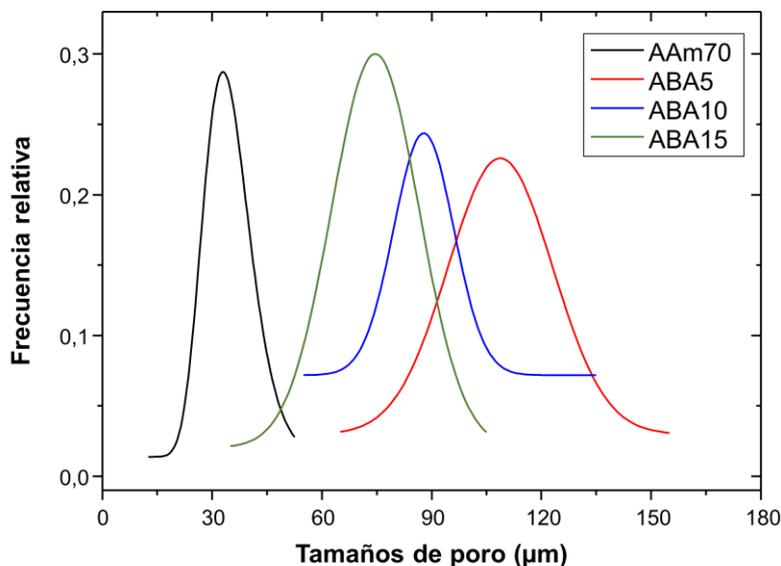
Por otra parte, se evaluó el efecto de la concentración del dendrón sobre criogeles basados en PEGDMA y AAm, comparando la morfología observada por imágenes SEM y los histogramas de cada muestra (Fig. 6.6).



**Fig. 6.6.** Micrografías SEM e histogramas de los criogeles: (A) PEGDMA30-AAm70, (B) PEGDMA30-AAm65-ABAh5, (C) PEGDMA30-AAm60-ABAh10 y (D) PEGDMA30-AAm55-ABAh15.

El criogel en ausencia del dendrón muestra una estructura altamente porosa con una distribución de tamaños de poros con un máximo alrededor de los 30  $\mu\text{m}$ . La estructura dendrítica, en todas las concentraciones estudiadas, incrementa los tamaños de poros. Sin embargo, dicho incremento se observa mayormente con un 5 % de ABAh, donde el máximo de tamaño corresponde a 110  $\mu\text{m}$ . Es decir que para concentraciones mayores de dendrón (10 y 15 %), los tamaños de poros vuelven a disminuir. Esto podría indicar que el dendrón presente en las cadenas poliméricas permite el crecimiento de cristales de hielo de mayor tamaño, independientemente de su concentración, permitiendo generar poros de mayor tamaño. Sin embargo, existe un compromiso entre

la concentración de ABAh y la distribución de tamaños de poros del criogel, siendo mayor cuando la concentración de dendrón es baja. La Fig. 6.7 muestra las curvas de ajuste de los distintos histogramas, donde se puede observar además que la presencia del dendrón genera distribuciones menos homogéneas.



**Fig. 6.7.** Curvas de distribución de tamaños de poro para los criogeles basados en PEGDMA, AAm y ABAh, a partir de los histogramas (Fig. 6.6).

Por otra parte, si se comparan los valores de índice de hinchamiento para distintas concentraciones de ABAh, se observa que el dendrón disminuye la capacidad de hincharse del criogel, conforme aumenta su concentración; esto puede entenderse como un mayor número de interacciones del tipo puente hidrógeno entre las cadenas poliméricas debido a la presencia de los grupos COOH de la estructura dendrítica, lo cual impide la interacción del material con las moléculas del solvente [24].

### 6.3. Conclusiones parciales

Sistemas tipo criogeles supermacroporosos a partir de monómeros convencionales y una estructura dendrítica fueron obtenidos durante el desarrollo de esta etapa del trabajo de Tesis. La metodología de obtención consistió en una fotopolimerización bajo condiciones de reacción sencillas, siendo una alternativa novedosa en la obtención de criogeles. Los tiempos óptimos de irradiación de luz LED azul no superaron los 45 min, dando como resultado conversiones completas y estructuras supermacroporosas, con tamaños de poros entre 30 y 200 μm. La incorporación del dendrón fue eficiente, demostrándose el efecto del entorno químico

debido a su multifuncionalidad, modificando la morfología final del material, variando los tamaños de poros, tamaño de las paredes de la red y su capacidad de expandirse. De esta manera, este trabajo presentó el primer reporte de criogeles dendronizados con multifuncionalidad ácida y la capacidad de ajustar las propiedades porosas en función de la concentración de dendrón utilizado. Los criogeles obtenidos demostraron poseer propiedades para ser utilizados como potenciales soportes mediante una interacción específica con un ligando.

#### 6.4. Referencias

- [1] V.I. Lozinsky, F.M. Plieva, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, The potential of polymeric cryogels in bioseparation, *Bioseparation*. 10 (2001) 163–188.
- [2] X.Y. Zhan, D.P. Lu, D.Q. Lin, S.J. Yao, Preparation and characterization of supermacroporous polyacrylamide cryogel beads for biotechnological application, *J. Appl. Polym. Sci.* 130 (2013) 3082–3089.
- [3] B.M.A. Carvalho, S.L. Da Silva, L.H.M. Da Silva, V.P.R. Minim, M.C.H. Da Silva, L.M. Carvalho, L.A. Minim, Cryogel Poly(acrylamide): Synthesis, Structure and Applications, *Sep. Purif. Rev.* 43 (2014) 241–262.
- [4] C. Zamecnik, M.J. Loureiro, C. Postnikoff, Y. Kong, A. Penlidis, Synthesis and Morphology of poly(*N*-isopropylacrylamide) Nanocomposites with Emulsion Templated Nanoporous Structure, *J. Macromol. Sci. Part A.* 49 (2012) 906–909.
- [5] S. Zheng, T. Wang, D. Liu, X. Liu, C. Wang, Z. Tong, Fast deswelling and highly extensible poly(*N*-isopropylacrylamide)-hectorite clay nanocomposite cryogels prepared by freezing polymerization, *Polymer*. 54 (2013) 1846–1852.
- [6] D. Çimen, A. Denizli, Immobilized metal affinity monolithic cryogels for cytochrome c purification, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 93 (2012) 29–35.
- [7] I. Perçin, E. Sağlar, H. Yavuz, E. Aksöz, A. Denizli, Poly(hydroxyethyl methacrylate) based affinity cryogel for plasmid DNA purification, *Int. J. Biol. Macromol.* 48 (2011) 577–582.
- [8] A. Elkak, A. Hamade, N. Bereli, C. Armutcu, A. Denizli, Synthesis of hydroxyethyl-methacrylate-(L)-histidine methyl ester cryogels. Application on the separation of bovine immunoglobulin G, *Anal. Biochem.* 525 (2017) 1–7.
- [9] Z. Chen, L. Xu, Y. Liang, J. Wang, M. Zhao, Y. Li, Polyethylene glycol diacrylate-based supermacroporous monolithic cryogel as high-performance liquid chromatography stationary phase for protein and polymeric nanoparticle separation, *J. Chromatogr. A.* 1182 (2008) 128–131.
- [10] M. Uygun, D.A. Uygun, E. Özçalışkan, S. Akgöl, A. Denizli, Concanavalin A

- immobilized poly(ethylene glycol dimethacrylate) based affinity cryogel matrix and usability of invertase immobilization, *J. Chromatogr. B.* 887–888 (2012) 73–78.
- [11] D. Singh, S.M. Zo, A. Kumar, S.S. Han, Engineering three-dimensional macroporous hydroxyethyl methacrylate-alginate-gelatin cryogel for growth and proliferation of lung epithelial cells, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 24 (2013) 1343–1359.
- [12] S.T. Koshy, T.C. Ferrante, S.A. Lewin, D.J. Mooney, Injectable, porous, and cell-responsive gelatin cryogels, *Biomaterials.* 35 (2014) 2477–2487.
- [13] T. Kutlusoy, B. Oktay, N.K. Apohan, M. Süleymanoğlu, S.E. Kuruca, Chitosan-co-Hyaluronic acid porous cryogels and their application in tissue engineering, *Int. J. Biol. Macromol.* 103 (2017) 366–378.
- [14] B. Mattiasson, A. Kumar, Igor Yu. Galaev, *Macroporous Polymers. Production Properties and Biotechnological/Biomedical Applications*, 1st ed., CRC Press, Lund University, Sweden, 2009.
- [15] A. Elkak, A. Hamade, N. Bereli, C. Armutcu, A. Denizli, Synthesis of hydroxyethyl-methacrylate-(L)-histidine methyl ester cryogels. Application on the separation of bovine immunoglobulin G, *Anal. Biochem.* 525 (2017) 1–7.
- [16] Y. Hwang, C. Zhang, S. Varghese, Poly(ethylene glycol) cryogels as potential cell scaffolds: effect of polymerization conditions on cryogel microstructure and properties, *J. Mater. Chem.* 20 (2010) 345–351.
- [17] F.M. Plieva, M. Karlsson, M.-R. Aguilar, D. Gomez, S. Mikhalovsky, I.Y. Galaev', Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels, *Soft Matter.* 1 (2005) 303–309.
- [18] F. Plieva, X. Huiting, I.Y. Galaev, B. Bergenstahl, B. Mattiasson, B. Bergenståhl, B. Mattiasson, Macroporous elastic polyacrylamide gels prepared at subzero temperatures: control of porous structure, *J. Mater. Chem.* 16 (2006) 4065–4073.
- [19] P. Petrov, E. Petrova, C.B. Tsvetanov, UV-assisted synthesis of supermacroporous polymer hydrogels, *Polymer.* 50 (2009) 1118–1123.
- [20] S. Reichelt, ed., *Affinity chromatography: Methods and protocols*, 3rd Ed, Springer, Leipzig, Germany, 2015.
- [21] P.F. Abate, V.N. Zahra, R.L. Macchi, Effect of photopolymerization variables on composite hardness, *J. Prosthet. Dent.* 86 (2001) 632–635.
- [22] D.-S. Lee, T.-S. Jeong, S. Kim, H.-I. Kim, Y.H. Kwon, Effect of dual-peak LED unit on the polymerization of coinitiator-containing composite resins, *Dent. Mater. J.* 31 (2012) 656–661.
- [23] J.C. Cuggino, M. Calderon, C.I. Alvarez, M.C. Strumia, K.N. Silva, E.K. Penott-Chang, A.J. Muller, New dendronized polymers from acrylate Behera amine and

- their ability to produce visco-elastic structured fluids when mixed with CTAT worm-like micelles, *J. Colloid Interface Sci.* 357 (2011) 147–156.
- [24] G.N. Rimondino, E. Miceli, M. Molina, S. Wedepohl, S. Thierbach, E. Rühl, M. Strumia, M. Martinelli, M. Calderón, Rational design of dendritic thermoresponsive nanogels that undergo phase transition under endolysosomal conditions, *J. Mater. Chem. B.* 5 (2017) 866–874.
- [25] M. Barrow, A. Eltmimi, A. Ahmed, P. Myers, H. Zhang, Frozen polymerization for aligned porous structures with enhanced mechanical stability, conductivity, and as stationary phase for HPLC, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 11615.
- [26] M.M. Ozmen, Q. Fu, J. Kim, G.G. Qiao, A rapid and facile preparation of novel macroporous silicone-based cryogels via photo-induced thiol-ene click chemistry, *Chem. Commun.* 51 (2015) 17479–17482.
- [27] W.F. Schroeder, R.J.J. Williams, C.E. Hoppe, H.E. Romeo, Unidirectional freezing as a tool for tailoring air permeability in macroporous poly(ethylene glycol)-based cross-linked networks, *J. Mater. Sci.* 52 (2017) 13669–13680.
- [28] H.D. Kim, J. Kim, R.H. Koh, J. Shim, J.-C. Lee, T.-I. Kim, N.S. Hwang, Enhanced Osteogenic Commitment of Human Mesenchymal Stem Cells on Polyethylene Glycol-Based Cryogel with Graphene Oxide Substrate, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 3 (2017) 2470–2479.
- [29] J. Jakubiak, X. Allonas, J.P. Fouassier, A. Sionkowska, E. Andrzejewska, L.Å. Linden, J.F. Rabek, Camphorquinone-amines photoinitiating systems for the initiation of free radical polymerization, *Polymer.* 44 (2003) 5219–5226.
- [30] Y.C. Chen, J.L. Ferracane, S.A. Prah, Quantum yield of conversion of the photoinitiator camphorquinone, *Dent. Mater.* 23 (2007) 655–664.
- [31] J. V. Crivello, M. Sangermano, Visible and Long-Wavelength Photoinitiated Cationic Polymerization, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 39 (2001) 343–356.
- [32] P.W. Gout, L. Morganti, Current and prospective applications of metal ion – protein binding, *Journal Chromatogr. A.* 988 (2003) 1–23.
- [33] A. Kumar, *Supermacroporous Cryogels: Biomedical and Biotechnological Applications*, CRC Press, 2016.





# SECCIÓN IV

---

Aplicación



# CAPÍTULO 7

## INMOVILIZACIÓN DE IONES METÁLICOS SOBRE SOPORTES

### *Consideraciones generales*

La unión de proteínas (o péptidos) a iones metálicos, se fundamenta en la interacción entre un grupo donador de electrones (GDE) presente en la superficie de la proteína con sitios de coordinación disponibles del ion metálico [1]. En IMAC, este ion metálico se encuentra unido a través de un grupo (o grupos) quelante presente en la matriz (Fig. 7.1), lo que se denomina ligando afín, como ya se mencionó anteriormente. Cuando el ion metálico es cargado, se genera un complejo metal-quelante; no obstante, el ion metálico en el complejo debe poseer sitios de coordinación libres, los cuales luego unirán al compuesto a resolver (proteína). La posibilidad y/o eficiencia de una interacción entre el metal y una proteína se puede predecir en función de la acidez (iones metálicos) o basicidad (grupos disponibles en proteínas) de Lewis; en general, los iones metálicos más utilizados corresponden a los metales de transición del tipo Me(II), tales como Co(II), Zn(II), Cu(II) y Ni(II), los cuales se consideran ácidos de Lewis moderados [2]. Por otra parte, estos iones coordinan eficientemente átomos de nitrógeno – principalmente aromáticos (bases de Lewis moderadas) – así como átomos de azufre (bases débiles) presentes en las proteínas [3]. Bajo estos fundamentos, la histidina es el aminoácido con la mayor afinidad por iones metálicos, seguido de triptófano y cisteína, y de esta manera conforman los principales sitios de unión de proteínas en IMAC [4].

La mayoría de los grupos utilizados como quelantes presentes en el soporte son compuestos multidentados, siendo el ácido iminodiacético (IDA) uno de los agentes más utilizados en columnas para IMAC, donde tanto el átomo de nitrógeno presente como los grupos ácido de la molécula son capaces de quelar al metal [5,6]. Por otra parte, diferentes autores han obtenido nuevos materiales como soportes de IMAC (tanto barras monolíticas como criogeles), innovando en el uso de nuevas moléculas como sitios de unión de iones metálicos [7–11]. Por ejemplo, Çimen y Denizli [12] desarrollaron un criogel a partir de HEMA y un monómero sintético de L-histidina metil éster, generando así un potencial centro de unión de iones Cu(II), para la posterior purificación de citocromo c. Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, se abordó el trabajo en este Capítulo.

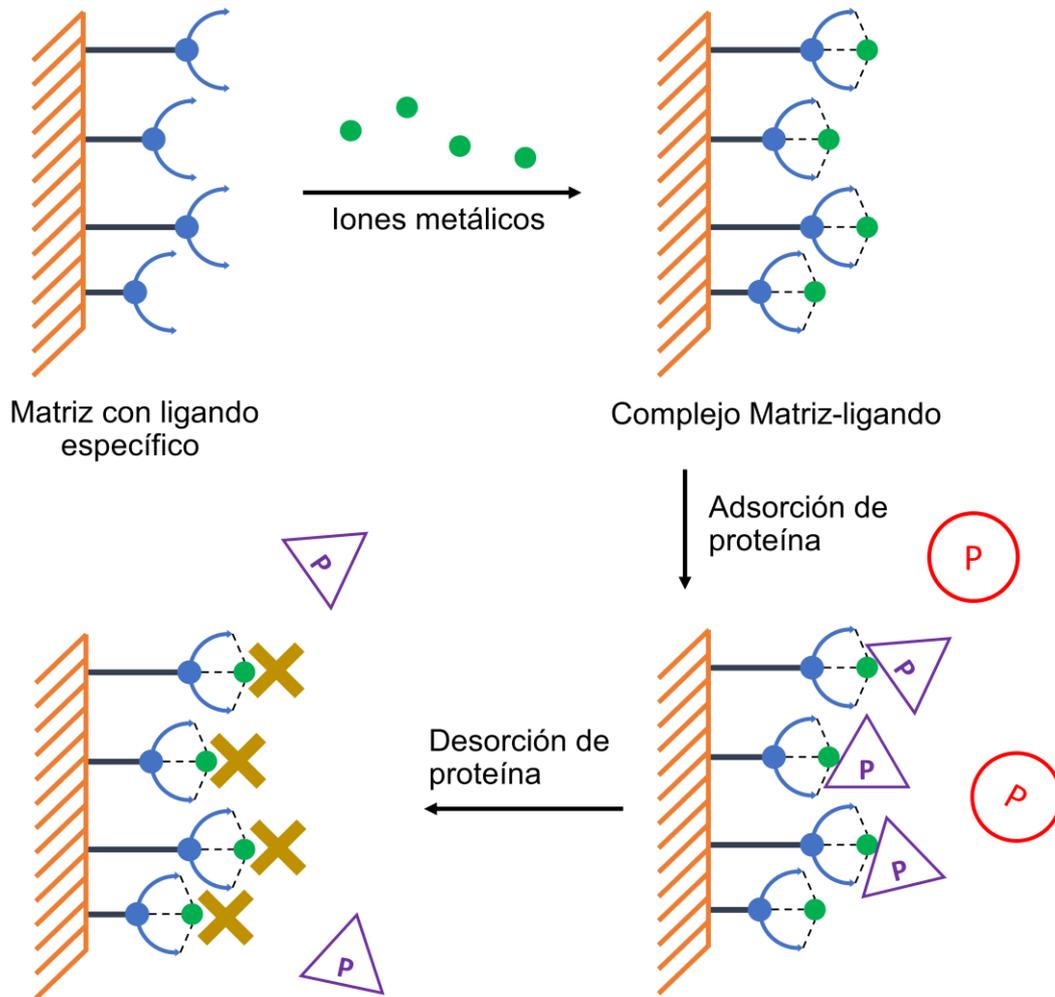


Fig. 7.1. Diagrama del mecanismo involucrado en retención y elución en IMAC.

### 7.1. Objetivos específicos

A partir de lo mencionado anteriormente y habiendo sintetizado diversos soportes, el objetivo de este capítulo fue:

- Inmovilizar diferentes iones metálicos, tales como Cu(II) y Zn(II), sobre la estructura polimérica y cuantificar el grado de retención.
- Estudiar el efecto de la composición de la matriz polimérica en la capacidad de inmovilización de iones metálicos.
- Estudiar la contribución del monómero dendrítico a la interacción matriz-metal.

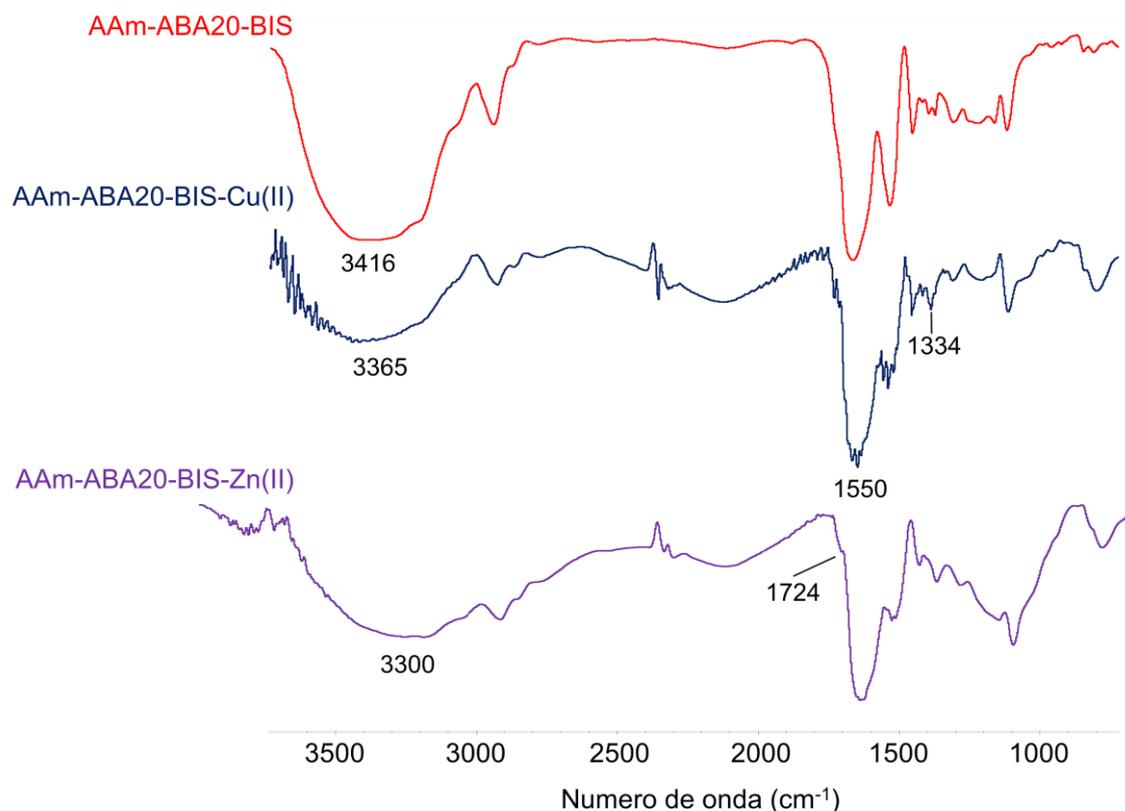
## 7.2. Resultados y discusión

### 7.2.1. Inmovilización de iones Cu(II) y Zn(II)

La inmovilización de los iones metálicos sobre las matrices previamente sintetizadas es una metodología sencilla; las matrices al ser sumergidas en una solución concentrada de  $\text{CuSO}_4$  o de  $\text{ZnCl}_2$  durante un tiempo prolongado, se “saturan” en iones Cu(II) y Zn(II), respectivamente. Los iones que no se encuentran interaccionando específicamente, es decir, acomplejados a la matriz, se eliminan por un cambio de pH del medio [1]. La formación del complejo matriz-Me(II) tendrá lugar principalmente a través de los átomos de nitrógeno y oxígeno de los grupos amida presentes en los distintos polímeros obtenidos [13]. Sin embargo, se conocen reportes donde dichas interacciones pueden establecerse por otros átomos disponibles en la estructura. Aldana y colaboradores [14] demostraron que diversos polímeros dendronizados son capaces de interaccionar con iones Cu(II), mediante grupos presentes en las cavidades del dendrón amina de Behera. Además, Lu-Bin y colaboradores [15] propusieron diferentes modelos de complejos formados por un polímero de IDA y 1,10-fenantrolino (Phe) con iones Zn(II) donde el metal es capaz de interacciones por diferentes grupos funcionales presentes en la estructura, dependiendo incluso del pH del medio.

La formación de los complejos entre los distintos *monoliths* dendronizados y los iones Cu(II) y Zn(II) se corroboraron mediante espectroscopía infrarroja (Fig. 7.2). La aparición de una banda a  $1334\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la formación de un nuevo enlace N-Cu-O y el desdoblamiento de la señal a  $1550\text{ cm}^{-1}$  (amida II, N-H), evidencian la interacción de los iones Cu(II) con los átomos de nitrógeno de los distintos grupos amida del polímero; además, el corrimiento de la señal de  $3416$  a  $3365\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento N-H) y la disminución de su intensidad relativa, indicaron cambios en el entorno químico de los grupos N-H presentes.

En el espectro de la muestra AAm-ABA20-BIS-Zn(II) se observa una disminución significativa de las señales correspondientes a las interacciones puente H y al estiramiento N-H ( $3300\text{ cm}^{-1}$ ), debido a una evidente coordinación entre los grupos amida y éster de la matriz con los iones Zn(II). Análogamente a la misma muestra, pero con iones Cu(II), se observa el desdoblamiento de las señales correspondientes a los grupos carbonilo a  $1530\text{ cm}^{-1}$ , e incluso la aparición de una nueva señal (hombro) a  $1724\text{ cm}^{-1}$ .



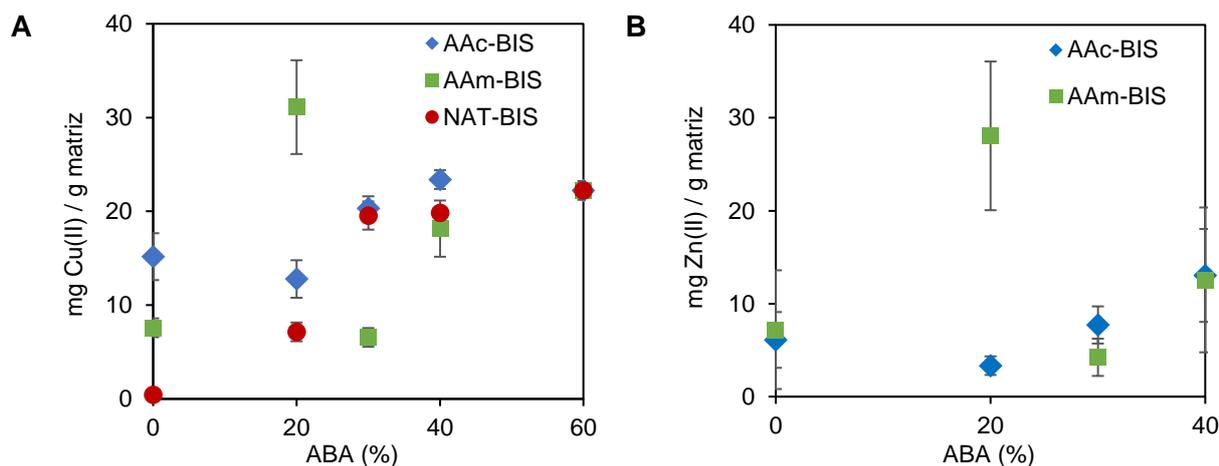
**Fig. 7.2.** Espectros FT-IR de una matriz en ausencia y en presencia del ligando inmovilizado.

#### 7.2.1.1. Barras monolíticas macroporosas

Se realizó la inmovilización de Cu(II) en las diferentes matrices macroporosas obtenidas, basadas en NAT, AAm y AAc, y copolimerizados con ABA. La Fig. 7.3 muestra los valores de concentración de iones Cu(II) y Zn(II) obtenidos mediante absorción atómica, los cuales se encuentran inmovilizados específicamente, es decir, luego del lavado, en función de la concentración de dendrón y para cada tipo de matriz.

La concentración máxima de iones Cu(II) retenidos en las matrices basadas en NAT se alcanzó cuando la cantidad de ABA fue de un 30 %. En el caso de las matrices de AAm, el comportamiento varió en cada punto, siendo máxima la retención con un 20 % de dendrón, indicando así un compromiso entre la cantidad de grupos funcionales presentes, la disposición de estos en la estructura y su disponibilidad frente al ion metálico. Por otra parte, los polímeros basados en AAc mostraron un máximo de retención a una concentración de 40 % de ABA. Si bien no se encuentra un único patrón de comportamiento en la interacción matriz-metal, en todos los casos la retención fue nula o pobre para aquellos *monoliths* no dendronizados (0 % de ABA), independientemente del co-monómero. Además, la mayor retención observada fue para

la matriz AAm-ABA20-BIS, para ambos iones estudiados. Esto podría indicar que las interacciones entre las especies presentes en el polímero son más importantes en todas las matrices, evitando la formación de complejos con Me(II). De esta manera se evidencia la importancia del entorno químico en la capacidad de retención propia del dendrón, así como la disponibilidad de los grupos funcionales dentro de la estructura del material.



**Fig. 7.3.** Valores de retención de (A) iones Cu(II) y (B) iones Zn(II) para distintas barras monolíticas macroporosas, en función de la concentración de ABA.

La Tabla 7.1 muestra en porcentaje la cantidad de metal específicamente unido en relación con la cantidad inicialmente retenida, observando que el dendrón incrementa la efectividad de las interacciones matriz-metal, debido al incremento del porcentaje de Cu(II) específico (90 % para matrices basadas en AAc y hasta un 100 % para matrices basadas en AAm). Además, observando el valor de la cantidad de Cu(II) interaccionando sólo con el dendrón en las matrices basadas en NAT y considerando que a 0 % de ABA la matriz no retiene iones Cu(II), esto indicaría que el único responsable de la interacción es el dendrón, es decir, el monómero dendrítico le confiere a una matriz la propiedad de generar interacciones específicas con el ligando de interés. En este sentido, se compararon además la cantidad de Cu(II) / mol dendron para las matrices con un 20 y un 30 % de ABA y se observó que la cantidad de iones inmovilizados incrementó en un 100 % mientras que la cantidad de dendrón solo lo hizo en un 50 %. Esto es indicativo de que la estructura dendrítica (en una concentración del 30 %) genera mayores interacciones en su conjunto que las interacciones individuales, lo cual se lo puede definir como un *efecto dendrítico positivo* [14,16,17].

Contrariamente, las matrices basadas en AAm disminuyen la cantidad de iones retenidos por mol de dendrón, cuando la concentración de ABA incrementa, siendo así a mayores concentraciones, menores las interacciones en conjunto que de cada

molécula dendrítica individual, indicando así un *efecto dendrítico negativo*, a concentraciones altas de dendrón.

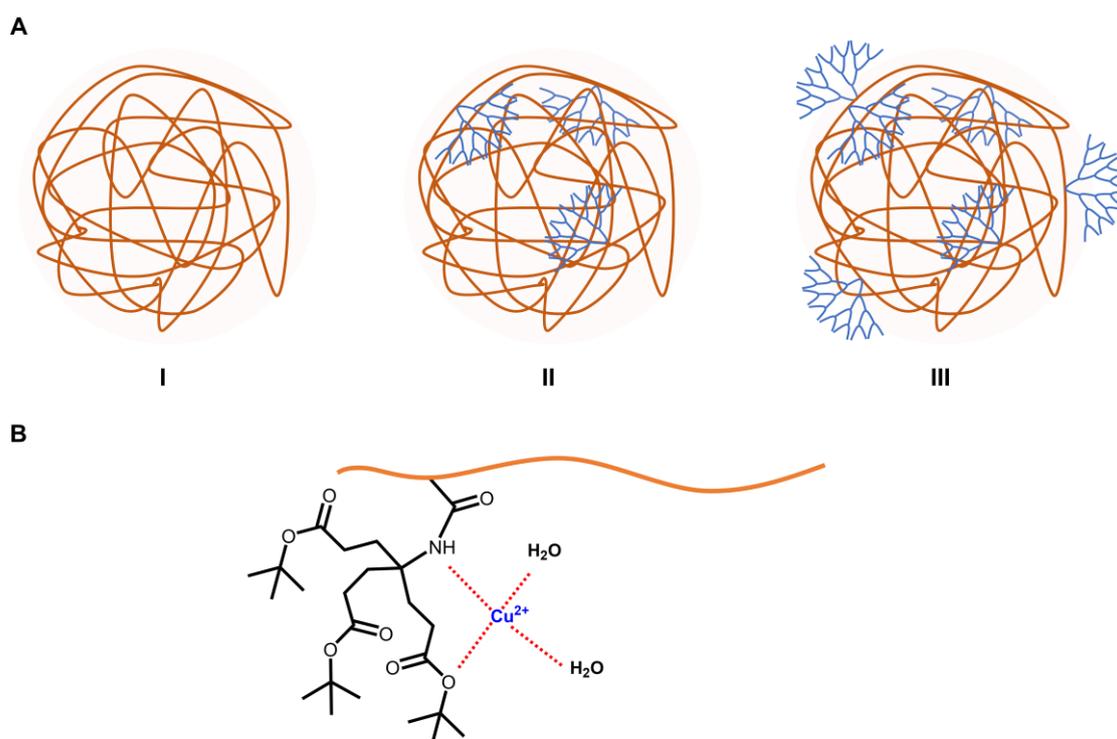
**Tabla 7. 1.** Propiedades en relación a la retención de iones Cu(II) y Zn(II) de diferentes matrices evaluadas.

	ABA (%)	Cu(II)		Zn(II)	
		Cu(II) específico (%)	mmol Cu(II)/mol ABA	Zn(II) específico (%)	mmol Zn(II)/mol ABA
NAT-BIS	0	0	0	nd	nd
	20	70	130	nd	nd
	30	93	260	nd	nd
	40	96	220	nd	nd
	60	96	210	nd	nd
AAc-BIS	0	50	0	43	0
	20	74	280	54	0
	30	90	350	80	0
	40	90	330	89	85
AAm-BIS	0	76	0	41	0
	20	100	750	76	310
	30	100	0	72	0
	40	100	140	75	98

La Fig. 7.4B muestra una propuesta sobre el arreglo estructural de las cadenas poliméricas en ausencia (I) y en presencia del monómero dendrítico (II y III). Cuando la reacción de polimerización ocurre en presencia del monómero ABA, la separación de fase se da en una etapa anterior, debido al mayor carácter hidrofóbico aportado por el dendrón (como se discutió en el Capítulo 5, sección 5.2.2.1). Se conoce que uno de los comportamientos de las cadenas poliméricas en presencia de macromonómeros dendríticos consiste, por un lado, en la formación de cadenas más cortas y por el otro, en un arreglo estructural, que ubica a los grupos apolares en paquetes densos para disminuir tanto el efecto apolar como el estérico [18,19]. De esta manera, se puede plantear una manera de acomodar los grupos funcionales del dendrón hacia el interior de los ovillos formados (II), lo cual es posible hasta cierto valor de concentración de ABA en el material. A partir de allí, la repulsión de los grupos y el efecto estérico obliga a los dendrones a una conformación distinta, permitiendo que dichas funcionalidades permanezcan más accesibles (III). Si bien se propone que los grupos de la periferia del dendrón se encuentran más impedidos a bajas concentraciones, es probable que la interacción de los iones Cu(II) ocurra en las cavidades cercanas al punto focal (Fig. 7.4A) y, dependiendo de la naturaleza del co-monómero utilizado (es decir, de las propiedades fisicoquímicas del material final), la quelación del metal está más o menos impedida.

Esto explicaría la diferencia de la interacción con Cu(II) entre cada una de las matrices, a una misma concentración de dendrón.

Las matrices basadas en NAT y AAc muestran mayores interacciones entre el MD y la cadena polimérica, lo cual indicaría un ordenamiento con pocos grupos dendríticos disponibles (II). El incremento de la concentración de ABA por encima del 20 % en estas matrices produce un mayor número de grupos disponibles para la quelación con Cu(II) (III). En el caso de las matrices de AAm-ABA-BIS-Cu(II), la máxima captación de iones se observa con un 20 % debido a una mayor cantidad de grupos del dendrón disponibles para interactuar (III). El incremento de la concentración de MD modifica la estructura y aumenta la cantidad de grupos no disponibles para interactuar con el metal (II), disminuyendo así la cantidad de iones Cu(II) retenidos.



**Fig. 7.4.** (A) Ordenamiento de las cadenas de un polímero con diferentes grados de dendronización ;(B) diseño esquemático de la interacción de iones Cu(II) a través de los grupos funcionales de ABA en *monoliths*.

Se llevó a cabo el ensayo de inmovilización de iones Zn(II) en todas las matrices antes mencionadas, como se muestra en la Fig. 7.3 y Tabla 7.1. Inicialmente se observa que el comportamiento de los materiales frente a ligandos de diferente naturaleza varía, es decir, la interacción de una misma matriz frente a iones Cu(II) y a iones Zn(II) es distinta, observándose valores de inmovilización diferentes. Con respecto a las matrices basadas en NAT, todos los ensayos llevados a cabo no mostraron retención

significativa; esto indica que el sistema NAT-BIS no es capaz de interactuar con iones Zn(II) y que además la presencia del dendrón en los sistemas NAT-ABA-BIS no modifica esta característica, contrariamente a lo observado con la inmovilización de iones Cu(II).

Las matrices basadas en AAc presentan una baja retención de Zn(II) en ausencia del dendrón. Si bien los grupos COOH de la matriz debido al ácido acrílico interactúan favorablemente con los iones metálicos, el cambio de pH provoca la fácil liberación de estos (interacciones no específicas), es por esto que se considera que la cantidad de Zn(II) específico en la matriz es baja. Cuando la concentración de dendrón en la matriz incrementa, se favorece las interacciones específicas. No obstante, la inclusión de ABA en bajas concentraciones disminuye incluso la cantidad de iones Zn(II) retenidos, mostrando un efecto dendrítico negativo en la matriz AAm-ABA20-BIS y AAm-ABA30-BIS. Ahora, cuando la concentración de ABA es del 40 %, la cantidad de iones Zn(II) por mol de dendrón incrementa considerablemente, lo cual denota un efecto dendrítico positivo.

Análogamente a las anteriores, las matrices basadas en AAm poseen una baja capacidad de inmovilizar iones Zn(II), como se observó en la retención de Cu(II). De hecho, el comportamiento de las matrices de AAm en función de la concentración de monómero dendrítico es similar para ambos ligandos metálicos.

### 7.3. Conclusiones parciales

Se inmovilizaron iones metálicos sobre diferentes matrices poliméricas y se calculó la influencia de la dendronización en la interacción matriz-ligando. En todos los casos, la presencia de un monómero dendrítico modificó las propiedades de interacción entre el material y los iones metálicos. Las características multifuncionales del dendrón generan un efecto dendrítico, tanto positivo como negativo dependiendo del ion metálico y de la concentración del dendrón en la matriz. Cabe destacarse que, en todos los casos, en algún punto, la presencia del dendrón es positiva, generando y/o mejorando interacciones con el ligando. De esta manera se demostró que las interacciones matriz-metal pueden ser modificadas mediante distintos factores: tipo de monómeros utilizados, naturaleza de Me(II) y además concentración del monómero dendrítico.

### 7.4. Referencias

- [1] P.W. Gout, L. Morganti, Current and prospective applications of metal ion – protein binding, *Journal Chromatogr. A.* 988 (2003) 1–23.
- [2] Z. Li, E. Rodriguez, S. Azaria, A. Pekarek, D.S. Hage, Affinity monolith

- chromatography: A review of general principles and applications, *Electrophoresis*. 38 (2017) 2837–2850.
- [3] J. Porath, IMAC-Immobilized metal ion affinity based chromatography, *Trends Anal. Chem.* 7 (1988) 254–259.
- [4] J. Porath, J.A.N. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage, Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation, *Nature*. 258 (1975) 598–599.
- [5] M. Peterka, M. Jarc, M. Banjac, V. Frankovič, K. Benčina, M. Merhar, V. Gaberc-Porekar, V. Menart, A. Štrancar, A. Podgornik, Characterisation of metal-chelate methacrylate monoliths, *J. Chromatogr. A*. 1109 (2006) 80–85.
- [6] D. Aktaş Uygun, M. Uygun, S. Akgöl, A. Denizli, Reversible adsorption of catalase onto Fe<sup>3+</sup> chelated poly(AAm-GMA)-IDA cryogels, *Mater. Sci. Eng. C*. 50 (2015) 379–385.
- [7] R. Mallik, D.S. Hage, Affinity monolith chromatography, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1686–1704.
- [8] D. Josic, J.G. Clifton, Use of monolithic supports in proteomics technology, *J. Chromatogr. A*. 1144 (2007) 2–13.
- [9] C. Hou, J. Ma, D. Tao, Y. Shan, Z. Liang, L. Zhang, Y. Zhang, Organic-Inorganic Hybrid Silica Monolith Based Immobilized Titanium Ion Affinity Chromatography Column for Analysis of Mitochondrial Phosphoproteome, *J. Proteome Res.* 9 (2010) 4093–4101.
- [10] J. Krenkova, F. Foret, Iron oxide nanoparticle coating of organic polymer-based monolithic columns for phosphopeptide enrichment, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 2106–2112.
- [11] A. Saeed, F. Maya, D.J. Xiao, M. Najam-ul-Haq, F. Svec, D.K. Britt, Growth of a Highly Porous Coordination Polymer on a Macroporous Polymer Monolith Support for Enhanced Immobilized Metal Ion Affinity Chromatographic Enrichment of Phosphopeptides, *Adv. Funct. Mater.* 24 (2014) 5790–5797.
- [12] D. Çimen, A. Denizli, Immobilized metal affinity monolithic cryogels for cytochrome c purification, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 93 (2012) 29–35.
- [13] H. Sigel, R.B. Martin, Coordinating Properties of the Amide Bond. Stability and Structure of Metal Ion Complexes of Peptides and Related Ligands, *Chem. Rev.* 82 (1982) 385–426.
- [14] A.A. Aldana, M.C. Strumia, M. Martinelli, The Cooperative Effect in Dendronized Chitosan Microbeads, *Aust. J. Chem.* 68 (2015) 1918–1925.
- [15] L. Bin Ni, R.H. Zhang, Q.X. Liu, W.S. Xia, H. Wang, Z.H. Zhou, pH- and mol-ratio dependent formation of zinc(II) coordination polymers with iminodiacetic acid:

- Synthesis, spectroscopic, crystal structure and thermal studies, *J. Solid State Chem.* 182 (2009) 2698–2706.
- [16] A.M. Caminade, A. Ouali, R. Laurent, C.O. Turrin, J.P. Majoral, The dendritic effect illustrated with phosphorus dendrimers, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 3890–3899.
- [17] F.H. Ling, V. Lu, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Effect of multivalency on the performance of enantioselective separation media for chiral HPLC prepared by linking multiple selectors to a porous polymer support via aliphatic dendrons, *J. Org. Chem.* 67 (2002) 1993–2002.
- [18] A. Zhang, L. Okrasa, T. Pakula, A.D. Schlüter, Homologous series of dendronized polymethacrylates with a methyleneoxycarbonyl spacer between the backbone and dendritic side chain: Synthesis, characterization, and some bulk properties, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 6658–6666.
- [19] R. Dong, Y. Zhou, X. Zhu, Supramolecular dendritic polymers: From synthesis to applications, *Acc. Chem. Res.* 47 (2014) 2006–2016.

## CAPÍTULO 8

### RETENCIÓN DE PROTEÍNAS: APLICACIÓN COMO SOPORTES EN CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD DE METAL INMOVILIZADO (IMAC)

#### *Consideraciones generales*

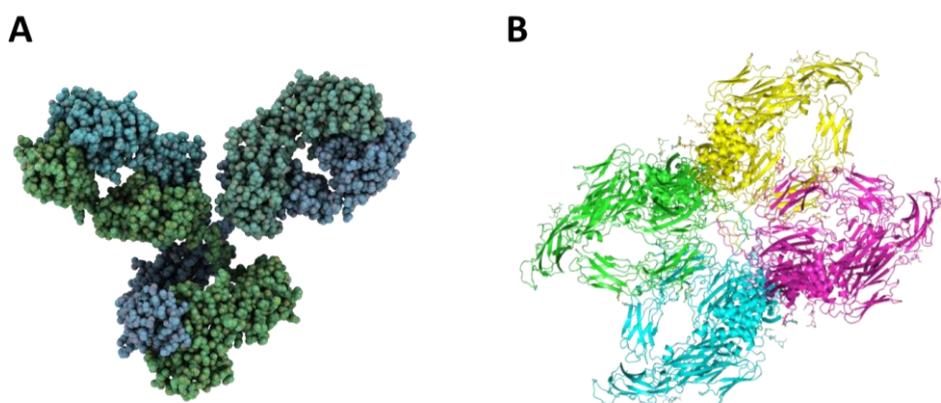
El constante progreso tecnológico tanto en medicina como en biotecnología lleva a un incremento en la demanda de biomoléculas altamente purificadas. Actualmente, los métodos de purificación más utilizados consisten en procesos de separación basados en afinidad [1–3]. Los materiales utilizados como soportes para dicha finalidad deben cumplir varios requisitos estructurales, y a su vez permitir, por ejemplo, la purificación rápida de grandes cantidades de biomoléculas o el aislamiento cuantitativo de moléculas poco abundantes, como algunas proteínas séricas presentes en humanos u otras mezclas multicomponente. Efectivamente, el desarrollo de nuevos materiales para fases estacionarias es un aspecto clave en la investigación en Cromatografía de Afinidad. Existe una amplia variedad de fases estacionarias disponibles para AC; entre ellas, los materiales tipo *monoliths* son de un gran interés [4].

Como ya se ha mencionado, la cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC) consiste en la utilización de iones metálicos como ligandos para generar así interacciones específicas con diferentes residuos de aminoácidos de proteínas, principalmente residuos histidina. Las características más destacadas del uso de histidina es la unión altamente selectiva que se genera entre el aminoácido y el metal quelado y la interferencia relativamente baja causada por otros componentes presentes durante la corrida cromatográfica [5].

Entonces, IMAC ofrece ciertas características que la hacen una metodología atractiva y única: (i) generalmente posee un único paso de purificación; (ii) la capacidad de cargado de proteínas es relativamente alta comparado con otros métodos de AC (valores entre 0,1-10  $\mu\text{M}/\text{mL}$  gel) [2]; (iii) los iones metálicos pueden ser removidos de la matriz utilizando un agente quelante como el EDTA y además, dichas matrices permiten utilizar diversos iones para poder determinar cuál es el mejor ligando para una proteína de interés; (iv) la utilización de soluciones diluidas de proteínas; (v) dependiendo de la naturaleza de la columna, IMAC es compatible con un gran número de soluciones reguladoras de pH, aun conteniendo una alta fuerza iónica; (vi) generalmente esta metodología no genera efectos adversos sobre la estructura de la proteína (no obstante existen reportes donde una columna con Cu(II)-iminodiacético causó proteólisis reductiva catalizada por Cu(II) [6]).

La Fig. 8.1 muestra la estructura de dos proteínas evaluadas durante este Capítulo. La Inmunoglobulina G constituye el principal isotipo de anticuerpos en mamíferos, representando aproximadamente el 75% del total de inmunoglobulinas presentes en el suero de adultos [7]. La IgG posee diferentes funciones inmunológicas; por ejemplo, la IgG bovina (al igual que otras especies animales) genera interacciones con microbios tales como bacterias o virus, llevando a su posterior destrucción [8]. Por ello, se suele utilizar IgG bovina como suplemento inmunológico en comidas, principalmente en formulaciones infantiles [9]. Estudios actuales sugieren varios efectos benéficos de productos basados en calostro y suplementos con IgG relacionados al mejoramiento durante el ejercicio, en inmunoterapias vía administración oral, y como una alternativa para la reducción del colesterol en pacientes con hipercolesterolemia [9–14].

Existen cuatro subclases de IgG en el ser humano, las cuales se denotan como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, donde las primeras dos son las más abundantes en un suero normal [15–18]. Estas subclases son altamente estudiadas a nivel clínico debido a la relación existente entre la cantidad de cada subclase de IgG y el estado de salud o enfermedad en un paciente, causado por la respuesta e interacción con antígenos específicos [19–22]. Por ejemplo, se conoce que la IgG1 es el anticuerpo más predominante que se ha detectado en respuesta a un virus linfotrópico de células T humanas tipo I (HTLV-I), y además elevados niveles de IgG1 e IgG3 han sido detectados en pacientes con HTLV-I asociado a mielopatías [23].



**Fig. 8.1.** Estructuras de las proteínas de trabajo: (A) Inmunoglobulina G y (B) alfa-2-Macroglobulina

Por otra parte, las alfas globulinas consisten en glicoproteínas presentes en fluidos corporales, tanto en vertebrados como invertebrados [24]. Particularmente, la

alfa-2-macroglobulina ( $\alpha_2M$ ) – perteneciente a la familia de las alfa globulinas – es una glicoproteína de alto peso molecular, que consiste en una estructura basada en un homotetrámero, como se observa en la Fig. 8.1 [25]. La  $\alpha_2M$  es un inhibidor de metalo, serino, aspartato y cisteinoproteasas, lo que la transforman en un inhibidor de amplio espectro. El mecanismo de inhibición consiste en un mecanismo no clásico [26]: primero, la proteasa produce un clivaje de la  $\alpha_2M$  en una región específica denominada región *bait*, la cual consiste en una secuencia de alrededor de 25 aminoácidos que contienen los sitios de proteólisis específicos para proteasas. Dicha proteólisis genera un cambio conformacional en la  $\alpha_2M$ , el cual produce una disociación de los enlaces tiol éster dentro de la molécula. Este cambio conformacional conlleva la captura de proteasas [24,26,27]. Además de la inhibición de proteasas, la  $\alpha_2M$  posee otra serie de funciones; una de ellas consiste en la unión y transporte de gran cantidad de citoquinas, incluyendo factor de crecimiento de fibroblasto (bFGF), factor de crecimiento de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), interleucina-1b (IL-1b), e interleucina-6 (IL-6), entre otros, modificando además su actividad biológica [24].

Además de relacionarse tanto la actividad como los niveles de  $\alpha_2M$  en enfermedades como el Alzheimer [28,29], en los últimos años se ha demostrado su participación en retinopatías y además se conoce que juega un rol importante durante dicha enfermedad, postulándose como un mediador citotóxico para la retina [30–34].

Numerosos métodos relacionados a cromatografías han sido desarrollados y optimizados para aislar y purificar dichas proteínas. La purificación de IgG generalmente se logra mediante diferentes métodos, principalmente IEC, cromatografía de pseudoafinidad y además IMAC [35–37]. Con respecto a la  $\alpha_2M$ , principalmente se sigue una cromatografía de afinidad de metal inmovilizado, utilizando columnas comerciales con grupos funcionales IDA con posibilidad de distintos metales con alta afinidad, tales como Cd(II), Zn(II), y en menor medida por Ni(II) y Pb(II) [38].

La purificación de dichas proteínas sigue siendo un desafío, buscando siempre desarrollar nuevos materiales que generen interacciones ligando-biomolécula cada vez más específicas, y promoviendo de esta manera su fácil y óptimo aislamiento del medio en el que se encuentren. Varios autores han publicado distintos *monoliths* con capacidad de reconocer proteínas de interés, basándose en AC [39–44]; particularmente, Daoud-Attieh y colaboradores [45] obtuvieron criogeles basados en HEMA y vinil imidazol, con capacidad de generar interacciones pseudo-específicas con IgG, logrando captar hasta 25 mg proteína/g matriz. Por otra parte, Elkak y colaboradores [46] desarrollaron criogeles con histidina presente en la matriz, lo cual demostró una mejor interacción frente a IgG de suero bovino, con una recuperación de hasta el 82% respecto a la concentración inicial de proteína, y una capacidad de 30 mg IgG/ g criogel.

### 8.1. Objetivos específicos

En base a los antecedentes mencionados, y en las matrices con ligando inmovilizado obtenidos en el Capítulo 7, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar el efecto de los sistemas matriz-Cu(II) en la adsorción específica de inmunoglobulina G.
- Evaluar el efecto de distintos sistemas matriz-Zn(II) en la interacción específica con alfa-2-macroglobulina.
- Desarrollar un sistema en flujo para la purificación de  $\alpha_2M$  mediante IMAC a partir de una muestra de suero humano.

### 8.2. Resultados y discusión

Los soportes en AC deben poseer un balance entre la superficie accesible del *monolith* y los tamaños de poro, entre otras propiedades anteriormente mencionadas. Esto es necesario por el hecho de permitir a las biomoléculas el libre movimiento dentro de la estructura, favoreciendo así la difusión y las interacciones específicas. Para ello, se estima que el diámetro de poro debe superar al menos 10 veces el diámetro del analito de interés, considerando además que la mayoría de las proteínas poseen diámetros cercanos a los 3 nm [47]. Una manera sencilla de estimar el diámetro de una proteína es a través de la Ecuación 8.1 [48], la cual relaciona el área accesible (A) y su peso molecular (M).

$$A = 11,1 M^{2/3} \quad \text{Ec. 8.1}$$

Si se considera el área de una esfera como  $A = 4\pi r^2$ , se puede relacionar la masa molecular de una proteína y su diámetro, como se muestra en la Ecuación 8.2.

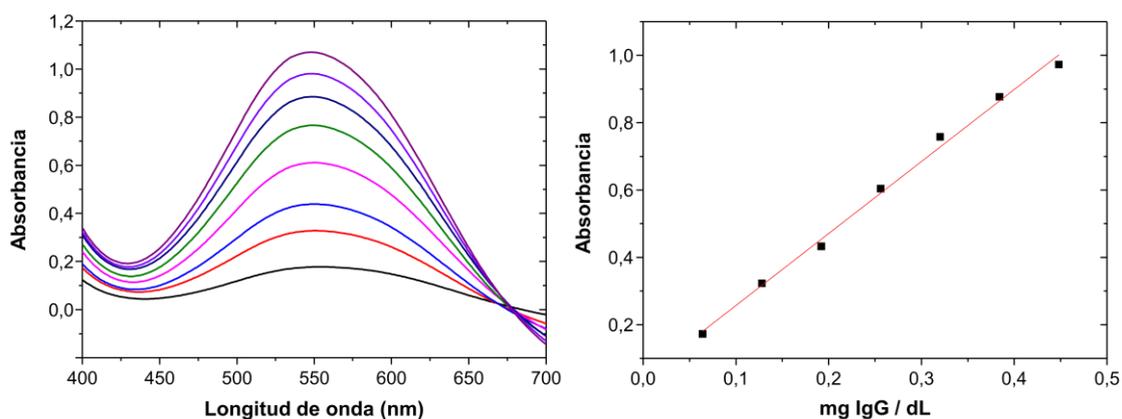
$$D = 2 \left( \sqrt{\frac{11,1 M^{2/3}}{4\pi}} \right) \quad \text{Ec. 8.2}$$

Basándose en los diámetros calculados en función de la masa molecular de IgG y  $\alpha_2M$  (150 y 720 kDa, respectivamente) y en los reportados en bibliografía [47,49], el diámetro de IgG es aproximadamente 6 nm mientras que el de  $\alpha_2M$  es 11 nm, lo cual demuestra que todas las matrices que se desarrollaron en esta Tesis poseen tamaños de poro superiores a 100 nm. En función de lo mencionado anteriormente, y

considerando los resultados obtenidos en cuanto a la inmovilización de iones metálicos (ligandos de interés), se planteó el estudio del comportamiento como soportes IMAC de las barras monolíticas macroporosas basadas en NAT, AAc, AAm y el monómero dendrítico (ABA), y además los criogeles dendronizados con ABAh, para la purificación de IgG y  $\alpha_2M$ .

### 8.2.1. Selección del método de cuantificación

La capacidad de adsorción de proteína sobre las matrices estudiadas se cuantificó mediante espectrofotometría UV-visible. La IgG se cuantificó empleando un método colorimétrico por la formación de un complejo azul, entre la proteína y una solución de EDTA/Cu(II), el cual posee un máximo de absorción a 540 nm. La curva espectral obtenida (Fig. 8.2) muestra un buen comportamiento lineal para el rango estudiado. En cuanto a la  $\alpha_2M$ , la cuantificación se realizó a 280 nm debido a la absorción de los residuos triptófano y tirosina de la proteína, la cual además posee un coeficiente de extinción elevado [50].



**Fig. 8.2.** Curva de calibración a 540 nm obtenida para complejos formados con IgG. Ecuación de la recta obtenida:  $y = 2,13895 x + 0,044$  ( $R^2 = 0,99413$ ).

### 8.2.2. Retención de IgG

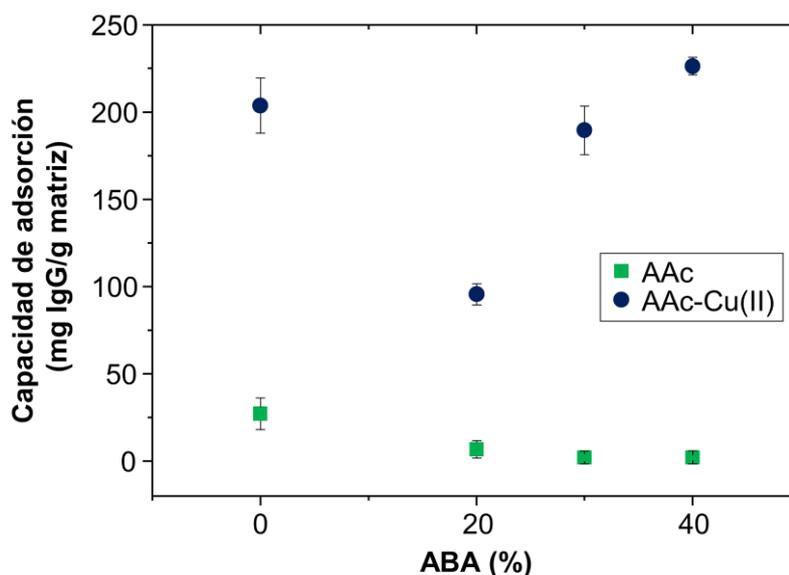
Se llevó a cabo el estudio de las capacidades de adsorción de IgG de las distintas matrices sintetizadas previamente. La comparación se realizó en función de la naturaleza de cada matriz polimérica, evaluando además el efecto de la estructura dendrítica sobre la adsorción final. La metodología adoptada se describe en el Capítulo 10, Sección 10.2.5.1.

Es importante mencionar que las condiciones a las cuales se realiza el estudio pueden modificar considerablemente los valores finales de adsorción; por ejemplo, la

temperatura en principio, debilita las interacciones del tipo no covalentes (excepto las interacciones hidrofóbicas), incluyendo enlaces de puente hidrógeno (intermoleculares e intramoleculares), interacciones electrostáticas y dipolo-dipolo, y además genera un efecto sobre la configuración electrónica y la esfera de coordinación de los iones Cu(II). Es por ello, por lo que se presupone que a una mayor temperatura existirá una disminución en las interacciones entre la matriz y la IgG, debido a la naturaleza de las matrices y a lo reportado en bibliografía [41]. Otro parámetro importante es el pH, el cual no fue posible variar y estudiar, debido a que se usó una solución previamente preparada de IgG, a un determinado pH.

#### 8.2.2.1. Barras monolíticas macroporosas

La captación de IgG de las barras monolíticas macroporosas basadas en AAc, entrecruzadas con BIS y co-polimerizadas con ABA se muestran en la Fig. 8.3.

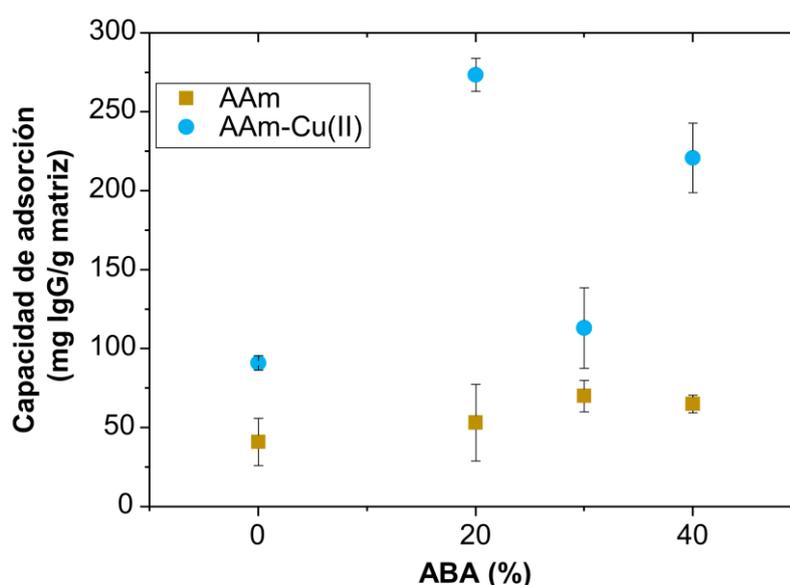


**Fig. 8.3.** Captación de IgG en solución acuosa en función de la concentración de ABA, para las barras monolíticas macroporosas basadas en AAc y BIS, en presencia y en ausencia del ligando inmovilizado. Condiciones: pH=5; temperatura ambiente.

Como se puede observar, la presencia del ligando Cu(II) genera un incremento significativo en la captación de IgG, causado por la generación de interacciones específicas entre el ligando y el analito de interés. El hecho de que se observe una adsorción sin la presencia del metal indica que la matriz por sí sola es capaz de generar interacciones pseudo-específicas con la IgG; no obstante, los valores resultaron relativamente bajos y no se observó un cambio significativo debido a la presencia de la estructura dendrítica. Cuando se comparan las matrices de AAc-Cu(II), se observa un

alto reconocimiento de IgG en el material sin el monómero dendrítico, el cual disminuye a la mitad debido a la utilización de un 20% de ABA. Sin embargo, este valor incrementa a concentraciones mayores de dendrón, hasta llegar a un valor ligeramente superior que el inicialmente mencionado. La cantidad de iones inmovilizados en la matriz posee un comportamiento análogo a la captación de IgG, en función de la concentración del dendrón, disminuyendo a 20% de ABA e incrementando a mayores concentraciones, lo cual indicó en primera instancia que existe una relación directa entre la cantidad de iones Cu(II) en las matrices basadas en AAc y los sitios de coordinación disponibles para la proteína. Como ya se mencionó anteriormente (*ver Capítulo 7, 7.2.1.1*), la disminución de la inmovilización de Cu(II) a 20% de dendrón puede ser atribuida a un cambio en la disposición de las cadenas poliméricas en la matriz, ubicando los grupos funcionales hacia el interior de los ovillos (para disminuir efectos de polaridad) e impidiendo así, por un lado, la interacción del metal con los grupos funcionales del dendrón, y por el otro, el ingreso de la proteína a la esfera de coordinación del ligando. En este mismo sentido, al incrementar la concentración de ABA en la matriz, el impedimento estérico podría dificultar que todos los grupos funcionales del dendrón se encuentren orientados en direcciones similares, lo que genera que los mismos se encuentren en zonas espacialmente más accesibles para los iones Cu(II) y por lo tanto una mayor adsorción del analito de estudio.

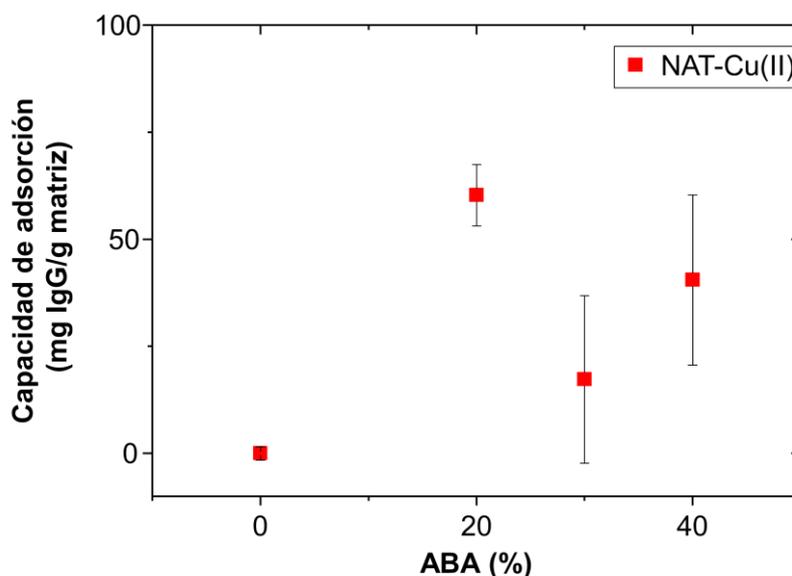
Las matrices AAm-ABA-BIS (Fig. 8.4) muestran también un incremento en las interacciones específicas debido a la presencia del Cu(II).



**Fig. 8.4.** Captación de IgG en solución acuosa en función de la concentración de ABA, para las barras monolíticas macroporosas basadas en AAm y BIS, en presencia y en ausencia del ligando inmovilizado. Condiciones: pH=5; temperatura ambiente.

En ausencia del ligando, todas las barras monolíticas mostraron interacciones pseudo-específicas, las cuales incrementaron ligeramente con el incremento de la concentración de ABA, siendo alrededor de 50 mg IgG / g matriz cuando la concentración de ABA fue del 40%. Los valores de captación de IgG para las barras monolíticas con iones Cu(II) nuevamente mostraron un comportamiento análogo a la concentración de metal inmovilizado sobre la matriz. De hecho, el comportamiento en función de la concentración de ABA es exactamente el mismo. Esto demostró que dichos materiales macroporosos poseen una alta capacidad de captación de IgG (superiores a 250 mg IgG / g matriz) y una fuerte dependencia de dicha interacción en función de los iones Cu(II) inmovilizados - y disponibles - y, por lo tanto, de la concentración del monómero dendrítico.

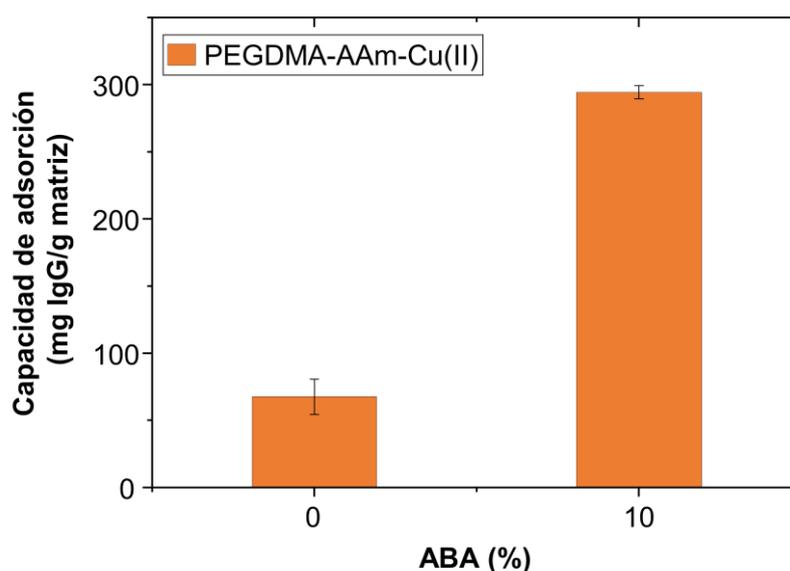
La Fig. 8.5 muestra el comportamiento referido a la captación de IgG de las matrices basadas en NAT. A una concentración de 0% de ABA, el sistema no presenta interacción con IgG; la matriz NAT-BIS además tampoco presentó inmovilización de iones Cu(II), indicando ambos resultados que dicho material no genera interacciones pseudo-específicas. Si bien la presencia del ion metálico en las matrices NAT-ABA-BIS provoca una captación de proteína considerable, dichos valores están dentro del rango de la capacidad de adsorción de los sistemas anteriores (AAc y AAm), en ausencia de Cu(II). Esto indicó la baja eficiencia de las barras monolíticas basadas en NAT, en comparación con las demás.



**Fig. 8.5.** Captación de IgG en solución acuosa en función de la concentración de ABA, para las barras monolíticas macroporosas basadas en NAT, BIS y el ligando Cu(II). Condiciones: pH=5; temperatura ambiente.

### 8.2.2.2. Criogeles supermacroporosos

La adsorción por parte de los distintos criogeles estudiados se muestran en la Fig. 8.6. La presencia del 10% de dendrón con grupos COOH en la periferia aumenta significativamente la adsorción de IgG sobre el material, debido a una mayor inmovilización de Cu(II). Los valores obtenidos para el sistema PEGDMA-AAm-ABAh10 son  $295 \pm 5$  mg IgG / g matriz, lo cual demuestra el alto nivel de especificidad del criogel dendronizado con respecto al no dendronizado, frente a la proteína IgG.



**Fig. 8.6.** Captación de IgG en solución acuosa en función de la concentración de ABA, para distintos criogeles supermacroporosos de PEGDMA-AAm y en presencia del ligando Cu(II). Condiciones: pH=5; temperatura ambiente.

### 8.2.3. Retención de $\alpha_2$ M

La captación de  $\alpha_2$ M en los distintos sistemas se estudió de dos maneras; por un lado, se realizó un estudio de adsorción en *batch*, es decir, mediante la interacción de la matriz sumergida en una solución de la proteína previamente purificada, y luego la cuantificación por espectrofotometría UV-Vis. Por otro lado, se llevó a cabo un sistema en flujo de 1 mL/min, utilizando una bomba peristáltica, y haciendo pasar por la columna el material en estudio, una solución previamente aislada del plasma sanguíneo (como se indica a continuación).

### 8.2.3.1. Metodología en batch

En función de lo previamente observado en relación a la cantidad de ligando inmovilizado con la proteína adsorbida finalmente, la matriz AAm-ABA20-BIS fue la que mayor retención de Zn(II) demostró. Por lo tanto, en una primera etapa se llevó a cabo el estudio de  $\alpha_2M$  con esta matriz, y comparativamente con el material sin metal inmovilizado, como se muestra en la Tabla 8.1. El sistema estudiado muestra una interacción con la proteína, en ausencia de Zn(II), lo que indica que la matriz por sí sola genera baja adsorción pseudo-específica. Al inmovilizar Zn(II) la capacidad de captar  $\alpha_2M$  incrementa hasta 54 mg/g matriz, demostrando especificidad del ligando por la proteína.

**Tabla 8.1.** Capacidad de adsorción de  $\alpha_2M$  para cada matriz estudiada.<sup>a</sup>

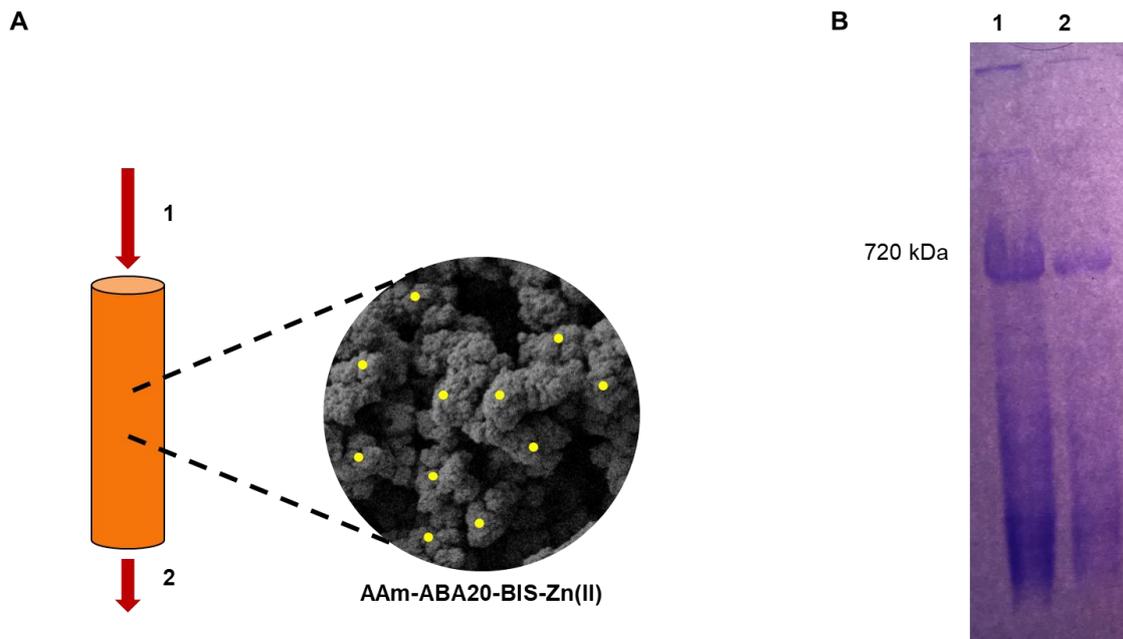
Muestra	Capacidad de adsorción (mg $\alpha_2M$ /g matriz)
AAm-ABA20-BIS	5,8
AAm-ABA20-BIS-Zn(II)	54,0

<sup>a</sup> Condiciones: solución  $\alpha_2M$  2,2  $\mu M$  en *buffer* fosfato pH 6; temperatura ambiente.

### 8.2.3.2. Metodología en flujo

Se llevó a cabo un estudio en flujo para evaluar la capacidad de adsorción de una columna AAm-ABA20-BIS (largo: 3 cm; diámetro: 1,2 cm, masa total: 0,998 g) en un proceso real de bioseparación, es decir, una aplicación del material en IMAC-Zn(II). Dicha columna fue sintetizada siguiendo la metodología de las barras monolíticas macroporosas basadas en AAm previamente estudiadas, utilizando un 20% de monómero dendrítico. La incorporación de iones Zn(II) se realizó también en flujo. Se utilizó una muestra de un pool de plasmas obtenidos de hombres sanos.

La Fig. 8.7 muestra un esquema de la utilización de la muestra como columna. Una vez realizado el cargado, se procedió a los lavados y elución de la muestra, en donde se observó mediante cuantificación por el método de Bradford y UPLC que el *buffer* de elución no contenía  $\alpha_2M$ , lo que en primera instancia indicaría que la columna no interaccionó con la proteína de interés.



**Fig. 8.7.** (A) Aplicación de la muestra AAm-ABA20-BIS-Zn(II) como columna en IMAC y (B) una imagen correspondiente a la electroforesis en gel de poliacrilamida para dos muestras: (1) muestra de sangre previo al cargado en la columna; (2) muestra de la fracción no retenida.

No obstante, con la finalidad de estimar si la matriz retuvo  $\alpha_2M$  durante el cargado de la solución, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) al 5%, de una muestra de la solución dializada (previo paso por la columna) y una muestra de la fracción no retenida (posterior al paso por la columna), es decir, evitando los pasos de lavado y elución, como se muestra en la Fig. 8.7B. El resultado del PAGE muestra que la intensidad de la banda de  $\alpha_2M$  en la línea 1 disminuye luego del proceso de adsorción (línea 2). Esto indica que la proteína interacciona con la columna, lo cual confirma que el problema de cuantificación posterior se debió al proceso de lavado y elución.

Más allá de que el paso de lavado haya terminado eluyendo a la  $\alpha_2M$  o bien, el paso de elución no haya sido efectivo, uno de los parámetros que puede afectar es en la fuerza iónica de las soluciones *buffer* utilizadas. Varios autores han estudiado el efecto de la fuerza iónica sobre la adsorción de proteínas [45,51], observando que el incremento de la concentración de iones en las soluciones debilita la unión entre la matriz y la proteína. Esta disminución en la capacidad de adsorción cuando la fuerza iónica incrementa puede ser atribuida a la repulsión electrostática entre el polímero y la proteína. Por lo tanto, diferentes pruebas se llevarán a cabo para estudiar dicho efecto.

Por lo tanto, si bien no pudo realizarse un estudio más detallado sobre la capacidad de adsorción de alfa-2-macroglobulina por IMAC-Zn(II) utilizando una matriz dendronizada, los resultados son prometedores en cuanto a la interacción específica entre proteína-columna.

### 8.3. Conclusiones parciales

En este capítulo se investigó la capacidad de interacción y purificación de novedosos materiales porosos dendronizados en IMAC-Cu(II) y en IMAC-Zn(II). La adsorción de IgG demostró afinidad por las barras monolíticas macroporosas NAT-ABA-BIS, AAm-ABA-BIS y AAc-ABA-BIS y una excelente capacidad de adsorción debido a la presencia del ligando Cu(II), corroborando además que dicha adsorción es mejorada en presencia del monómero dendrítico. Criogeles de PEGDMA-AAm-ABAh-Cu(II) fueron estudiados en la adsorción de IgG, mostrando valores de captación superadores cuando se utiliza el dendrón ácido. Por otra parte, el sistema AAm-ABA20-BIS se evaluó como soporte en IMAC-Zn(II) mediante la purificación de  $\alpha_2$ M de una muestra de plasma sanguíneo; la presencia del ligando específico Zn(II) le aporta al material muy buena adsorción de la proteína. La purificación en columna demostró que, si bien no fue posible cuantificar debido a errores experimentales durante la etapa de lavado y elución, el material fue capaz de interactuar con la  $\alpha_2$ M. Todos estos resultados demuestran que los polímeros macroporosos dendronizados constituyen materiales con potencial aplicación como soportes en cromatografía de afinidad de metal inmovilizado, de diferentes tipos de proteínas séricas, donde las interacciones presentes en el sistema se encuentran favorecidas debido a la presencia de la estructura dendrítica.

### 8.4. Referencias

- [1] D.S. Hage, J. Cazes, eds., Handbook of affinity chromatography, 2nd Ed, CRC Press, Boca Raton, 2006.
- [2] A.C. Moser, D.S. Hage, Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments, *Bioanalysis*. 2 (2010) 769–790.
- [3] S. Reichelt, Introduction to Macroporous Cryogels, in: S. Reichelt (Ed.), *Affin. Chromatogr. Methods Protoc.*, Springer New York, New York, NY, 2015: pp. 173–181.
- [4] S. Reichelt, ed., *Affinity chromatography: Methods and protocols*, 3rd Ed, Springer, Leipzig, Germany, 2015.
- [5] P.W. Gout, L. Morganti, Current and prospective applications of metal ion – protein binding, *J. Chromatogr. A*. 988 (2003) 1–23.
- [6] K.D. Bush, J.A. Lumpkin, Structural damage to lactate dehydrogenase during copper iminodiacetic acid metal affinity chromatography, *Biotechnol. Prog.* 14 (1998) 943–950.
- [7] R.G. Hamilton, Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory.,

- Clin. Chem. 33 (1987) 1707–1725.
- [8] A.S. Goldman, The immune system of human milk: Antimicrobial, antiinflammatory and immunomodulating properties, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 12 (1993) 664–672.
- [9] L.W. Gapper, D.E.J. Copestake, D.E. Otter, H.E. Indyk, Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrum and dietary supplements: A review, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 93–109.
- [10] C.M. Shing, D.G. Jenkins, L. Stevenson, J.S. Coombes, The influence of bovine colostrum supplementation on exercise performance in highly trained cyclists, *Br. J. Sports Med.* 40 (2006) 797–801.
- [11] C.M. Shing, D.C. Hunter, L.M. Stevenson, Bovine Colostrum Supplementation and Exercise Performance, *Sport. Med.* 39 (2009) 1033–1054.
- [12] T.H. Casswall, H.-O. Nilsson, L. Björck, S. Sjöstedt, L. Xu, C.-E. Nord, T. Borén, T. Wadström, L. Hammarström, Bovine Anti- *Helicobacter pylori* Antibodies for Oral Immunotherapy, *Scand. J. Gastroenterol.* 37 (2002) 1380–1385.
- [13] R.E. Brimelow, N.P. West, L.T. Williams, A.W. Cripps, A.J. Cox, A role for whey-derived lactoferrin and immunoglobulins in the attenuation of obesity-related inflammation and disease, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57 (2017) 1593–1602.
- [14] D.M. Asmuth, Z.-M. Ma, A. Albanese, N.G. Sandler, S. Devaraj, T.H. Knight, N.M. Flynn, T. Yotter, J.-C. Garcia, E. Tsuchida, T.-T. Wu, D.C. Douek, C.J. Miller, Oral serum-derived bovine immunoglobulin improves duodenal immune reconstitution and absorption function in patients with HIV enteropathy, *AIDS.* 27 (2013) 2207–2217.
- [15] V.-A. Oxelius, Immunoglobulin G (IgG) subclasses and human disease, *Am. J. Med.* 76 (1984) 7–18.
- [16] A.M. Collins, K.J.L. Jackson, A Temporal Model of Human IgE and IgG Antibody Function, *Front. Immunol.* 4 (2013) 235.
- [17] I. Gueta, Y. Shoenfeld, H. Orbach, Intravenous immune globulins (IVIg) treatment for organizing pneumonia in a selective IgG immune deficiency state, *Immunol. Res.* 60 (2014) 165–169.
- [18] S. Bournazos, J. V. Ravetch, Diversification of IgG effector functions, *Int. Immunol.* 29 (2017) 303–310.
- [19] R.B. Lal, C. Buckner, R.F. Khabbaz, J.E. Kaplan, G. Reyes, K. Hadlock, J. Lipka, S.K.H. Fong, L. Chan, J.E. Coligan, Isotypic and IgG subclass restriction of the humoral immune-responses to human T-lymphotropic virus type-I, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 67 (1993) 40–49.
- [20] T. Saeki, M. Kawano, K. Yoshita, M. Ueno, M. Nagata, Y. Yamaguchi, IgG4-

- Related Kidney Disease, in: H. Umehara, K. Okazaki, J.H. Stone, S. Kawa, M. Kawano (Eds.), *IgG4-Related Dis.*, Springer Japan, Tokyo, 2014: pp. 169–179.
- [21] T. Umemura, Y. Zen, *IgG4-related hepatopathy*, in: H. Umehara, K. Okazaki, J.H. Stone, K. Shigeyuki, K. Mitsuhiro (Eds.), *IgG4-Related Dis.*, Springer Japan, Tokyo, 2014: pp. 205–209.
- [22] W. Egner, K. Swallow, R.J. Lock, D. Patel, Falsely low immunoglobulin (Ig)G4 in routine analysis: how not to miss IgG4 disease, *Clin. Exp. Immunol.* 186 (2016) 57–63.
- [23] R.R. McKendall, Neurologic disease due to HTLV-1 infection, *Handb. Clin. Neurol.* 123 (2014) 507–530.
- [24] A.A. Rehman, H. Ahsan, F.H. Khan, Alpha-2-macroglobulin: A physiological guardian, *J. Cell. Physiol.* 228 (2013) 1665–1675.
- [25] I. Garcia-Ferrer, A. Marrero, F.X. Gomis-Rüth, T. Goulas,  $\alpha$ 2-Macroglobulins: Structure and Function, in: J.R. Harris, J. Marles-Wright (Eds.), *Macromol. Protein Complexes Struct. Funct.*, Springer International Publishing, Cham, 2017: pp. 149–183.
- [26] E. Mocchegiani, R. Giacconi, E. Muti, M. Muzzioli, C. Cipriano, Zinc-binding proteins (metallothionein and  $\alpha$ -2 macroglobulin) as potential biological markers of immunosenescence, *Exp. Gerontol.* 41 (2006) 1094–1107.
- [27] C.T. Chu, G.C. Howard, U.K. Misra, S. V. Pizzo,  $\alpha$ 2- Macroglobulin: A Sensor for Proteolysis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 737 (1994) 291–307.
- [28] D. Blacker, M.A. Wilcox, N.M. Laird, L. Rodes, S.M. Horvath, R.C.P. Go, R. Perry, B. Watson Jr., S.S. Bassett, M.G. McInnis, M.S. Albert, B.T. Hyman, R.E. Tanzi, Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease, *Nat. Genet.* 19 (1998) 357.
- [29] V.R. Varma, S. Varma, Y. An, T.J. Hohman, S. Seddighi, R. Casanova, A. Beri, E.B. Dammer, N.T. Seyfried, O. Pletnikova, A. Moghekar, M.R. Wilson, J.J. Lah, R.J. O'Brien, A.I. Levey, J.C. Troncoso, M.S. Albert, M. Thambisetty, Alpha-2 macroglobulin in Alzheimer's disease: A marker of neuronal injury through the RCAN1 pathway, *Mol. Psychiatry.* 22 (2017) 13–23.
- [30] J.P.V. humor in the pathologic scope: I. from proteomic approaches Monteiro, F.M. Santos, A.S. Rocha, J.P. Castro-de-Sousa, J.A. Queiroz, L.A. Passarinha, C.T. Tomaz, Vitreous humor in the pathologic scope: Insights from proteomic approaches, *Proteomics - Clin. Appl.* 9 (2015) 187–202.
- [31] L.C. Cáceres, G.R. Bonacci, M.C. Sánchez, G.A. Chiabrando, Activated  $\alpha$ 2 macroglobulin induces matrix metalloproteinase 9 expression by low-density lipoprotein receptor-related protein 1 through MAPK-ERK1/2 and NF- $\kappa$ B activation

- in macrophage-derived cell lines, *J. Cell. Biochem.* 111 (2010) 607–617.
- [32] P.F. Barcelona, J.R. Jaldín-Fincati, M.C. Sánchez, G.A. Chiabrand, Activated  $\alpha$ 2-macroglobulin induces Müller glial cell migration by regulating MT1-MMP activity through LRP1, *FASEB J.* 27 (2013) 3181–3197.
- [33] M.C. Sánchez, P.F. Barcelona, J.D. Luna, S.G. Ortiz, P.C. Juárez, C.M. Riera, G.A. Chiabrand, Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) expression in a rat model of oxygen-induced retinal neovascularization, *Exp. Eye Res.* 83 (2006) 1378–1385.
- [34] G.R. Bonacci, L.C. Cáceres, M.C. Sánchez, G.A. Chiabrand, Activated  $\alpha$ 2-macroglobulin induces cell proliferation and mitogen-activated protein kinase activation by LRP-1 in the J774 macrophage-derived cell line, *Arch. Biochem. Biophys.* 460 (2007) 100–106.
- [35] E.M. Akita, E.C.Y. Li-Chan, Isolation of Bovine Immunoglobulin G Subclasses from Milk, Colostrum, and Whey Using Immobilized Egg Yolk Antibodies, *J. Dairy Sci.* 81 (1998) 54–63.
- [36] M. Wu, Y. Xu, Isolation and purification of lactoferrin and immunoglobulin G from bovine colostrum with serial cation-anion exchange chromatography, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 14 (2009) 155–160.
- [37] A. Elkak, T. Yehya, I. Salloub, F. Berry, A one step separation of immunoglobulin G from bovine serum by pseudobioaffinity chromatography on histidine grafted to epoxy activated sepharose, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 17 (2012) 584–590.
- [38] F. Wang, C. Chmil, F. Pierce, K. Ganapathy, B.B. Gump, J.A. Mackenzie, Y. Metchref, K. Bendinskas, Immobilized metal affinity chromatography and human serum proteomics, *J. Chromatogr. B.* 934 (2013) 26–33.
- [39] R.D. Arrua, C.I. Alvarez Igarzabal, Macroporous monolithic supports for affinity chromatography, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1974–1987.
- [40] D. Çimen, A. Denizli, Immobilized metal affinity monolithic cryogels for cytochrome c purification, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 93 (2012) 29–35.
- [41] S. Asliyuçe, L. Uzun, R. Say, A. Denizli, Immunoglobulin G recognition with Fab fragments imprinted monolithic cryogels: Evaluation of the effects of metal-ion assisted- coordination of template molecule, *React. Funct. Polym.* 73 (2013) 813–820.
- [42] M. Peterka, M. Jarc, M. Banjac, V. Frankovič, K. Benčina, M. Merhar, V. Gaberc-Porekar, V. Menart, A. Štrancar, A. Podgornik, Characterisation of metal-chelate methacrylate monoliths, *J. Chromatogr. A.* 1109 (2006) 80–85.
- [43] D. Aktaş Uygun, M. Uygun, S. Akgöl, A. Denizli, Reversible adsorption of catalase onto  $\text{Fe}^{3+}$  chelated poly(AAm-GMA)-IDA cryogels, *Mater. Sci. Eng. C.* 50 (2015)

- 379–385.
- [44] S. Çulha, C. Armutcu, L. Uzun, S. Şenel, A. Denizli, Synthesis of L-lysine imprinted cryogels for immunoglobulin G adsorption, *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 52 (2015) 315–324.
- [45] M. Daoud-Attieh, H. Chaib, C. Armutcu, L. Uzun, A. Elkak, A. Denizli, Immunoglobulin G purification from bovine serum with pseudo-specific supermacroporous cryogels, *Sep. Purif. Technol.* 118 (2013) 816–822.
- [46] A. Elkak, A. Hamade, N. Bereli, C. Armutcu, A. Denizli, Synthesis of hydroxyethyl-methacrylate-(L)-histidine methyl ester cryogels. Application on the separation of bovine immunoglobulin G, *Anal. Biochem.* 525 (2017) 1–7.
- [47] M.T. Tyn, T.W. Gusek, Prediction of diffusion coefficients of proteins, *Biotechnol. Bioeng.* 35 (1990) 327–338.
- [48] J. Janin, Surface and inside volumes in globular proteins, *Nature.* 277 (1979) 491–492.
- [49] R.C. Tarvers, F.C. Church, Use of high- performance size- exclusion chromatography to measure protein molecular weight and hydrodynamic radius: An investigation of the properties of the TSK 3000 SW column, *Int. J. Pept. Protein Res.* 26 (1985) 539–549.
- [50] J.B.Y. Richman, J.A. Verpoorte, The optical properties of  $\alpha$ 2-macroglobulin from normal and from cystic fibrosis plasma, *Can. J. Biochem.* 59 (1981) 519–523.
- [51] N. Bereli, Y. Saylan, L. Uzun, R. Say, A. Denizli, L-Histidine imprinted supermacroporous cryogels for protein recognition, *Sep. Purif. Technol.* 82 (2011) 28–35.



# SECCIÓN V

---

## Consideraciones finales



# CAPÍTULO 9

## CONSIDERACIONES FINALES

### 9.1. Conclusiones generales

El objetivo general planteado al comienzo de esta Tesis Doctoral abarcó el desarrollo de polímeros dendronizados tipo *monoliths* altamente porosos, para su potencial aplicación como soportes en cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC). Para alcanzar este objetivo se diseñó el trabajo de investigación que permitió obtener los diferentes materiales presentados en este manuscrito. El análisis de los resultados obtenidos en cada una de las etapas de trabajo permite afirmar que durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se diseñaron, sintetizaron y caracterizaron matrices poliméricas dendronizadas tipo *monoliths*.

Además de evaluar distintas metodologías de síntesis de dichos materiales, se estudió la influencia de la dendronización sobre la morfología y las propiedades fisicoquímicas del material final, evidenciando el efecto de multivalencia (*efecto dendrítico*).

Teniendo en cuenta que el trabajo de Tesis se dividió en tres partes, las conclusiones más relevantes se detallan a continuación:

1) En una primera parte se llevaron a cabo modificaciones de estructuras dendríticas mediante diferentes reacciones químicas, derivatizando tanto los grupos de la periferia como del punto focal. De esta manera, se obtuvieron monómeros dendríticos mediante una metodología de síntesis sencilla, capaces de polimerizar por polimerización radicalaria en diferentes condiciones, dependiendo de la funcionalidad otorgada (Fig. 9.1).

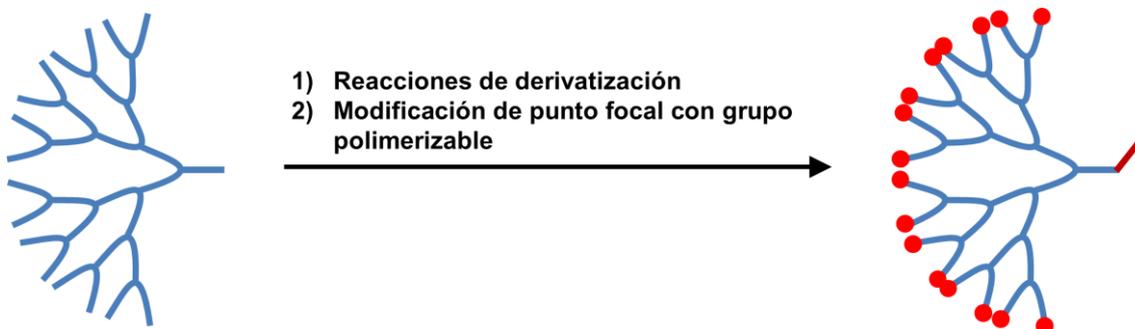


Fig. 9.1. Obtención de macromonómeros dendríticos.

2) A continuación, se obtuvieron exitosamente diferentes polímeros dendronizados tipo barras monolíticas porosas mediante copolimerización de los monómeros dendríticos previamente sintetizados (Fig. 9.2). Las reacciones de polimerización se llevaron a cabo mediante dos vías sintéticas distintas: (i) polimerización en solución a altas temperaturas dando como resultado la formación de *monoliths* macroporosos dendronizados. Se evaluaron las condiciones de reacción en función de los rendimientos y propiedades del material final. (ii) Polimerización a bajas temperaturas para obtener criogeles supermacroporosos dendronizados, innovando en el desarrollo de una metodología de fotopolimerización eficiente utilizando luces LEDs, a bajas temperaturas.

En todos los casos se observó la capacidad del dendrón para incorporarse a la estructura de la matriz y para gobernar, junto con otras variables, las propiedades del material final, observándose la variación del efecto dendrítico de acuerdo al tipo de grupo funcional de la periferia y a la concentración de dendrón.

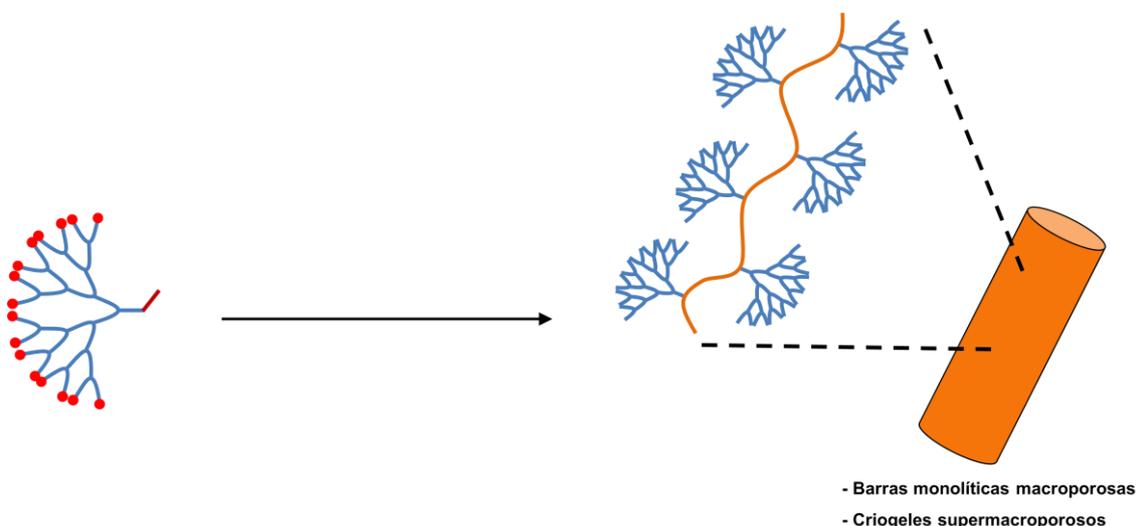
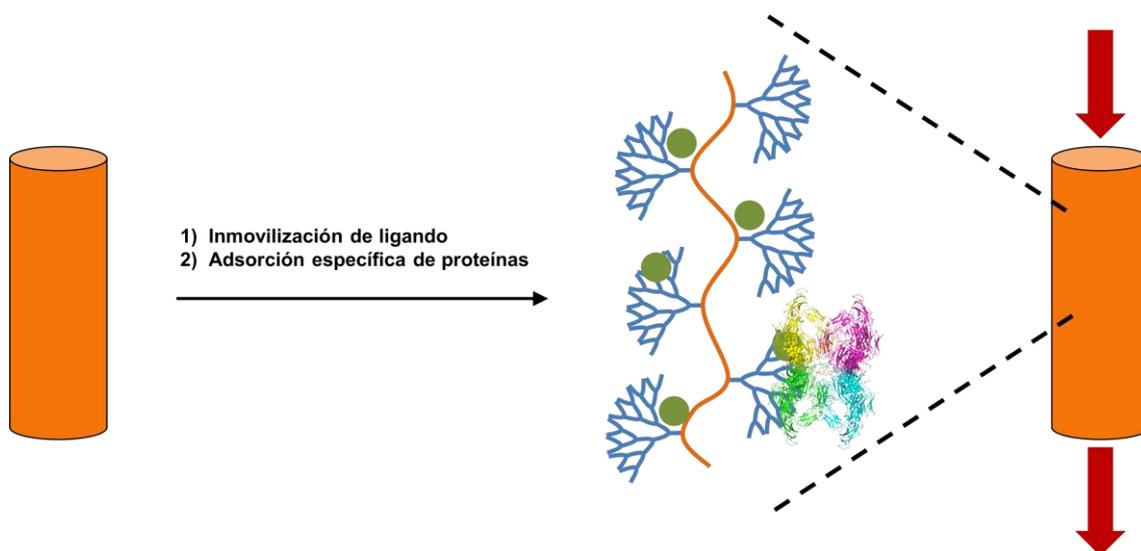


Fig. 9.2. Obtención de polímeros dendronizados tipo *monoliths*.

3) Por último, se modificaron *monoliths* dendronizados basados en NAT, AAc y AAm y criogeles dendronizados basados en PEGDMA y AAm, con iones metálicos del tipo M(II) como ligando específico (Fig. 9.3). Los materiales dendronizados con ligandos inmovilizados se evaluaron como soportes frente a dos proteínas: IgG y  $\alpha$ 2M. En esta oportunidad, la presencia del dendrón también tuvo una influencia directa en la interacción matriz-M(II) y en la posterior adsorción de proteínas. El efecto dendrítico observado fue durante la inmovilización del ion metálico y de la proteína en estudio. Se destaca en general que la dendronización mejoró las propiedades del material como potencial soporte en AC.



**Fig. 9.3.** Aplicación de los materiales dendronizados como soportes en IMAC.

Finalmente, se concluye que en este trabajo de Tesis se evidenció la importancia del diseño sintético de un material para una aplicación específica, incluso desde el nivel molecular, lo que permite un mayor control de las propiedades finales. Particularmente, no existen a la fecha antecedentes en donde moléculas dendríticas sean polimerizadas mediante las metodologías aquí estudiadas para el desarrollo de *monoliths*, y los reportes sobre la aplicación de soportes dendronizados en AC se restringe a sistemas tipo *beads*. De esta manera, la utilización de dendrones en un soporte cromatográfico constituye una nueva alternativa para el futuro diseño de novedosas matrices poliméricas dendronizadas, mejorando así las posibles interacciones entre matriz-ligando y optimizando además sus propiedades fisicoquímicas.

## 9.2. Proyecciones

En este trabajo de Tesis, las moléculas dendríticas han demostrado la capacidad de modificar y mejorar diversas propiedades relacionadas a las interacciones generadas por una matriz polimérica (soporte) con un ligando específico, y una proteína de estudio. Esto, no sólo que se ha conseguido manteniendo la naturaleza del soporte, sino que incluso se han mejorado las propiedades fisicoquímicas del mismo. Además, los ensayos llevados a cabo en este trabajo indican la potencial aplicación de dichos materiales en metodologías de separación.

Por lo tanto, se propone continuar estudiando dichos soportes dendríticos como fase estacionaria en HPLC, para la separación selectiva de distintas proteínas mediante IMAC. Se plantea entonces un estudio en la determinación de la velocidad de flujo óptima, en relación con la presión que soporta el material, elección de o los solventes de elución, entre otros.

El efecto multivalente pudo ser evidenciado en estos materiales, mediante un cambio significativo en las interacciones específicas llevadas a cabo. Teniendo esto en cuenta, se propone a futuro desarrollar nuevos materiales dendronizados utilizando monómeros dendríticos de generaciones mayores, para poder estudiar el efecto generacional en las interacciones específicas.

### 9.3. Producción científica

#### 9.1.1. Trabajos publicados

Los resultados de este trabajo de Tesis fueron parcialmente publicados en los siguientes artículos:

**Synthesis and characterization of novel dendronized polymers as macroporous monoliths.** Sergio David García Schejtman, Cecilia I. Alvarez Igarzabal y Marisa Martinelli. *Polymer* (2018). *En revisión* (POLYMER-18-614).

**Immobilized metal ion affinity dendronized supermacroporous cryogels for Immunoglobulin G adsorption.** Sergio David García Schejtman, Cecilia I. Alvarez Igarzabal y Marisa Martinelli. *Manuscrito en redacción*.

Otras publicaciones:

**Films de Gelatina Dendronizados Selectivamente Sobre una Cara.** Sergio David García Schejtman y Marisa Martinelli, *Bitácora Digital*. 1 (2013) 1–9. ISSN 2344-9144.

**Gelatin Films Dendronized Selectively on One Side: Enhancing Antimicrobial Properties and Water Repellence.** Sergio David García Schejtman, Ricardo Toselli, Miriam C. Strumia y Marisa Martinelli. *Polymer Bulletin*. 72 (2015) 3043–3062.

Capítulo de libro sobre materiales dendronizados:

**Chemistry of Hybrid Multifunctional and Multibranched Composites.** Sergio David García Schejtman, Verónica Brunetti, Marisa Martinelli y Miriam C. Strumia, en: *Hybrid Polymer Composite Materials*, 2017: pp. 31–63. ISBN: 9780081007914.

#### 9.1.2. Presentaciones a Reuniones Científicas

I. 13er Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Metalurgia y Materiales (SAM-CONAMET), Puerto Iguazú, Argentina, 2013. “Obtención de biomateriales derivados de gelatina. Dendronización”. Sergio D. García, Marisa Martinelli. *Poster*

- II. 14to Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL), Rosario, 2013. “Comparación de mieles de distinto origen geográfico. Características fisicoquímicas, microbiológicas y propiedades antioxidantes”. Pesce, Silvia; García Schejtman, Sergio D.; Toselli, Ricardo. *Poster*
- III. VI Jornadas de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, 2013. “Síntesis de polímeros dendronizados”. Sergio D. García Schejtman, Marisa Martinelli. *Poster*
- IV. XXII Jornadas de Jóvenes Investigadores AUGM 2014 (Asociación de Universidades del Grupo Montevideo), Universidad de Playa Ancha, Valparaíso, Chile, octubre 2014. “Síntesis y caracterización de nuevos materiales poliméricos dendronizados tipo *monoliths*” (Química), Sergio David García Schejtman, Orientadora: Marisa Martinelli. *Oral*
- V. XIV Simposio Latinoamericano de Polímeros (SLAP 2014) y XII Congreso Iberoamericano de Polímeros (CIP). Porto de Galinhas, Brasil. Octubre 2014. “Síntesis de nuevos materiales poliméricos dendronizados tipo *monoliths*”, Sergio David García Schejtman, Cecilia Inés Alvarez Igarzabal, Marisa Martinelli. *Poster*
- VI. XI Simposio Argentino de Polímeros (SAP), Santa Fe, Octubre 2015. “Avances en la síntesis y caracterización de polímeros dendronizados tipo *monoliths*. Ensayos de inmovilización de metales para su aplicación como soportes en cromatografía de afinidad”. Sergio David García Schejtman, Cecilia Inés Alvarez Igarzabal, Marisa Martinelli. *Poster*
- VII. XI Simposio Argentino de Polímeros (SAP), Santa Fe, Octubre 2015. “Películas de quitosán con gelatina y nitrato de cerio: Síntesis y estudios de sus propiedades fisicoquímicas”. V.S. Passotti, S.D. García Schejtman, A. Ávila y M. Martinelli. *Poster*
- VIII. XX Simposio Nacional de Química Orgánica (SINAQO), Mar del Plata, noviembre 2015. “Síntesis y caracterización de nuevos monómeros dendríticos a partir de ácido 5-nitroisoftálico”, Sergio D. García Schejtman, Guido N. Rimondino y Marisa Martinelli. *Poster*.
- IX. VII Jornadas de Posgrado y I Jornadas de Ciencia y Tecnología, Córdoba, abril 2016. “Síntesis de monómeros dendríticos. Obtención de polímeros dendronizados para su aplicación en reconocimiento molecular”. Sergio D. García Schejtman y Marisa Martinelli. *Oral*
- X. 16to Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Metalurgia y Materiales (SAM-CONAMET) 2016. Córdoba, Argentina. Síntesis y caracterización de polímeros dendronizados tipo *monoliths* a partir de acrilamida, ácido acrílico, *N,N'*-metilénbisacrilamida y un monómero dendrítico basado en amina de Behera. Sergio D. García Schejtman, Florencia Rivelli Triverio y Marisa Martinelli. *Poster*.

- XI.** 16to Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Metalurgia y Materiales (SAM-CONAMET) 2016. Córdoba, Argentina. Polímeros macroporosos a partir de un monómero dendrítico. Estudio del efecto multivalente en la inmovilización de de metales y su aplicación en la purificación de una proteína sérica. Sergio D. García Schejtman, Paula V. Subirada Caldarone, Cecilia I. Álvarez Igarzabal, María C. Sánchez y Marisa Martinelli. *Oral*.
- XII.** XII Simposio Argentino de Polímeros (SAP) 2017. Córdoba, Argentina. Polímeros dendronizados macroporosos tipo barras monolíticas como soportes para IMAC. Florencia Rivelli Triverio, Sergio D. García Schejtman y Marisa Martinelli. *Poster*.
- XIII.** XII Simposio Argentino de Polímeros (SAP) 2017. Córdoba, Argentina. Criogeles supermacroporosos dendronizados obtenidos mediante fotopolimerización. Sergio D. García Schejtman, Cecilia I. Álvarez Igarzabal y Marisa Martinelli. *Poster*.





# SECCIÓN VI

---

Parte experimental



# CAPÍTULO 10

## PARTE EXPERIMENTAL

### 10.1. Materiales y equipos

#### 10.1.1. Materiales

Los dendrones di-*t*-butil-4-amino-4-(3-(*t*-butoxi)-3-oxopropil)heptanodiato (Aminotriester, amina de Behera, AB) y di-*t*-butil-4-[2-(*t*-butoxicarbonil)etil]-4-isocianato-1,7-heptanodicarboxilato (Weisocianato, Weis) fueron provistos por Frontier Scientific (USA). Cloruro de benzoilo (Merk) y ácido fórmico puro (Cicarelli) fueron utilizados sin tratamiento previo.

Ácido acrílico (AAc, anhidro, contiene 200 ppm de MEHQ como inhibidor), trietilamina (EtN<sub>3</sub>, 99,5 %), nitrometano (CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>), *N*-[Tris(hidroximetil)metil]acrilamida (NAT, 93 %, contiene ≤7% KCl), 2-hidroxietil metacrilato (HEMA), 2-aminoetil metacrilato (AEMA, *N,N'*-metilénbis(acrilamida) (BIS, 99 %), 2,2'-Azobis(2-metilpropionitrilo) (AIBN, 98%), polietilenglicol dimetacrilato (Mn = 550, PEGDMA), canforquinona (CQ, 97 %), etil 4-(dimetilamino)benzoato (EDMAB, 99 %), laurato de dibutil estaño, paladio sobre carbono (Pd/C 10 % p/p), tetrametilguanidina (TMG, 99 %), sulfato de cobre(II) pentahidratado (CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, ≥ 98 %), cloruro de zinc(II) (ZnCl<sub>2</sub>, anhidro, ≥ 97 %) y el reactivo de Bradford, fueron provistos por Sigma-Aldrich (USA). El azul brillante de Coomassie® (G 250, pH = 6,4) fue provisto por Merck. Ácido acrílico (AAc) fue purificado por destilación bajo presión reducida. El iniciador AIBN fue previamente purificado por recristalización utilizando metanol (MeOH) y fue usado en un período no mayor a dos meses.

Todos los solventes utilizados como diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), cloroformo (CHCl<sub>3</sub>), dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dimetilacetanilida (DMAc), acetato de etilo (EtOAc), ciclohexano, tolueno, acetona y metanol (MeOH), fueron previamente destilados y/o secados utilizando tamices moleculares 4 Å 8-12 (Sigma, USA). Tetrahidrofurano (THF, Sintorgan, grado HPLC) fue almacenado con hilos de sodio metálico. Ácido clorhídrico (HCl, 38%) y ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>, 65%), así como los agentes desecantes sulfato de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), sulfato de magnesio (Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) anhidro fueron provistos por Cicarelli. Los agentes porógenos polietilenglicol (Fluka, Mn = 6000, PEG6000), etanol, *n*-pentanol (C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>OH), dodecanol (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>OH) y tetradecanol (C<sub>14</sub>H<sub>29</sub>OH, Fluka) fueron usados sin tratamiento previo.

Todas las soluciones *buffers* fueron preparadas al momento de ser utilizadas. Además, se corroboró el valor de pH con un pH-metro. El reactivo EDTA/Cu(II) (13 mmol/L), en hidróxido de sodio (875 mmol/L) y alquil aril poliéter (R<sub>A</sub>, Wiener Lab) fue utilizado sin tratamiento previo. La solución de inmunoglobulina G (IgG, 5 % p/v en *buffer* glicina pH = 5) fue provista por el Laboratorio de Hemoderivados de la Universidad Nacional de Córdoba.

La muestra de alfa-2-macroglobulina ( $\alpha_2M$ ) fue obtenida a partir de una extracción sanguínea realizada en el Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET).

### 10.1.2. Equipamiento y metodologías de caracterización

#### 10.1.2.1 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los experimentos fueron realizados en un espectrómetro Bruker UltraShield 400, operado a 400 MHz y 100,6 MHz, para  $^1H$  y  $^{13}C$ , respectivamente, a 25°C y utilizando como solvente D<sub>2</sub>O, CDCl<sub>3</sub> y DMSO-d<sub>6</sub>, según correspondiera. Para el análisis de los resultados obtenidos se usó el programa MestreC. Los espectros fueron calibrados usando la señal residual del solvente y los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en partes por millón (ppm) relativos a TMS.

#### 10.1.2.2 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros fueron realizados en un equipo Nicolet iN10 (Thermo Scientific, USA) empleando un detector enfriado con nitrógeno líquido de Mercurio Cadmio Telurio 7800-650 cm<sup>-1</sup> (MCT-A) o de temperatura ambiente 7600-450 cm<sup>-1</sup> (DTGS), según la muestra. Se obtuvieron espectros a partir del promedio de al menos 64 mediciones con una resolución de 8 cm<sup>-1</sup>. Las muestras tipo polvo fueron depositadas en un espejo de oro y analizadas por el modo reflexión. Los polímeros obtenidos fueron pulverizados y analizadas utilizando una pastilla de KBr o bien determinados directamente por transmitancia, según correspondiera. Se procesaron los espectros utilizando el programa Omnic 8.3.

#### 10.1.2.3 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes de morfología superficial de todos los polímeros fueron registradas utilizando un equipo SEM Carl Zeiss Sigma con un adaptador EDS (OXFORD-AZTEC

XMAX 80, LAMARX-FaMAF-UNC). Todas las muestras fueron previamente metalizadas con oro.

#### 10.1.2.4 Porosimetría por intrusión de nitrógeno

La superficie específica de ciertas matrices fue determinada por el método Brunauer-Emmet-Teller (BET) [1] utilizando un instrumento Micromeritics Tristar II 2020 automático de adsorción-desorción de nitrógeno (ACROSS, Australia). Antes de realizar la medida, las muestras fueron secadas en un equipo Micromeritics SmartPrep a 70 °C durante 24 horas.

#### 10.1.2.5 Análisis termogravimétrico (TGA)

Las curvas de TGA-DTA fueron obtenidas utilizando un equipo Shimadzu DTG-60 (Japan), en un rango de temperatura de 30-600 °C con una curva de calentamiento de 20 °C/min (de 30 a 150 °C) y de 10 °C/min (de 150 a 600 °C), bajo ambiente de nitrógeno. Para graficar y procesar los datos se utilizó el programa OriginPro 8.0.

#### 10.1.2.6 Estudios de índice de hinchamiento

La variación de masa por hinchamiento en el equilibrio fue estudiada tanto en agua como en DMSO, y se realizó utilizando una balanza Mettler Toledo Newclassic MF balance (Modelo MS204S). Todas las muestras fueron secadas y luego hinchadas por 24 horas. Se determinó el índice de hinchamiento, expresado en porcentaje de hinchamiento en el equilibrio, mediante la siguiente ecuación 10.1:

$$\text{Índice de hinchamiento}(\%) = \frac{m_w - m_d}{m_d} 100 \quad \text{Ec. 10.1,}$$

donde  $m_d$  es la masa de la muestra seca y  $m_w$  es la masa de la muestra hinchada en el equilibrio.

#### 10.1.2.7 Determinación de porosidad ( $\Phi$ )

Para criogeles, se determinó la variación de masa siguiendo un procedimiento análogo al correspondiente para índice de hinchamiento, determinando en este caso los

cambios de volumen del polímero utilizando una probeta graduada. La porosidad ( $\Phi$ ) de los criogel se calculó de acuerdo con la ecuación 10.2:

$$\Phi (\%) = \frac{m_w m_d}{\rho_w V_0} 100 \quad \text{Ec. 10.2,}$$

donde  $m_w$  es la masa del criogel hinchado,  $m_d$  es la masa del criogel seco,  $\rho_w$  es la densidad del agua y  $V_0$  es el volumen del criogel, el cual se determinó a partir de un volumen conocido de agua ( $V_1$ ) y el volumen resultante de sumergir el criogel ( $V_2$ ), como indica la ecuación 10.3:

$$V_0 = V_2 - V_1 \quad 10.3,$$

#### 10.1.2.8 Absorción atómica (AA)

Se empleó Absorción Atómica para la cuantificación de iones metálicos Cu(II) y Zn(II) empleando un espectrofotómetro Shimadzu AA-7000 (CEQUIMAP, FCQ-UNC). Inicialmente fue necesario seleccionar la lámpara de trabajo y calibrar el equipo utilizando soluciones de concentración conocida del ion a cuantificar (5 soluciones). Las condiciones del método se encuentran en la Tabla 10.1. Para procesar los resultados se utilizó el programa OriginPro 8.0.

**Tabla 10.1.** Valores analíticos obtenidos para cada determinación.

	LOD (ppm)	LOQ (ppm)	Máxima concentración tolerable (ppm)
Zn (II)	0,0051	0,015	5
Cu (II)	0,003	0,0091	1

LOD: Límite de detección; LOQ: límite de cuantificación.

#### 10.1.2.9 Espectrofotometría UV-Vis

Las mediciones se efectuaron en el espectrofotómetro Shimadzu MultiSpect 1800. Los espectros fueron adquiridos entre 400-700 nm a 25 °C con un modo de velocidad de barrido rápida y un intervalo de muestreo de 0,2. Se utilizaron celdas de cuarzo con paso óptico de 1 cm. Para graficar y procesar los datos se usaron los programas UVProbe (versión 2.42) y OriginPro 8.0.

### 10.1.2.10 Liofilizado de muestras

Diferentes muestras fueron liofilizadas para su posterior caracterización. El liofilizado consistió en una primera instancia en colocar las muestras a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 12 h en un freezer. Las muestras congeladas se colocaron dentro de la unidad de liofilización. El proceso de liofilización se realizó utilizando un liofilizador de laboratorio (Rificor L-T8) operado con un condensador a  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  y un vacío de 0,1 mbar durante 24 – 48 h.

## 10.2. Procedimientos

### 10.2.1. Síntesis de estructuras dendríticas

#### 10.2.1.1. Formación de cloruro de acrililo, AcCl

En un balón de 100 mL se colocaron 0,0200 g de inhibidor (hidroquinona), 12 mL de ácido acrílico (0,1748 mol) y 35 mL de cloruro de benzoilo (0,3013 mol), y se llevó a  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se realizó una destilación fraccionada y se recolectó la fracción que destiló por debajo de  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un balón enfriado conteniendo 0,0200 g de hidroquinona. Posteriormente, esta fracción fue redestilada en el mismo equipo y se colectó la fracción entre  $72$  y  $74\text{ }^{\circ}\text{C}$  (correspondiente al producto clorado) en un balón conteniendo 0,0200 g de hidroquinona. **FT-IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1760 (solo se destaca la señal que evidencia la formación del producto destacado).

#### 10.2.1.2. Síntesis de ABA

La obtención del monómero dendrítico se basó en una metodología previamente descrita [2]. En un balón de 100 mL se agitó una solución de amina de Behera (2,0750 g, 5,0 mmol), TEA (1,2 mL, 8,5 mmol) en 40 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , en un baño de hielo. Se disolvió cloruro de acrililo (0,5 mL, 6 mmol) en 8 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se agregó por goteo a la solución anterior, utilizando una ampolla de compensación con una trampa de  $\text{CaCl}_2$  para mantener el medio libre de humedad. Posteriormente, la mezcla resultante se dejó agitando a temperatura ambiente durante 24 horas. La reacción fue monitoreada mediante cromatografía en placa delgada contra testigos de reactivos, utilizando una mezcla de EtOAc/ $\text{CHCl}_3$  (1:9 v/v), como fase móvil. Al final de la reacción, el contenido del balón se trasvasó a una ampolla de decantación y se lavó con dos porciones de solución saturada de NaCl y dos porciones de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, de 20 mL

cada una. La fase orgánica fue secada con  $\text{MgSO}_4$  anhidro y luego evaporada a sequedad. El producto ABA fue obtenido como un sólido blanco (2,1865 g, 95 % rendimiento):  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1,43 (s, 27H); 2,03 (t,  $J = 7,7$  Hz, 6H); 2,25 (t,  $J = 7,7$  Hz, 6H); 5,58 (dd,  $J = 10,2, 1,0$  Hz, 1H); 6,03 (dd,  $J = 16,9, 10,2$  Hz, 1H); 6,21 (dd,  $J = 17,0, 1,0$  Hz, 1H); 6,26 (s, 1H);  $^{13}\text{C RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100,6 MHz)  $\delta$  (ppm) 28,2; 29,8; 30,1; 57,9; 80,7; 126,2; 132,0; 165,1; 173,2; **FT-IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3307; 2973; 1728; 1660; 1540; 1248; 850; 755.

#### 10.2.1.3. Síntesis de NPD

Se preparó una solución utilizando 560  $\mu\text{L}$  de TMG y 240  $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_3\text{NO}_2$  en 100 mL THF, y se agitó durante 6 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 2,0480 g de ABA (4 mmol), para luego aumentar la temperatura gradualmente hasta 50 °C. La reacción se llevó a cabo a 50 °C con agitación, durante 5 días. La mezcla de reacción fue concentrada al vacío, se redisolvió en  $\text{CHCl}_3$  y posteriormente se lavó con volúmenes iguales de HCl 5%, agua destilada y una solución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró y se llevó a sequedad. El seguimiento de la reacción se llevó a cabo por espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN, mediante la desaparición de las señales vinílicas correspondiente al ABA. El producto NPD fue obtenido como un sólido amarillo (1,7412 g, 85,8% de rendimiento):  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1,44 (81 H, s), 1,97 (18 H, t,  $J = 7,7$  Hz), 2,22 (30 H, t,  $J = 6,7$  Hz);  $^{13}\text{C RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100,6 MHz)  $\delta$  (ppm) 28,1; 29,7; 29,8; 31,9; 57,7; 74,7; 87,4; 170,1; 172,8. **FT-IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3313; 1730; 1663; 1553; 1368.

#### 10.2.1.4. Síntesis de G2-NH<sub>2</sub>

En un recipiente de reacción de hidrogenación se colocaron 36,7 mg (0,025 mmol) de NPD, y se agregaron 8,0 mg de Pd/C 10% y 2 mL de una mezcla 50:50 de MeOH: $\text{CHCl}_3$ . La reacción de hidrogenación se llevó a cabo a 40 psi de presión y a temperatura ambiente durante 6 horas. Luego, se filtró en columna de Celite utilizando  $\text{CHCl}_3$ . Posteriormente, se lavó con 3 volúmenes de 10 mL de HCl 5% cada uno. La fase orgánica fue secada con  $\text{MgSO}_4$  anhidro, filtrada y finalmente secada al vacío, para obtener 28,50 mg de producto (0,0198 mmol, 79% de rendimiento):  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1,42 (81 H, s), 1,95 (18 H, t,  $J = 7,5$  Hz), 2,20 (30 H, t,  $J = 7,5$  Hz).  $^{13}\text{C RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100,6 MHz)  $\delta$  (ppm) 28,2; 29,8; 30,0; 31,9; 54,0; 57,8; 81,5; 169,3; 174,3. **FT-IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3346; 1719; 1680; 1540.

## 10.2.1.5. Síntesis de ABAh

La hidrólisis del monómero ABA se llevó a cabo basándose en una metodología previamente reportada [3,4]. Se colocaron 1,0549 g de ABA (2,25 mmol) en un balón junto con 1 mL de acetona y 7 mL (0,15 mol) de ácido fórmico. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 72 horas con agitación. Posteriormente, el crudo se llevó a sequedad utilizando un rotavapor, mediante el agregado de alícuotas de 1 mL de tolueno. El producto hidrolizado fue obtenido como un sólido blanco (0,7337 g, 97,4% rendimiento).  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 2,00 (t,  $J = 7,4$  Hz, 6H); 2,30 (t,  $J = 7,7$  Hz, 6H); 5,65 (d,  $J = 10,2$  Hz, 1H); 6,08 (d,  $J = 16,8$  Hz, 1H); 6,20 (dd,  $J = 17,0, 10,1$  Hz, 1H);  $^{13}\text{C RMN}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100,6 MHz)  $\delta$  (ppm) 28,1; 28,7; 57,9; 127,2; 130,5; 165,9; 167,9; 177,9; **FT-IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3278; 2923; 1720; 1700; 1658; 1627; 1558.

## 10.2.1.6. Síntesis de AEMA-Weis

En un equipo de reacción previamente seco, que consistió en un balón de 10 mL y un refrigerante, se colocaron las cantidades correspondientes de cada uno de los reactantes, según se indica en la Tabla 10.1, de acuerdo a la relación molar utilizada. El contenido del balón se disolvió con 6 mL de DMF y se agregó laurato de dibutil estaño en 1% respecto a los moles de Weis. La reacción se llevó a cabo a 80°C durante dos tiempos diferentes, a 8 y a 16 h.

**Tabla 10.2.** Cantidades de reactivos utilizados para la obtención de AEMA-Weis.

	Relación molar AEMA:Weis (1:1)	Relación molar AEMA:Weis (2:1)	Tiempos de reacción (h)
<b>AEMA</b>	0,1381 g (1 mmol)	0,2854 g (2 mmol)	8 y 16
<b>Weis</b>	0,4650 g (1 mmol)	0,4678 g (1 mmol)	8 y 16

Luego de transcurrida la reacción, la mezcla se lavó con 30 mL de ciclohexano y 3 volúmenes de 10 mL de solución saturada de NaCl. Se eliminó el agua de la fase orgánica utilizando  $\text{MgSO}_4$  anhidro y posteriormente se llevó a sequedad. La formación de producto se siguió mediante cromatografía en placa delgada utilizando una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (95:5 v/v). No fue posible aislar en estado puro el producto formado.  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1,45 (d,  $J=1,5, 44\text{H}$ ); 1,93 (dd,  $J=15,0, 7,5, 10\text{H}$ ); 1,98 – 1,96 (m, 6H); 2,24 (dd,  $J=15,9, 7,9, 13\text{H}$ ); 3,50 – 3,39 (m, 3H); 4,21 (dt,  $J=11,1, 5,5, 2\text{H}$ ); 5,61 (t,  $J=1,6, 1\text{H}$ ); 6,14 (s, 1H).  $^{13}\text{C RMN}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100,6 MHz)  $\delta$  (ppm) 18,1; 39,2; 56,5; 64,0; 80,5; 126,0; 136,0; 156,4; 167,5; 173,2.

#### 10.2.1.7. Síntesis de HEMA-Weis

La metodología de reacción empleada fue análoga a la descrita en el punto anterior para AEMA-Weis. En un equipo de reflujo previamente seco se colocaron 0,6170 g de Weis (1,40 mmol), 0,42 mL de HEMA (3,5 mmol), 0,1 mL de laurato de dibutil estaño (0,017 mmol) y se disolvieron en 6 mL de DMF. La reacción se llevó a 80 °C durante 16 horas. Posteriormente, a la mezcla se agregaron 10 mL de etanol, y se llevó al rotavapor; este paso (agregado de etanol y evaporación) se repitió hasta eliminación completa de la DMF. El crudo de reacción se redisolvió en 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se lavó con agua, y una solución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub> anhidro y posteriormente se eliminó el solvente por filtración. La formación del producto se observó por cromatografía en placa delgada utilizando como fase móvil CHCl<sub>3</sub>:MeOH (95:5 v/v). No fue posible aislar el producto en estado puro. <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O, 400 MHz) δ (ppm) 1,37 (t, J=2,9, 34H); 1,88 (dd, J=16,3, 7,4, 12H); 2,16 (t, J=7,7, 5H); 1,91 – 1,89 (m, 5H); 3,83 – 3,77 (m, 12H); 4,26 – 4,19 (m, 16H); 5,25 (s, 1H); a5,53 (dd, J=3,2, 1,6, 3H); 6,13 – 6,05 (m, 3H). <sup>13</sup>C RMN (D<sub>2</sub>O, 100,6 MHz) δ (ppm) 18,2; 28,3; 60,8; 66,3; 80,6; 125,9; 136,0; 153,6; 162,7; 167,9; 172,3.

#### 10.2.2. Obtención de barras monolíticas macroporosas

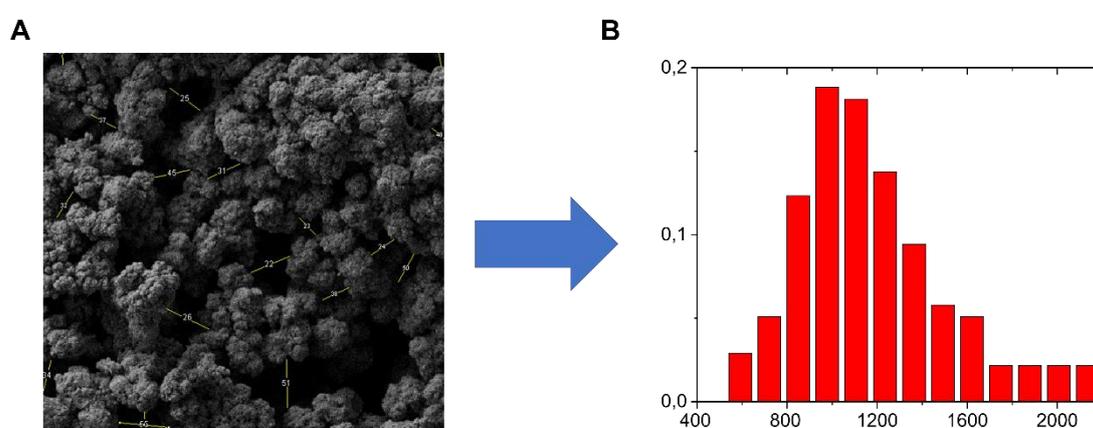
##### 10.2.2.1. Síntesis de barras monolíticas

Se obtuvieron diferentes polímeros utilizando ABA como monómero dendrítico, BIS como agente entrecruzante y NAT, AAm y AAc como co-monómeros. La relación de monómeros y las diferentes condiciones de reacción empleadas, se muestran en las Tablas 5.1, 5.2 y 5.3 (Capítulo 5).

Todos los sistemas fueron obtenidos a partir de una polimerización radicalaria en solución utilizando como molde de reacción una jeringa de polipropileno de 3 mL. En una primera etapa, los monómeros fueron disueltos en 1 mL de una mezcla porogénica en una relación solvente:porógeno 72:28. La mezcla así formada se agitó a 60 °C hasta disolución completa de los monómeros, luego se eliminó todo el O<sub>2</sub> disuelto realizando un burbujeo con N<sub>2</sub>. Posteriormente, se agregó AIBN en 1% respecto a la masa total de monómeros, y la reacción se llevó a cabo en un baño de aceite durante 24 horas a 70 °C, sin agitación. Finalmente, los polímeros obtenidos fueron lavados con metanol utilizando un equipo de soxhlet durante 48 horas y luego fueron secados a 60 °C en una estufa, para obtener finalmente diferentes barras monolíticas macroporosas (rendimientos >90%).

### 10.2.2.2. Determinación de tamaños de poros

La determinación de los tamaños de poro de las barras monolíticas macroporosas se realizó a partir de diferentes imágenes SEM de cada una de las muestras, tomadas en distintas zonas y en función del ancho de imagen (15, 30 y 60  $\mu\text{m}$ ), utilizando el software ImageJ (version 1.51, National Institute of Health, USA) para procesar las imágenes. Se midió el diámetro de poro a partir de las imágenes SEM (entre 60 y 100 medidas por imagen), con estos datos se obtuvo un histograma para cada una de las muestras analizadas, como se observa a modo de ejemplo en la Fig. 10.1.



**Fig. 10.1.** Determinación de tamaños y distribución de tamaños de poro a partir de una imagen SEM (imagen representativa). (A) Imagen SEM, (B) histograma.

### 10.2.3. Obtención de criogel supermacroporosos

#### 10.2.3.1. Síntesis de criogel supermacroporosos

Para obtener distintos criogel fotopolimerizados, se prepararon soluciones acuosas de los monómeros (PEGDMA, AAm y ABAh) al 10% p/p, en las proporciones indicadas en la Tabla 6.1. (Capítulo 6), siendo el volumen final 1 mL. El fotoiniciador CQ y el coiniciador EDMAB se agregaron en un 2% en masa cada uno, respecto a la masa total de monómeros. Una vez disuelto todo el contenido, se burbujeó  $\text{N}_2$  durante 5 minutos, para eliminar el  $\text{O}_2$  disuelto. Posteriormente, se trasvasó la solución a una jeringa de polipropileno de 1 mL y se llevó a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  durante un tiempo no menor a 2 horas. Para llevar a cabo la reacción de fotopolimerización, se utilizó un arreglo de luces LEDs de color azul ( $\lambda = 450\text{-}500\text{ nm}$ ), de  $4,5\text{ W/m}$ , con una luminancia de 8500 lux. Las muestras congeladas se sometieron a irradiación, variando el tiempo de exposición: 30

(T1), 45 (T2), 60 (T3), 90 (T4) y 120 minutos (T5). Luego, las muestras fueron llevadas a temperatura ambiente y lavadas utilizando una bomba peristáltica (Gilson's MINIPULS® 3) con un flujo de agua milliQ de 1 mL/min. Finalmente, las muestras fueron liofilizadas para obtener los criogeles de color blanco, con rendimientos superiores al 90 %.

#### 10.2.3.2. Determinación de tamaños de poros

La distribución de tamaños de poro para cada criogel fue determinada a partir de imágenes SEM, de acuerdo al mismo procedimiento descrito para las barras monolíticas (punto 10.2.2.2).

#### 10.2.4. Inmovilización de iones metálicos

La determinación de la cantidad de metal inmovilizado en las matrices se realizó empleando absorción atómica, midiendo la concentración de cada solución antes y después del procedimiento de retención. En una primera etapa, se prepararon soluciones de Cu(II) y Zn (II) de concentración conocida (solución madre) entre 800 y 1500 ppm. Luego, por medio de diferentes diluciones se prepararon aquellas soluciones testigo con una concentración entre los valores establecidos de acuerdo a la metodología previamente descrita (punto 10.1.2.8). La inmovilización de iones metálicos se realizó como se indica en la Fig. 10.2. La muestra (de masa conocida, entre 20-50 mg) se colocó en contacto con 3 mL de solución del ión metálico correspondiente y se dejó durante 48 horas con agitación constante. Posteriormente, se retiró una muestra de la solución resultante para ser determinada por AA (cantidad de metal retenido total), mientras que la muestra con metal retenido se sumergió en 3 mL de una solución de HNO<sub>3</sub> al 2% p/p y se dejó durante 24 horas para eliminar todo el metal retenido inespecíficamente. Luego, se determinó la concentración de iones presentes en la solución ácida, lo cual se restó a la cantidad determinada anteriormente (cantidad de metal retenido específicamente). La cantidad de metal específico (ppm) se determinó mediante la ecuación 10.4:

$$\text{cantidad metal específico (ppm)} = C_1 - C_2 - C_3 \quad \text{Ec. 10.4}$$

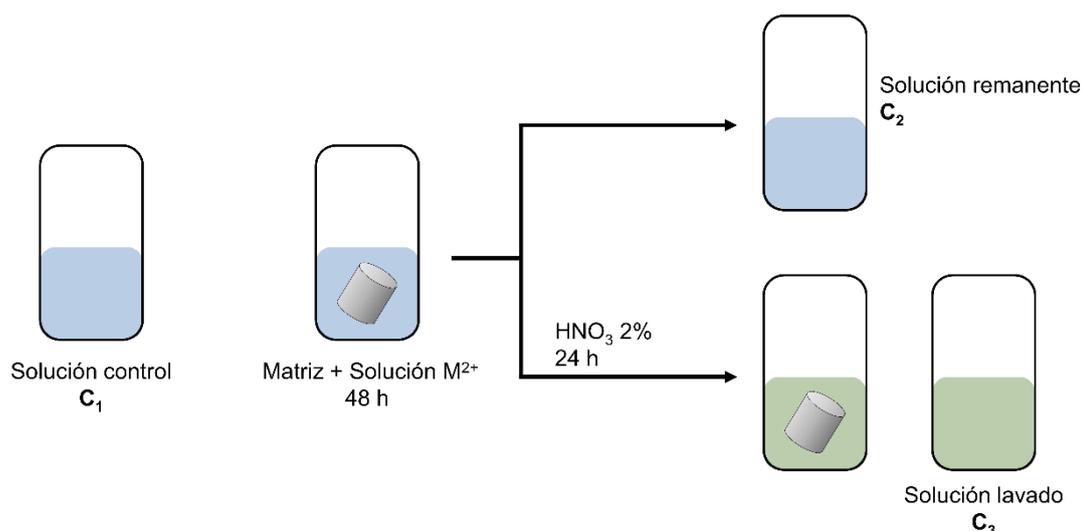


Fig. 10.2. Metodología de inmovilización de iones metálicos sobre los *monoliths*.

## 10.2.5. Estudio de adsorción de proteínas

### 10.2.5.1. Adsorción y Cuantificación de IgG

La metodología para la adsorción de IgG de las matrices fue análoga a la descrita para iones metálicos; una cantidad conocida de matriz-Cu(II) (entre 30-50 mg) fue colocada en 500  $\mu$ L de solución de IgG 5% (previando una concentración máxima de proteína adsorbida de 800 mg/g matriz), junto a 500  $\mu$ L de buffer acetato y 1 mL de agua milliQ. La adsorción se llevó a cabo durante 6 horas mediante agitación externa.

Para realizar la cuantificación de la proteína retenida en cada una de las matrices se empleó espectrofotometría UV-Vis, determinando el máximo de absorbancia a 540 nm de las soluciones de proteína antes y después de estar en contacto con la matriz correspondiente, mediante la formación de un complejo coloreado utilizando R<sub>A</sub>. Para ello, inicialmente se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de IgG. Para la determinación de las soluciones en contacto con la matriz, a la solución resultante se le agregó 3,5 mL de R<sub>A</sub> y se lo incubó durante 15 minutos a 37 °C. Posteriormente, se midieron las curvas espectrales de cada muestra. El volumen final en todos los casos fue 3,9 mL. En cada solución se agregaron 3,5 mL de R<sub>A</sub> y el volumen se ajustó con buffer acetato pH = 4,5. La solución blanco fue preparada a partir de 3,5 mL de R<sub>A</sub> y 0,4 mL de buffer.

### 10.2.5.2. Adsorción y Cuantificación de $\alpha_2M$ <sup>1</sup>

La adsorción de  $\alpha_2M$  sobre matrices-Zn(II) se llevó a cabo siguiendo dos metodologías distintas: i) en *batch*, ii) en flujo.

Para realizar la cuantificación de la proteína retenida en cada una de las matrices y por cada uno de los métodos se empleó espectrofotometría UV-Vis, determinando el máximo de absorbancia a 280 nm de las soluciones de proteína antes y después de estar en contacto con la matriz correspondiente.

#### 10.2.5.2.1. Metodología en *batch*

Se sumergieron entre 5-10 mg de muestra en 1 mL de solución de proteína de concentración 0,55  $\mu M$ , y se dejó 6 horas con agitación externa. Posteriormente, se separó la solución y se determinó la absorbancia a 280 nm. La concentración de  $\alpha_2M$  se determinó de acuerdo a la ecuación 10.5:

$$[\alpha_2M] = Abs \frac{Fd}{8,6} 10. (720000)^{-1} \quad \text{Ec. 10.5,}$$

donde la Abs es la absorbancia medida a 280 nm y Fd es el factor de dilución aplicado (20).

#### 10.2.5.2.2. Metodología en flujo

Para la purificación de  $\alpha_2M$  a partir de un *pool* de plasmas (previamente procesado), fue necesario preparar los siguientes buffers: buffer A (NaCl 0,5 M + EDTA 0,05 M; pH = 7), buffer B (ZnCl<sub>2</sub> 3 mg/mL), buffer C (NaCl 0,15 M + acetato de sodio 0,25 M; pH = 5), buffer D (NaCl 0,8 M + NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0685 M + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,0315 M; pH = 6,5), buffer E (NaCl 0,15 M + NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01754 M + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,00246 M; pH = 6) y buffer F (NaCl 0,15 M + acetato de sodio 0,01 M; pH = 5).

La purificación se realizó utilizando una columna de AAm-ABA20-BIS (largo: 3 cm; diámetro: 1,2 cm, masa total: 0,998 g) y un flujo continuo de 1 mL/min. En una primera etapa, se realizó (en el orden indicado) el lavado de la columna, utilizando 30

<sup>1</sup> Este trabajo se realizó en colaboración con la Dra. Maria Cecilia Sanchez y la Bioq. Paula Subirada Caldarone, pertenecientes al Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET Departamento de Bioquímica Clínica, FCQ-UNC).

mL de agua milliQ, 25 mL de buffer A, y nuevamente 75 mL de agua milliQ. Posteriormente, se incorporó el ion metálico utilizando 25 mL de buffer B. Luego, se ajustó el pH de la columna con 25 mL de buffer C y 30 mL de buffer D. La columna se dejó reposar durante 24 horas. Se realizó el cargado de 2 mL de plasma y se lo dejó en circuito cerrado durante 15-20 minutos. La columna se lavó con 50 mL de buffer D y 75 mL de buffer E. Finalmente, la elución de la proteína de la columna se realizó utilizando buffer F (en cantidades necesarias), en un flujo de 0,5 mL/min y recolectando muestras de 0,5 mL en tubos *ependorf*, agregando una gota de reactivo de Bradford para observar la presencia de proteína. Debido a la ausencia de  $\alpha_2M$  en la eluido, no se realizó la cuantificación posterior.

A fin de visualizar si la  $\alpha_2M$  se retuvo y si la cantidad ofrecida a la columna estaba en excedente, se llevó a cabo una electroforesis en geles de poliacrilamida al 5% de una muestra previo al paso por la columna y de una muestra posterior al paso por la columna. A las mismas se les adicionó 5  $\mu$ L de *buffer* de Laemmli, sin calentamiento para evitar la desnaturalización de cualquier proteína. Posteriormente, las proteínas fueron fijadas en el gel con una solución de etanol-acético durante 1 hora a temperatura ambiente y el gel fue teñido con una solución de azul brillante de coomasie al 0,1% por 3 horas a 37°C. Condiciones de corrida: 100V, 400mA, 100W.

### 10.3. Referencias

- [1] S. Brunauer, P.H. Emmett, E. Teller, Adsorption of Gases in Multimolecular Layers, *J. Am. Chem. Soc.* 60 (1938) 309–319.
- [2] G.R. Newkome, K.K. Kotta, C.N. Moorefield, Convenient Synthesis of 1  $\rightarrow$  3 C-Branched Dendrons, *J. Org. Chem.* 70 (2005) 4893–4896.
- [3] G.N. Rimondino, E. Miceli, M. Molina, S. Wedepohl, S. Thierbach, E. Rühl, M. Strumia, M. Martinelli, M. Calderón, Rational design of dendritic thermoresponsive nanogels that undergo phase transition under endolysosomal conditions, *J. Mater. Chem. B.* 5 (2017) 866–874.
- [4] J.C. Cuggino, M. Calderon, C.I. Alvarez, M.C. Strumia, K.N. Silva, E.K. Penott-Chang, A.J. Muller, New dendronized polymers from acrylate Behera amine and their ability to produce visco-elastic structured fluids when mixed with CTAT worm-like micelles, *J. Colloid Interface Sci.* 357 (2011) 147–156.





