

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

FACULTAD DE QUÍMICA

Departamento de Química Inorgánica



NUEVOS DENDRÍMEROS DE TIPOLOGÍA CARBOSILANO VIA “CLICK CHEMISTRY”. SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES BIOMÉDICAS.

Memoria presentada en la Universidad de Alcalá
para optar al grado de Doctor en Química por el
licenciado Eduardo Arnáiz Garrido.

Manuel Gómez Rubio, Catedrático de Universidad y Director del
Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá.

CERTIFICA:

Que la presente memoria titulada: "Nuevos dendrímeros de tipología carbosilano vía "click Chemistry". Síntesis, caracterización y aplicaciones biomédicas", ha sido dirigida por el Dr. Rafael Gómez Ramírez y el Dr. Javier de la Mata de la Mata y realizada por el Licenciado D. Eduardo Arnáiz Garrido en el Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá y cumple con todos los requisitos para su presentación como Tesis Doctoral.

Alcalá de Henares, 25 Abril de 2012.

Fdo. Dr. D. Manuel Gómez Rubio

Rafael Gómez Ramírez, Profesor Titular de Universidad del
Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá.

y Javier de la Mata de la Mata, Profesor Titular de Universidad del
Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada: "Nuevos dendrímeros de tipología carbosilano vía "click Chemistry". Síntesis, caracterización y aplicaciones biomédicas", ha sido realizada en el Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá con nuestra inmediata dirección, y autorizamos su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Alcalá de Henares, 25 Abril de 2012.

Fdo. Dr. D. Rafael Gómez Ramírez

Fdo. Dr. D. Javier de la Mata de la Mata

Me gustaría comenzar agradecer a los Dres. Rafael Gómez, Fco. Javier de la Mata y M^a Ángeles Muñoz por la oportunidad concedida para realizar esta tesis doctoral.

Al Dr. Mikhail Galakhov por los estudios de resonancia magnética nuclear. Al Dr. Javier Sánchez-Nieves por los consejos y los experimentos realizados sin los cuales hubiera sido más complicado llegar a ciertas conclusiones. A los miembros de los grupos de investigación en los que se llevaron a cabo los experimentos biomédicos, muy especialmente a los compañeros del Hospital Gregorio Marañón. A los miembros de departamento de Química Inorgánica. A M^a Jesús Bueno por todos los tramites administrativos realizados.

También quiero agradecer a los compañeros becarios que han pasado por el departamento durante todos estos años por las muchas horas compartidas dentro y fuera del laboratorio.

A Macarena porque te has ido a trabajar muy lejos y te echo de menos cada día.

Y a mi familia... sencillamente porque os quiero.

Índice

Índice

Capítulo 1: introducción y objetivos

1.1 Introducción	3
1.2 Estrategias generales de síntesis de dendrímeros	4
1.3 Antecedentes históricos sobre la síntesis de dendrímeros	6
1.4 Aproximación “click chemistry” a la síntesis de dendrímeros	10
1.4.1 Tipos de reacciones englobadas en la “click chemistry”	11
1.4.2 Características generales de la cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos para dar 1,2,3-triazoles	12
1.4.3 Metodologías sintéticas desarrolladas para la cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos	14
1.4.4 Mecanismo de reacción de la cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos	17
1.5 “Click chemistry” aplicada a la síntesis de dendrímeros	18
1.6 Aplicaciones biomédicas de dendrímeros	22
1.6.1 Dendrímeros en terapia génica	23
1.6.1.1 Liposomas catiónicos	24
1.6.1.2 Polímeros catiónicos	25
1.6.1.3 Dendrímeros catiónicos	26
1.6.2 Transporte de fármacos	28
1.6.3 Dendrímeros como agentes terapéuticos	33
1.6.3.1 Agentes antivirales	34
1.6.3.2 Agentes antibacterianos	35
1.6.3.3 Terapia fotodinámica	35
1.6.4 Dendrímeros como agentes de diagnóstico	36
1.7 Objetivos y distribución de la memoria	38
1.8 Bibliografía	40

Capítulo 2: Dendrímeros carbosilano catiónicos

2.1 Antecedentes	49
2.1.1 Síntesis de dendrímeros carbosilano	49
2.1.2 Síntesis de dendrímeros catiónicos	51
2.1.3 Síntesis de dendrímeros carbosilano catiónicos	58

2.2 Síntesis de dendrímeros carbosilano precursores	62
2.3 Síntesis de dendrímeros carbosilano catiónicos mediante “click chemistry”	64
2.3.1 Síntesis de dendrímeros terminados en grupos bromo y azida	65
2.3.2 Síntesis de dendrímeros terminados en grupos amina	67
2.3.3 Síntesis de dendrímeros terminados en grupos amonio	70
2.4 Estudio estructural	76
2.4.1 Espectroscopía de RMN de dendrímeros terminados en grupos bromo y azida	76
2.4.2 Espectroscopía de RMN de dendrímeros terminados en grupos amino	85
2.4.3 Espectroscopía de RMN de dendrímeros terminados en grupos amonio	100
2.4.4 Espectrometría de masas	115
2.5 Bibliografía	117

Capítulo 3: Aplicaciones biomédicas de dendrímeros catiónicos

3.1 Antecedentes de dendrímeros catiónicos en transporte de material genético	119
3.1.1 Vectores para el transporte de material genético	119
3.1.2 Tipos de material genético transfectado y mecanismo de acción	121
3.1.3 Dendrímeros como vectores de material genético	124
3.1.4 Tipos de dendrímeros utilizados en transfección	126
3.2 Antecedentes de dendrímeros catiónicos como antibacterianos	132
3.2.1 Mecanismo de acción de dendrímeros catiónicos como antibacterianos	132
3.2.2 Ejemplos de dendrímeros catiónicos con actividad antibacteriana	133
3.3 Actividad biológica de los dendrímeros	135
3.3.1 Vectores no virales en transporte de material genético contra el cáncer	136
3.3.1.1 Capacidad de unión del dendrímero al ADNp y caracterización químico-física	136
3.3.1.2 Evaluación de la toxicidad de los complejos dendrímero -ADNp y de la capacidad de transfección	142

3.3.2 Vectores no virales en terapia con ácidos nucleicos contra el VIH.	147
3.3.2.1 Caracterización de la unión dendrímero ARNpi	148
3.3.2.2 Evaluación de la toxicidad de los sistemas dendrímero-ARNpi y de la capacidad de transfección	150
3.3.3 Comportamiento antibacteriano de dendrímeros carbosilano catiónicos	155
3.4 Bibliografía	159

Capítulo 4: Dendrímeros carbosilano aniónicos

4.1 Antecedentes	165
4.1.1 Síntesis de dendrímeros aniónicos	165
4.1.2 Síntesis de dendrímeros carbosilano aniónicos	179
4.2 Síntesis de dendrímeros con grupos aniónicos terminales mediante “click chemistry”	181
4.2.1 Síntesis de dendrímeros con grupos carboxilato terminales	182
4.2.2 Síntesis de dendrímeros con grupos fosfonato terminales	184
4.2.3 Síntesis de dendrímeros con grupos derivados de azufre terminales	188
4.3 Estudio estructural	193
4.3.1 Caracterización estructural de dendrímeros con grupos carboxilato en la periferia	193
4.3.2 Caracterización estructural de dendrímeros con grupos fosfonato en la periferia	200
4.3.3 Caracterización estructural de dendrímeros con grupos naftalensulfonato en la periferia	207
4.3.4 Caracterización estructural de dendrímeros con grupos sulfato en la periferia	212
4.3.5 Espectrometría de masas	215
4.4 Bibliografía	217

Capítulo 5: Aplicaciones biomédicas de dendrímeros aniónicos

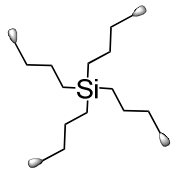
5.1 Antecedentes	221
5.1.1 Estructura del VIH y mecanismo de infección	221

5.1.2 Microbicidas aniónicos: antecedentes y mecanismo de acción	223
5.1.3 Dendrimeros aniónicos como microbicidas	226
5.2 Ensayos biomédicos	232
5.2.1 Estudio de citotoxicidad	233
5.2.2 Estudio de inhibición	235
5.3 Bibliografía	242
Capítulo 6: Parte experimental	
6.1 Condiciones generales de trabajo	247
6.2. Productos de partida utilizados	247
6.3. Técnicas instrumentales	248
6.3.1 Caracterización de los compuestos dendríticos	248
6.3.2 Ensayos biomédicos de los dendrimeros en aplicaciones contra el cáncer	249
6.3.3 Ensayos biomédicos de los dendrimeros para aplicaciones antivih	250
6.3.4 Ensayos biomédicos de los dendrimeros para aplicaciones como antibacterianos	251
6.4. Descripción de las preparaciones	252
6.5 Bibliografía	281
Conclusiones	285
Summary	293

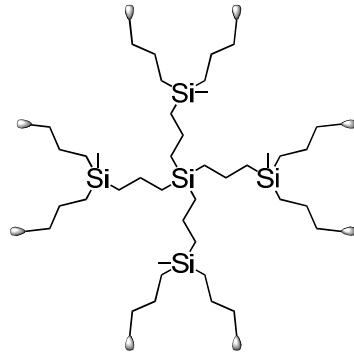
Índice de abreviaturas

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNp	ADN plasmídico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNpi	ARN pequeño de interferencia
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₃ CN	Acetonitrilo
CMB	Concentración mínima bactericida
CMSp	Células monoclonales de sangre periférica
CMI	Concentración mínima inhibitoria
Cod	ciclooctadieno
d	Doblete (RMN)
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DLS	Dynamic light scattering
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DOSY	Diffusion optimized spectroscopy
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Et	Etilo
EtOH	Etanol
Fmoc	Fluorenilmetiloxycarbonilo
gHMBC	Gradient heteronuclear multiple bond correlation
J	Constante de acoplamiento
m	Multiplete
MALDI	Matrix-assisted laser desorption
Me	Metilo
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
ml	Mililitro
μM	Micromolar
m/z	Proporción masa carga
nm	Nanómetro
NOE	Nuclear Overhauser effect
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy
PEG	Polietilenglicol
pKa	Logaritmo negativo de la constante de disociación de un ácido
pyBOP	Benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio hexafluorofosfato
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROESY	Rotating frame Overhauser effect spectroscopy
t	Triplete
THF	Tetrahidrofurano
TMSBr	Bromuro de trimetilsililo
TOF	Time of flight (tiempo de vuelo)
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

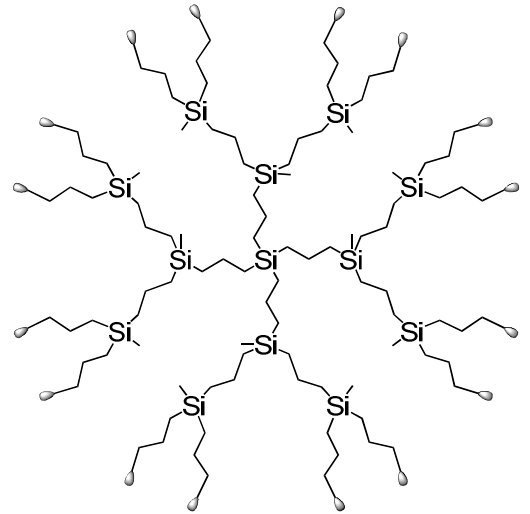
Índice de compuestos



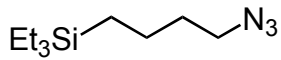
G1



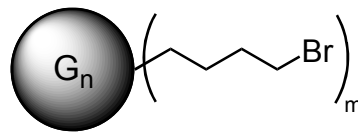
G2



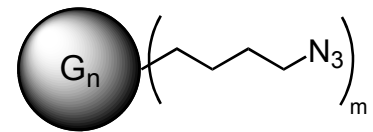
G3



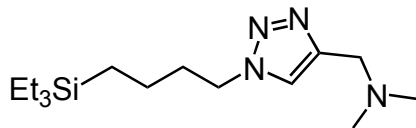
1



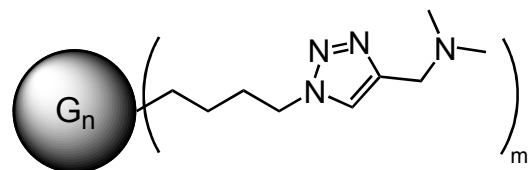
n = 1; m = 4 (2)
n = 2; m = 8 (3)
n = 3; m = 16 (4)



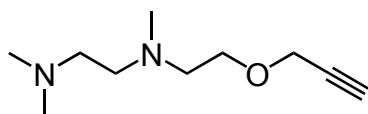
n = 1; m = 4 (5)
n = 2; m = 8 (6)
n = 3; m = 16 (7)



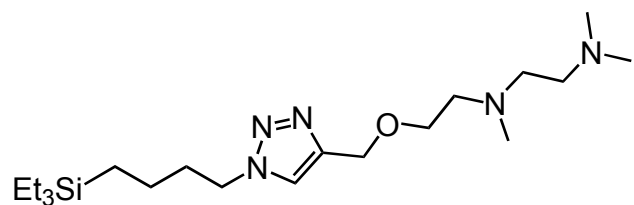
8



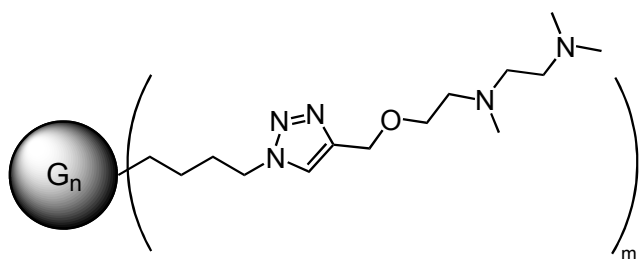
n = 1; m = 4 (9)
n = 2; m = 8 (10)
n = 3; m = 16 (11)



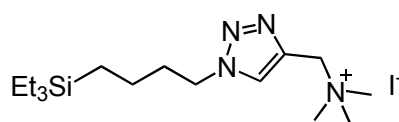
12



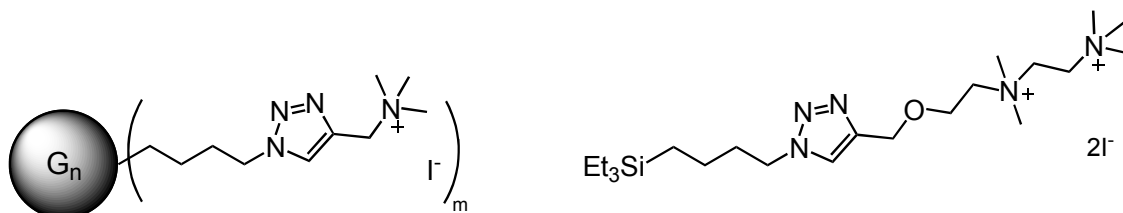
13



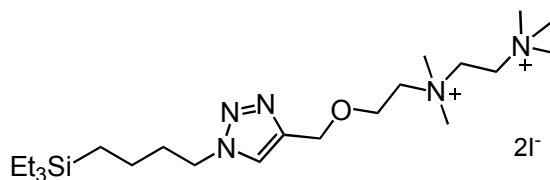
$n = 1; m = 4$ (14)
 $n = 2; m = 8$ (15)
 $n = 3; m = 16$ (16)



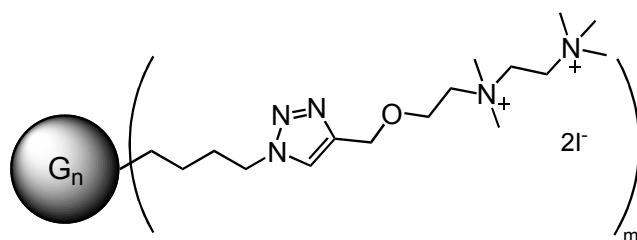
17



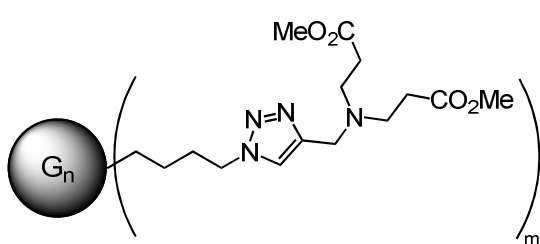
$n = 1; m = 4$ (18)
 $n = 2; m = 8$ (19)
 $n = 3; m = 16$ (20)



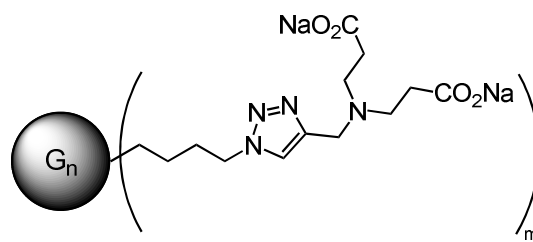
21



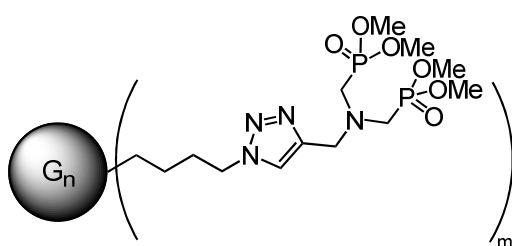
$n = 1; m = 4$ (22)
 $n = 2; m = 8$ (23)
 $n = 3; m = 16$ (24)



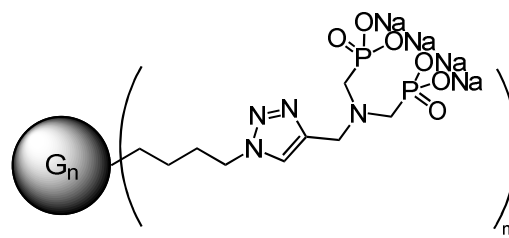
$n = 1; m = 4$ (25)
 $n = 2; m = 8$ (26)
 $n = 3; m = 16$ (27)



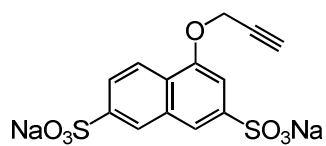
$n = 1; m = 4$ (28)
 $n = 2; m = 8$ (29)
 $n = 3; m = 16$ (30)



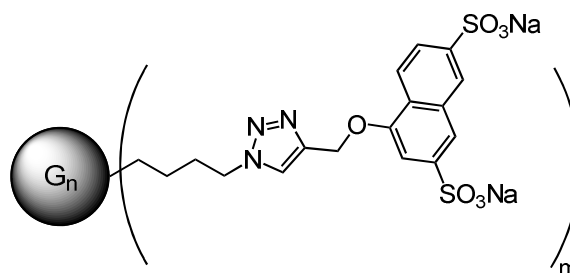
$n = 1; m = 4$ (31)
 $n = 2; m = 8$ (32)
 $n = 3; m = 16$ (33)



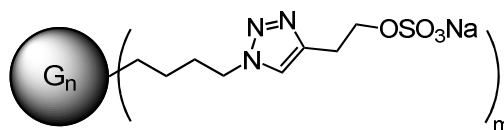
$n = 1; m = 4$ (34)
 $n = 2; m = 8$ (35)
 $n = 3; m = 16$ (36)



37



$n = 1; m = 4$ (38)
 $n = 2; m = 8$ (39)



$n = 1; m = 4$ (40)
 $n = 2; m = 8$ (41)
 $n = 3; m = 16$ (42)

Capítulo 1: Introducción y objetivos

1.1 INTRODUCCIÓN

Los dendrímeros son macromoléculas de estructura globular, altamente ramificada y regular, que se sintetizan mediante una serie de reacciones repetitivas que dan lugar a compuestos monodispersos de igual estructura y dimensión, con propiedades fisicoquímicas específicas.¹⁻⁵ Una de las características más representativas de los dendrímeros es el gran control que se puede ejercer sobre sus propiedades durante el proceso de síntesis, lo que les confiere una alta versatilidad y permite su uso en numerosos campos científicos, entre los que se encuentran la química, la medicina, la ciencia de los materiales, etc.

Los componentes fundamentales del esqueleto de un dendrímero son tres: el núcleo, las unidades de ramificación y los grupos terminales (Figura I.1).

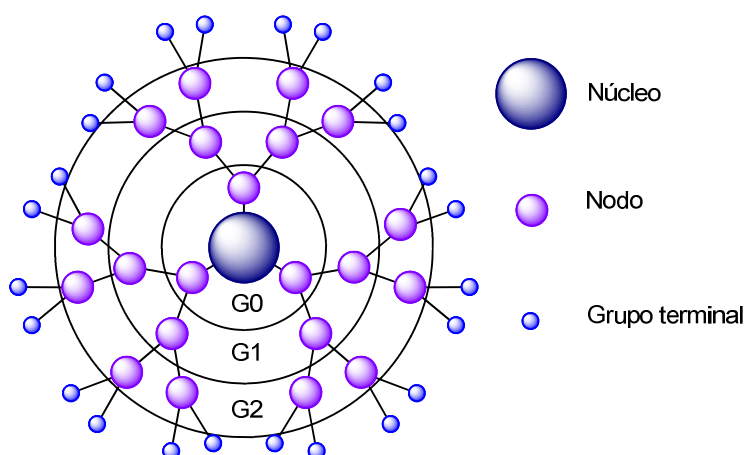


Figura I.1. Estructura de un dendrímero.

El núcleo puede ser un átomo o conjunto de átomos, la cantidad de ramas que parten de él depende del número y de la naturaleza de los grupos funcionales que posea. Habitualmente suelen ser 3, 4 o 6 ramas las que parten del núcleo. A mayor cantidad de ramificaciones que surgen del núcleo, se produce una disminución en los huecos internos de la estructura, además de una mayor congestión estérica en la superficie.

La unidad repetitiva es la unidad estructural del dendrímero. La repetición de ésta, forma las distintas capas o generaciones. El grado de ramificación de la

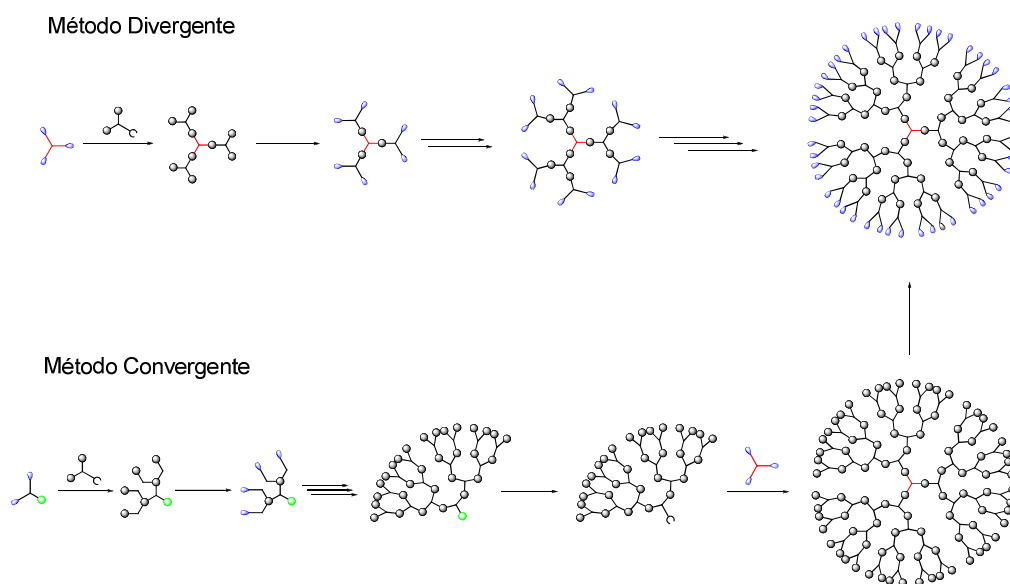
macromolécula viene determinado por el número de grupos funcionales del extremo terminal del monómero, también llamados centros de ramificación o nodos. De un modo similar al núcleo, nodos con numerosas ramificaciones dan lugar un aumento de la densidad interna del dendrímero y por tanto, a una disminución del tamaño de los huecos en la estructura interna.

Los grupos terminales, forman la superficie externa del dendrímero y el número de éstos está determinado por la generación del dendrímero, el número de ramas que parten del núcleo y el grado de ramificación de los nodos (Figura I.1).

Estos tres factores, junto a la naturaleza química de los átomos que los componen, pueden ser modificados durante el proceso de síntesis, lo que permite alterar la polaridad del dendrímero, la densidad y longitud de las ramas, el tamaño de la macromolécula, etc.

1.2 ESTRATEGIAS GENERALES DE SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS

La preparación de los dendrímeros se realiza de forma sistemática mediante un proceso iterativo de dos etapas: acoplamiento y activación. La repetición de estas dos etapas permite la obtención de estructuras ramificadas y regulares que forman las generaciones del dendrímero. En estos dos procesos es importante que las reacciones sean selectivas y de rendimientos elevados para evitar la formación de defectos en el esqueleto dendrítico. El proceso de crecimiento se puede llevar a cabo mediante tres estrategias sintéticas (Esquema I.1).



Esquema I.1. Síntesis divergente y convergente.

1. Método divergente

En el método divergente, el dendrímero crece desde el núcleo de la estructura hasta la periferia. Para ello, los grupos funcionales que posee el núcleo se hacen reaccionar con la unidad repetitiva seleccionada, dando lugar a la primera generación de la macromolécula. A continuación, la activación de los grupos funcionales del extremo terminal del monómero forman los centros de ramificación sobre los que se crecerá la siguiente generación del dendrímero. A medida que aumenta la generación, aumenta la densidad de grupos funcionales en la periferia y por tanto, aumenta la probabilidad de formación de defectos en la estructura.

2. Método convergente

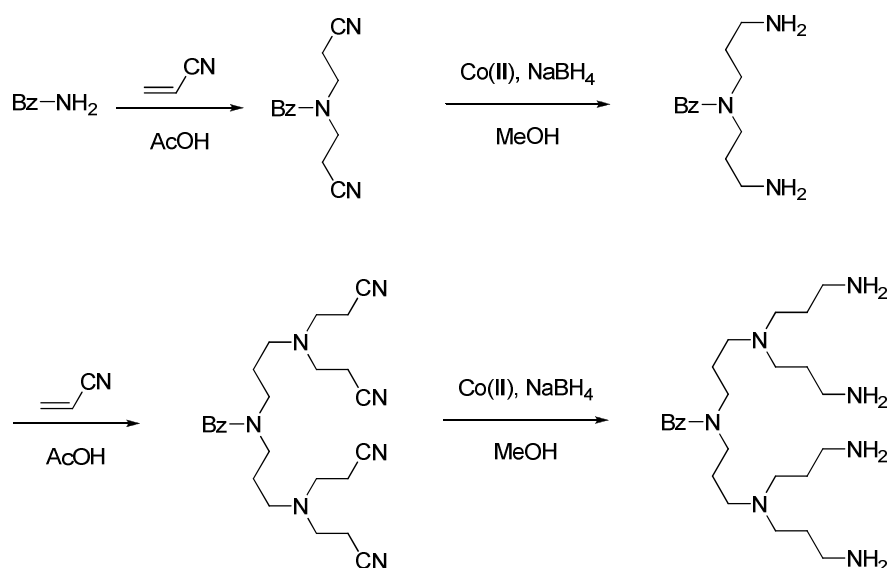
A diferencia del método anterior, el método convergente empieza a construir cada rama dendrítica o dendrón de forma independiente, es decir desde la superficie hacia el interior. Una vez se alcanza el tamaño adecuado se anclan las ramas a los grupos funcionales del núcleo. Mediante este método se disminuye la probabilidad de formación de defectos en la estructura, ya que la superficie de cada dendrón posee menos grupos reactivos. Sin embargo, a medida que se crecen los dendrones el impedimento estérico aumenta, haciendo que la unión final al núcleo se vea dificultada.

3. Método mixto

El método mixto supone una combinación de los métodos descritos anteriormente, de este modo, se hacen reaccionar unas ramas sintetizadas mediante el método convergente con un núcleo sintetizado mediante el método divergente. Así, se pueden evitar los inconvenientes que producen tanto el método divergente como el convergente.

1.3 ANTECEDENTES HISTÓRICOS SOBRE LA SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS

La primera síntesis de una molécula dendrítica fue descrita por Vögtle y colaboradores en 1978,⁶ y fue denominada molécula en cascada. En esta publicación se presentaba la metodología sintética necesaria para la preparación de estos compuestos, que se basaba en una adición de Michael de una amina a acrilonitrilo con posterior reducción del grupo ciano para generar grupos amino de modo iterativo (Esquema I.2).



Esquema I.2. Síntesis de la primera molécula dendrítica.

En un principio, esta síntesis se vio limitada debido a problemas en los rendimientos del paso de reducción del grupo ciano, más tarde, estos problemas

fueron resueltos y hoy en día se comercializan dendrímeros basados en esta metodología denominados dendrímeros polipropilenimina o PPI.⁷

También a principios de los años 80 los trabajos de Denkewalter y posteriormente Newkome,^{8,9} (Figura I.2) a mediados de la década, mostraban estrategias sintéticas que conducían hacia estructuras dendríticas y dendrímeros de esqueletos de distinta naturaleza.

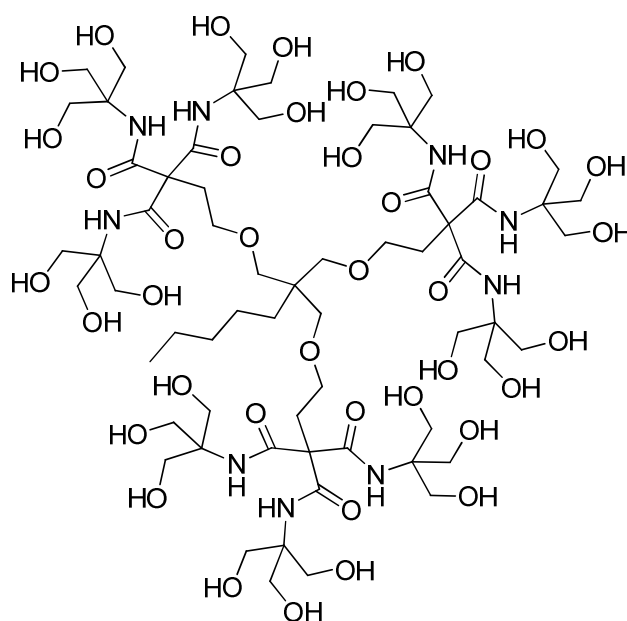
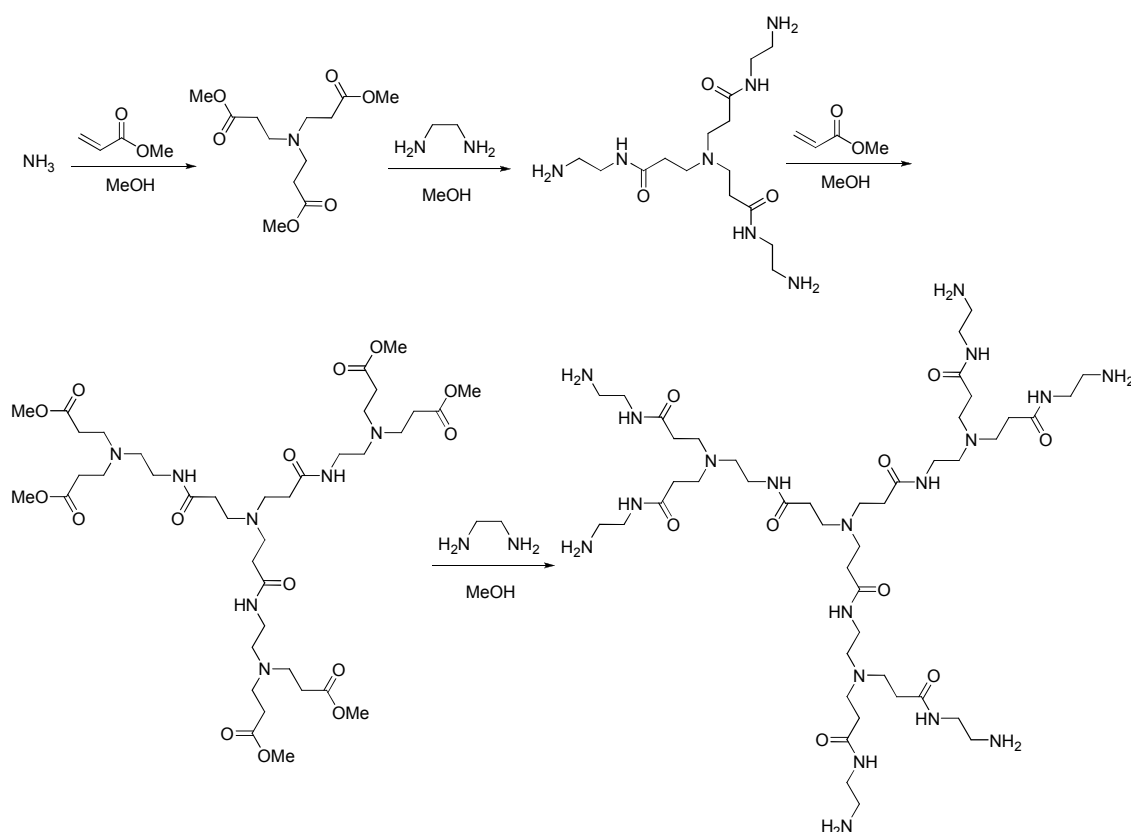


Figura I.2. Dendrímtero de Newkome.

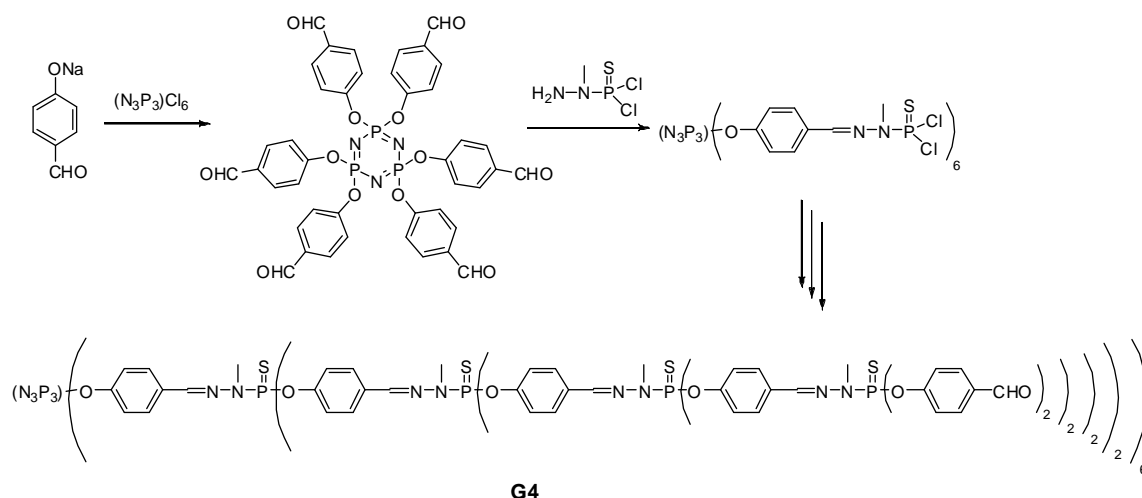
Tomalia, también en los años 80, diseñó un tipo de síntesis basada en la adición de tipo Michael a aminas de acrilato de metilo y posterior ataque con etilendiamina. Esta metodología da lugar a un grupo de dendrímeros tipo poliamidoamina,¹⁰ que hoy en día se comercializan con un núcleo de etilendiamina bajo el acrónimo PAMAM (Esquema I.3).



Esquema I.3. Primera síntesis de un dendrímero poliamidoamina.

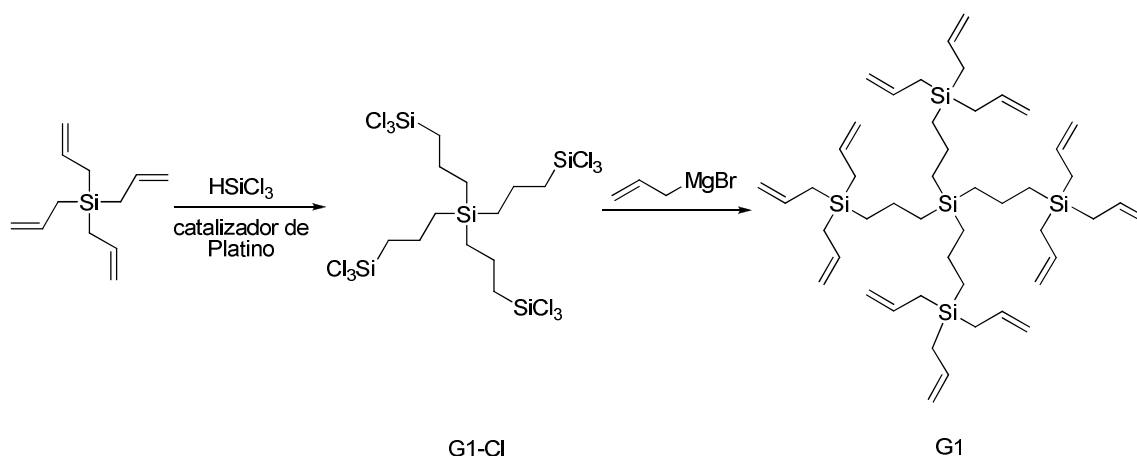
Otro tipo de dendrímeros que han recibido gran atención en los últimos años han sido los dendrímeros basados en fósforo. Rengan y Engel publicaron en 1991 la primera familia de dendrímeros basados en fósforo, éstos se sintetizaban mediante la ruptura de enlaces tipo éter por yoduro de trimetilsililo y posterior ataque de una fosfina con tres grupos éter, lo que conducía a dendrímeros iónicos, que multiplicaban sus ramas por tres a cada generación.¹¹ Aunque hoy en día existen muchos ejemplos de dendrímeros basados en fósforo,¹²⁻¹⁴ el grupo de Majoral ha sido el que más activo se ha mantenido en el desarrollo de dendrímeros de fósforo, sintetizando numerosas familias de dendrímeros cambiando tanto el tipo de núcleo como la unidad de monómero, el grado de ramificación y los grupos terminales para múltiples aplicaciones.¹⁵⁻¹⁹ Ésto lo convierte en una de las metodologías más versátiles en la preparación de dendrímeros. Una de las grandes ventajas de esta metodología es que los rendimientos son cuantitativos, además, los únicos residuos generados en la reacción de crecimiento son cloruro de sodio y agua (Esquema I.4). Utilizando esta metodología se han llegado a sintetizar algunos de los dendrímeros de mayor tamaño

conocido, de hasta duodécima generación y un peso superior a los tres millones de g/mol, sin generar defectos en su estructura.²⁰



Esquema I.4. Preparación típica de un dendrímero de fósforo.

Además de los dendrímeros sintetizados a partir de unidades de fósforo, otra familia de dendrímeros basados en heteroátomos que tiene amplia aceptación hoy en día son los dendrímeros que poseen átomos de silicio en los nodos de crecimiento del dendrímero. Los dendrímeros basados en silicio tienen varias características interesantes, como la capacidad de variar con facilidad el número de ramas que parten de cada nodo desde una hasta tres ramas, además de una gran flexibilidad y baja polaridad. La estrategia sintética seguida para crecer este tipo de dendrímeros está basada en reacciones consecutivas de hidrosililación y posterior adición de un haluro de alquilmagnesio. Aunque Fetters y colaboradores, en 1978, fueron los primeros en publicar la síntesis de una molécula dendrítica basada en átomos de silicio,²¹ no es hasta principios de los años 90 cuando de forma independiente van der Made, Muzafarov y Zhou publican trabajos que presentan dendrímeros basados en silicio enfocados a la obtención sistemática de diversas generaciones.²²⁻²⁴ A partir de estos trabajos, fueron diseñados los primeros metalodendrímeros basados en esqueleto carbosilano por parte de Morán y colaboradores.^{25,26} En el esquema I.5 se muestra la forma típica de crecimiento de los dendrímeros organosilano.



Esquema I.5. Síntesis clásica de dendrímeros carbosilano.

1.4 APROXIMACIÓN “CLICK CHEMISTRY” A LA SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS

Como ya se ha comentado previamente, la síntesis de dendrímeros, especialmente de generaciones altas, es extremadamente tediosa debido en parte a las largas secuencias de purificación. Además, la ineficiencia de algunas reacciones contribuye a que a medida que se crece un dendrímero, aparezcan más defectos en su estructura. Es por ello, que el desarrollo de la denominada “click chemistry”, entre cuyas características se encuentra el uso de reacciones muy eficaces en la unión de distintos fragmentos moleculares y los métodos de purificación sencillos, haya sido acogido como uno de los métodos principales en la síntesis de moléculas dendríticas.

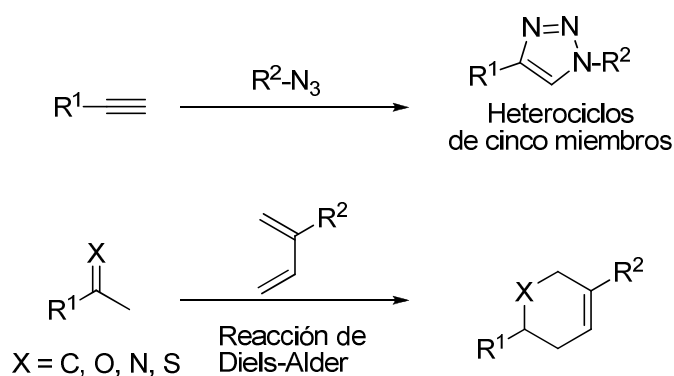
En el año 2001 Sharpless y colaboradores publicaron un trabajo que describía una nueva estrategia sintética basada en un reducido grupo de reacciones muy eficientes, versátiles y selectivas que requeriría de condiciones de reacción suaves y de métodos de purificación accesibles.²⁷ El objetivo era el desarrollo de un tipo de química que permitiera la unión, de un modo sencillo, de distintos bloques sintéticos mediante conexiones de naturaleza heteroatómica. Las reacciones seleccionadas debían ser modulares, de amplio espectro, estereoespecíficas, proporcionar altos rendimientos y generar subproductos inofensivos que pudieran eliminarse por métodos no cromatográficos. Además, las características del proceso deben incluir condiciones de reacción simples (en condiciones ideales han de ser insensibles a la

presencia de agua y oxígeno), tolerancia de estas reacciones a la variación de la naturaleza de los reactivos de partida, productos de partida de síntesis sencilla y uso de disolventes no contaminantes.²⁷

1.4.1 TIPOS DE REACCIONES ENGLOBALADAS EN LA “CLICK CHEMISTRY”

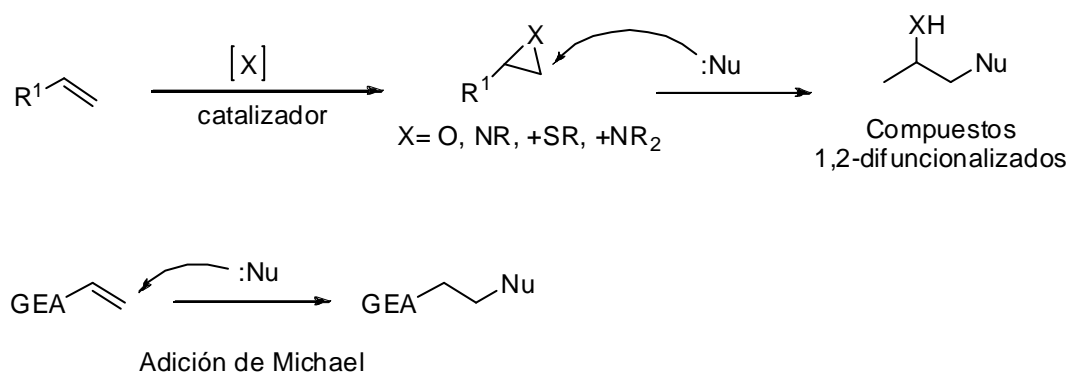
Aunque muchas reacciones pueden englobarse en este tipo de filosofía sintética, las más importantes dentro de la “click chemistry” se muestran a continuación.²⁸

1. Reacciones de cicloadición, dentro de las cuales destacan las 1,3-dipolares²⁹ y las cicloadiciones [4+2] como las hetero Diels–Alder.³⁰



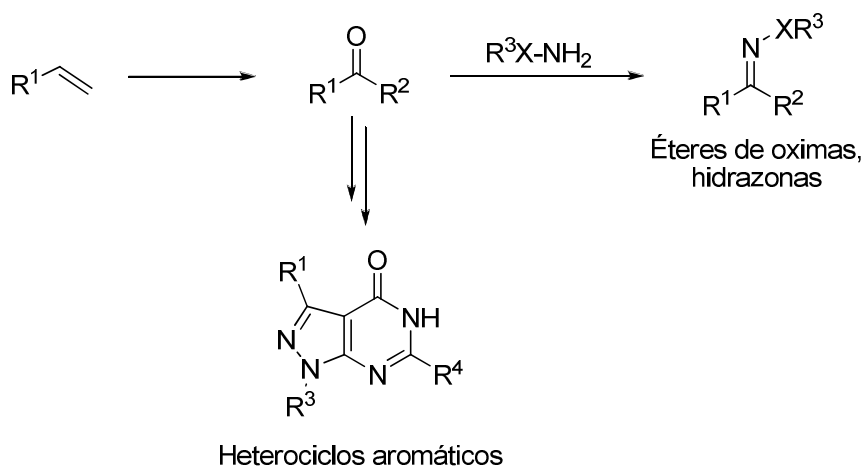
Esquema I.6. Reacciones de cicloadición englobadas en “click chemistry”.

2. Reacciones de adición a enlaces C-C insaturados, especialmente adiciones oxidantes tales como epoxidación, aziridinación, dihidroxilación y también la apertura de estos anillos mediante sustitución nucleófila. Además, la adición a dobles enlaces, como la reacción de Michael o los acoplamientos tiol-eno y tiol-ino, también pueden incluirse en este grupo de reacciones.



Esquema I.7. Reacciones de adición a dobles enlaces englobadas en la “click-chemistry”.

3. Reacciones de grupo carbonílico no aldólicas, como la formación de hidrazonas, oximas, ureas y heterociclos aromáticos.



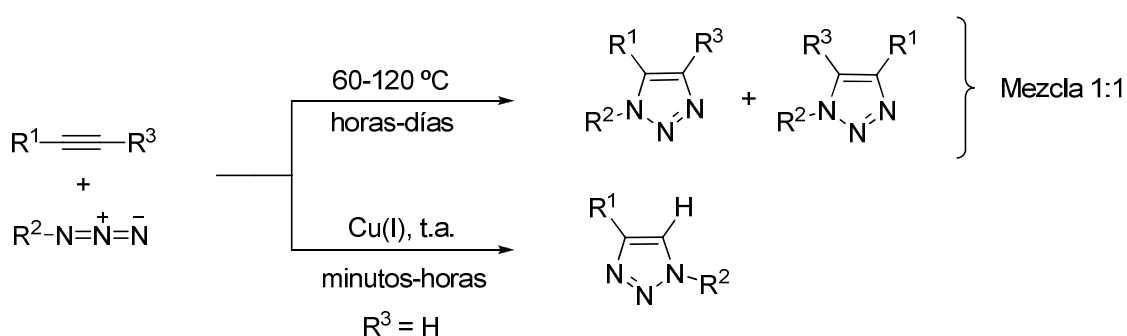
Esquema I.8. Reacciones de grupo carbonílico englobadas en la “click chemistry”.

1.4.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA CICLOADICIÓN 1,3-DIPOLAR ENTRE AZIDAS Y ALQUINOS PARA DAR 1,2,3-TRIAZOLES

La razón existente detrás de la invención de la “click chemistry”, es el desarrollo de estrategias sintéticas que primen el rápido descubrimiento y producción de moléculas con unas propiedades determinadas. De este modo, el empleo de métodos de síntesis complejos sólo se justifica si son la mejor forma de obtener dichas propiedades. El empleo de uniones heteroatómicas también entra dentro de esta

filosofía sintética, debido a que la formación de estos tipos de enlaces suelen ser más sencillos de formar que enlaces C-C *de novo*.²⁷ La reacción de “click chemistry” ideal parte de productos con un alto contenido energético para que la formación del producto final sea fuertemente exotérmica, evitando así, la reversibilidad del proceso. A pesar de este alto contenido energético, los grupos funcionales que van a formar parte de la reacción, deben tener una alta estabilidad cinética que evite la formación de productos secundarios. Esta estabilidad cinética es la que confiere algunas de las propiedades más interesantes de la “click chemistry”: la tolerancia frente a una gran diversidad de grupos funcionales, al agua y al oxígeno.²⁹

De entre todas las reacciones englobadas en la “click chemistry”, la cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos para dar 1,2,3-triazoles catalizada por cobre, se la considera la reacción prototípica de este tipo de química, debido a que se ajusta a todos los requerimientos de ésta. Este proceso termodinámicamente favorable fue descrito por Huisgen en los años 60, pero debido a la relativa inercia de los grupos alquino y azida necesita como condiciones de reacción alta temperatura y tiempos de reacción largos. Este tipo de condiciones de reacción severas provoca la formación de los regioisómeros 1,4 y 1,5 en cantidades prácticamente equimoleculares. Sin embargo, mediante la modificación de la naturaleza electrónica de los sustituyentes, tanto del grupo azida, como del fragmento alquino, además del uso de catalizadores de Cu(I), puede hacer que varíe la regioselectividad del proceso térmico (Esquema I.9), obteniéndose solamente el isómero 1,4.



Esquema I.9. Regioselectividad de la reacción entre alquinos y azidas.

1.4.3 METODOLOGÍAS SINTÉTICAS DESARROLLADAS PARA LA CICLOADICIÓN 1,3-DIPOLAR ENTRE AZIDAS Y ALQUINOS

En el año 2002 los grupos de Sharpless y Meldal descubrieron de forma independiente que este proceso puede ser catalizado por Cu(I), consiguiendo además una regioselectividad absoluta hacia el regioisómero 1,4 y acelerando la reacción de manera significativa (ver esquema 1.9).^{29,31} Hoy en día, se han desarrollado numerosos protocolos para acelerar la reacción entre azidas y alquinos para la formación de triazoles. A continuación se exponen algunos de los más relevantes.

1. *Adición de directa de especies de Cu(I):*

Meldal y colaboradores describieron el uso de CuI para catalizar la reacción de los alquinos soportados en fase sólida con azidas. Esta metodología desarrollada por Meldal requiere de la adición de algún tipo de base, ya que si no la reacción avanza muy lentamente. La presencia de una base en estas condiciones de reacción, tiene el inconveniente de que favorece el homoacoplamiento de alquinos catalizado por Cu(II), produciéndose una bajada significativa del rendimiento de la reacción, aunque esto puede evitarse usando bases y disolventes nitrogenados como DIPEA y acetonitrilo. Aunque no se han realizado estudios sobre ello, se cree que el exceso de algún tipo de base nitrogenada protege al Cu(I) de la degradación lo que mejora el rendimiento.³²

2. *Reducción de sales de Cu(II):*

Por otro lado Sharpless y colaboradores emplearon una síntesis en fase líquida que suponía la reducción de Cu(II) a Cu(I). Hoy en día, las condiciones más utilizadas son la reducción de CuSO₄·5H₂O con ascorbato sódico en mezclas de disolventes orgánicos y agua, debido a que no es necesario el uso de atmosfera inerte, a pesar de la inestabilidad del Cu(I) y a que la carga de catalizador para llevar a cabo la reacción es muy baja. En este tipo de método la purificación suele ser muy sencilla, implicando tan solo una filtración del compuesto o lavados con un ligando que atrape el Cu(I).²⁹

3. Oxidación de cobre metálico:

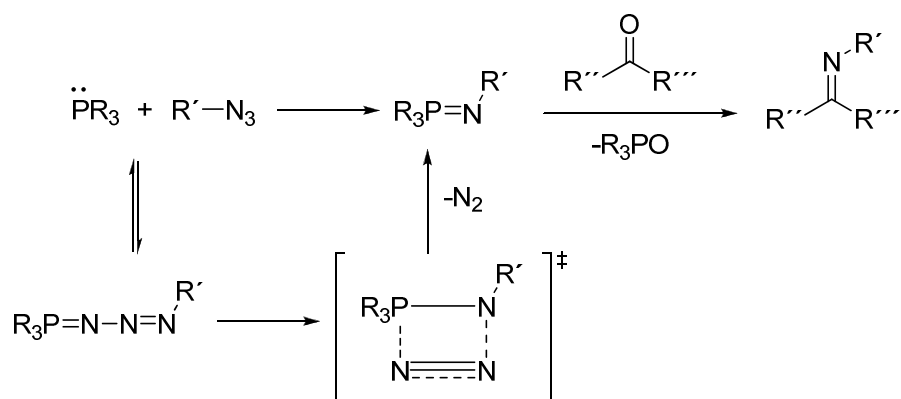
Además de estos dos métodos, hay que incluir la posibilidad de catalizar la reacción mediante la adición de cobre metálico, y generar la especie activa de Cu(I) mediante conmutación de una mezcla de especies de Cu(II) y Cu(0).³³

Dentro de esta metodología, puede incluirse también la posibilidad de llevar a cabo la reacción simplemente añadiendo limaduras de Cu(0), pero la reacción avanza muy lentamente, y requiere de cantidades de cobre superiores a las estequiométricas.³³ Se sabe que clusters nanométricos de Cu(0) son capaces de catalizar la reacción eficazmente sin la inclusión de especies oxidantes. Este tipo de catálisis, se ha estudiado en otras reacciones y se cree que la catálisis ocurre en la superficie de las nanopartículas, en vez de en disolución, pero se cree que la especie activa en estas condiciones de reacción sigue siendo Cu(I).^{34,35}

4. Aceleración de la reacción sin especies de cobre:

Sin embargo, todos los métodos explicados anteriormente no sirven para llevar a cabo la reacción en sistemas biológicos *in vivo* en procesos de bioconjugación en química biológica. Las condiciones drásticas de presión y temperatura, o el uso de cobre para catalizar la reacción, podrían dañar las células.

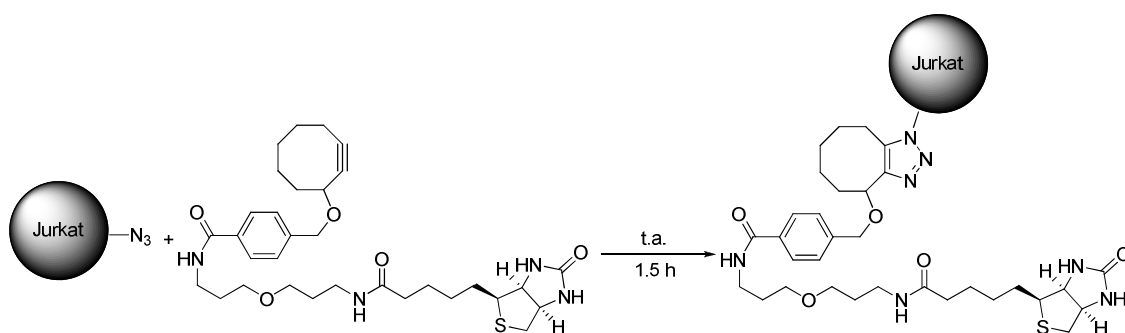
A pesar de estos inconvenientes, la cicloadición de Huisgen posee el potencial necesario para sustituir a la ligación de Staudinger en procesos de bioconjugación (Esquema I.10),³⁶ debido a que: es quimioselectiva y es capaz de mimetizar el enlace peptídico, con la ventaja añadida de que el triazol generado es inerte a la hidrólisis enzimática.³⁷ Además, la naturaleza ortogonal de la reacción con respecto a otras reacciones químicas que ocurren a nivel celular, evitaría la interferencia en diversos procesos biológicos. Puede, por tanto, ser utilizada para marcaje de ácidos nucleicos,³⁸ la modificación de la cápside de un virus,³⁹ la modificación de superficies celulares, etc.



Esquema I.10. Esquema del mecanismo de la ligación de Staudinger.

Existen dos formas de realizar la cicloadición de Huisgen a temperatura ambiente sin el uso de un catalizador de cobre, soportando el alquino sobre un ciclo muy tensionado, o utilizar un alquino sustituido con grupos fuertemente electroattractores.

En el primer caso, la reacción de una azida y un ciclooctino fue descrita en 1961 por Wittig y Krebs observándose un sólo producto.⁴⁰ Sin embargo, pasó desapercibida hasta 2004, cuando fue utilizada por Bertozzi y colaboradores para modificar la pared celular de células Jurkat con grupos biotina que estaban directamente unidos al ciclooctino (Esquema I.11).⁴¹ Debido a la deformación del ángulo del triple enlace, el producto de partida posee un alto estado energético, lo que permite obviar el uso de un catalizador que rebaje la energía de activación de formación del triazol.



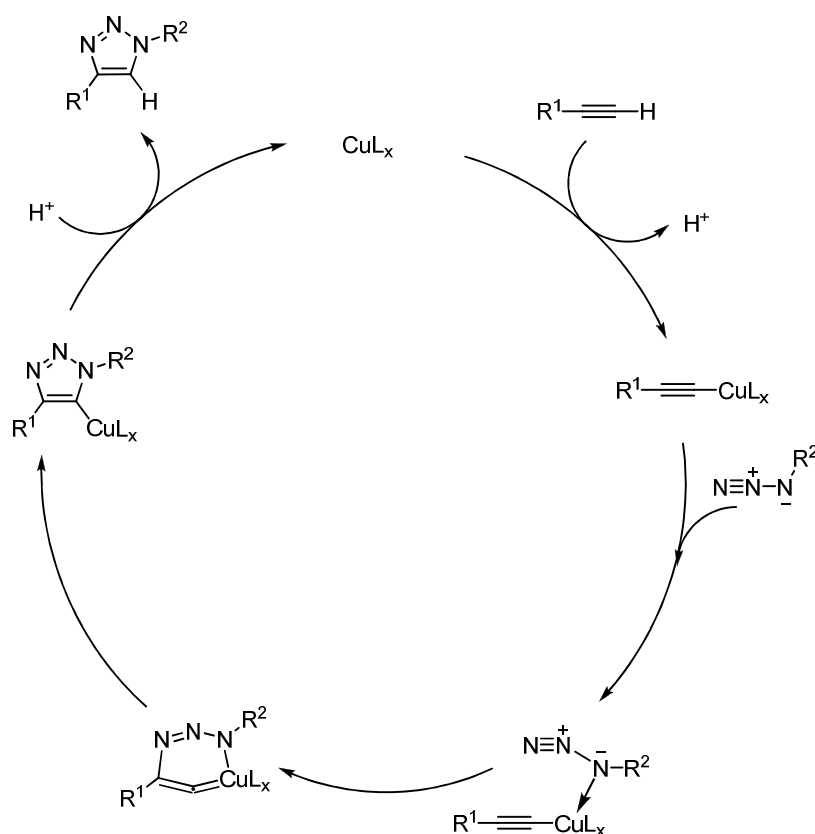
Esquema I.11. Reacción entre azidas y alquinos promovida por tensión de anillo.

El segundo caso ha recibido menos atención, debido a que tener que usar sustituyentes electroattractores en el alquino impone una gran limitación a la hora de elegir los sustratos necesarios para llevar a cabo la reacción, lo que a su vez, limita su utilización en procesos de bioconjugación.³⁸

1.4.4 MECANISMO DE REACCIÓN DE LA CICLOADICIÓN 1,3-DIPOLAR ENTRE AZIDAS Y ALQUINOS

Los diversos estudios mecanísticos realizados, no permiten proponer un mecanismo único para esta reacción. Existen evidencias, aparentemente contradictorias, que impiden determinar cual es el mecanismo de la reacción con exactitud, ya que éste puede cambiar según la concentración de los sustratos, el disolvente, la fuente de cobre, etc.⁴² Para la reacción de tipo térmico, se ha propuesto un mecanismo concertado, sin embargo, varios cálculos teóricos han establecido que este proceso está muy desfavorecido con respecto al mecanismo por etapas, propuesto para la reacción catalizada por cobre.³³

El mecanismo de la cicloadición propuesto para el proceso catalizado por Cu(I) de alquinos terminales se describe en el Esquema I.12. Este comienza con la coordinación del alquino a una especie de cobre mediante los electrones π del enlace, aunque no se sabe con exactitud cual es la especie activa de cobre que participa en el ciclo catalítico. Estudios recientes parecen indicar que ésta puede poseer varios centros metálicos.⁴³ La dificultad de reacción de los alquinos totalmente sustituidos para formar triazoles mediante la reacción de Huisgen, indica que el compuesto de coordinación podría evolucionar hacia la formación de un acetiluro de cobre. Este tipo de coordinación del cobre confiere una mayor acidez al enlace Csp-H, permitiendo que incluso el agua en el medio de reacción pueda captar el protón alquílico sin la adición de una base. El protocolo de reacción desarrollado por Meldal requiere la adición de una base.³¹ El siguiente paso supone la formación de un enlace dativo del nitrógeno de la azida que posee densidad de carga negativa, con el átomo de cobre coordinado al triple enlace. Seguidamente se produce la formación del metalaciclo, quedando la azida en posición adecuada para sufrir una contracción de anillo. La protonación de esta última especie, genera el producto final y la especie inicial de cobre que se reincorpora al ciclo catalítico.⁴⁴



Esquema I.12. Ciclo catalítico de la reacción entre alquinos y azidas catalizada por cobre.

1.5 “CLICK CHEMISTRY” APLICADA A LA SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS

Aunque en los últimos años se ha despertado un gran interés por la química de los dendrímeros, esta área se ve limitada por la gran cantidad de pasos de reacción que se tienen que llevar para la síntesis de estructuras de gran tamaño, el incremento del precio con el crecimiento de cada generación y las tediosas purificaciones que hay que llevar a cabo, que además, reducen considerablemente el rendimiento. Debido a la metodología versátil inherente a la “click chemistry”, la relativa rapidez a la que ocurren las reacciones englobadas en ésta y las sencillas purificaciones, hacen de este tipo de química una candidata ideal para ser aplicada al área de los dendrímeros, en especial la formación de triazoles catalizada por Cu(I).

Las uniones triazol pueden situarse en distintos lugares de la topología del dendrímero:

1. Las reacciones de “click chemistry” pueden llevarse a cabo sobre el núcleo del dendrímero, consiguiendo la fusión de dendrones de diferentes características.
2. La síntesis de triazoles puede formar parte del crecimiento del dendrímero, de este modo el heterociclo se situaría en los nodos de ramificación.
3. Por último la “click chemistry” puede servir para la modificación de la periferia de los dendrímeros, alterando las características generales, y con ello las distintas aplicaciones, del esqueleto de la macromolécula.

1. *Dendrímero funcionalizado en el núcleo mediante “click chemistry”*

El uso de unidades de triazol en el núcleo del dendrímero, ha sido adoptado como uno de los métodos más fiables para la unión de dendrones en síntesis convergente. Esta metodología permite de una forma sencilla la unión de fragmentos de distinta naturaleza que posibilita la formación de dendrímeros asimétricos y con grupos funcionales no ortogonales. Un ejemplo de este tipo de química fue desarrollado por Lee y colaboradores, uniendo dendrones de tipo Fréchet y dendrones de tipo PAMAM de igual o distinta generación mediante una cicloadición de Huisgen catalizada por cobre, revelándose como un procedimiento muy eficaz que proporciona excelentes rendimientos.^{45,46} En la Figura 1.3 se muestra un dendrón tipo Fréchet, en rojo, unido a un dendrón tipo PAMAM, en azul.

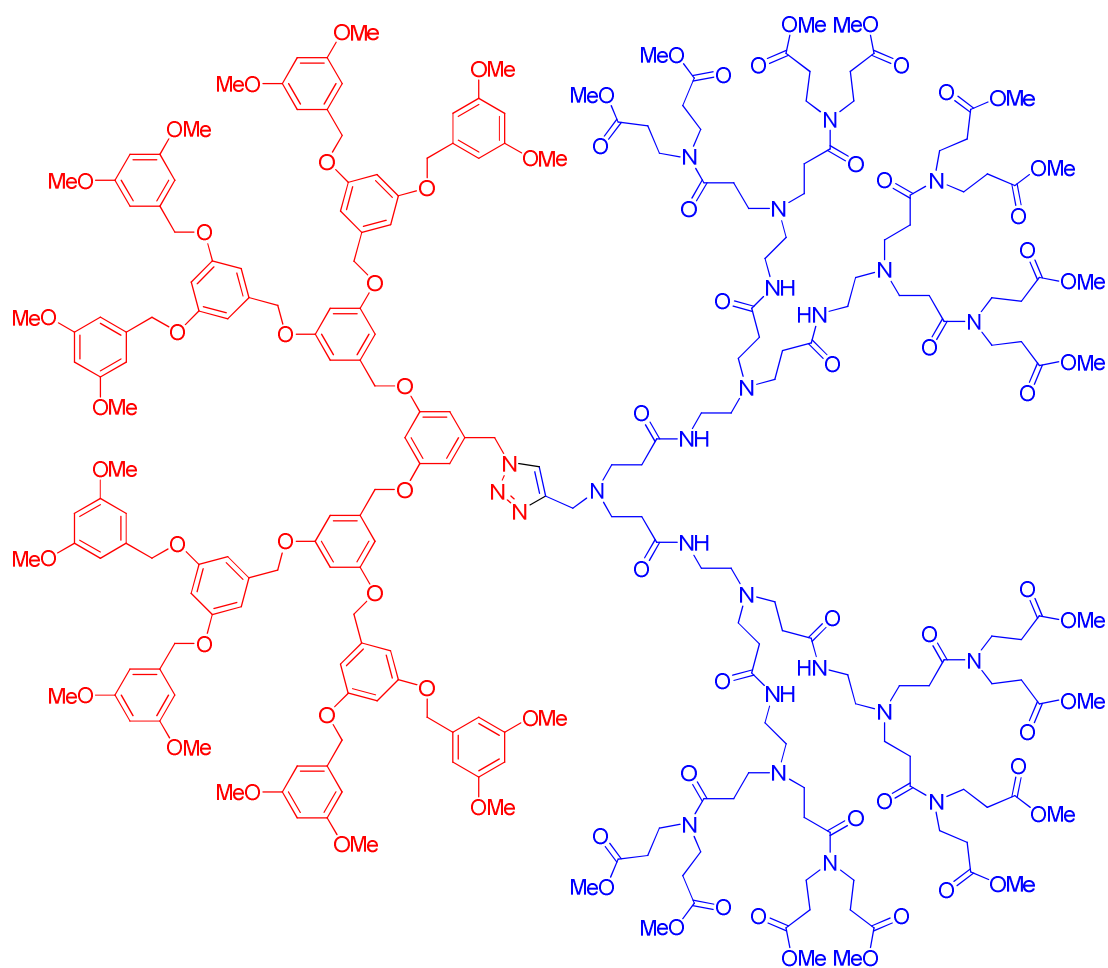


Figura I.3. Dendrímtero mixto sintetizado por “click chemistry”.

En nuestro grupo de investigación también se ha utilizado esta técnica para unir cuñas de tipo carbosilano de primera hasta tercera generación con otra cuña formada por grupos PEG mediante un espaciador tipo anillo de triazol para obtener dendrímeros mixtos (Figura I.4).⁴⁷

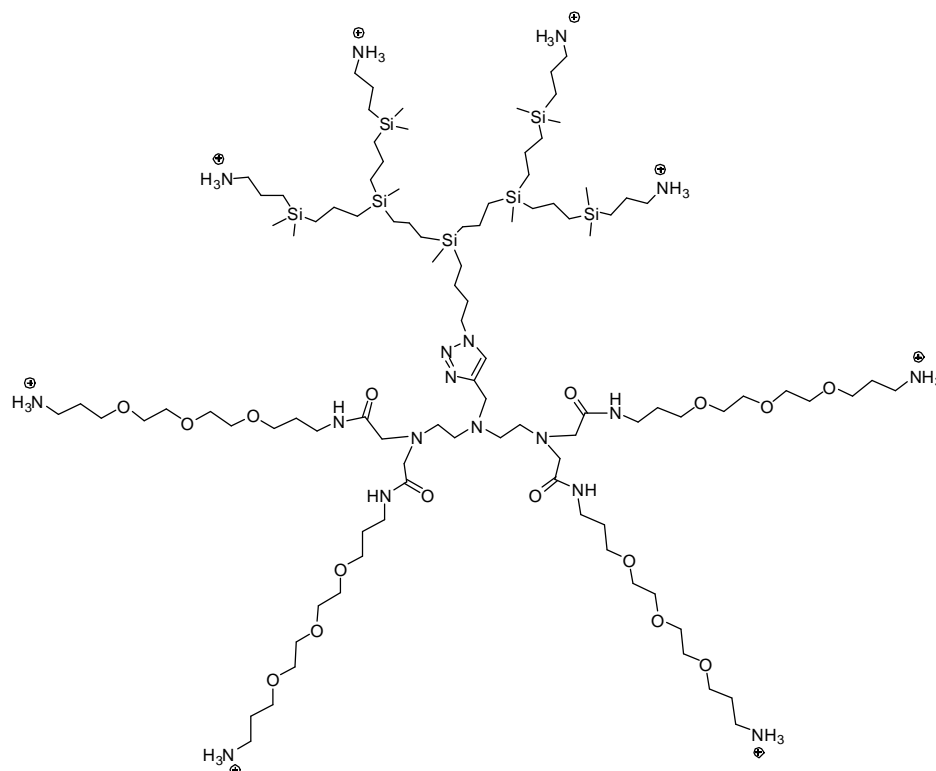
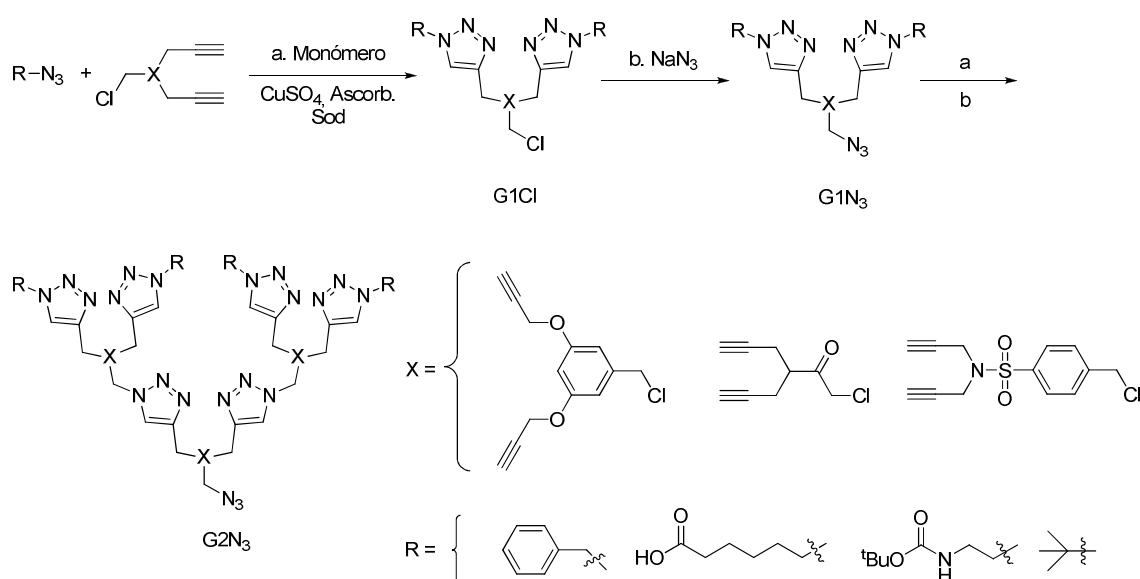


Figura I.4. Dendrúmero carbosilano/PEG.

2. Dendrúmero funcionalizado en los nodos mediante “click chemistry”

A los dos años de descubrir la capacidad de especies de Cu(I) para catalizar la cicloadición de Huisgen, Sharpless y colaboradores publicaron un trabajo en el que recurrían a esta reacción para construir un dendrúmero de forma convergente, de modo que las distintas generaciones estaban unidas mediante triazoles situados en los nodos de ramificación. Así, el tiempo de construcción del dendrúmero se veía considerablemente reducido debido a las características de la reacción, ya que la ruta sintética no requería de cromatografía y el tratamiento de las reacciones se limitaba a una extracción líquido-líquido. Además, la periferia de estos dendrúmeros podía funcionalizarse con facilidad, lo que permitía ajustar las propiedades del dendrúmero.⁴⁸ En el Esquema I.13 se muestra un ejemplo de crecimiento hasta la segunda generación y algunos de los monómeros y grupos terminales utilizados.



Esquema I.13. Dendrimeros preparados mediante “click chemistry”.

3. Dendrimero funcionalizado en la periferia mediante “click-chemistry”

Por último la modificación de la periferia de los dendrimeros es la utilización más extendida de la “click chemistry” en este tipo de química. Las propiedades fisicoquímicas de los dendrimeros están generalmente determinadas por los grupos terminales, y la cicloadición de Huisgen catalizada por cobre aporta un método reproducible, rápido y robusto de llevar a cabo estas modificaciones. Uno de los ejemplos más recientes de modificación de la periferia de dendrimeros ha sido publicado por Boons y colaboradores.⁴⁹ En este trabajo se sintetizan dendrones que posteriormente se derivatizan para decorar la superficie del dendrimer con grupos alquino terminales. Estos triples enlaces posteriormente se hacen reaccionar con distintas azidas que conducen a la obtención de estructuras modificadas con péptidos, unidades de PEG o azúcares en la periferia. Además, en la publicación estos dendrones se enlazan para dar dendrimeros esféricos mediante una reacción de adición entre azidas y alquinos sin catalizador, promovida por tensión de anillo

1.6 APLICACIONES BIOMÉDICAS DE DENDRÍMEROS

En los últimos años se han encontrado numerosas aplicaciones a los dendrimeros. Debido a su naturaleza modulable es relativamente sencillo cambiar las

características básicas de éstos, pudiendo amoldarse a una gran cantidad de aplicaciones prácticas. Así, se han empleado en catálisis,^{50,51} como plantillas para la formación y estabilización de nanopartículas metálicas,⁵² sensores químicos,⁵² química supramolecular,⁵³ etc. Además de estos usos, cabe destacar el gran crecimiento que ha tenido el uso de dendrímeros para aplicaciones biomédicas, que incluyen el reconocimiento molecular,⁵⁴ transportadores tanto de fármacos como de biomoléculas para su uso en terapia génica,⁵⁵ tratamiento de tumores,⁵⁶ desarrollo de antivirales,⁵⁷ etc. En este apartado se describen algunas de estas aplicaciones.

1.6.1 DENDRÍMEROS EN TERAPIA GÉNICA

La terapia génica consiste en la introducción de genes en las células portadoras de enfermedades para tratar de sustituir material genético defectuoso por uno funcional. Actualmente el método más usado para el transporte de material genético es el uso de vectores de tipo viral, debido a su gran eficacia.⁵⁸⁻⁶⁰ Sin embargo, el uso de virus para introducir ácidos nucleicos dentro una célula no está exento de riesgos, ya que también poseen numerosas desventajas: pueden ser tóxicos, carecen de especificidad celular y pueden inducir respuesta inmune en los pacientes. Esto ha provocado un gran interés en el descubrimiento de nuevos vectores no virales que puedan servir como alternativa a los virus como nuevos vehículos de transporte. Debido a que estos transportadores han de ser sintetizados se puede seleccionar y modificar todos los aspectos que los componen, desarrollando las características que más convienen para este fin. Sus ventajas principales son que presentan una gran flexibilidad con respecto al tamaño y naturaleza del material nucleico a transfectar y que no provocan una respuesta inmune por parte del paciente, propiedad importante en el caso de ser administrados de manera continuada.⁶¹⁻⁶³

Los vectores no virales, generalmente suelen ser catiónicos, o con capacidad de cargarse positivamente a pH fisiológico, para de este modo, ser capaces de formar interacciones electrostáticas con el ácido nucleico a transportar. Hasta ahora los vehículos de transporte no víricos que más se han estudiado son los liposomas, los polímeros convencionales y los dendrímeros.

1.6.1.1 Liposomas catiónicos

Los liposomas catiónicos están constituidos por una bicapa lipídica que a su vez, están formadas por cadenas lipídicas unidas a una cabeza polar, con la que es capaz de formar interacciones electrostáticas con otras sustancias.^{64,65} Este tipo de fosfolípidos se ensamblan orientando las partes polares de su estructura hacia un hueco acuoso interno y hacia el medio acuoso exterior, dejando las partes apolares en una zona interna alejada del medio fisiológico.

Los liposomas catiónicos presentan ciertas ventajas como por ejemplo:

- Protegen al material nucleico de la degradación hasta su llegada al núcleo.
- Poseen un tamaño modulable, lo que les confiere una gran versatilidad con respecto al tamaño del ADN que pueden transportar.
- Es posible incluir en su estructura receptores específicos de la membrana lipídica, lo que hace que puedan ser dirigidos a tejidos de forma selectiva.
- No son tóxicos ni generan respuesta inmune en el paciente.

Los liposomas catiónicos no están exentos de desventajas, ya que las zonas apolares de sus estructuras les confieren una cierta insolubilidad y en presencia de suero baja su eficacia debido a interacciones con proteínas que éste contiene (Figura I.5).

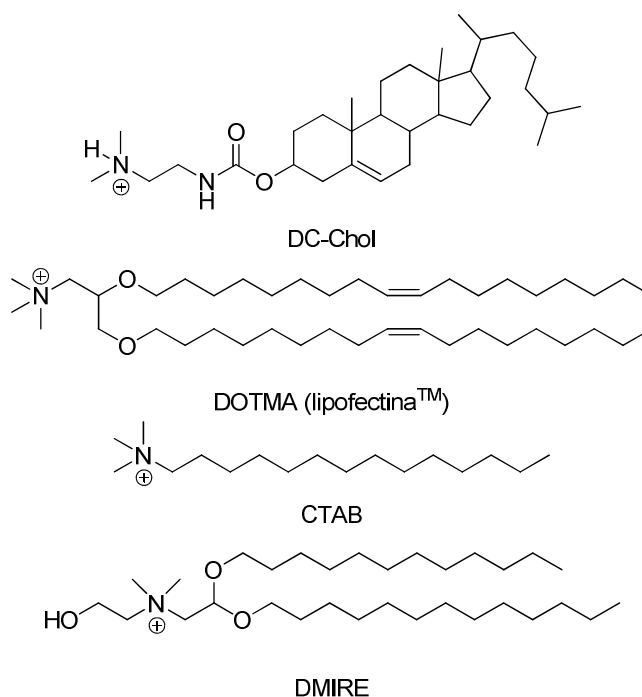


Figura I.5. Liposomas catiónicos.

1.6.1.2 Polímeros catiónicos

Otro de los vectores más utilizados en terapia génica son los polímeros lineales catiónicos.

Los polímeros de polilisina fueron de los primeros en utilizarse para el transporte de ADN. Son péptidos de gran tamaño formados por unión de monómeros del aminoácido lisina que se cargan positivamente a pH fisiológico. Además, este tipo de estructuras son degradables lo que impide que se acumulen en el organismo. Sin embargo, estos polímeros se caracterizan por poseer una toxicidad alta.

Uno de los polímeros utilizados en sustitución de los polímeros de polilisina fueron las polietileniminas (PEI), que poseen una menor toxicidad que las polilisinias y también poseen una mayor eficacia en la transfección del material nucleico al interior celular, pero que no tienen una estructura totalmente definida, además de una alta polidispersidad, lo que se traduce en grandes inconvenientes. Estos polímeros están formados por unidades de polietilenimina y al igual que los polímeros basados en lisina se protonan en medio acuoso (Figura I.6).^{66,67}

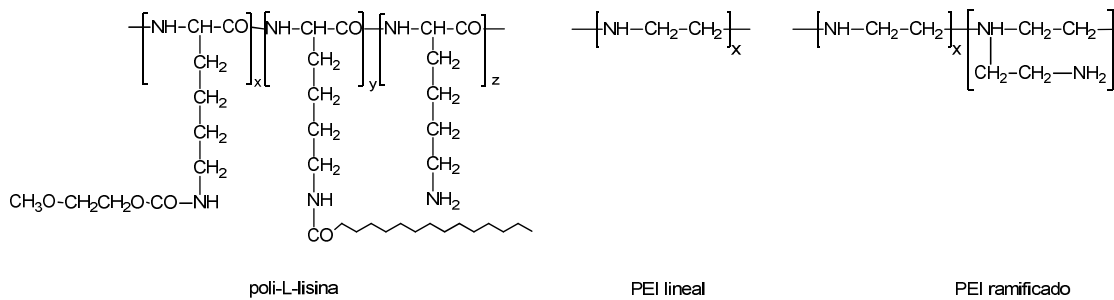


Figura I.6. Polímeros catiónicos

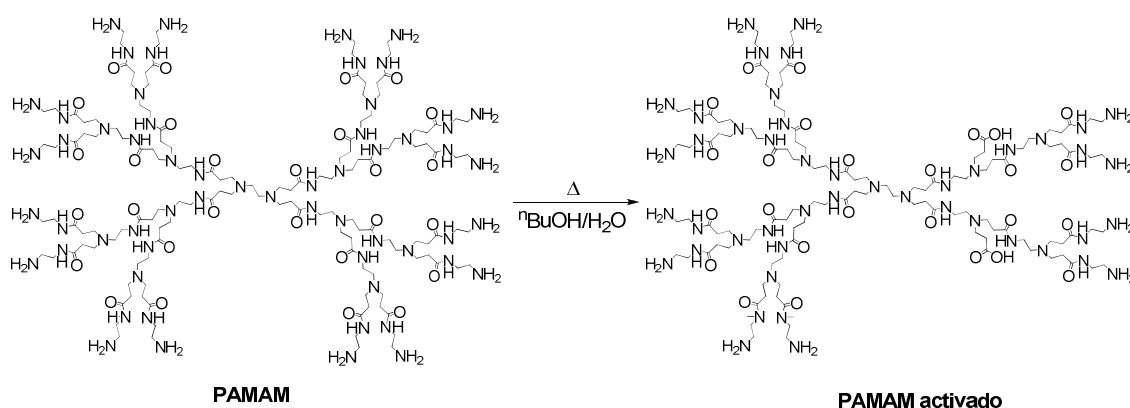
1.6.1.3 Dendrimeros catiónicos

A diferencia de otro tipo de estructuras utilizadas para el transporte de ácido nucleicos, los dendrimeros destacan por ser monodispersos, es decir sus estructuras poseen un tamaño y peso molecular bien definido, son estables y además tienen una relativa baja viscosidad a pesos moleculares altos. Estas características convierten a los dendrimeros en candidatos ideales para el transporte de material genético dentro del organismo.

En 1993 Haensler y Szoka fueron los primeros en demostrar que un fragmento de ADN que contiene el gen de la luciferasa y de la β -galactosidasa podía ser internalizado dentro de las células usando dendrimeros PAMAM, constatando una mayor eficacia en la transfección cuando la relación de cargas era de 6:1 (grupos amonio:fosfato), con dendrimeros superiores a la tercera generación.⁶⁸ Posteriormente, en 1996, Roberts y colaboradores realizaron un estudio utilizando dendrimeros PAMAM de tercera, quinta y séptima generación, observando que a medida que aumentaba la generación crecía la toxicidad de éstos, tanto *in vitro* como *in vivo*. En este estudio también se determinó que estos dendrimeros no generaban respuesta inmune, y se observó que dependiendo de la generación los dendrimeros se distribuían en distintos órganos.⁶⁹

La estabilidad de los sistemas formados por dendrimeros PAMAM y oligonucleótidos (fragmentos de ADN de menor tamaño que los plásmidos) antisentido fue evaluada por Juliano y colaboradores, confirmando lo que habían determinado estudios anteriores, la unión de las estructuras dendriméricas con material genético presentaba una baja toxicidad y una gran capacidad de transfección.⁷⁰

En los dendrímeros tipo PAMAM se ha demostrado que una degradación parcial por tratamiento térmico en agua y en algunos alcoholes, confiere una mayor eficacia en la transfección. Se cree que esta fragmentación proporciona a estos sistemas una mayor flexibilidad, en contrapunto a los dendrímeros de altas generaciones que poseen un gran impedimento estérico en su superficie, conocido como efecto paraguas (Esquema I.14).^{71,72} Hoy en día este tipo de derivados se comercializan con el nombre de Superfect®.



Esquema I.14. Activación de un dendrímero PAMAM.

Otros dendrímeros catiónicos que han sido analizados en fenómenos de transfección de material genético son los dendrímeros polipropilenimina (PPI). Estas estructuras han resultado ser más tóxicas y menos eficaces en la transfección que los dendrímeros PAMAM a igual generación.^{73,74} Sin embargo, a diferencia de los PAMAM, los dendrímeros PPI, son capaces de transfectar material genético a generaciones más bajas con mayor eficacia, con la ventaja añadida de que las generaciones más bajas son menos tóxicas que las generaciones superiores.^{75,76}

Los dendrímeros basados en fósforo son otra clase de dendrímeros que han sido usados para el transporte de material genético. Majoral y colaboradores demostraron que este tipo de dendrímeros eran capaces de transfectar el gen de la luciferasa en células 3T3, y que a medida que aumentaba la generación, aumentaba la capacidad de transfección hasta alcanzar la tercera generación, a partir de la cual la capacidad de transfectar ADN se mantenía estable. Además, en este tipo de dendrímeros, a diferencia de los liposomas catiónicos, la presencia de suero beneficia

sus propiedades, disminuyendo su toxicidad y aumentando su capacidad de transfección.⁷⁷

En nuestro grupo de investigación se han sintetizado varias familias de dendrímeros carbosilano catiónicos de diversas generaciones que son capaces de formar complejos mediante interacciones electrostáticas con fragmentos de material nucleico y son capaces de transportar estos fragmentos al interior celular. De estos dendrímeros se hablará en posteriores capítulos.

Aunque los dendrímeros aquí descritos son los sistemas más utilizados en el transporte de material genético al interior celular, existen muchos otros ejemplos de dendrímeros con diversos tipos de esqueleto diseñados al respecto, como por ejemplo dendrímeros de polilisina,⁷⁸ de triazina,⁷⁹ lípidos,⁸⁰ etc.

1.6.2 TRANSPORTE DE FÁRMACOS

Hoy en día se conocen numerosas moléculas bioactivas, sin embargo, la gran mayoría de estas moléculas no llegan ni siquiera al ensayo clínico debido a que son incapaces de llegar con eficacia al tejido celular donde podrían ejercer su efecto terapéutico. Esto puede ser debido a numerosos efectos, su gran hidrofobia, falta de especificidad tisular, degradación en medios biológicos, incapacidad para atravesar barreras biológicas, etc. Todo ello ha obligado al desarrollo de sistemas para evitar todos estos problemas, que incluyen liposomas, nanopartículas, polímeros hiperramificados, etc. De entre todo este grupo, los dendrímeros destacan sobremanera ya que su naturaleza modulable permite adaptarse a las propiedades del fármaco a transportar.

Existen dos modos generales de transporte de fármacos por parte de los dendrímeros, interacciones no covalentes e interacciones covalentes (conjugación).

1. Transporte de fármacos mediante interacciones no covalentes

Hoy en día, el transporte de fármacos mediante interacciones no covalentes es un campo que se ha estudiado en profundidad debido a las ventajas que conlleva: es

capaz de proteger a los fármacos de la degradación por parte de proteínas, pero a su vez la unión a estos fármacos suele ser lo suficientemente débil como para una vez transportado al tejido diana el fármaco sea liberado para poder realizar su función terapéutica.

A su vez el transporte mediante interacciones no covalentes suele realizarse mediante dos tipos de unión: interacciones hidrofóbicas, mediante enlaces de hidrógeno o interacciones electrostáticas.

1.1 Encapsulación mediante interacciones hidrofóbicas

De modo general el transporte de fármacos en medio biológico requiere de dendrímeros muy polares que sean capaces de solubilizarse en medio fisiológico. La polaridad de un dendrímero viene determinada por los grupos funcionales que decoran su superficie dejando las partes apolares de éste en el interior alejadas del medio acuoso exterior, produciendo huecos internos donde pueden alojarse fármacos que interactúan con el dendrímero mediante interacciones hidrofóbicas con el esqueleto. Este tipo de encapsulación de moléculas bioactivas puede darse en forma de cajas dendríticas,⁸¹ agregados y micelas dendríticas y se muestra en la Figura I.7.⁹

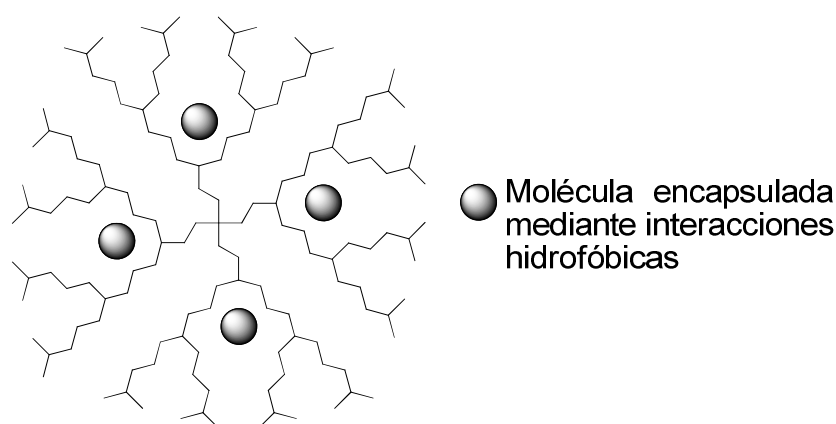


Figura I.7. Caja dendrítica.

1.2 Encapsulación mediante enlaces de hidrógeno

Los esqueletos de algunos dendrímeros no son completamente hidrofóbicos, ya que pueden poseer átomos de nitrógeno y oxígeno que pueden interactuar

Las pruebas realizadas mostraron un aumento de la solubilidad 40 veces en presencia de una disolución de 10 mg/ml del dendrímero. Además, estudios *in vitro* mostraron que el dendrímero era capaz de retener dicha sulfonamida y realizar una liberación lenta del fármaco. Los estudios de actividad microbiciada mostraron que la actividad antibacteriana del sulfametoxazol aumentaba en comparación con el fármaco libre.⁸⁹ Un estudio similar se ha llevado a cabo por parte de este mismo grupo de investigación con las quinolonas nadifloxacina y prulifloxacina con resultados similares, la solubilidad de ambas quinolonas aumenta en presencia de un dendrímero PAMAM de 4ª generación, y la solubilidad de éstas aumenta a medida que la concentración del dendrímero aumenta. Además, la solubilidad de estas quinolonas aumenta con la generación del dendrímero utilizado.⁹⁰

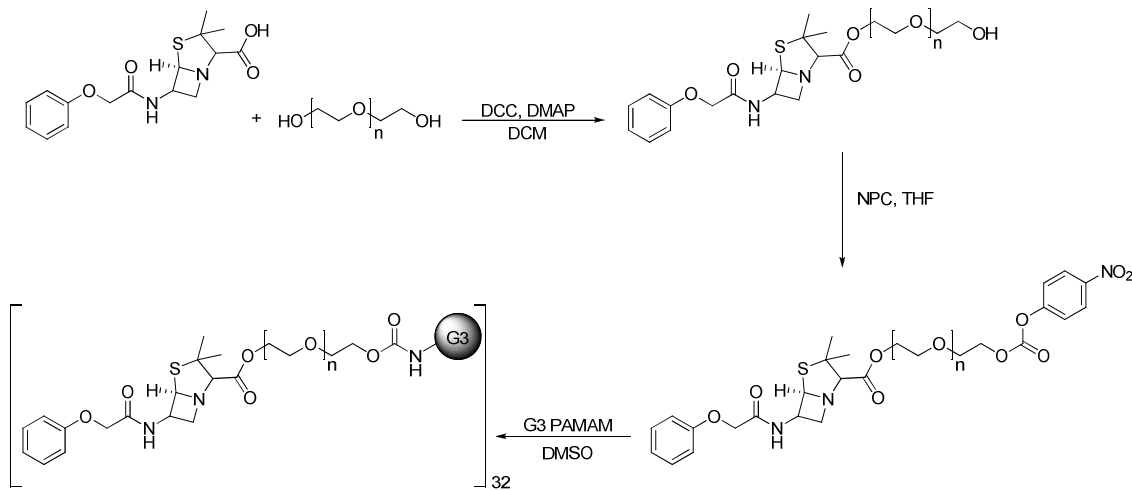
1.3 *Transporte de fármacos mediante interacciones electrostáticas*

Otro tipo de unión no covalente entre fármaco y dendrímero es la unión mediante interacciones electrostáticas. Muchos dendrímeros se modifican para contener grupos iónicos en la superficie para poder mejorar la solubilidad de éstos en agua. Este cambio en la polaridad del dendrímero hace que sean capaces de unir una gran variedad de principios activos a modo de contraión del nanoconjugado. Un ejemplo de este tipo de transporte de fármacos fue llevado a cabo por D'Emanuele y colaboradores. En este estudio se refleja que un dendrímero tipo PAMAM de 4ª generación es capaz de interaccionar con hasta 40 moléculas de ibuprofeno incrementándose la solubilidad de éste comparándolo con disoluciones en agua y micelas SDS.⁹¹

Otro ejemplo de interacción electrostática es la unión de un fármaco de naturaleza catiónica basado en metales de transición con dendrímeros aniónicos de esqueleto tipo PAMAM publicado por Grant Collins y colaboradores en 2008. En este estudio se muestra la unión de complejos de platino y rutenio a dendrímeros cuya superficie contiene grupos aniónicos tipo carboxilato, aunque la constante de unión relativamente baja indica que no son candidatos ideales para el transporte de este tipo de moléculas.⁹²

2. Transporte de fármacos mediante unión covalente (conjugación)

El transporte de fármacos por conjugación conlleva la unión mediante enlace covalente del fármaco al dendrímero. Este tipo de unión implica una mayor fortaleza en el enlace. Generalmente, esta estrategia supone una disminución de la solubilidad del conjugado en medio fisiológico. Este problema puede ser solventado mediante la modificación del dendrímero para que contenga grupos que aumenten su solubilidad, como por ejemplo grupos funcionales cargados iónicamente o cadenas de polietilenglicol. Otro inconveniente es que al ser una unión de gran fuerza, al llegar al lugar donde el fármaco debe realizar su acción terapéutica, la unión al dendrímero se lo impida. Esto puede solucionarse eligiendo que los enlaces que unen el principio activo y el dendrímero sean fácilmente hidrolizables. Un ejemplo de este tipo de transporte de fármacos fue llevado a cabo por el grupo de Yang y Lopina,⁹³ en la que se unió la penicilina V a dendrímeros PAMAM de generación 2.5 y 3, utilizando un espaciador de polietilenglicol. La unión se realizó mediante un enlace tipo amida que puede ser hidrolizado en la célula, como se puede ver en el Esquema I.15.



Esquema I.15. Conjugación de un dendrímero PAMAM a moléculas de penicilina V.

Otro ejemplo de este tipo de unión fue publicado en 1999 con cuñas dendríticas de tipo Fréchet de segunda generación a grupos folato que son capaces de dirigir al fármaco a algunos tipos de células cancerígenas que sobreexpresan el receptor de ácido fólico (Figura I.9).⁹⁴

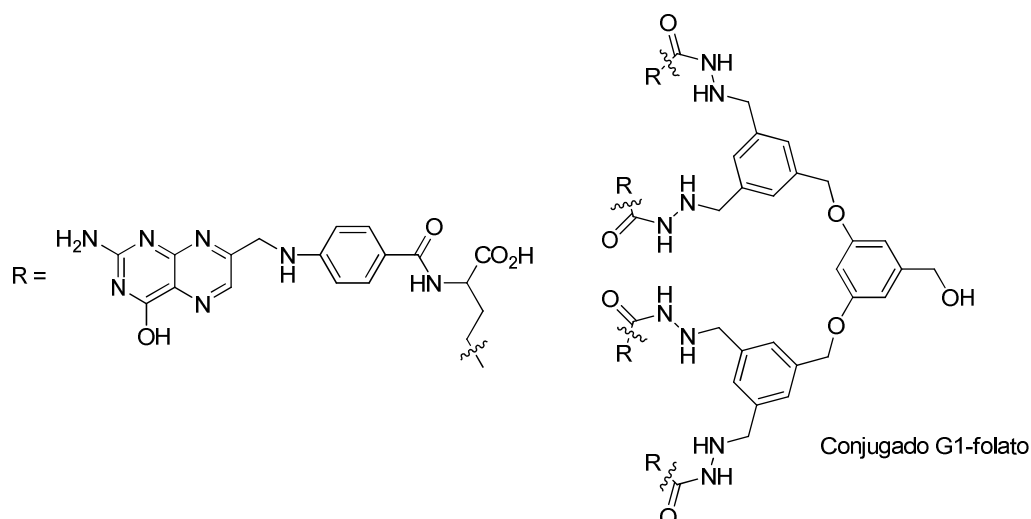


Figura I.9. Dendrímtero conjugado a un resto folato.

1.6.3 DENDRÍMEROS COMO AGENTES TERAPÉUTICOS

La gran mayoría de aplicaciones biológicas de los dendrímeros son como vectores para el transporte de fármacos, como ya se ha comentado en este capítulo. No obstante, debido a sus características de citotoxicidad, biopermeabilidad, estabilidad, unido a lo sencillo que es realizar modificaciones en su estructura, hacen de ellos candidatos ideales para ser probados como fármacos en sí mismos.

Una de las características más importantes de los dendrímeros es la multivalencia. Los efectos multivalentes son especialmente importantes en la química de sistemas biológicos, ya que dan lugar a efectos sinérgicos que promueven un aumento de la actividad, afinidad e incluso la actividad catalítica de ciertos sistemas.⁹⁵ Este efecto, también denominado efecto dendrítico o efecto cluster, supone no solo la suma del efecto de cada monómero aislado, sino un incremento mayor, o cooperativo.⁹⁶⁻⁹⁸

A continuación se muestran algunos de los usos de los dendrímeros como agentes terapéuticos.

1.6.3.1 Agentes antivirales

De modo general los dendrímeros con función antiviral son de naturaleza aniónica o son glicodendrímeros. La forma en que estos dendrímeros actúan es por competencia, es decir, los dendrímeros compiten por los sitios de unión que usan distintos virus para entrar en la célula. Así, bloqueando dichos sitios de unión por restos que tengan gran afinidad por éstos se evita el acoplamiento de las proteínas de la cápside del virus, lo que lleva a una menor probabilidad de infección por el virus.⁹⁹

Los dendrímeros con carbohidratos unidos a la superficie han sido mayoritariamente probados contra la infección de distintos tipos de virus de la gripe. Desde los años 90 se conoce que derivados de ácido siálico son capaces de inhibir distintos tipos de virus de la gripe.¹⁰⁰⁻¹⁰⁵ Reuter, Tomalia y colaboradores realizaron modificaciones a dendrímeros PAMAM y otras moléculas de naturaleza dendrítica, con derivados de ácido siálico, obteniendo un incremento dramático en la inhibición del virus de la gripe comparándolo con unidades aisladas de ácido siálico. También existen diversos ejemplos de glicodendrímeros utilizados para bloquear la capacidad de unión de las glicoproteínas gp120 del VIH a los receptores celulares CD4 y los correceptores CXCR4 y CCR5.¹⁰⁶⁻¹¹⁰

Los dendrímeros polianiónicos también han sido probados como microbicidas contra distintos virus: VIH, herpes, etc.¹¹¹ Generalmente estos tipos de dendrímeros suelen estar acabados en grupos sulfonato o carboxilato. Un ejemplo de ello fue publicado en el año 2000 con dendrímeros de esqueleto polilisina, que fueron aplicados por vía tópica a ratones reduciendo el porcentaje de infección por virus del herpes.¹¹² Posteriores estudios en 2002, han reflejado que dendrímeros terminados en grupo sulfonato son capaces de actuar en postratamiento interfiriendo con los pasos finales de la replicación del virus del herpes,¹¹³ aumentando sobremanera la eficacia del tratamiento. Uno de los mayores éxitos en este campo fue la formulación del vivagel, cuyo principio activo es un dendrímero de polilisina con grupos naftilsulfonato en la periferia, de esta estructura se hablará en posteriormente en esta memoria.

En nuestro grupo de investigación también se ha llevado a cabo la síntesis de dendrímeros cuya periferia está modificada con grupos aniónicos y con éstos se han

realizado ensayos preliminares para el tratamiento del VIH. De estas estructuras y los ensayos biomédicos se hablará en posteriores capítulos.

Existen también ejemplos de dendrímeros derivatizados con péptidos con propiedades antiVIH, pero este tipo de moléculas no han sido tan estudiados como los dos tipos previamente mencionados.^{114,115}

1.6.3.2 Agentes antibacterianos

De un modo contrario a los dendrímeros con aplicaciones antivirales, los dendrímeros utilizados como agentes antibacterianos son generalmente de naturaleza catiónica. Su mecanismo de acción se basa en que las cargas positivas de la superficie del dendrímero son capaces de desplazar los cationes divalentes alojados en la superficie de la membrana de las bacterias, afectando a la integridad estructural de éstas, causando en última instancia la lisis celular. Un ejemplo de dendrímeros catiónicos para su uso como microbicidas fue publicado en 2002, donde se muestran distintos dendrímeros tipo polipropilenimina, acabados en grupos amonio, variando distintos factores como la generación, la longitud de las cadenas y la naturaleza del contraión. Se utilizaron varios modelos de vesículas formadas por fosfolípidos y mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC en sus siglas en ingles) se demostró que eran capaces de unirse mediante interacción electrostática a los restos aniónicos de las vesículas. Además se verificó, mediante espectroscopía ultravioleta, que las bacterias en presencia de estos dendrímeros arrojaban nucleótidos al exterior celular, lo que indica que la membrana celular había sido dañada.^{116,117}

1.6.3.3 Terapia fotodinámica

La terapia fotodinámica es una de las metodologías contra el cáncer más prometedoras. Implica la generación de moléculas citotóxicas para un tumor a partir de compuestos químicos inicialmente inertes (fotosensibilizadores) que se activan mediante irradiación de luz localizada en una región.^{118,119} Este tipo de terapia, delimitada a ciertas regiones del cuerpo, impide que se dañen otros tejidos sanos del paciente. Generalmente, la citotoxicidad surge al irradiar porfirinas para generar especies de oxígeno singlete, que son capaces de alterar moléculas de la célula como

ADN, proteínas y lípidos. Para ello Nishiyama y colaboradores han sintetizado dendrímeros con un núcleo de porfirina al que se le coordina un átomo de zinc. A este núcleo se le han acoplado diversas cuñas dendríticas poliariléter, también denominadas de tipo Fréchet, tanto catiónicas como aniónicas. Estos compuestos fueron capaces de ser internalizados, encapsulados dentro de una micela PIC, en células tumorales y resultaron no ser tóxicos en ausencia de luz. Tras la irradiación, se puso de manifiesto una mayor eficacia fotodinámica, reflejada en menores valores de IC50, frente a la protoporfirina IX, usada como control (Figura I.10).^{120,121}

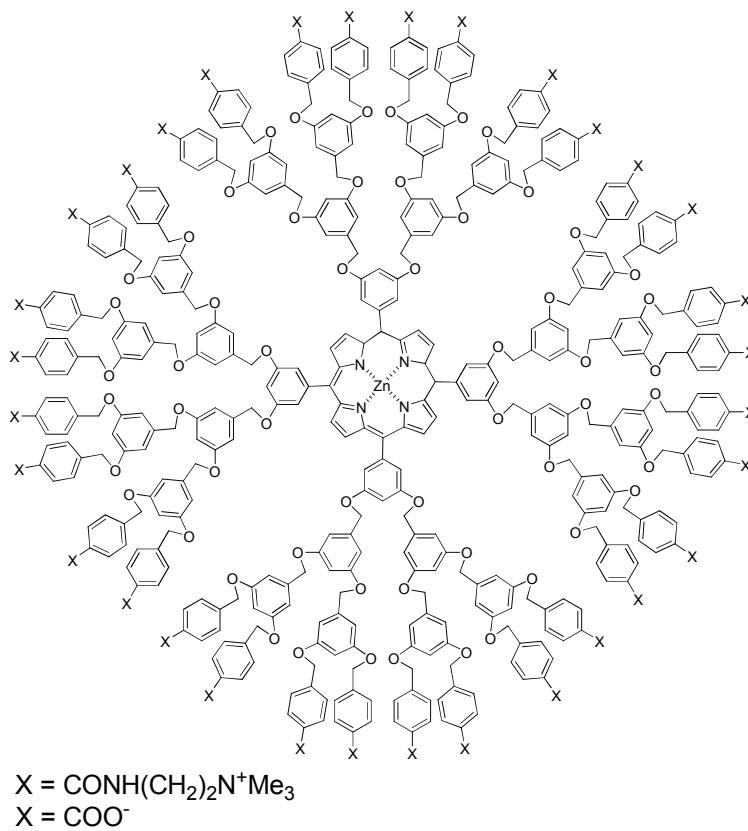


Figura I.10. Dendrímero aplicado en terapia fotodinámica.

1.6.4 DENDRÍMEROS COMO AGENTES DE DIAGNÓSTICO

El diagnóstico del cáncer es un paso esencial en su tratamiento. Una detección temprana de la enfermedad permite elegir entre un mayor abanico de terapias, lo que repercute en una mayor posibilidad de recuperación del paciente. Uno de los métodos de diagnóstico más utilizados hoy en día es la resonancia magnética de imagen (MRI), que es una técnica de imagen que permite distinguir entre distintos tipos de tejidos.

Para poder diferenciar con mayor claridad estos tejidos se suele recurrir a agentes de contraste en los que están absorbidos incrementando el tiempo de relajación de los protones cercanos. La mayoría de estos agentes de contraste están basados en iones de Gd^{3+} . Generalmente, estos iones libres son muy tóxicos, por lo que se suelen utilizar ligandos que los coordinen fuertemente formando un quelato. Sin embargo, las moléculas formadas son de bajo peso molecular y se excretan fácilmente. Para lograr un mayor tiempo de retención en el cuerpo se recurre a administrar dosis mayores del compuesto lo que provoca un aumento de la toxicidad.^{122,123}

Los dendrímeros en este campo pueden aportar numerosas ventajas: el aumento de peso molecular del complejo dendrítico hace que el gadolinio sea más difícil de excretar, lo que le permite permanecer en el cuerpo hasta 24 horas.^{124,125} Además, aunque el dendrímero en sí mismo no tiene capacidad de modificar los tiempos de relajación de protones contiguos, se cree que su elevado peso molecular colabora alterando las características del gadolinio, lo que incrementa sensiblemente la calidad de la imagen. Es por ello que para este tipo de aplicaciones se suelen usar dendrímeros de generaciones altas, aunque también hay ejemplos con dendrímeros de generación baja. Otra ventaja sustancial de este tipo de complejos es que, como se ha expresado previamente en este capítulo, los dendrímeros podrían dirigirse específicamente a tejidos cancerosos que sobreexpresan algún receptor, como por ejemplo el receptor de ácido fólico, permitiendo incrementar su especificidad.¹²⁶

1.7 OBJETIVOS Y DISTRIBUCIÓN DE LA MEMORIA

El objetivo general de este trabajo es la síntesis mediante metodología “click-chemistry” de dendrímeros carbosilano solubles en agua, la caracterización de estas estructuras y su evaluación en distintas aplicaciones biomédicas.

Para la consecución de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

1. Síntesis y caracterización estructural de dendrímeros carbosilano terminados en grupos azida como posible plataforma precursora para el estudio de la versatilidad de la tecnología “click chemistry”.

2. Síntesis y caracterización estructural de dendrímeros carbosilano que contengan grupos catiónicos en la periferia mediante cicloadición 1,3-dipolar entre alquinos y azidas.

3. Estudio de la biocompatibilidad de los dendrímeros catiónicos y su evaluación como agentes de transporte de material genético frente al VIH y cáncer, y como agentes antibacterianos.

4. Síntesis y caracterización estructural de dendrímeros carbosilano que contengan grupos aniónicos en la periferia mediante cicloadición 1,3-dipolar entre alquinos y azidas.

5. Estudio de la biocompatibilidad de los dendrímeros carbosilano aniónicos y su evaluación como agentes antivirales frente al VIH.

La memoria se distribuye de la siguiente manera atendiendo a los objetivos prefijados:

En el capítulo 1 se hace una breve revisión general de los trabajos más representativos del uso de dendrímeros dentro del campo de la nanomedicina, además de una sucinta introducción al estado del arte de la denominada tecnología

“click chemistry”, haciendo hincapié en la cicloadición de Huisgen catalizada por cobre y su aplicación a la síntesis de dendrímeros.

En el capítulo 2 se describe la síntesis y caracterización estructural de dendrímeros carbosilano precursores y su funcionalización con las aminas N,N-dimetilpropargilamina y N',N',N''-trimetil-N''-(2-(prop-2-iniloxi)etil)etano-1,2-diamina, para posteriormente describir la cuaternización de los grupos amino de la periferia.

En el capítulo 3 se recogen los estudios de biocompatibilidad, capacidad de transfección de los dendrímeros carbosilano catiónicos frente a cáncer y VIH, así como su capacidad antibacteriana frente a bacterias Gram+ y Gram-.

En el capítulo 4 se aborda la síntesis y caracterización de derivados dendríticos carbosilano aniónicos de distinta naturaleza (carboxilatos, fosfonatos, sulfatos y naftilsulfonatos).

En el capítulo 5 se reúnen los ensayos biomédicos que determinan la biocompatibilidad de los dendrímeros aniónicos, así como los estudios de su capacidad antiviral frente al VIH.

En el capítulo 6 se describen las condiciones del trabajo experimental, las técnicas y equipos empleados, así como el método de preparación y los datos de caracterización de los compuestos.

Al final de cada uno de los capítulos mencionados previamente se recoge la bibliografía citada a lo largo de éstos.

Por último, se recogen las principales conclusiones extraídas del trabajo realizado, así como el pertinente resumen en inglés.

1.8 BIBLIOGRAFÍA

- ¹ D. A. Tomalia, A. M. Naylor and W. A. Goddard, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, *29*, 138.
- ² M. Fischer and F. Vogtle, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 885.
- ³ D. A. Tomalia and H. D. Durst, *Top. Curr. Chem.* **1993**, *165*, 193.
- ⁴ J. M. J. Fréchet, C. J. Hawker, I. Gitsov and J. W. Leon, *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.* **1996**, *A33*, 1399.
- ⁵ A. W. Bosman, H. M. Janssen and E. W. Meijer, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1665.
- ⁶ E. Buhleier, W. Wehner and F. Vogtle, *Synthesis* **1978**, 155.
- ⁷ E. M. M. Brabander van den Berg and E. W. Meijer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, *32*, 1308.
- ⁸ R. G. Denkewalter, J. Kolc and W. J. Lukasavage in *Macromolecular highly branched homogeneous compound based on lysine units*, Vol. (Allied Corp., USA). Application: US, **1981**, p. 8.
- ⁹ G. R. Newkome, Z. Q. Yao, G. R. Baker and V. K. Gupta, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2003.
- ¹⁰ D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder and P. Smith, *Polym. J.* **1985**, *17*, 117.
- ¹¹ K. Rengan and R. Engel, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 1084.
- ¹² A. Miedaner, C. J. Curtis, R. M. Barkley and D. L. DuBois, **1994**, *33*, 5482.
- ¹³ E. Dadapeer, B. Hari Babu, C. Suresh Reddy and N. R. Charmathi, *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *6*, 726.
- ¹⁴ J. Sjoqvist, M. Linares and P. Norman, *J. Phys. Chem.* **2010**, *114*, 4981.
- ¹⁵ C. Larre, A.-M. Caminade and J.-P. Majoral, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 596.
- ¹⁶ V. Maraval, D. Prevote-Pinet, R. Laurent, A.-M. Caminade and J.-P. Majoral, *New J. Chem.* **2000**, *24*, 561.
- ¹⁷ C.-O. Turrin, J. Chiffre, D. de Montauzon, J.-C. Daran, A.-M. Caminade, E. Manoury, G. Balavoine and J.-P. Majoral, *Macromolecules* **2000**, *33*, 7328.
- ¹⁸ B.-S. Kim, V. Lebedeva Olga, H. Kim Dong, A.-M. Caminade, J.-P. Majoral, W. Knoll and I. Vinogradova Olga, *Langmuir* **2005**, *21*, 7200.
- ¹⁹ V. Maraval, R. Laurent, B. Donnadiou, M. Mauzac, A.-M. Caminade and J.-P. Majoral, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *22*, 2499.
- ²⁰ M.-L. Lartigue, B. Donnadiou, C. Galliot, A.-M. Caminade, J.-P. Majoral and J.-P. Fayet, *Macromolecules* **1997**, *30*, 7335.
- ²¹ N. Hadjichristidis, A. Guyot and L. J. Fetters, *Macromolecules* **1978**, *11*, 668.
- ²² A. W. Van der Made and P. W. N. M. Van Leeuwen, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 1400.
- ²³ A. M. Muzafarov, O. B. Gorbatshevich, E. A. Rebrov, G. M. Ignat'eva, T. B. Chenskaya, V. D. Myakushev, A. F. Bulkin and V. S. Papkov, *Polym. Sci.* **1993**, *35*, 1575.
- ²⁴ L. L. Zhou and J. Roovers, *Macromolecules* **1993**, *26*, 963.
- ²⁵ B. Alonso, I. Cuadrado, M. Morán and J. Losada, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 2575.
- ²⁶ F. Lobete, I. Cuadrado, C. M. Casado, B. Alonso, M. Morán and J. Losada, *J. Organomet. Chem.* **1996**, *509*, 109.
- ²⁷ H. C. Kolb, M. G. Finn and K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.
- ²⁸ J. E. Moses and A. D. Moorhouse, *Chem Soc Rev.* **2007**, *36*, 1249.

- ²⁹ V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin and K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
- ³⁰ K. A. Jorgensen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3558.
- ³¹ W. Tornøe Christian, C. Christensen and M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057.
- ³² T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless and V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853.
- ³³ F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless and V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210.
- ³⁴ H. A. Orgueira, D. Fokas, Y. Isome, P. C. M. Chan and C. M. Baldino, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2911.
- ³⁵ M. B. Thathagar, J. Beckers and G. Rothenberg, *Green Chem.* **2004**, *6*, 215.
- ³⁶ H. C. Kolb and K. B. Sharpless, *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 1128.
- ³⁷ W. S. Horne, M. K. Yadav, C. D. Stout and M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15366.
- ³⁸ T. S. Seo, Z. M. Li, H. Ruparel and J. Y. Ju, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 609.
- ³⁹ Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless and M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192.
- ⁴⁰ G. Wittig and A. Krebs, *Chem. Ber.Recl.* **1961**, *94*, 3260.
- ⁴¹ N. J. Agard, J. A. Prescher and C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046.
- ⁴² R. Huisgen, G. Szeimies and L. Mobius, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 2494.
- ⁴³ B. F. Straub, *Chem. Commun.* **2007**, 3868.
- ⁴⁴ E. Hein Jason and V. Fokin Valery, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1302.
- ⁴⁵ J. W. Lee, B. K. Kim, J. H. Kim, W. S. Shin and S. H. Jin, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4988.
- ⁴⁶ J. W. Lee, J. H. Kim, S. C. Han, W. R. Kim, B. K. Kim, J. H. Kim, D. S. Huh, W. S. Shin and S. H. Jin, *Macromol. Symp.* **2007**, *249*, 357.
- ⁴⁷ J. Sánchez-Nieves, D. Pulido, P. Fransén, M. Royo, F. J. de la Mata, R. Gómez and F. Albericio, **2012**, Trabajo realizado en colaboración dentro de la plataforma CIBER, resultados sin publicar.
- ⁴⁸ P. Wu, A. K. Feldman, A. K. Nugent, C. J. Hawker, A. Scheel, B. Voit, J. Pyun, J. M. J. Frechet, K. B. Sharpless and V. V. Fokin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3928.
- ⁴⁹ P. A. Ledin, F. Friscourt, J. Guo and G. J. Boons, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 839.
- ⁵⁰ R. Kreiter, A. W. Kleij, R. Gebbink and G. van Koten in *Top. Curr. Chem.* **217** **2001**, 163.
- ⁵¹ G. E. Oosterom, J. N. H. Reek, P. C. J. Kamer and P. van Leeuwen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1828.
- ⁵² R. Saraswathi and S.-M. Chen, *Nanostruct. Mater. Electrochem. Biosens.* **2009**, *1*.
- ⁵³ S. C. Zimmerman and L. J. Lawless, *Top. Curr. Chem.* **2001**, *217*, 95.
- ⁵⁴ M. W. P. L. Baars and E. W. Meijer, *Top. Curr. Chem.* **2000**, *210*, 131.
- ⁵⁵ T. Dutta, N. K. Jain, N. A. J. McMillan and H. S. Parekh, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2010**, *6*, 815.
- ⁵⁶ I. J. Majoros, C. R. Williams and J. R. Baker, *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 1165.
- ⁵⁷ A. R. Borges and C. L. Schengrund, *Curr. Drug Targets.* **2005**, *5*, 247.
- ⁵⁸ L. Barzon, A.-L. Stefani, M. Pacenti and G. Palu, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2005**, *5*, 639.
- ⁵⁹ I. M. Verma and M. D. Weitzman, *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 711.
- ⁶⁰ K. Lundstrom, *Technol. Cancer Res. Treat.* **2004**, *3*, 467.
- ⁶¹ D. G. Shcharbin, B. Klajnert and M. Bryszewska, *Biochemistry* **2009**, *74*, 1070.
- ⁶² T. Dutta and N. K. Jain, *Nanotechnol. Appl. Novel Polym.* **2009**, *15*.
- ⁶³ Shishu and M. Maheshwari, *Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnol.* **2009**, *2*, 493.
- ⁶⁴ P. P. Karmali and A. Chaudhuri, *Med. Res. Rev.* **2007**, *27*, 696.

- ⁶⁵ S. Simoes, A. Filipe, H. Faneca, M. Mano, N. Penacho, N. Duezguenes and M. Pedroso De Lima, *Expert Opin. Drug Delivery* **2005**, 2, 237.
- ⁶⁶ T. Merdan, K. Kunath, H. Petersen, U. Bakowsky, K. H. Voigt, J. Kopecek and T. Kissel, *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 785.
- ⁶⁷ K. Kunath, A. von Harpe, D. Fischer, H. Peterson, U. Bickel, K. Voigt and T. Kissel, *J. Control. Release* **2003**, 89, 113.
- ⁶⁸ J. Haensler and F. C. Szoka, *Bioconjugate Chem.* **1993**, 4, 372.
- ⁶⁹ J. C. Roberts, M. K. Bhargat and R. T. Zera, *J. Biomed. Mater. Res.* **1996**, 30, 53.
- ⁷⁰ H. Yoo and R. L. Juliano, *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 4225.
- ⁷¹ C. C. Lee, J. A. MacKay, J. M. J. Fréchet and F. C. Szoka, *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23, 1517.
- ⁷² M. X. Tang, C. T. Redemann and F. C. Szoka, *Bioconjugate Chem.* **1996**, 7, 703.
- ⁷³ N. Malik, R. Wiwattanapatapee, R. Klopsch, K. Lorenz, H. Frey, J. W. Weener, E. W. Meijer, W. Paulus and R. Duncan, *J. Control. Release* **2000**, 68, 299.
- ⁷⁴ C. L. Gebhart and A. V. Kabanov, *J. Control. Release* **2001**, 73, 401.
- ⁷⁵ B. H. Zinselmeyer, S. P. Mackay, A. G. Schatzlein and I. F. Uchegbu, *Pharm. Res.* **2002**, 19, 960.
- ⁷⁶ J. H. S. Kuo and Y. L. Lin, *J. Biotechnol.* **2007**, 129, 383.
- ⁷⁷ C. Loup, M. A. Zanta, A. M. Caminade, J. P. Majoral and B. Meunier, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 3644.
- ⁷⁸ M. Ohsaki, T. Okuda, A. Wada, T. Hirayama, T. Niidome and H. Aoyagi, *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13, 510.
- ⁷⁹ O. M. Merkel, M. A. Mintzer, J. Sitterberg, U. Bakowsky, E. E. Simanek and T. Kissel, *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, 1799.
- ⁸⁰ I. Toth, T. Sakthivel, A. F. Wilderspin, H. Bayele, M. O'Donnell, D. J. Perry, K. J. Pasi, C. A. Lee and A. T. Florence, *S.T.P. Pharma Sci.* **1999**, 9, 93.
- ⁸¹ J. Jansen, E. W. Meijer and E. M. M. Debrabander van den Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 4417.
- ⁸² E. R. Gillies and J. M. J. Fréchet, *Drug Discov. Today* **2005**, 10, 35.
- ⁸³ M. T. Morgan, Y. Nakanishi, D. J. Kroll, A. P. Griset, M. A. Carnahan, M. Wathier, N. H. Oberlies, G. Manikumar, M. C. Wani and M. W. Grinstaff, *Cancer Res.* **2006**, 66, 11913.
- ⁸⁴ R. Garcia-Carbonero and J. G. Supko, *Clin. Cancer Res.* **2002**, 8, 641.
- ⁸⁵ Y. Uehara, *Curr. Cancer Drug Targets* **2003**, 3, 325.
- ⁸⁶ J. R. Hecht, *Oncology* **1998**, 12, 72.
- ⁸⁷ D. K. Armstrong, *Oncologist* **2004**, 9, 33.
- ⁸⁸ M. T. Morgan, M. A. Carnahan, C. E. Immoos, A. A. Ribeiro, S. Finkelstein, S. J. Lee and M. W. Grinstaff, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 15485.
- ⁸⁹ M. L. Ma, Y. Y. Cheng, Z. H. Xu, P. Xu, H. Qu, Y. J. Fang, T. W. Xu and L. P. Wen, *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, 42, 93.
- ⁹⁰ Y. Y. Cheng, H. Qu, M. L. Ma, Z. H. Xu, P. Xu, Y. J. Fang and T. W. Xu, *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, 42, 1032.
- ⁹¹ O. M. Milhem, C. Myles, N. B. McKeown, D. Attwood and A. D'Emanuele, *Int. J. Pharm.* **2000**, 197, 239.
- ⁹² M. J. Pisani, N. J. Wheate, F. R. Keene, J. R. Aldrich-Wright and J. G. Collins, *J. Inorg. Biochem.* **2009**, 103, 373.
- ⁹³ H. Yang and S. T. Lopina, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2003**, 14, 1043.
- ⁹⁴ K. Kono, M. J. Liu and J. M. J. Fréchet, *Bioconjugate Chem.* **1999**, 10, 1115.
- ⁹⁵ M. Mammen, S. K. Choi and G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2755.
- ⁹⁶ W. B. Turnbull and J. F. Stoddart, *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, 90, 231.

- ⁹⁷ P. H. Ehrlich, *J. Theor. Biol.* **1979**, *81*, 123.
- ⁹⁸ J. J. Lundquist, S. D. Debenham and E. J. Toone, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8245.
- ⁹⁹ U. Boas and P. M. H. Heegaard, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 43.
- ¹⁰⁰ I. B. Rietveld, W. G. Bouwman, M. Baars and R. K. Heenan, *Macromolecules* **2001**, *34*, 8380.
- ¹⁰¹ R. L. Lescanec and M. Muthukumar, *Macromolecules* **1990**, *23*, 2280.
- ¹⁰² M. Murat and G. S. Grest, *Macromolecules* **1996**, *29*, 1278.
- ¹⁰³ M. H. Chai, Y. H. Niu, W. J. Youngs and P. L. Rinaldi, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4670.
- ¹⁰⁴ M. Ballauff in *Structure of dendrimers in dilute solution* **2001**, 212, 177.
- ¹⁰⁵ J. Recker, D. J. Tomcik and J. R. Parquette, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10298.
- ¹⁰⁶ M. Viard, I. Parolini, S. S. Rawat, K. Fecchi, M. Sargiacomo, A. Puri and R. Blumenthal, *Glycoconjugate J.* **2003**, *20*, 213.
- ¹⁰⁷ N. Seddiki, A. Ben Younes-Chennoufi, A. Benjouad, L. Saffar, N. Baumann, J. C. Gluckman and L. Gattegno, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **1996**, *12*, 695.
- ¹⁰⁸ P. Hug, H. M. J. Lin, T. Korte, X. D. Xiao, D. S. Dimitrov, J. M. Wang, A. Puri and R. Blumenthal, *J. Virol.* **2000**, *74*, 6377.
- ¹⁰⁹ A. Puri, P. Hug, K. Jernigan, P. Rose and R. Blumenthal, *Biosci. Rep.* **1999**, *19*, 317.
- ¹¹⁰ R. D. Kensinger, B. C. Yowler, A. J. Benesi and C. L. Schengrund, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 349.
- ¹¹¹ B. R. Matthews and G. Holan in *Antiviral polyamidoamine dendrimers*, Vol. (Biomolecular Research Institute Ltd., Australia). Application: WO, **1995**, p. 47.
- ¹¹² N. Bourne, L. R. Stanberry, E. R. Kern, G. Holan, B. Matthews and D. I. Bernstein, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 2471.
- ¹¹³ Y. H. Gong, B. Matthews, D. Cheung, T. Tam, I. Gadawski, D. Leung, G. Holan, J. Raff and S. Sacks, *Antiviral Res.* **2002**, *55*, 319.
- ¹¹⁴ N. Yahji, J. Fantini, S. Baghidiguan, K. Mabrouk, C. Tamalet, H. Rochat, J. van Rietschoten and J. M. Sabatier, *Proc. Natl. Acad. Sci. III* **1995**, *92*, 4867.
- ¹¹⁵ L. J. Cruz, E. Iglesias, J. C. Aguilar, L. J. González, O. Reyes, F. Albericio and D. Andreu, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 112.
- ¹¹⁶ B. Wang, R. S. Navath, A. R. Menjoge, B. Balakrishnan, R. Bellair, H. Dai, R. Romero, S. Kannan and R. M. Kannan, *Int. J. Pharm.* **2010**, *395*, 298.
- ¹¹⁷ B. Wang, S. Navath Raghavendra, R. Menjoge Anupa, B. Balakrishnan, R. Bellair, H. Dai, R. Romero, S. Kannan and M. Kannan Rangaramanujam, *Int. J. Pharm.* **2010**, *395*, 298.
- ¹¹⁸ R. K. Tekade, P. V. Kumar and N. K. Jain, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 49.
- ¹¹⁹ K. E. Borbas and D. Lahaye, *Anticancer Ther.* **2008**, 187.
- ¹²⁰ G. D. Zhang, A. Harada, N. Nishiyama, D. L. Jiang, H. Koyama, T. Aida and K. Kataoka, *J. Control. Release* **2003**, *93*, 141.
- ¹²¹ N. Nishiyama, H. R. Stapert, G. D. Zhang, D. Takasu, D. L. Jiang, T. Nagano, T. Aida and K. Kataoka, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 58.
- ¹²² A. Hengerer and J. Grimm, *Biomed. Imaging Intervention J.* **2006**, *2*.
- ¹²³ P. Caravan, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 512.
- ¹²⁴ H. Kobayashi, N. Sato, S. Kawamoto, T. Saga, A. Hiraga, T. Ishimori, J. Konishi, K. Togashi and M. W. Brechbiel, *Magn. Reson. Med.* **2001**, *46*, 579.
- ¹²⁵ S. D. W. Swanson, C. R., *Dendrimer based nanomedicine*, **2009**, 255.
- ¹²⁶ S. D. Konda, M. Aref, M. Brechbiel and E. C. Wiener, *Invest. Radiol.* **2000**, *35*, 50.

Capítulo 2: Dendrímeros carbosilano catiónicos

2.1 ANTECEDENTES

2.1.1 SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS CARBOSILANO

Las primeras macromoléculas dendríticas que contenían heteroátomos, distintos de nitrógeno u oxígeno, en su estructura fueron los dendrímeros basados en silicio. La química del silicio ofrece varias reacciones de rendimiento cuantitativo que son adecuadas para ser utilizadas en el crecimiento de macromoléculas dendríticas. El crecimiento del esqueleto dendrítico de estas moléculas se realiza habitualmente mediante dos reacciones básicas: hidrosililaciones con haloderivados de silicio y posterior ataque con un reactivo de Grignard.^{1,2} En el caso de la preparación de siloxanos y silazanos habría que añadir la sustitución nucleófila de un átomo de halógeno mediante una molécula de alcohol o una amina (Figura II.1).³⁻⁷

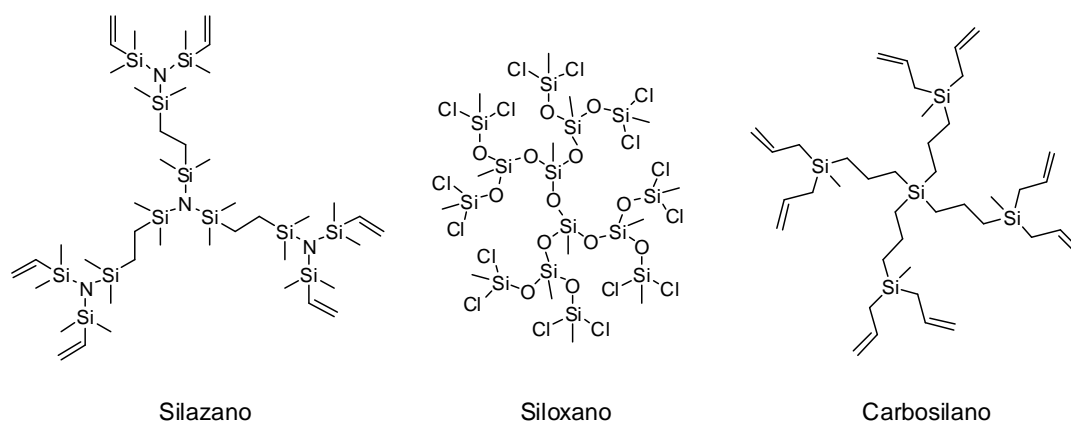
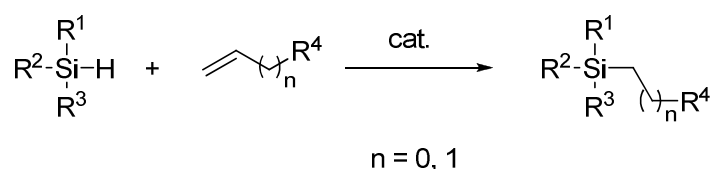


Figura II.1. Tipos de dendrímeros basados en silicio.

De entre toda la familia de dendrímeros basados en silicio los dendrímeros carbosilano, hasta la fecha, han sido los que mayor atención han recibido debido a que se preparan de un modo directo y la ruta sintética utilizada ofrece una gran estabilidad, flexibilidad y versatilidad. La estructura final puede adaptarse fácilmente variando el núcleo, el número de ramas que parte de cada nodo (desde una hasta tres escogiendo el derivado de silicio adecuado) y por último la longitud de las cadenas que parten de los nodos de crecimiento. Además, todos estos cambios pueden realizarse sin apenas variar las condiciones de reacción de ninguno de los procesos implicados.

Aunque hoy en día se conocen procesos de síntesis convergentes de dendrímeros carbosilano, la síntesis clásica es una síntesis de tipo divergente. Generalmente la preparación comienza con la hidrosililación de una molécula que posee dobles enlaces terminales. El silano utilizado varía dependiendo del grado de ramificación que se desee en la molécula final. Los más comúnmente utilizados son el diclorometilsilano y el triclorosilano, para dos y tres ramificaciones por nodo respectivamente. La adición del silano puede producirse tanto en posición α como en β , aunque las condiciones de reacción utilizadas favorecen la adición en β . La hidrosililación suele catalizarse añadiendo especies de platino, generalmente los catalizadores de Speier o de Karstedt (Esquema II.1).



Esquema II.1. Reacción de hidrosililación.

Otro inconveniente asociado a la hidrosililación es la aparición de isomerización del doble enlace provocada por el propio catalizador, lo que resulta en ramas que no pueden proseguir el proceso iterativo del crecimiento del dendrímero. Sin embargo, este problema puede minimizarse con una elección de temperatura y disolvente adecuados.⁸

El siguiente paso es el ataque nucleófilo de un agente magnesiano desplazando un átomo de halógeno. Esta reacción no suele ser problemática mientras se utilicen magnesianos de cadena corta, como bromuro de alilmagnesio o de vinilmagnesio. El uso de espaciadores más largos en estas especies, provoca que la reacción no alcance rendimientos altos lo que se traduce en defectos en la estructura del dendrímero.

Utilizando este tipo de síntesis, se han llegado a obtener dendrímeros de sexta generación. Sin embargo, existe un ejemplo de un dendrímero de séptima generación con 256 grupos terminales que utiliza la hidrosililación de triples enlaces como

reacción para el crecimiento de la estructura dejando un esqueleto formado por enlaces C-C dobles entre cada dos átomos de silicio.⁹

Otra de las características más interesantes de este tipo de estructura carbosilano es la gran estabilidad tanto termodinámica como cinética que poseen, ya que la energía de disociación del enlace C-Si es casi tan alta como la del enlace C-C (306 kJ/mol frente a 345 kJ/mol respectivamente). Así mismo, el enlace C-Si apenas posee polaridad lo que contrasta frente a los dendrímeros PAMAM y PPI más comúnmente utilizados. Además, la naturaleza de los enlaces que forman los dendrímeros carbosilano confiere una gran flexibilidad a sus ramas lo que se refleja en su baja temperatura de transición vítrea y que son aceites a temperatura ambiente.¹⁰

La caracterización de estos dendrímeros se realiza mediante las mismas técnicas que otros dendrímeros en la bibliografía. Además de las técnicas de RMN de ^1H y ^{13}C , puede utilizarse RMN de ^{29}Si . A finales de los años 90 estas técnicas fueron combinadas en experimentos de triple resonancia consiguiendo de este modo conocer la conectividad de todos los enlaces presentes y con ello la prueba de la estructura inequívoca de la molécula.¹¹

En el pasado, la cromatografía de exclusión de tamaños acoplada a un detector de dispersión de luz (“Light scattering”) ha sido utilizada para determinar que no existieran defectos graves en el crecimiento del dendrímero. Sin embargo, este método no es capaz de determinar pequeños errores en el esqueleto dendrítico. No obstante el desarrollo de la técnica de ionización MALDI-TOF para la espectrometría de masas ha permitido determinar el peso molecular de estas estructuras con precisión.^{10,12,13}

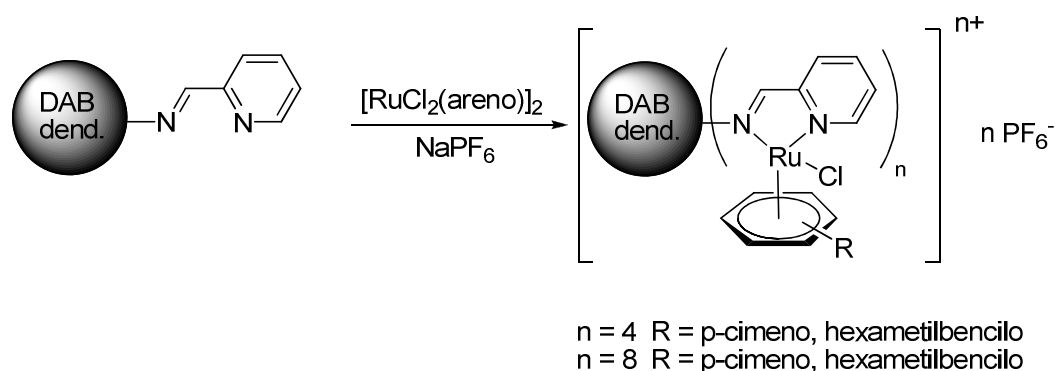
2.1.2 SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS CATIONICOS

Existen dos estrategias básicas para sintetizar dendrímeros catiónicos: coordinación de un centro metálico que forme una especie catiónica, y cuaternización de un heteroátomo. Ambas pueden ser extrapoladas para la preparación de dendrímeros carbosilano catiónicos.

1. Coordinación a un centro metálico

La síntesis de dendrímeros con centros metálicos en su estructura ha sido uno de los objetivos de los químicos inorgánicos desde la preparación de las primeras estructuras dendríticas para ser aplicadas a la formación de nuevos materiales y catalizadores. Los métodos para llevar a cabo la síntesis de estos dendrímeros catiónicos son similares a los métodos para sintetizar compuestos de coordinación catiónicos.

Un ejemplo de dendrímeros catiónicos con metales en su estructura ha sido publicado recientemente por Smith y colaboradores, en él presentan dendrímeros PPI de primera y segunda generación, con un núcleo diaminobutano que contienen en la periferia ligandos bidentados tipo iminopiridilo. Estos dendrímeros son capaces de formar compuestos de coordinación N dados con especies tipo areno-rutenio catiónicos y estables (Esquema II.2).¹⁴



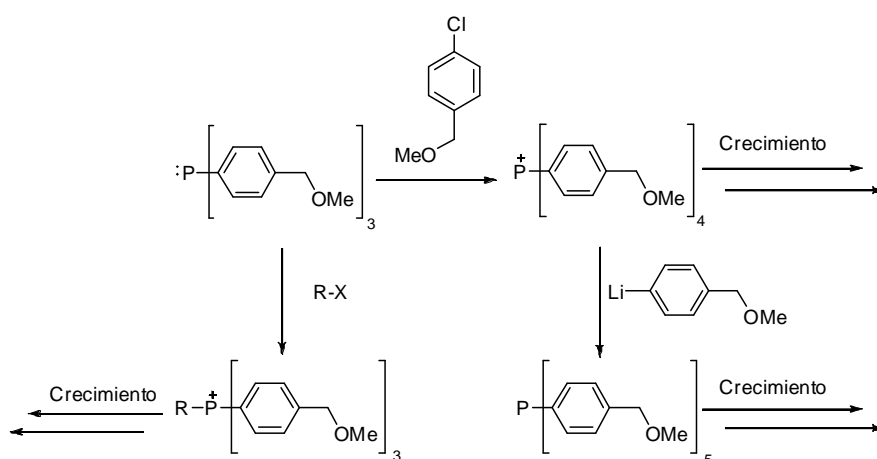
Esquema II.2. Metalodendrímeros con periferia tipo iminopiridilo.

Debido a las características fotofísicas de algunos complejos de osmio y rutenio la síntesis de metalodendrímeros con estos núcleos metálicos ha sido el objetivo para la síntesis de nuevos materiales luminiscentes. Utilizando derivados de bipyridina como ligandos, Campagna y colaboradores sintetizaron estructuras dendríticas decanucleares de rutenio y osmio con 20 cargas positivas con propiedades fotoquímicas interesantes, pero estas moléculas se agregaban a concentraciones muy bajas.¹⁵

2. Cuaternización de un heteroátomo

Dentro de esta estrategia sintética cabe destacar fundamentalmente dos familias: los dendrímeros basados en sales de fosfonio y los dendrímeros basados en sales de amonio.

En estas especies dendríticas la unidad de fosfonio está situada en los nodos de ramificación. Varios de estos dendrímeros se han sintetizado variando el número de ramas que parten del núcleo, pero todos siguen un esquema común, primero se genera la sal de fosfonio con un agente alquilante para posteriormente seguir con un proceso de activación de los grupos terminales que permiten el crecimiento de la estructura dendrítica. Son varias las familias de dendrímeros así generadas, con la diferencia del tipo de núcleo al que están ancladas las ramas y también del número de ramas que parten del núcleo: 3, 4 o 5 (Esquema II.3).^{16,17}



Esquema II.3. Crecimiento de dendrímeros catiónicos basados en sales de fosfonio.

Sin embargo, la forma más extendida de diseñar dendrímeros catiónicos implica que sea un átomo de nitrógeno el que soporte la carga positiva, debido a la sencillez de las reacciones químicas implicadas.

Dentro de este grupo hay que englobar a los dendrímeros con el uso más extendido en la literatura, debido a que están disponibles comercialmente, los dendrímeros PAMAM y PPI. La preparación de estos dendrímeros supone el emplazamiento de grupos amino en la periferia de la molécula. Estos grupos se

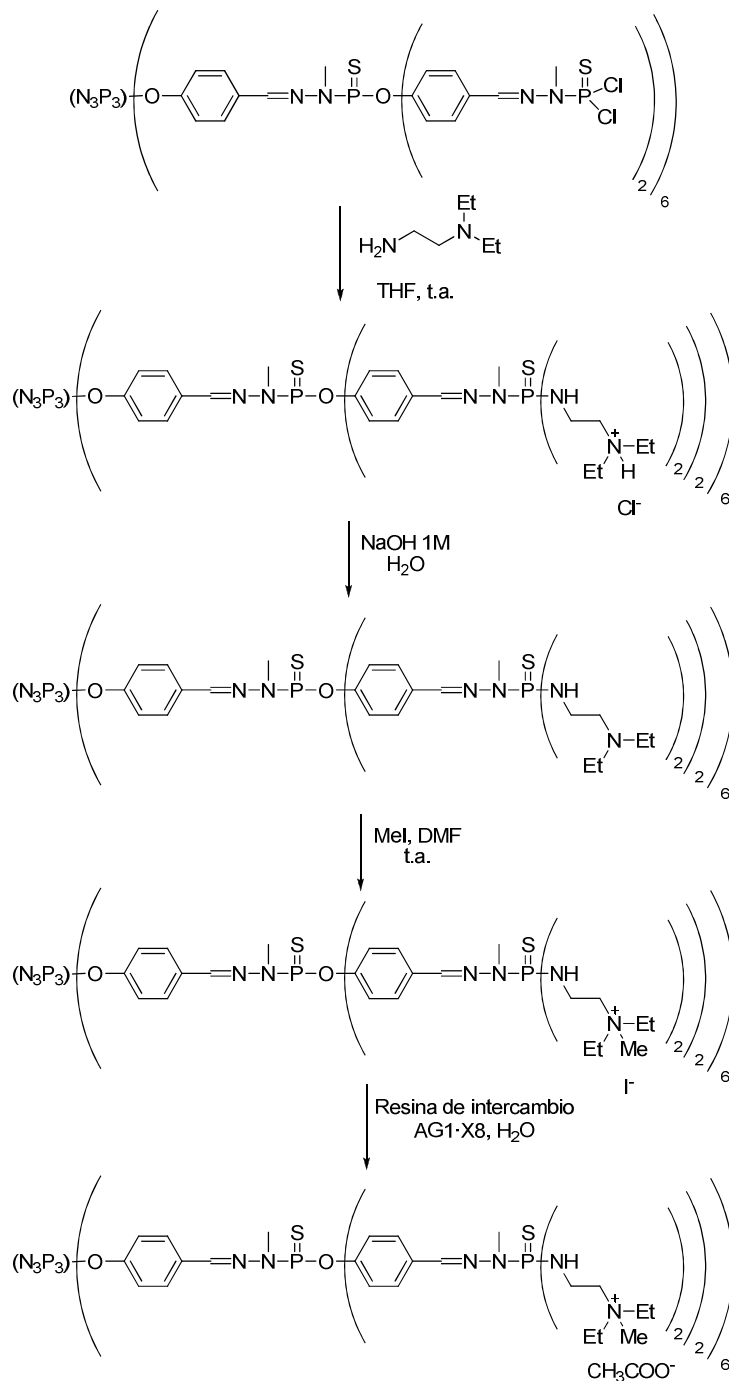
ionizan en medio prótico con facilidad por medio de los grupos amino tanto del esqueleto como de la esfera externa.

En el caso de los dendrímeros PPI, estudios de valoración de pH han concluido que la curva de valoración de los dendrímeros posee dos puntos de inflexión. El primero supone la protonación de los grupos amino externos, primarios y por tanto más accesibles, a un pH cercano a 10, mientras que el segundo es la protonación de los grupos amino terciarios a un pH de aproximadamente 6. Entre ambos estados se encuentra una etapa de protonación a un pH cercano al fisiológico en el que aproximadamente 2/3 de los sitios ionizables están protonados. Además, aplicando un modelo de Ising se puede concluir que a este pH los grupos amino de las capas impares están protonados, mientras que las capas pares están desprotonadas, de este modo se minimizan las repulsiones electrostáticas.¹⁸ Esto ha sido confirmado mediante estudios de RMN-¹⁵N, en los que se observan 3 resonancias relativas a los distintos tipos de nitrógenos de la molécula (los situados en el núcleo, en la periferia y los internos). A medida que se hace bajar el pH se observan modificaciones de cada una de estas señales (no se observan en ningún momento más de tres señales debido a que el intercambio de protones es más rápido que la escala de tiempos del RMN) que reflejan que el primer grupo en protonarse son los de la esfera externa del dendrímero, a continuación se protonan los nitrógenos del núcleo y por último los nitrógenos de las capas intermedias.¹⁹

Estudios similares han sido realizados con dendrímeros PAMAM, y muestran resultados análogos. Macroscópicamente se observa en las curvas de valoración que a pH altos se protonan las aminas primarias, seguidamente se protonan los grupos amino terciarios del núcleo del dendrímero y por último se protonan los grupos amino terciarios de las capas internas sin que se vean afectados los enlaces tipo amido que contiene la estructura.²⁰

Otros ejemplos de dendrímeros catiónicos pasan por una estrategia similar a la expuesta previamente para los dendrímeros PPI y PAMAM y supone cuaternizar átomos de nitrógeno con diferentes agentes alquilantes, como por ejemplo diversos haluros de alquilo. Majoral y colaboradores han utilizado este método para sintetizar dendrímeros basados en fósforo solubles en agua para su uso en aplicaciones

biomédicas. Utilizando distintos métodos consiguen dendrímeros cuyos nitrógenos de la periferia están cuaternizados con diversos agentes cuaternizantes. Además son capaces de obtener estas macromoléculas con varios contraiones (Esquema II.4).²¹



Esquema II.4. Dendrímeros catiónicos basados en fósforo.

Otro ejemplo de cuaternización de heteroátomos para conseguir dendrímeros catiónicos fue llevado a cabo por van Koten y colaboradores, que han utilizado con

éxito esta técnica sintetizando diversos dendrímeros con carga positiva en las capas internas de un dendrímero. Para ello usaron como agente alquilante cuñas de pequeño tamaño de tipo Fréchet, para a continuación anclar complejos metálicos mediante interacciones electrostáticas. Lo que se produce es un núcleo catiónico fenilsilano decorado con dendrones tipo Fréchet que aportan una capa exterior hidrofóbica.²² Este soporte dendrítico ha sido utilizado mediante el mismo procedimiento para anclar otros compuestos organometálicos (Figura II.2).

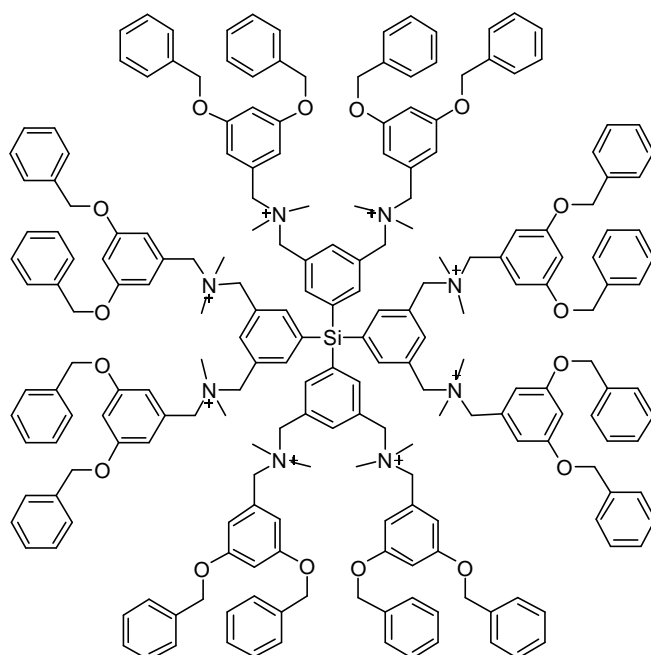


Figura II.2. Dendrímeros catiónicos utilizados como soporte para catalizadores.

Otro agente cuaternizante que ha sido utilizado por Chow y colaboradores, en 2003 (Figura II.3) para la obtención de dendrímeros catiónicos, es el ácido trifluoroacético, que fue aplicado, para en un mismo paso de reacción, desproteger los grupos amino terminales de un dendrímero basado en β -alanina y cuaternizarlos con un protón para obtener una familia de dendrímeros solubles en agua.²³

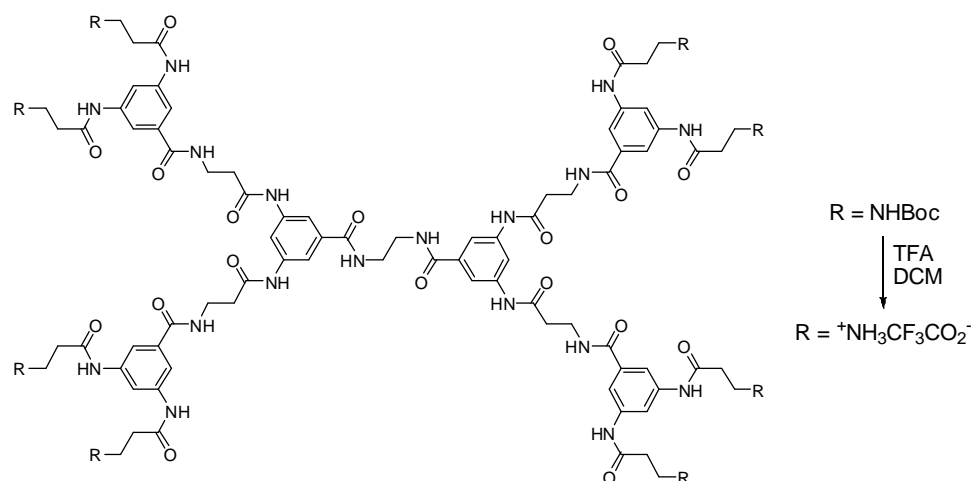


Figura II. 3. Dendrímeros catiónicos basados en β -alanina.

En 2009 se publicó un trabajo en que se prepararon dendrímeros catiónicos basados en unidades de piridilfenileno. La cuaternización de los nitrógenos de las estructuras se llevó a cabo utilizando sulfato de dimetilo. Estos dendrímeros cargados se caracterizan por poseer la carga positiva en el interior de la estructura deslocalizada en el anillo aromático en vez de en la periferia. Además, en el trabajo se constató la capacidad de estos dendrímeros para formar interacciones estables con material genético, incluso la adición de un medio salino con una fuerza iónica equivalente a la fisiológica fue incapaz de romper esta interacción, lo que sugiere que estos complejos pueden utilizarse para transfectar material genético al interior celular sin que el complejo se vea alterado en el endosoma al ser internalizado.²⁴

Además, el dendrímero puede ser utilizado como el propio agente cuaternizante, de este modo, Luo y colaboradores sintetizaron dendrímeros de tercera a quinta generación basados en polilisina cuya periferia fue modificada para formar sales de imidazolio. La síntesis se basa en un ataque nucleófilo a un dendrímero decorado con átomos de bromo por parte de un anillo de imidazol que posee uno de sus nitrógenos sin sustituir. Esto conduce a dendrímeros con 24, 48 y 96 cargas positivas en su estructura.²⁵

Los dendrímeros mostrados en este apartado tan sólo forman una pequeña parte de los muchos tipos de estructuras dendríticas que pueden formarse no sólo en

cuanto al esqueleto sino a los múltiples agentes cuaternizantes que pueden utilizarse para generar las cargas positivas en la estructura.

2.1.3 SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS CARBOSILANO CATIÓNICOS

La obtención de dendrímeros de silicio catiónicos se realiza de un modo similar a como se ha comentado en el punto anterior. Las dos estrategias fundamentales que se han seguido hasta este momento son la coordinación de un núcleo metálico y la cuaternización de grupos amino de la periferia utilizando distintos agentes alquilantes.

1. Coordinación de un centro metálico

Los dendrímeros basados en silicio son frecuentemente los esqueletos dendríticos preferidos a la hora de formar metalodendrímeros. Aunque los dendrímeros PAMAM y PPI son comerciales, su alta polaridad y falta de solubilidad en numerosos disolventes orgánicos los hacen poco adecuados para este uso. Es por ello que se recurre a estructuras más apolares como por ejemplo los dendrones tipo Fréchet o los dendrímeros de silicio.

El primer trabajo de un metalodendrímero catiónico fue publicado en 1998 por Tilley y colaboradores. En él dendrímeros de estructura carbosilano de primera y segunda generación decorados con grupos bencilo se coordinan a átomos de rutenio con ligandos pentametilciclopentadienilo (Cp*) completando la esfera de coordinación del metal. Estas estructuras fueron caracterizadas mediante resonancia magnética nuclear, MALDI-TOF y más tarde se consiguieron cristales adecuados para su análisis mediante difracción de rayos X confirmándose la estructura, siendo este uno de los primeros ejemplos de estructuras cristalinas en dendrímeros (Figura II.4).²⁶

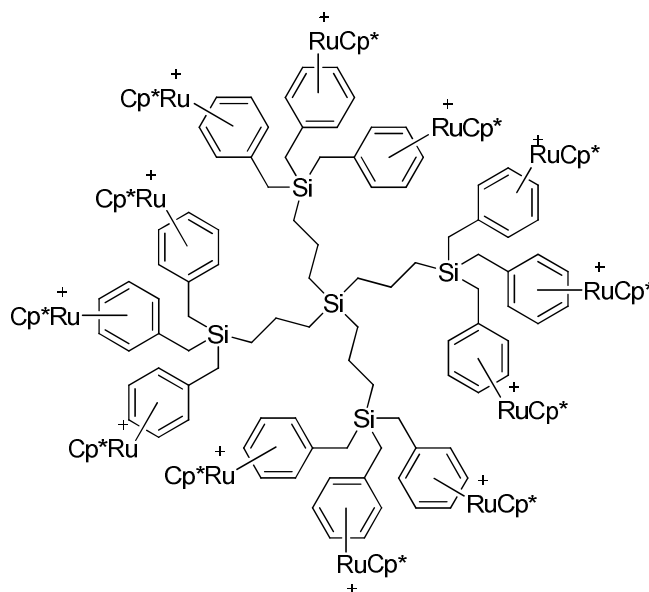


Figura II.4. Metalodendrímtero catiónico con estructura carbosilano.

Otro ejemplo de dendrímeros carbosilano catiónicos metálicos, son los sintetizados para obtener catalizadores de rodio e iridio para la hidrogenación de alquenos. Para ello se sintetizaron dendrímeros carbosilano de modo divergente de distintas generaciones decorados con grupos fosfina en la periferia. La formación del metalodendrímtero se realizó haciendo reaccionar el dendrímtero con compuestos metálicos del tipo $[MCl(cod)]_2$ en presencia de triflato de plata, para poder abstraer el átomo de cloro y dar el compuesto cargado.²⁷

2. Cuaternización de grupos amino

La obtención de dendrímeros catiónicos carbosilano solubles en agua hasta la fecha se realiza cuaternizando aminas en la periferia del dendrímtero. La cuaternización de estas aminas altera las características de polaridad de los dendrímeros carbosilano, que pasan a ser solubles en agua a bajas generaciones. A medida que se aumenta de generación el carácter apolar del esqueleto cobra mayor importancia reduciéndose la solubilidad de la macro molécula.

El primer dendrímtero de silicio catiónico sintetizado por este método fue preparado por Seyferth y Krska. En este trabajo se crecían los dendrímeros dejando funciones terminales tipo $SiCH_2Cl$, a continuación se producía una sustitución

nucleófila del átomo de halógeno por una molécula con un átomo de azufre terminal. Por último, el tratamiento del dendrímero con MeI o HCl conducía a dendrímeros catiónicos solubles en agua (Figura II.5).²⁸ Estos dendrímeros fueron caracterizados, además de por las técnicas habituales de RMN-¹H y RMN-¹³C, por espectrometría de masas MALDI-TOF, lo que constituye uno de los primeros ejemplos del uso de esta técnica aplicada al campo de la caracterización de dendrímeros.²⁸

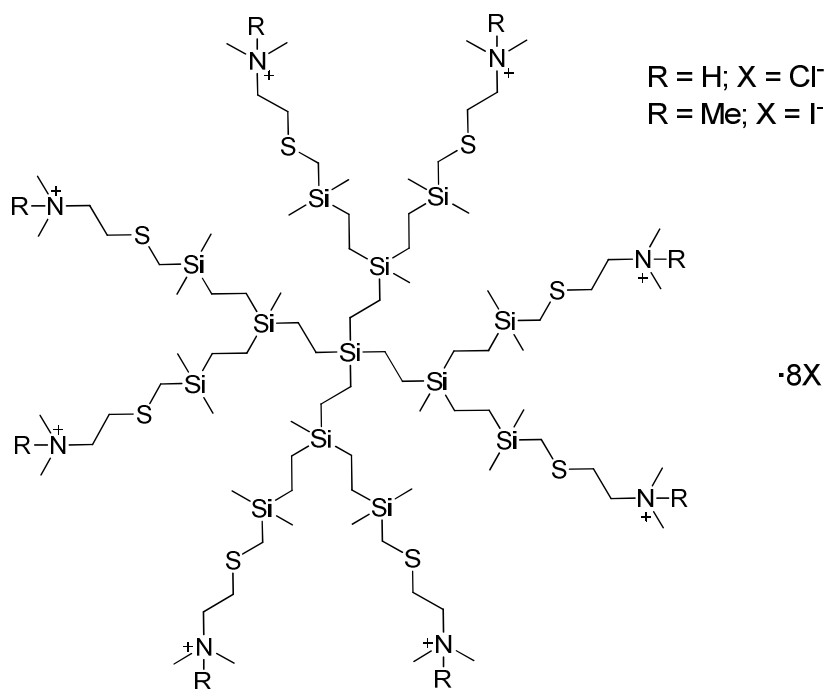
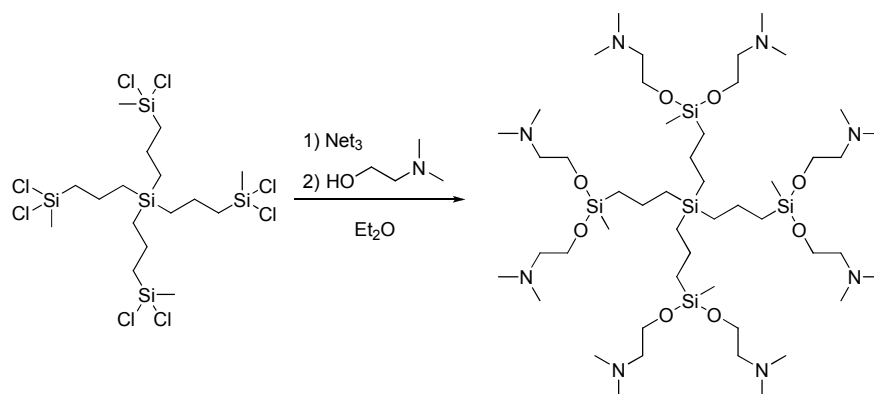


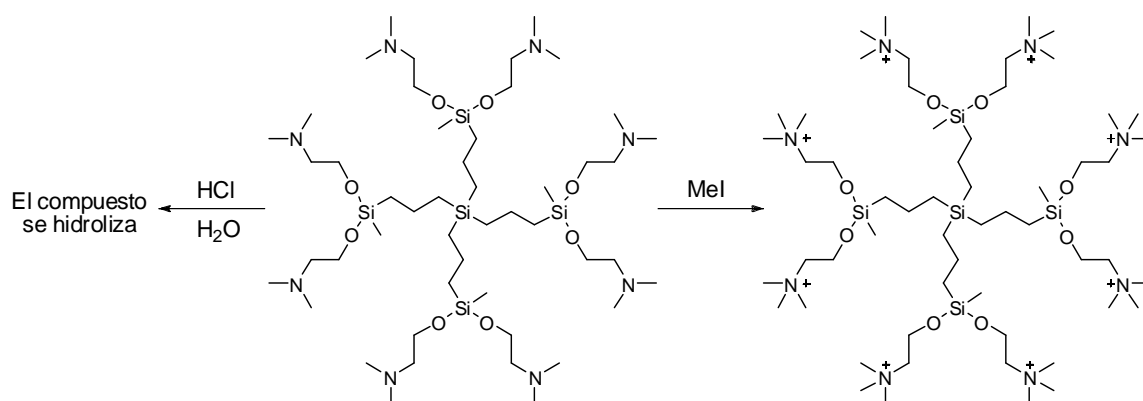
Figura II.5. Primer dendrímero carbosilano catiónico sintetizado.

En nuestro grupo de investigación, en los últimos años se han desarrollado varias generaciones de dendrímeros carbosilano catiónicos utilizando una metodología similar a la desarrollada por Lang para la síntesis de dendrímeros siloxano,^{3,4} para ser utilizados en la transfección de material genético en el interior celular. En una de las primeras familias sintetizadas, el grupo amino terminal era situado en la periferia del dendrímero mediante el ataque nucleófilo de un alcohol sobre diversos esqueletos carbosilano decorados con átomos de cloro (Esquema II.5).



Esquema II.5. Dendrímtero carbosilano de primera generación sintetizado mediante alcoholisis.

Los dendrímeros resultantes fueron cuaternizados con MeI. Cuando la cuaternización de estos dendrímeros se llevaba a cabo con cloruro de hidrógeno los dendrímeros se descomponían debido a la sensibilidad a la hidrólisis del enlace Si-O (Esquema II.6). Esto puede ser de utilidad en la liberación controlada de principios activos en medio acuoso, ya que los dendrímeros se irían degradando paulatinamente arrojando al medio biológico el medicamento.²⁹



Esquema II.6. Reacciones de cuaternización de un dendrímero con enlaces Si-O en la capa externa.

También en nuestro grupo de investigación se han sintetizado macromoléculas dendríticas que no son sensibles a la hidrólisis de sus enlaces. Para ello se sintetizaron dendrímeros que sustituían las uniones del tipo Si-O por enlaces Si-C. Se partió de dendrímeros con grupos Si-H terminales y diversas alilaminas y se procedió a una hidrosililación con el catalizador de Karstedt. Estos dendrímeros sí pudieron

cuaternizarse con cloruro de hidrógeno, además de con Mel o con triflato de metilo (Figura II.6).³⁰

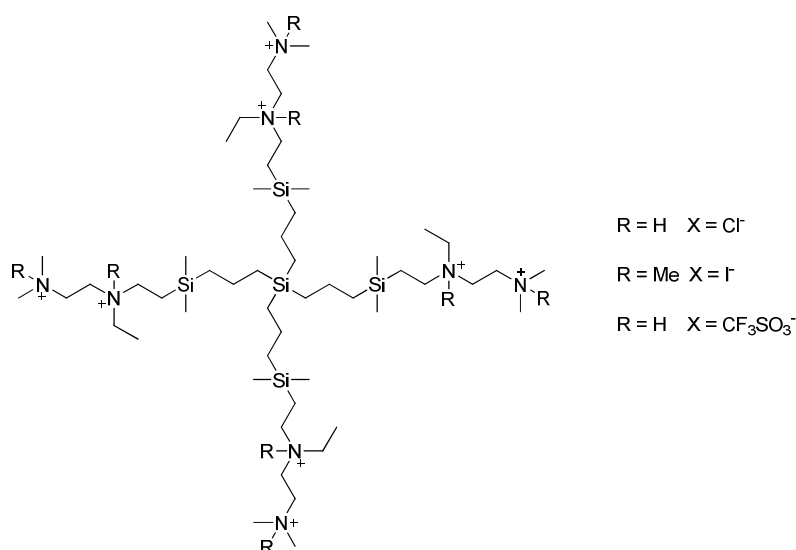


Figura II.6. Dendrímtero de primera generación no degradable en medio acuoso.

2.2 SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS CARBOSILANO PRECURSORES

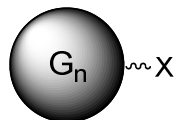
La complejidad de los sistemas dendríticos crea problemas a la hora de realizar la nomenclatura. Si se usa la nomenclatura estándar de la IUPAC se producen nombres extremadamente largos que son muy difíciles de interpretar correctamente. Por ello, de forma general, los dendrimeros en esta memoria se nombraran del siguiente modo:

$$G_n X_m$$

En esta fórmula cada término hace referencia a:

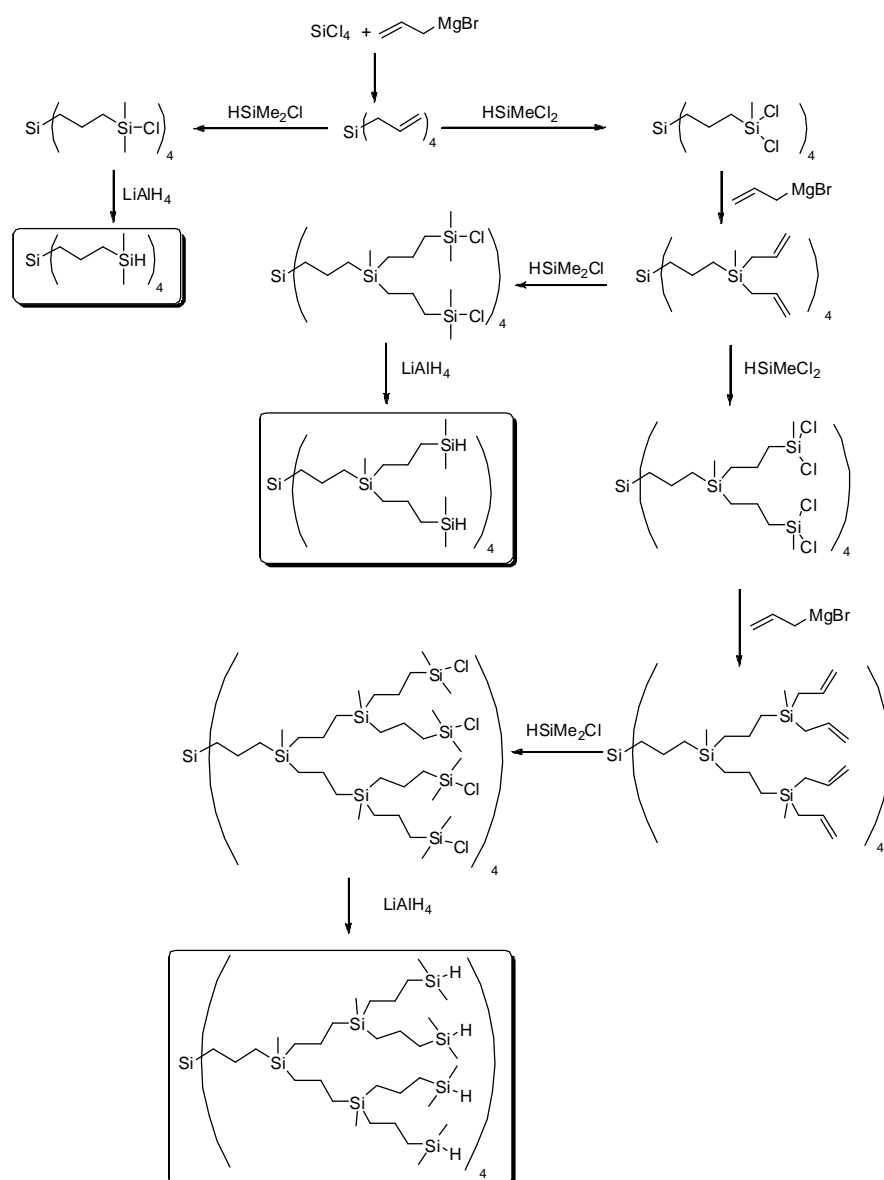
- G: representa el esqueleto carbosilano.
- n: indica la generación del dendrímtero, es decir el número de capas de silicio que se han añadido a la estructura central.
- X: señala la naturaleza de los grupos terminales situados en la periferia del dendrímtero.
- m: hace referencia al número de grupos terminales presentes en la estructura.

Para mayor claridad, los esquemas de estos dendrímeros se representarán con una sola rama y sin mostrar el esqueleto interior de la estructura, del siguiente modo:



La síntesis de dendrímeros carbosilano precursores se ha realizado de acuerdo a la metodología descrita en la literatura por Morán,³¹⁻³³ van Leeuwen,^{34,35} Roovers^{1,2,36} y Seyferth.³⁷⁻⁴⁰

Los dendrímeros fueron sintetizados utilizando el método divergente, partiendo de SiCl_4 y alternando reacciones de alquencilación con un reactivo de Grignard y reacciones de hidrosililación. Las hidrosililaciones se llevan a cabo con el derivado clorosilano correspondiente como disolvente y el catalizador de Speier. Por último, para obtener las estructuras que han sido utilizadas en esta memoria se sustituyen los átomos de cloro terminales por átomos de hidrógeno por tratamiento con LiAlH_4 (Esquema II.7).



Esquema II.7. Síntesis de dendrimeros carbosilano precursores.

2.3 SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS CARBOSILANO CATIÓNICOS MEDIANTE “CLICK CHEMISTRY”

En este apartado se describe la síntesis de dendrimeros catiónicos basados en esqueleto carbosilano, continuando así con una de las líneas de investigación realizada en el grupo durante los últimos años. Para ello, se ha utilizado la reacción de cicloadición 1,3-dipolar entre alquinos y azidas catalizada por cobre, que da lugar a la formación de anillos de triazol. Esta reacción está englobada dentro de la denominada “click chemistry”, debido a la sencillez de la metodología necesaria junto con los altos

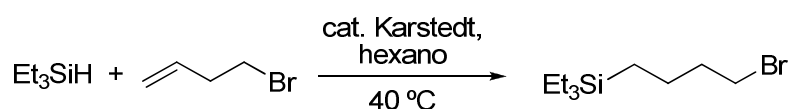
rendimientos y la selectividad total de la reacción. Como ya se ha comentado en el primer capítulo de esta memoria, la compatibilidad de la reacción con numerosos grupos funcionales y las condiciones de reacción necesarias sencillas permiten decorar la periferia de dendrímeros confiriéndoles las propiedades deseadas.

En primer lugar se ha tenido que abordar la síntesis de dendrímeros terminados en grupos azida. Estas estructuras dendríticas han resultado ser una plataforma adecuada para generar una considerable variedad de dendrímeros con diversas características dependiendo de la naturaleza de los grupos que posean.

2.3.1 SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS TERMINADOS EN GRUPOS BROMO Y AZIDA

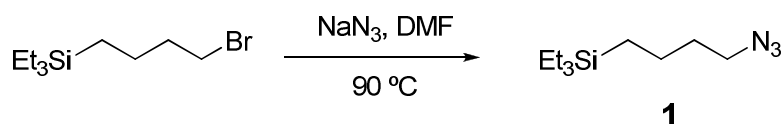
En esta sección se describe la síntesis de las estructuras dendríticas precursoras terminadas en un grupo azida por rama. Para ello, primero se prepara un modelo que imita la periferia de los dendrímeros que se pretenden sintetizar. A estos compuestos se les denominará de ahora en adelante en esta memoria, modelo molecular o generación cero. Las condiciones de reacción que se emplean en la síntesis de estas moléculas junto con los datos de caracterización estructural, son fácilmente extrapolados a las estructuras dendriméricas de generaciones superiores.

El primer paso de reacción para obtener derivados azida consiste en obtener compuestos terminados en átomos de bromo. Para ello, se realiza una reacción de hidrosililación de 4-bromo-1-buteno con trietilsilano catalizada por el catalizador de Karstedt a 40 °C en hexano y 4 horas de reacción que conduce, tras el proceso de aislamiento, al bromoderivado $G_0[(CH_2)_4Br]$. (Esquema II.8). Este compuesto está descrito en la bibliografía con un método sintético distinto pero se incluye aquí para poder comparar con los compuestos de generaciones superiores.⁴¹



Esquema II.8. Síntesis del bromoderivado de generación cero.

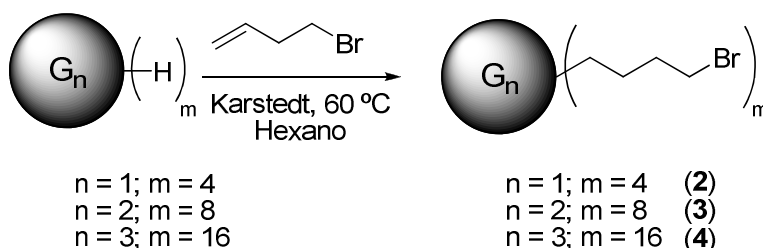
A continuación, el sistema bromado de generación cero se hace reaccionar con azida sódica en un exceso de 5:1 frente al derivado de bromo, en DMF a 90 °C durante 16 horas. Tras ello, se evapora el disolvente y se lava con agua para eliminar los restos de azida sódica y bromuro de sodio que pudieran permanecer en la fase orgánica. Esto conduce a la obtención del derivado $G_0[(CH_2)_4N_3]$ (**1**) con un rendimiento del 99% (Esquema II.9).



Esquema II.9. Síntesis del derivado azida **1**.

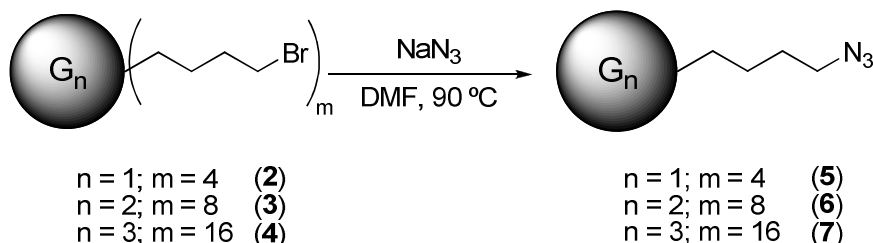
Una vez determinadas las condiciones idóneas que conducen al derivado **1** se prepararon las generaciones 1, 2 y 3 de dendrímeros carbosilano utilizando como productos de partida los dendrímeros precursores $G_n\text{-H}_m$ descritos previamente en este capítulo.

Primero se realizó la hidrosililación de 4-bromo-1-buteno utilizando los dendrímeros $G_n\text{-H}_m$ y el catalizador de Karstedt para obtener los dendrímeros $G_n[(CH_2)_4Br]_m$ ($n = 1, m = 4$, (**2**); $n = 2, m = 8$, (**3**); $n = 3, m = 16$, (**4**)). Para acelerar la reacción con respecto a la generación cero, las hidrosililaciones se realizaron a 60 °C. Las generaciones 2 y 3 no supusieron ningún problema en este paso de reacción, sin embargo, la primera generación requirió que se adicionara mayor cantidad de catalizador (Esquema II.10).



Esquema II.10. Síntesis de los dendrímeros bromados **2-4**.

A continuación, la sustitución de los átomos de bromo por grupos azida se llevó a cabo utilizando las condiciones de reacción ensayadas en la generación cero, obteniéndose los compuestos $G_n[(CH_2)_4N_3]_m$ ($n = 1, m = 4$, (5); $n = 2, m = 8$, (6); $n = 3, m = 16$, (7)), como se muestra en el Esquema II.11.



Esquema II.11. Preparación de dendrímeros carbosilano de generación 1-3 con grupos azida terminales.

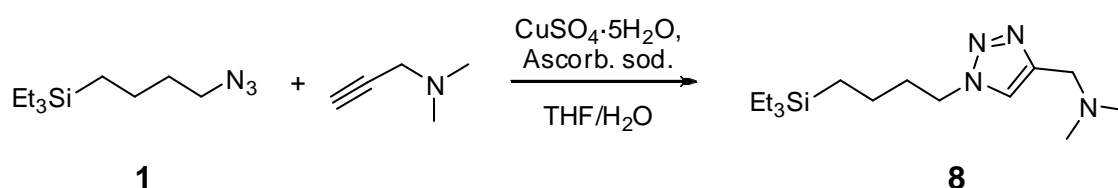
Los compuestos 1-7 se obtuvieron en forma de aceites viscosos solubles en los disolventes orgánicos de uso común en el laboratorio.

2.3.2 SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS TERMINADOS EN GRUPOS AMINA

La preparación de los dendrímeros catiónicos se realiza introduciendo grupos amino mediante “click chemistry”. Este esquema de síntesis se utiliza tanto para preparar dendrímeros con una carga positiva como con dos cargas positivas por rama. La preparación de estos últimos derivados se realiza para aumentar la carga superficial que podría ayudar a favorecer la solubilidad de estos derivados en agua y además, puede aportar diferencias al emplear estos dendrímeros catiónicos como vehículos de transporte de ácidos nucleicos, que es uno de los objetivos de este trabajo.

Al igual que en los dendrímeros previamente descritos en este capítulo, se desarrollaron las condiciones de reacción primeramente en el modelo de generación cero. Para ello, el derivado azida **1** se utiliza como precursor para introducir grupos amino a través de la cicloadición de Huisgen catalizada por cobre entre azidas y alquinos para la formación de triazoles. De esta forma, se hace reaccionar **1** con N,N-dimetilpropargilamina en exceso y en presencia de especies de Cu(I), quedando ambos fragmentos unidos por un espaciador tipo triazol. Para ello, se disuelven

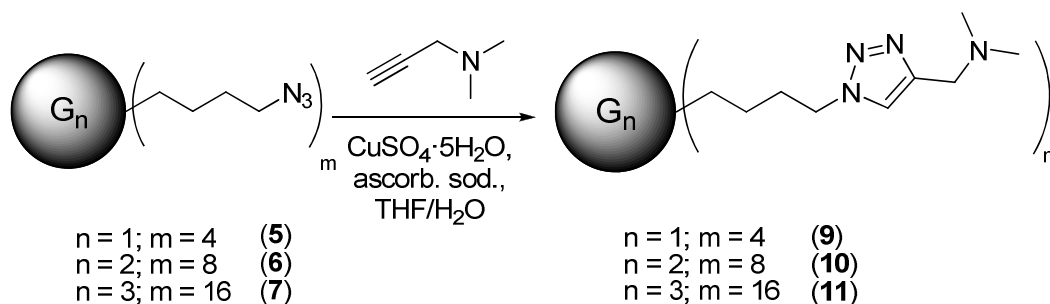
ambos derivados orgánicos en THF y se añaden una disolución acuosa de sulfato de cobre pentahidratado al 5% y otra de ascorbato sódico al 10%, ambas con respecto al número de grupos azida. La mezcla se deja reaccionar a temperatura ambiente 4 horas y se interrumpe la reacción añadiendo una pequeña proporción de hidróxido de amonio para capturar los restos de cobre en forma de hexaaminocomplejo. De este modo se obtiene el compuesto $G_0[(CH_2)_4(C_2HN_3)CH_2NMe_2]$ (**8**). La fase orgánica se evapora para retirar las fracciones volátiles (Esquema II.12).



Esquema II.12. Reacción de cicloadición entre azida y alquino para obtener el derivado **8**.

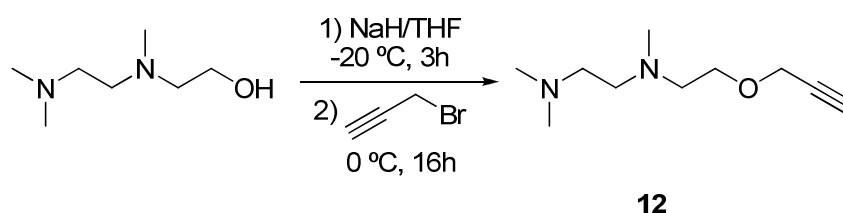
Aunque la reacción se puede realizar en diversos disolventes, como por ejemplo tolueno, con disolventes miscibles con el agua se obtienen mejores rendimientos y tiempos de reacción más cortos, debido a que son capaces de poner en contacto con más eficacia a los compuestos de partida con el catalizador de cobre. Se ha observado en nuestro grupo de investigación que el THF es un buen disolvente para nuestros compuestos debido a que es capaz de solubilizar los dendrímeros carbosilano y es miscible con agua en todas las proporciones. Estas características no son compartidas por otros disolventes típicamente usados en esta reacción como el tertbutanol, isopropanol o DMF.

Una vez determinadas las condiciones idóneas para llevar a cabo la reacción con la generación cero, se prepararon las generaciones 1, 2 y 3 de dendrímeros carbosilano utilizando como productos de partida los dendrímeros precursores **5-7** descritos previamente en este capítulo y las mismas condiciones de reacción (Esquema II.13). De este modo, se obtuvieron los derivados triazólicos $G_n[(CH_2)_4(C_2HN_3)CH_2NMe_2]_m$ ($n = 1, m = 4$, (**9**); $n = 2, m = 8$, (**10**); $n = 3, m = 16$, (**11**)). Todos los compuestos neutros se obtuvieron en forma de aceites viscosos solubles en los disolventes orgánicos de uso común en el laboratorio (Esquema II.13).

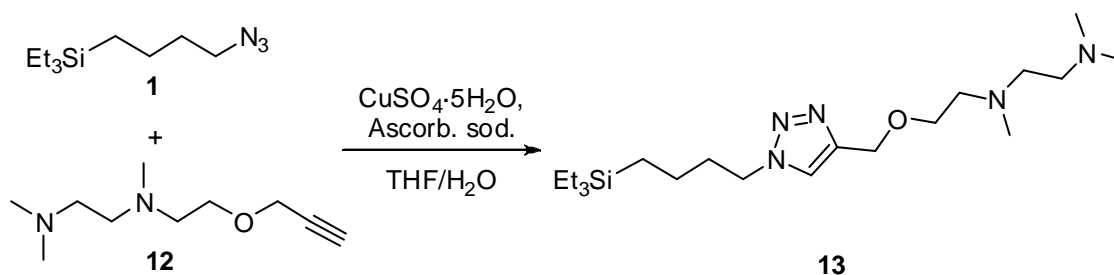


Esquema II.13. Síntesis de dendrímeros 9-11.

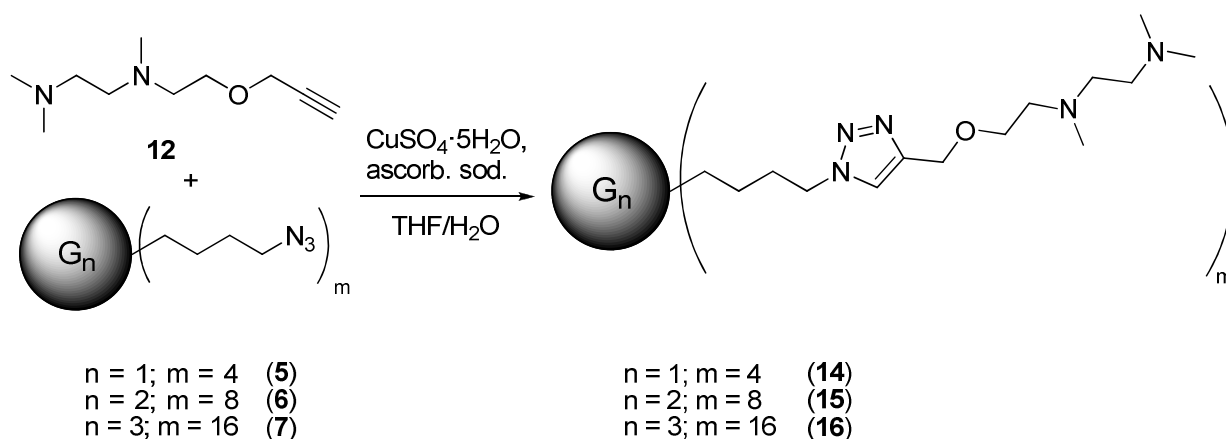
La síntesis de un modelo con dos grupos amino terminales se llevó a cabo preparando previamente un alquino con dos grupos amino susceptibles de ser cuaternizados. Así, se partió de 2-[[2(dimetilamino)etil]metilamino]etanol que fue añadido a una suspensión de hidruro sódico, para poder abstraer el protón del grupo alcohol, a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Transcurridas 3 horas se retira el baño, la mezcla se pone a $0\text{ }^\circ\text{C}$ y se añade bromuro de propargilo en un ligero exceso. La mezcla se agita 16 horas dejando que adquiera temperatura ambiente. A continuación, se neutraliza el exceso de hidruro sódico a $0\text{ }^\circ\text{C}$ con agua destilada y se realiza una extracción, obteniéndose el derivado $[\text{NMe}_2(\text{CH}_2)_2\text{NMe}(\text{CH}_2)_2\text{CCH}]$ (**12**) como un aceite amarillo oscuro que se utiliza sin necesidad de más purificación (Esquema II.14).

Esquema II.14. Síntesis del derivado alquino **12**.

La especie identificada como $\text{G}_0[(\text{CH}_2)_4\text{C}_2\text{HN}_3\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{NMe}(\text{CH}_2)_2\text{NMe}_2]$ (**13**), se prepara en las condiciones previamente ensayadas en la síntesis del derivado **8**, añadiendo el alquino **12** en cantidad estequiométrica (Esquema II.15).

Esquema II.15. Síntesis del derivado triazol **13**.

Las reacciones que conducen a los dendrimeros de generaciones 1 a 3 con el doble de grupos amino por rama fueron llevadas a cabo utilizando las condiciones desarrolladas durante la síntesis de la generación cero. Los dendrimeros neutros así sintetizados fueron purificados utilizando una columna de exclusión de tamaños para eliminar los restos que pudieran quedar de amina, ya que ésta, a diferencia de la N,N-dimetilpropargilamina, no es volátil. Se obtienen así los compuestos $G_n[(CH_2)_4(C_2HN_3)CH_2O(CH_2)_2NMe(CH_2)_2NMe_2]_m$ ($n = 1, m = 4$, (**14**); $n = 2, m = 8$, (**15**); $n = 3, m = 16$, (**16**)) (Esquema II.16).

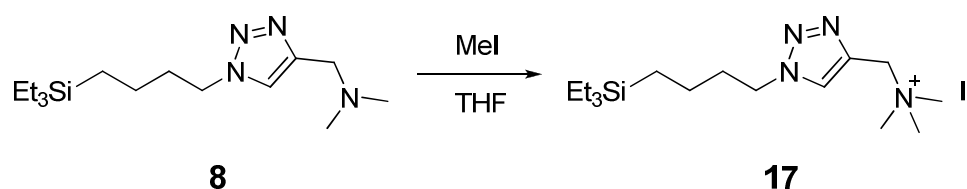
Esquema II.16. Obtención de las especies **14-16** mediante una cicloadición de Huisgen.

2.3.3 SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS TERMINADOS EN GRUPOS AMONIO

El último paso en la preparación de dendrimeros catiónicos consiste en la cuaternización de los nitrógenos externos. Esta reacción se lleva a cabo utilizando un agente metilante como MeI, que sufre un ataque por parte de los pares de electrones

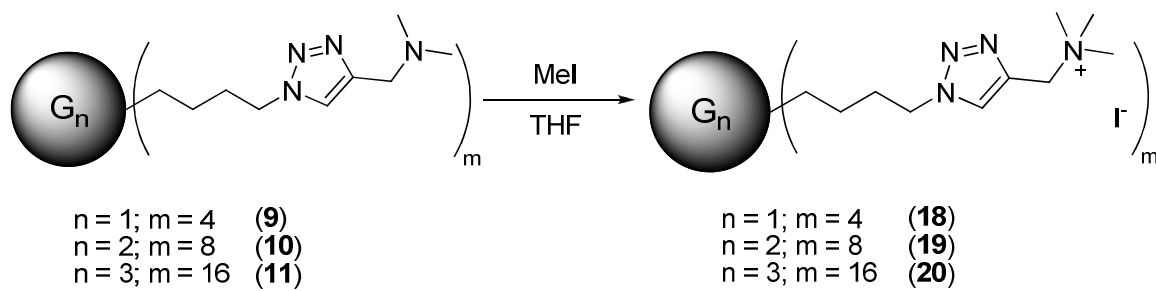
sin compartir de los nitrógenos terciarios de los dendrímeros. Esto conduce a compuestos dendríticos solubles en disolventes muy polares como H₂O y DMSO.

Las condiciones de reacción de estas preparaciones también se ensayaron previamente sobre las moléculas modelo de generación cero. Para ello se disuelve en THF la especie de partida **8** y se añade MeI en un ligero exceso a temperatura ambiente. Transcurridas 13 horas, el compuesto final ha precipitado en el medio de reacción y puede filtrarse eliminando las impurezas solubles en el disolvente. Por último, se seca el producto a vacío eliminando tanto las trazas de disolvente y de especies volátiles. El compuesto G₀[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂N⁺Me₃] (**17**) se obtiene como un sólido blanco soluble en H₂O y DMSO con un rendimiento cuantitativo (Esquema II.17).



Esquema II.17. Reacción de cuaternización del derivado **8**.

Las condiciones descritas previamente son las llevadas a cabo para la preparación de las estructuras dendríticas de generaciones 1 a 3 denominadas G_n[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂N⁺Me₃]_m (n = 1, m = 4, (**18**); n = 2, m = 8, (**19**); n = 3, m = 16, (**20**)) (Esquema II.18). Todos los derivados catiónicos se obtuvieron como sólidos blanco-amarillentos. Los dendrímeros de primera y segunda generación catiónicos son solubles tanto en agua como en DMSO, sin embargo, el dendrímero de tercera generación, aunque es soluble en DMSO, no es posible disolverlo en agua por completo, debido a que las cargas positivas de la periferia no son capaces de compensar la apolaridad de la estructura interna. Los rendimientos globales de la ruta sintética son buenos en general, aunque van decreciendo a medida que se preparan generaciones mayores. Esto es debido a que a medida que los dendrímeros aumentan de generación poseen una mayor capacidad de formar agregados insolubles en todo tipo de disolventes.



Esquema II.18. Síntesis de los dendrimeros **18-20**.

En la Figura II.7 se muestran las estructuras completas de los dendrimeros carbosilano catiónicos **18-20**.

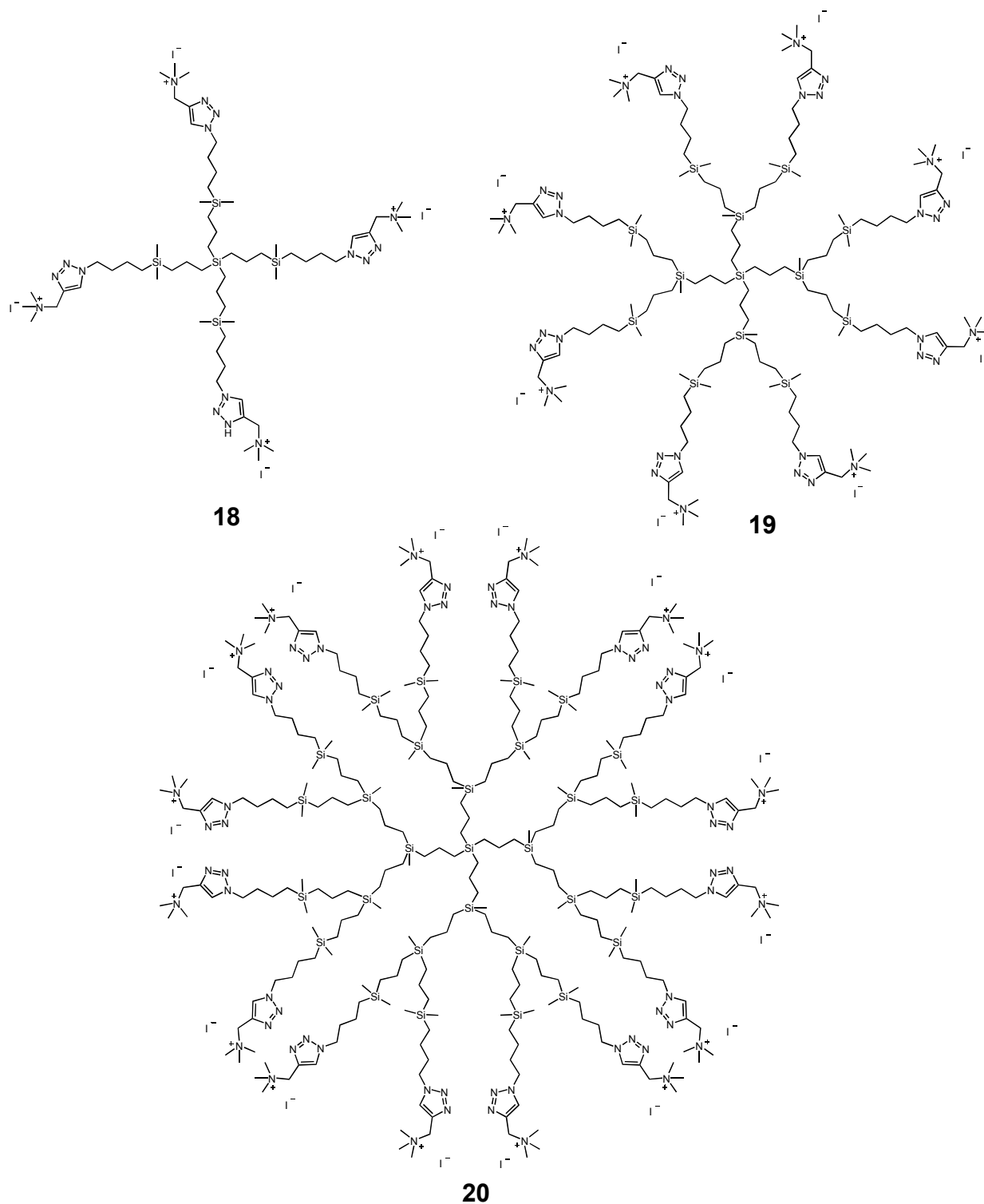
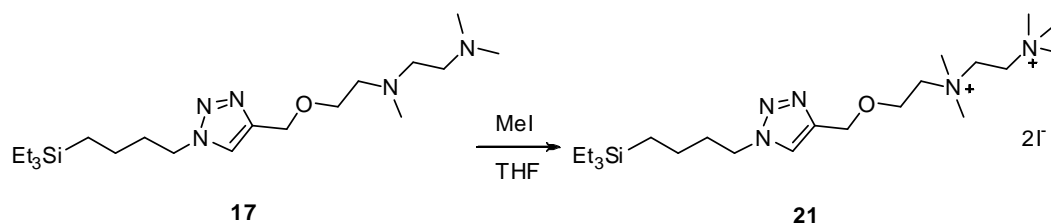


Figura II.7. Estructuras propuestas para los dendrímeros catiónicos sintetizados vía “click chemistry” **18-20**.

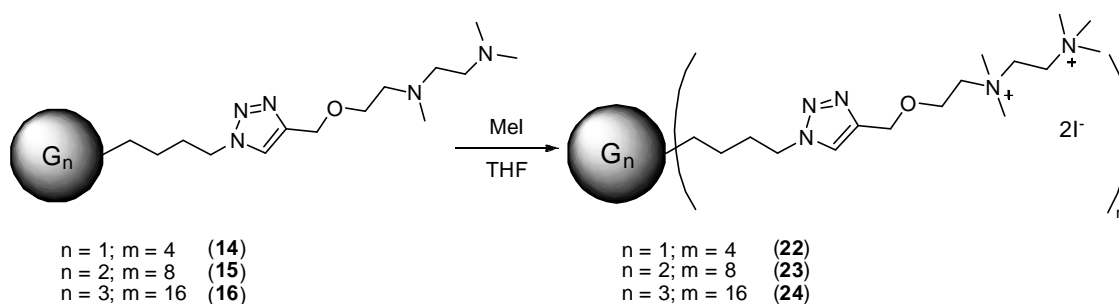
De un modo análogo a lo expuesto hasta ahora, la cuaternización de las estructuras con dos grupos amino se lleva a cabo utilizando las mismas condiciones de reacción que para la obtención del derivado **17**, variando únicamente la estequiometría en la que se añade el MeI. Al igual que en lo expuesto hasta ahora, la

reacción de metilación se llevó a cabo primero con el modelo de generación cero obteniéndose el derivado $G_0[(CH_2)_4(C_2HN_3)CH_2O(CH_2)_2N^+Me_2(CH_2)_2N^+Me_3]$ (**21**), soluble tanto en D_2O como DMSO, como se muestra en el Esquema II.19.



Esquema II.19. Síntesis del compuesto **21** mediante tratamiento con MeI.

Por último, la obtención de los dendrímeros con dos cargas por rama, se lleva a cabo de modo análogo a la síntesis de **21**, obteniéndose los compuestos $G_n[(CH_2)_4(C_2HN_3)CH_2O(CH_2)_2N^+Me_2(CH_2)_2N^+Me_3]_m$ ($n = 1, m = 4$, (**22**); $n = 2, m = 8$, (**23**); $n = 3, m = 16$, (**24**)) con buenos rendimientos como sólidos amarillos solubles en agua y en DMSO (Esquema II.20). En esta familia la presencia de una segunda carga positiva por rama es capaz de compensar la apolaridad del esqueleto dendrítico del compuesto de tercera generación **24**, en comparación con el compuesto **20**, haciendo que sea soluble en agua.



Esquema II.20. Esquema de síntesis de la preparación de los dendrímeros **22-24**.

En la Figura II.8 se muestran las estructuras completas de los dendrímeros carbosilano catiónicos **22-24**, con dos cargas positivas por rama en la periferia.

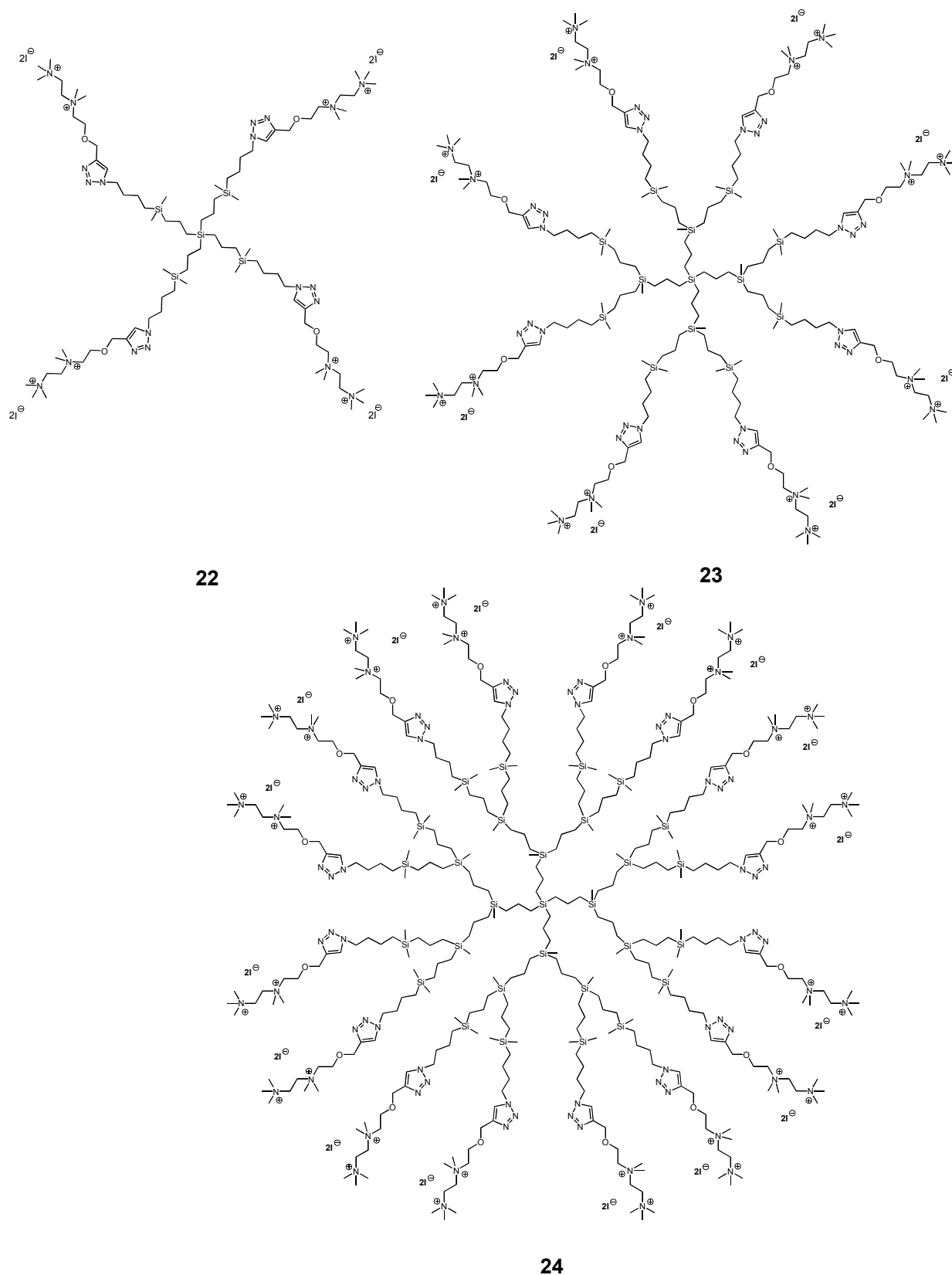


Figura II.8. Estructuras propuestas para los dendrímeros catiónicos sintetizados vía “click chemistry” **22-24**.

2.4 ESTUDIO ESTRUCTURAL

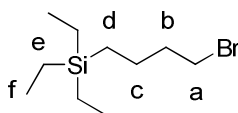
Los dendrimeros sintetizados en este capítulo han sido caracterizados mediante análisis elemental de C, H, N y espectroscopía de RMN de ^1H , ^{13}C y ^{29}Si , así como por espectrometría MALDI-TOF. Los datos completos se encuentran en la sección experimental de esta memoria. En todos los casos presentados en esta memoria se describe la parte externa de la rama dendrítica y el número de protones asignados a cada grupo por tanto se corresponde con una fracción de los que se encuentran en la estructura final.

2.4.1 ESPECTROSCOPIA DE RMN DE DENDRIMEROS TERMINADOS EN GRUPOS BROMO Y AZIDA

A continuación, se comentan los datos espectroscópicos más significativos de los distintos derivados de generación cero a tercera extraídos de los espectros de RMN de ^1H , ^{13}C y ^{29}Si mono- y bidimensionales. La asignación de las señales de estos espectros se realiza primero sobre el derivado de generación cero, para a continuación ser extrapolados a las estructuras dendríticas de las generaciones primera a tercera.

Caracterización de $G_0[(\text{CH}_2)_4\text{Br}]$

En la Tabla II.1 se recogen los desplazamientos químicos de las señales observadas en los espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C del siguiente bromoderivado.



	ASIGNACIÓN	-
RMN- ^1H CDCl $_3$	SiCH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ Br	3.41
	SiCH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ Br	1.85
	SiCH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ Br	1.42
	SiCH $_2$ CH $_3$	0.91
	SiCH $_2$ y SiCH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ Br	0.48

RMN- ¹³ C CDCl ₃	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ Br	36.5
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ Br	33.6
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ Br	22.4
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ Br	10.4
	SiCH ₂ CH ₃	7.4
	SiCH ₂ CH ₃	3.2

Tabla II.1. Datos de RMN-¹H y ¹³C del derivado G₀[(CH₂)₄Br] en CDCl₃.

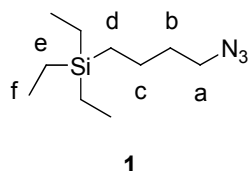
En el espectro de RMN-¹H del derivado bromado se observa un triplete a 3.41 ppm que integra para dos protones asignado al resto metileno en posición α al átomo de bromo. A continuación, se sitúan dos multipletes centrados en 1.85 y 1.42 ppm que se adjudican a los grupos metileno **b** y **c** cada uno en posiciones β y γ respectivamente, cayendo a menores frecuencias a medida que se alejan del efecto inductivo del átomo de halógeno. Las señales más apantalladas en el espectro son un triplete que integra para nueve protones, **f** en la figura, y un multiplete que integra para ocho protones que comprende los protones **d** y **e** y que se corresponden con los restos etilo de la molécula y el fragmento metileno directamente unido al átomo de silicio de la cadena de cuatro átomos de carbono.

En el espectro de RMN-¹³C del 4-bromobutilsilano las señales más cercanas al átomo de bromo también se encuentran más desapantalladas al encontrarse cerca de un átomo electronegativo, sorprendentemente en este tipo de sistemas el metileno en β se encuentra a mayores frecuencias que aquel que está en α ,⁴² así **b** se asigna a la señal a 36.5 ppm y **a** a la señal que se sitúa a 33.6 ppm. A medida que los carbonos están más cercanos al átomo de silicio las señales se desplazan a campo más alto, por tanto las señales a 10.4, 7.4 y 3.2 ppm se corresponden con los átomos de carbono **d**, **f** y **e**.

Este compuesto fue sintetizado en 1979 con otra metodología,⁴¹ aunque se describe aquí para poder ser comparado con los dendrímeros **2-4**.

Caracterización de $G_0[(CH_2)_4N_3]$ (1)

En la tabla II.2 se recogen los desplazamientos químicos de las señales observadas en los espectros de RMN- 1H y ^{13}C del compuesto **1**.



	ASIGNACIÓN	1
RMN- 1H CDCl $_3$	SiCH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ N $_3$	3.24
	SiCH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ N $_3$	1.60
	SiCH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ N $_3$	1.35
	SiCH $_2$ CH $_3$	0.91
	SiCH $_2$ y SiCH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ N $_3$	0.50
RMN- ^{13}C CDCl $_3$	SiCH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ N $_3$	51.0
	SiCH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ N $_3$	32.8
	SiCH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ N $_3$	21.1
	SiCH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ N $_3$	10.9
	SiCH $_2$ CH $_3$	7.4
	SiCH $_2$ CH $_3$	3.2

Tabla II.2. Datos de RMN- 1H y ^{13}C de la especie **1** en CDCl $_3$.

El cambio más significativo de **1** con respecto al compuesto de partida, lo sufren los dos grupos metilénicos más cercanos al grupo azida y suponen un ligero desplazamiento a frecuencias más bajas de las señales con respecto al derivado bromado hasta una frecuencia de 3.24 y 1.60 ppm respectivamente. Este cambio no es muy acusado debido a que la electronegatividad del átomo de bromo y el grupo azida es muy similar.⁴³ A medida que la posición de los grupos metileno se aleja del grupo azida, éstos sufren en menor magnitud el efecto de desapantallamiento de este grupo. Es por ello que el multiplete a 1.35 ppm se asigna al grupo metileno nombrado **c**. Por último, el triplete a 0.91 ppm se asigna a **f** ya que integra para nueve protones y el multiplete centrado en 0.50 ppm incluye los fragmentos metileno **d** y **e** (Figura II.9.A).

En el RMN- ^{13}C apenas se aprecian cambios frente al bromoderivado de partida, tan sólo el del átomo de carbono adyacente al grupo azida sufre un cambio significativo, este núcleo se ve desapantallado frente a su análogo en el producto de partida, situándose a 51.0 ppm. Las señales a 32.8 y 21.1 ppm se corresponden con **b** y **c** respectivamente. Y por último, las señales más alejadas del cambio realizado en la reacción apenas varían sus desplazamientos, siendo 10.9, 7.4 y 3.2 ppm para los átomos de carbono nombrados **d**, **f** y **e** respectivamente (Figura II.9.B).

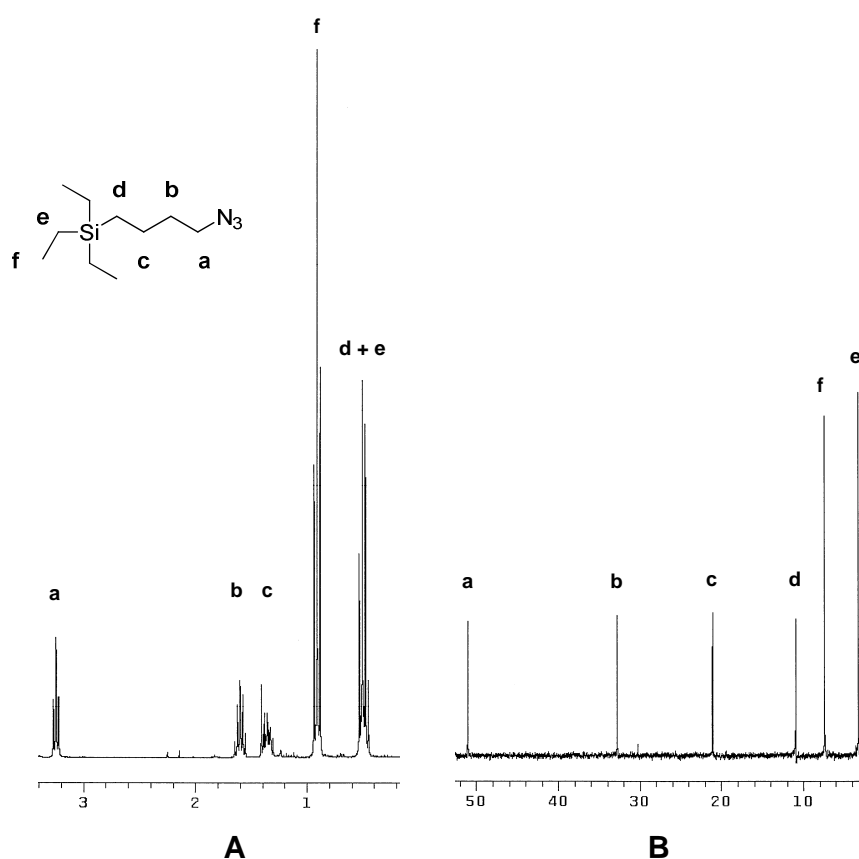


Figura II.9. Espectros de RMN- ^1H (A) y RMN- ^{13}C (B) del compuesto 1.

La asignación completa de este compuesto se realizó atendiendo a un experimento COSY $\{^1\text{H}-^1\text{H}\}$ que permite observar la conectividad de los protones de la cadena. La disposición de los multipletes establecidos en este experimento ayuda a la asignación del resto de protones de los compuestos sintetizados en esta memoria, ya que éstos no varían en su multiplicidad y tan sólo sufren pequeños cambios en su desplazamiento químico (Figura II.10).

Se observa que el triplete a 3.24 ppm interacciona con el multiplete a 1.60 ppm y éste a su vez con el multiplete a 1.35 ppm. Además, en esta última señal se observa una interacción con el multiplete a 0.50 ppm que se asigna fácilmente al grupo metileno **d**. De este modo queda establecida la conectividad de la cadena de 4 grupos metileno.

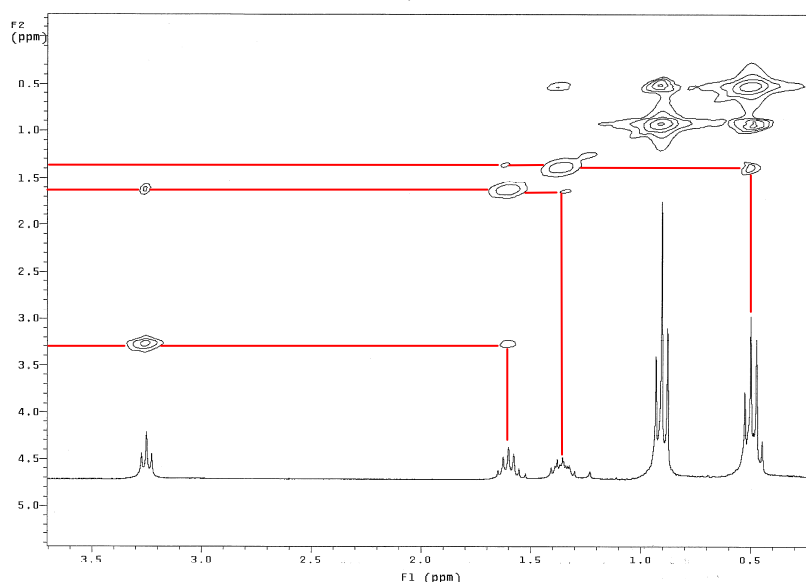
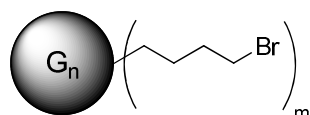


Figura II.10. Experimento RMN-COSY $\{^1\text{H}-^1\text{H}\}$ de **1**.

Caracterización de $G_n[(\text{CH}_2)_4\text{Br}]_m$ (2-4)

En la tabla II.3 se recogen los desplazamientos químicos de las señales observadas en los espectros de RMN- ^1H y ^{13}C de los dendrímeros **2-4**.



- $n = 1; m = 4$ (2)
 $n = 2; m = 8$ (3)
 $n = 3; m = 16$ (4)

	ASIGNACIÓN	2	3	4
RMN- ^1H CDCl ₃	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ Br	3.40	3.40	3.40
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ Br	1.85	1.85	1.85
	SiCH ₂ CH ₂	1.37	1.31	1.30

	SiCH ₂	0.51	0.53	0.53
	Si(CH ₃) ₂	-0.05	-0.05	-0.05
	SiCH ₃	-	-0.09	-0.09
RMN- ¹³ C CDCl ₃	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ Br	36.4	36.8	36.4
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ Br	33.5	34.0	33.6
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ Br	22.4	22.9	22.5
	SiCH ₂ y SiCH ₂ CH ₂	20.2-14.5	20.5-14.9	20.1-14.5
	Si(CH ₃) ₂	-3.3	-2.8	-3.3
	SiCH ₃	-	-4.5	-4.8

Tabla II.3. Datos de RMN-¹H y RMN-¹³C de los compuestos **2-4** en CDCl₃.

Las multiplicidades y los desplazamientos son muy similares a los observados en la generación cero, por lo tanto, las asignaciones se realizan en consonancia a lo anteriormente expuesto. Aunque hay que destacar un aumento generalizado de la anchura de las señales relativas al esqueleto dendrítico. Este ensanchamiento es más acusado a medida que aumenta la generación, debido a que el aumento de tamaño de las estructuras puede resultar en una disminución de la movilidad de ciertos átomos, que se traduce en desplazamientos químicos ligeramente modificados. La suma total de estas pequeñas variaciones provoca el ensanchamiento de las señales (Figura II.11). Este patrón se mantiene en todos los espectros de los dendrímeros presentados en esta memoria y es más acusado en los compuestos iónicos como se podrá observar más adelante. Además, a frecuencias bajas se observan las señales debidas al esqueleto dendrítico. Así, en el espectro de RMN-¹H la señal 1.37 ppm engloba todas las señales en β a un átomo de silicio, a menores frecuencias, alrededor de 0.50 ppm, se encuentran los metilenos directamente unidos a un átomo de silicio. Por último, los metilos unidos a átomos de silicio se encuentran alrededor de 0 ppm.

En el espectro de RMN-¹³C las señales de los carbonos metilénicos se acumulan en la región del espectro entre 20 y 14.5 ppm aproximadamente, la reducida movilidad de estos átomos hace que no se observen como señales discretas sino como un multiplete muy ancho. Las señales relativas a los metilos unidos a átomos de silicio se observan a frecuencias negativas, alrededor de -3.0 los grupos Si(CH₃)₂ y alrededor de -4.6 ppm los grupos SiCH₃.

Las asignaciones tanto en RMN-¹H como en RMN-¹³C del esqueleto dendrítico son muy similares en todos los dendrímeros carbosilano, por lo que no volverán a ser comentadas en el resto de esta memoria.

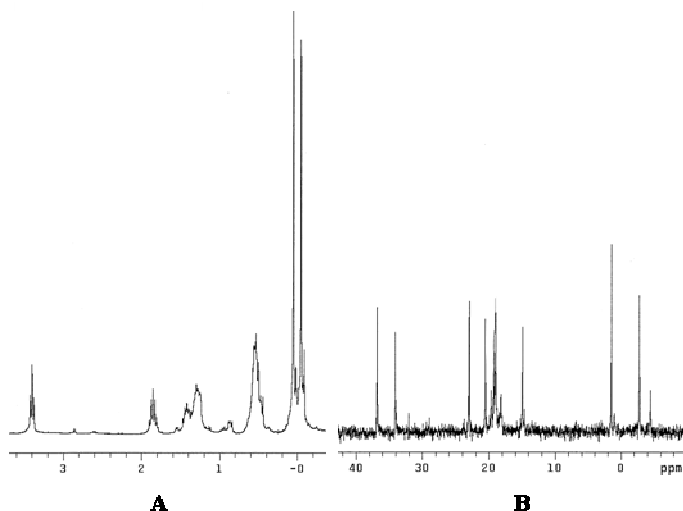
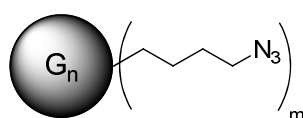


Figura II.11. Espectros de RMN-¹H (A) y RMN ¹³C (B) del derivado bromado **3**.

Caracterización de $G_n[(CH_2)_4N_3]_m$ (5-7)

En la tabla II.4 se recogen los desplazamientos químicos de las señales observadas en los espectros de RMN-¹H y ¹³C de los dendrímeros **5-7**.



- n = 1; m = 4 (5)
 n = 2; m = 8 (6)
 n = 3; m = 16 (7)

	ASIGNACIÓN	5	6	7
RMN- ¹ H CDCl ₃	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N ₃	3.24	3.24	3.24
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N ₃	1.60	1.58	1.60
	SiCH ₂ CH ₂	1.35	1.29	1.32
	SiCH ₂	0.52	0.54	0.54
	Si(CH ₃) ₂	-0.06	-0.06	-0.05
	SiCH ₃	-	-0.10	-0.09

RMN- ¹³ C CDCl ₃	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N ₃	51.1	51.1	51.1
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N ₃	32.6	32.6	32.6
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N ₃	21.1	21.2	21.2
	SiCH ₂ y SiCH ₂ CH ₂	20.2-15.0	20.5-15.0	20.0-15.0
	Si(CH ₃) ₂	-3.3	-3.3	-3.3
	SiCH ₃	-	-4.9	-4.9

Tabla II.4. Datos de RMN-¹H y RMN-¹³C de los productos **5-7** en CDCl₃.

Los dendrímeros terminados en grupos azida poseen señales cuyos desplazamientos son prácticamente idénticos comparados con la generación cero y las señales se asignan siguiendo ese patrón (Figura II.12).

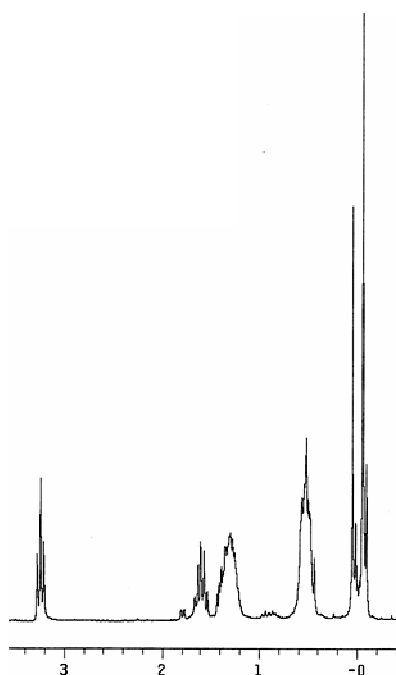


Figura II.12. Espectro de RMN-¹H del dendrímero de segunda generación **6** en CDCl₃.

Como se ha descrito previamente, en el espectro de RMN-¹³C no se aprecia ningún cambio significativo en los desplazamientos de las señales de los dendrímeros **5-7** con respecto al derivado de generación cero **1** y la asignación de las señales se realiza acorde con la previamente mostrada (Figura II.13).

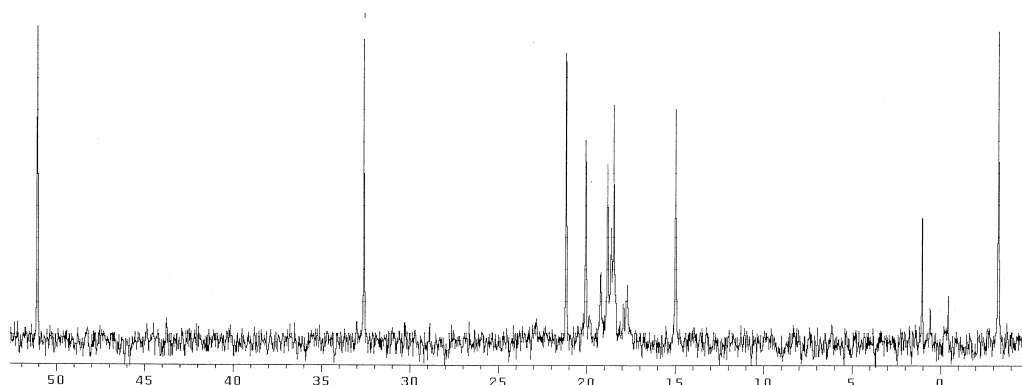


Figura II.13. Espectro de RMN-¹³C del dendrímero de segunda generación **6** en CDCl₃.

Debido a la naturaleza carbosilano de los dendrímeros descritos en esta memoria, tanto catiónicos como aniónicos (mostrados más adelante) se han realizado espectros gHMBC {¹H-²⁹Si} de los dendrímeros carbosilano sintetizados. Como ejemplo se presenta el espectro gHMBC {¹H-²⁹Si} de **6**. El resto de espectros de ²⁹Si de los compuestos sintetizados en esta memoria son muy similares entre sí, ya que los cambios realizados en la periferia no afectan a los desplazamientos químicos de los átomos en el interior del dendrímero, por lo que no se volverán a discutir. Los datos de todos estos espectros se muestran en la parte experimental de esta memoria.

En el espectro, se observan dos tipos de silicio distintos, uno situado en torno a 1.0 ppm atribuido al grupo Si(CH₃)₂ y otra localizada alrededor de 0.50 ppm debida al grupo SiCH₃ atendiendo al experimento gHMBC {¹H-²⁹Si} (Figura II.14). Sin embargo, no se puede observar el átomo de silicio interno.

Las señales alrededor de -22.0 y 7.0 ppm en el RMN-²⁹Si, se corresponden con la señal de compuestos de silicio provenientes de la grasa con la que se comercializa el catalizador utilizado en la hidrosililación.⁴⁴

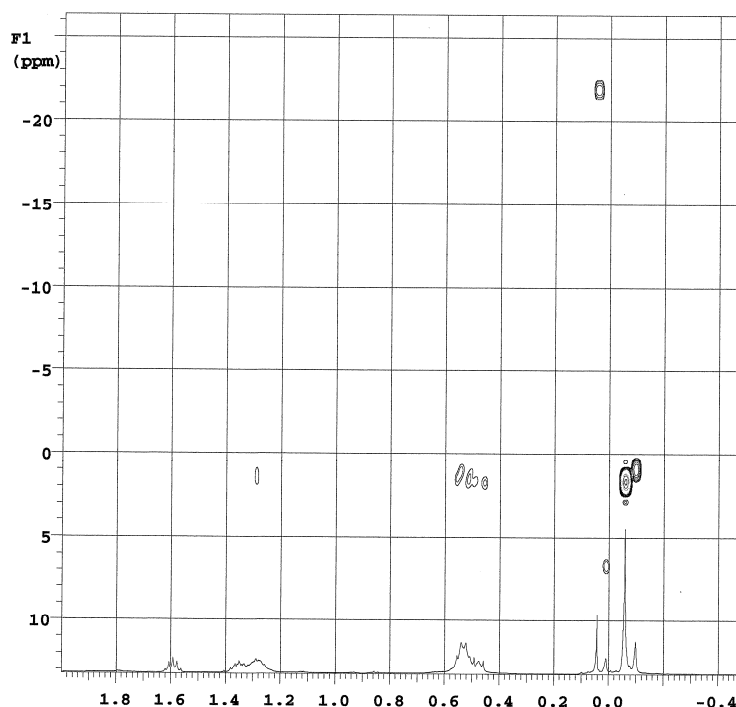


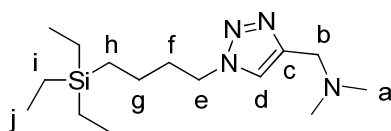
Figura II.14. Espectro gHMBC $\{^1\text{H}-^{29}\text{Si}\}$ de **6** en CDCl_3 .

2.4.2 ESPECTROSCOPIA DE RMN DE DENDRIMEROS TERMINADOS EN GRUPOS AMINO

A continuación, se comentan los datos espectroscópicos de los productos funcionalizados con grupos amino a partir de los derivados azida, mostrados anteriormente, de generación cero a tercera extraídos de los espectros de RMN de ^1H , ^{13}C y ^{15}N mono- y bidimensionales. Al igual que en el epígrafe anterior, la asignación de las señales de estos espectros se realiza primero sobre el derivado de generación cero y estos datos se extrapolan a las estructuras dendríticas de generación superior.

Caracterización de $G_0[(\text{CH}_2)_4(\text{C}_2\text{HN}_3)\text{CH}_2\text{NMe}_2]$ (8**)**

En la tabla II.5 se recogen los desplazamientos químicos de las señales observadas en los espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C del compuesto **8**.



8

	ASIGNACIÓN	8
RMN- ¹ H CDCl ₃	NHCN	7.45
	SiCH ₂ CHCH ₂ CH ₂ N	4.33
	CCH ₂ N	3.61
	N(CH ₃) ₂	2.27
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	1.90
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	1.29
	SiCH ₂ CH ₃	0.88
	SiCH ₂ CH ₃ y SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	0.47
RMN- ¹³ C CDCl ₃	NHCN	145.0
	NHCN	121.9
	CCH ₂ N	54.3
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	49.7
	N(CH ₃) ₂	45.0
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	34.0
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	20.7
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	10.7
	SiCH ₂ CH ₃	7.2
	SiCH ₂ CH ₃	3.0

Tabla II.5. Datos de RMN-¹H y RMN-¹³C del derivado **8** en CDCl₃.

El cambio más significativo en el espectro de RMN-¹H de **8** frente al derivado **1** de partida supone la aparición de un singlete a 7.45 ppm que se identifica con el protón **d** del anillo triazol. De este hecho, junto a la desaparición del triplete del fragmento metileno en α al grupo azida, se infiere que la reacción se ha completado. Esta señal se encuentra muy desplazada a frecuencias altas debido a la naturaleza aromática del derivado triazólico y a la naturaleza electroattractora de los tres átomos de nitrógeno del anillo. Los grupos metileno **e** y **b** se asignan atendiendo a la multiplicidad de las señales. El resto metileno **e** se asigna al triplete situado a 4.33 ppm, este fragmento metileno sufre un desapantallamiento debido a la incorporación de los tres átomos de nitrógeno del grupo azida en un anillo aromático. El singlete a

3.61 ppm se atribuye al grupo metileno **b**. La señal a 2.27 ppm integra para seis protones, y por tanto se identifica como los grupos metilo enlazados a nitrógeno, nombrados **a** en la figura (Figura II.15). El resto de señales siguen el mismo patrón que en el derivado **1**.

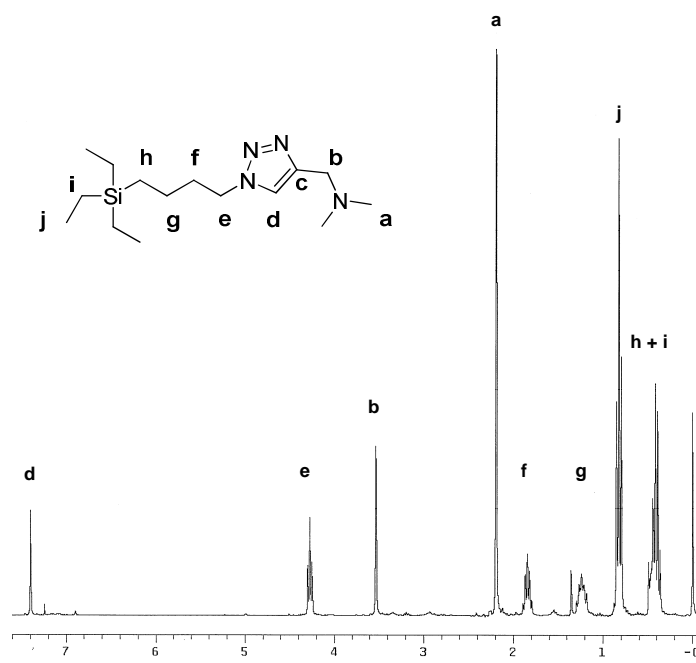


Figura II.15. Espectro de RMN-¹H del compuesto **8**.

Una vez realizada la asignación en el espectro de RMN-¹H, la asignación del RMN-¹³C se completa atendiendo a un espectro gHSQC {¹H-¹³C} que muestra una relación a ¹J entre cada señal de RMN-¹H con las señales de RMN-¹³C (Figuras II.16 y II.17). Hay que destacar que el espectro de RMN-¹³C confirma la formación del derivado **8** ya que se observan dos señales aromáticas a 145.0 y 121.9 ppm que se asignan a **c** y **d**.

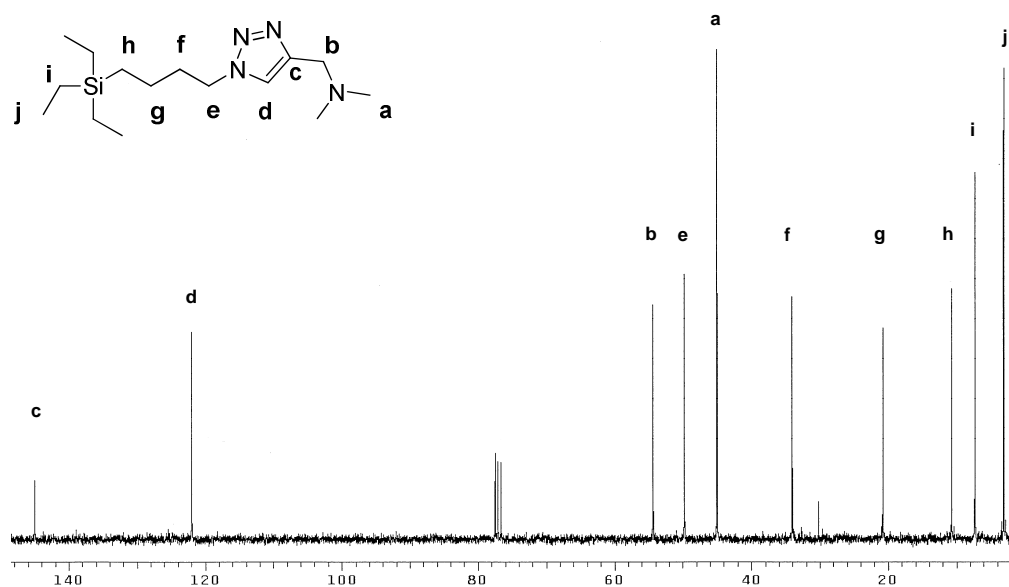


Figura II.16. RMN- ^{13}C del derivado **8**.

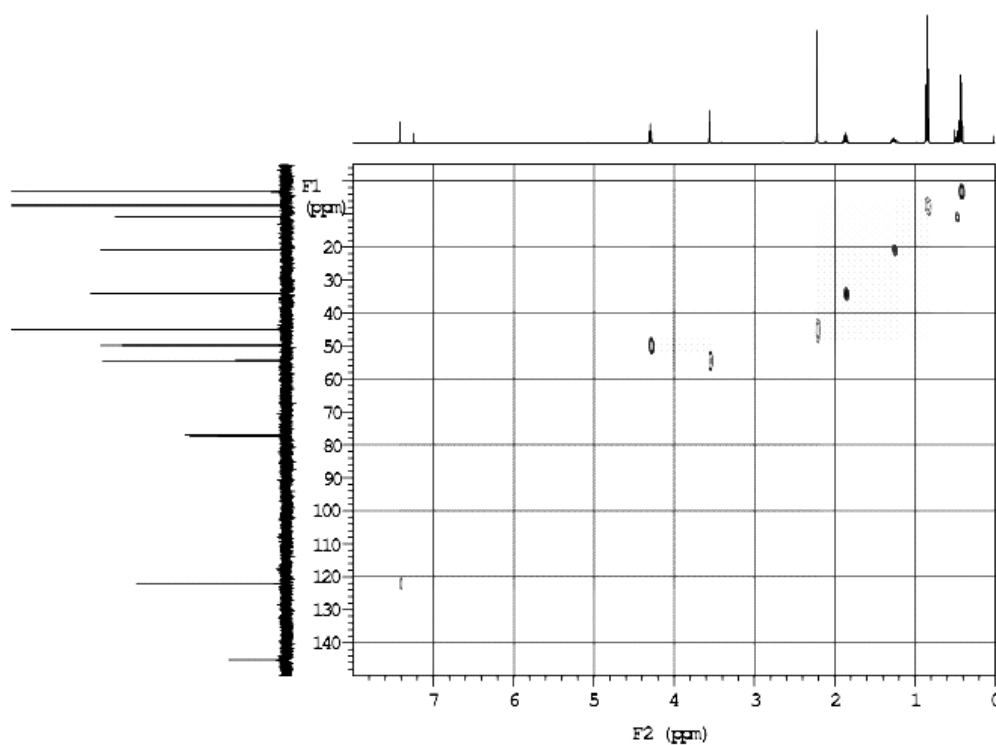


Figura II.17. Espectro bidimensional gHSQC $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ del compuesto **8**.

Sobre este sustrato también se ha realizado un experimento gHMBC $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ para comprobar la correcta formación del anillo de triazol. El derivado **8**, dispone de cuatro átomos de nitrógeno, uno de ellos de tipo alifático (grupo amino), dos

nitrógenos de tipo piridina y uno tipo pirrol. La Figura II.18 muestra el espectro referenciado a $\text{NH}_3(\text{l})$, sin embargo, a los datos mostrados a continuación se les ha aplicado un factor de corrección de -380.2 ppm para transformarlos a la escala de CH_3NO_2 , más común en este tipo de espectros. Esta corrección también se aplicará, cuando sea necesario, en los siguientes experimentos de ^{15}N .

En el caso del átomo de N tipo pirrol, el par de electrones desapareado se encuentra incorporado dentro del sistema π , y por tanto su comportamiento es similar al de la anilina, mientras que el par electrónico solitario de los N tipo piridina es ortogonal al sistema π . La contribución adicional que supone el estado π^* en este último, conduce a desapantallamientos adicionales de los núcleos con respecto al N tipo pirrol. Con esto en mente y teniendo en cuenta los picos cruzados observados en el espectro bidimensional RMN $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$, la asignación de los átomos de nitrógeno en el derivado **8** es la siguiente:

- N(1) nitrógeno alifático: -352 ppm
- N(2) nitrógeno tipo piridina: -32 ppm
- N(3) nitrógeno tipo piridina: -22 ppm
- N(4) nitrógeno tipo pirrol: -138 ppm

El átomo de nitrógeno N(1) presenta un pico cruzado con los hidrógenos de los grupos metilo adyacentes **a** (^2J) apareciendo en una zona muy apantallada. Por el contrario, el nitrógeno tipo pirrol N(4) presenta tres picos cruzados con los protones **d** (^2J) **e** (^2J) y **f** (^3J). La señal N(2) origina dos picos cruzados con los protones **b** (^3J) y **d** (^3J), mientras que N(3) da lugar a un solo pico cruzado con los átomos de hidrógeno **e** (^3J), no observándose el pico cruzado con **d** (^3J) (Figura II.18).

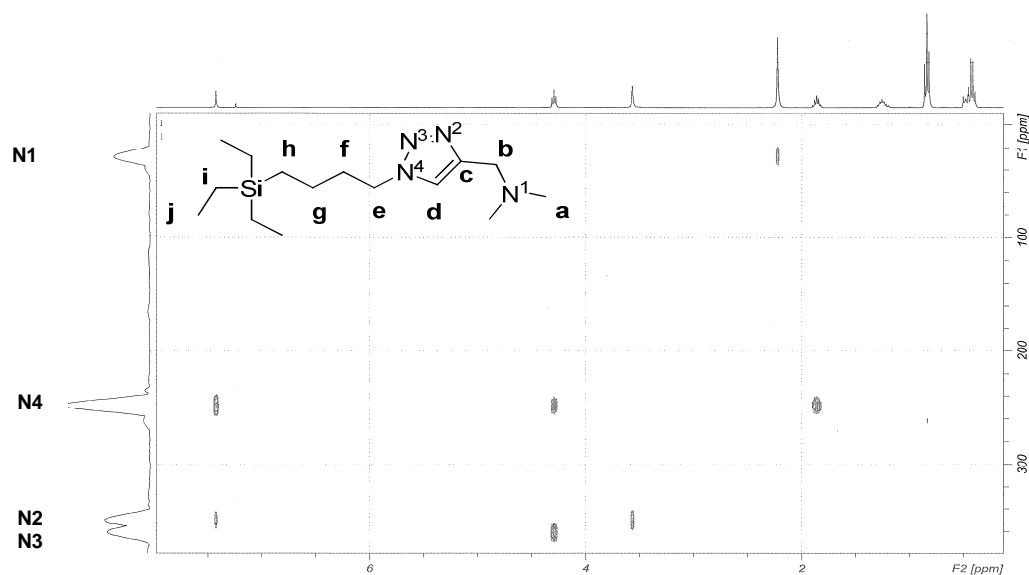
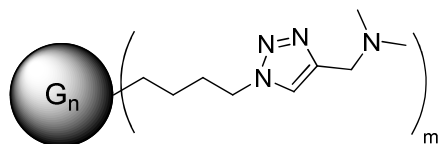


Figura II.18. Espectro bidimensional gHMBC $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ del compuesto **8**.

Caracterización de $G_n[(\text{CH}_2)_4(\text{C}_2\text{HN}_3)\text{CH}_2\text{NMe}_2]_m$ (9-11)

En la tabla II.6 se recogen los desplazamientos químicos de las señales observadas en los espectros de RMN- ^1H y ^{13}C de los dendrimeros **9-11**.



$$\begin{aligned} n = 1; m = 4 & \quad \text{(9)} \\ n = 2; m = 8 & \quad \text{(10)} \\ n = 3; m = 16 & \quad \text{(11)} \end{aligned}$$

	ASIGNACIÓN	9	10	11
RMN- ^1H CDCl_3	NCHCN	7.41	7.39	7.42
	$\text{SiCH}_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{N}$	4.28	4.26	4.27
	CCH_2N	3.55	3.52	3.54
	$\text{N}(\text{CH}_3)_2$	2.21	2.19	2.20
	$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$	1.85	1.83	1.84
	SiCH_2CH_2	1.25	1.21	1.22
	SiCH_2	0.49	0.46	0.47
	$\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ y $\text{Si}(\text{CH}_3)$	-0.13	-0.15	-0.14

RMN- ¹³ C CDCl ₃	NCHCN	145.0	145.0	144.9
	NCHCN	122.0	121.9	122.0
	CCH ₂ N	54.4	54.3	54.3
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	49.8	49.7	49.8
	N(CH ₃) ₂	45.1	45.0	45.0
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	33.9	33.8	33.9
	SiCH ₂ CH ₂ y SiCH ₂	20.8-14.7	20.8-14.7	20.8-14.7
	Si(CH ₃) ₂	-3.5	-3.5	-3.5
	SiCH ₃	-	-5.2	-5.1

Tabla II.6. Datos de RMN-¹H y ¹³C de los productos **9-11** en CDCl₃.

Una vez realizada la cicloadición, los cambios de la periferia se reflejan en el espectro del mismo modo que en el compuesto **8** y por tanto la asignación sigue el mismo patrón, tal y como se muestra en las Figuras II.19 y II.20

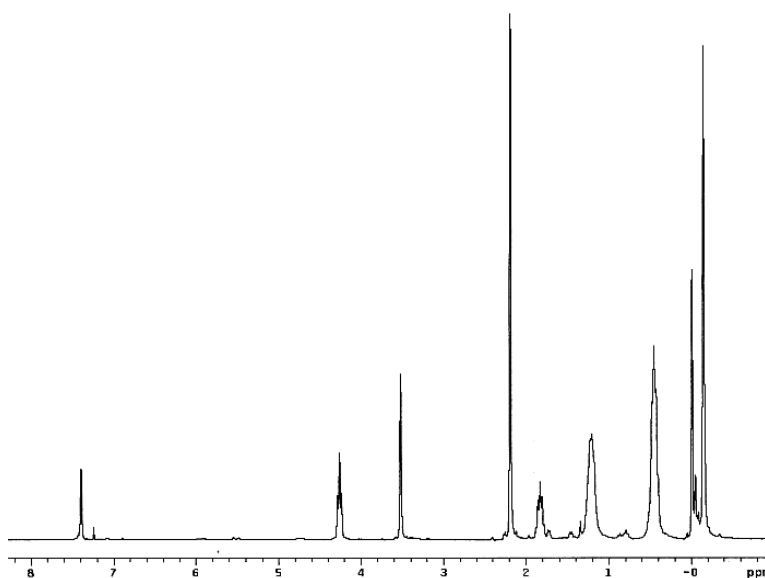


Figura II.19. Espectro de RMN-¹H de **10**.

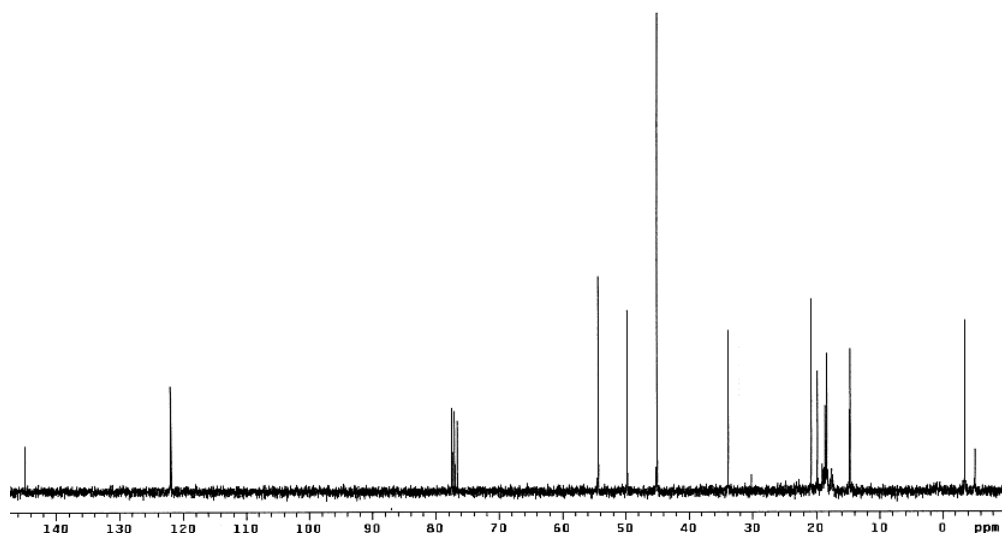
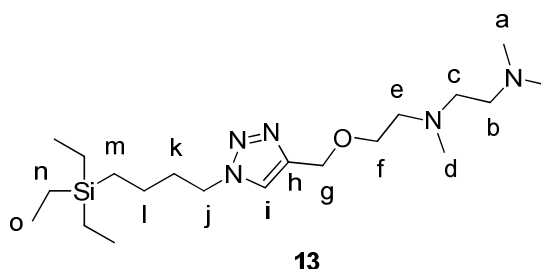


Figura II.20. Espectro de RMN-¹³C de del dendrímero de segunda generación **10** en CDCl₃.

Caracterización de $G_0[(CH_2)_4(C_2HN_3)CH_2O(CH_2)_2NMe(CH_2)_2NMe_2]$ (13**)**

En la tabla II.7 se recogen los desplazamientos químicos de las señales observadas en los espectros de RMN-¹H y ¹³C del compuesto **13**.



	ASIGNACIÓN	13
RMN- ¹ H CDCl ₃	NCHCN	7.50
	CCH ₂ O	4.63
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	4.32
	OCH ₂ CH ₂ N	3.61
	OCH ₂ CH ₂ N	2.61
	NCH ₂ CH ₂ N	2.50 y 2.37
	NCH ₃	2.26
	N(CH ₃) ₂	2.21
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	1.90
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	1.32

	SiCH ₂ CH ₃	0.89
	SiCH ₂ CH ₃ y SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	0.48
RMN- ¹³ C CDCl ₃	NCHCN	144.7
	NCHCN	122.1
	OCH ₂ CH ₂ N	68.1
	CCH ₂ O	64.3
	OCH ₂ CH ₂ N	56.9
	NCH ₂ CH ₂ N	56.5
	NCH ₂ CH ₂ N	55.0
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	49.6
	N(CH ₃) ₂	45.1
	NCH ₃	42.7
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	34.0
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	20.7
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	10.6
	SiCH ₂ CH ₃	7.2
SiCH ₂ CH ₃	3.0	

Tabla II.7. Datos de RMN-¹H y ¹³C del derivado **13** en CDCl₃.

En el espectro de RMN-¹H del compuesto **13** se observan ciertas similitudes con el derivado **8** que permiten realizar la asignación más fácilmente (Figura II.21). Se advierte una señal a 7.50 ppm que se identifica con el protón aromático del heterociclo nombrado **i** en la figura. La señal de los protones del grupo metileno unido a oxígeno **g** se muestra como un singlete a 4.63 ppm, fácilmente identificable debido a que es el único singlete que integra para 2 protones del espectro. Los restos metileno unidos a átomos de oxígeno suelen aparecer alrededor de 3.5 ppm mientras que los grupos metileno unidos a átomos de nitrógeno se muestran alrededor de 2.5 ppm,⁴⁵ esto permite adjudicar con facilidad los tripletes a 3.61 ppm y a 2.61 ppm a los fragmentos metileno **f** y **e** respectivamente. Las señales **b** y **c** forman un sistema A₂B₂ fácilmente identificable con las señales a 2.50 y 2.37 ppm. Las señales debidas a los grupos metilo unidos a los nitrógenos **d** y **a** se corresponden con 2.26 y 2.21 ppm y aparecen en un rango muy estrecho de desplazamiento debido al entorno químico tan similar que poseen, sin embargo, son fácilmente diferenciables debido a la distinta integral de los picos. Las señales **k-o** apenas sufren modificaciones comparadas con su análogo en el derivado **8**, asignándose según se muestra en la Figura II.21. Para asignar la

señal **j** se recurrió a irradiar el multiplete correspondiente al fragmento metileno nombrado **k**, lo que provocó que la señal a 4.32 ppm colapsara en un singlete, asignándose de este modo al grupo metileno **j**.

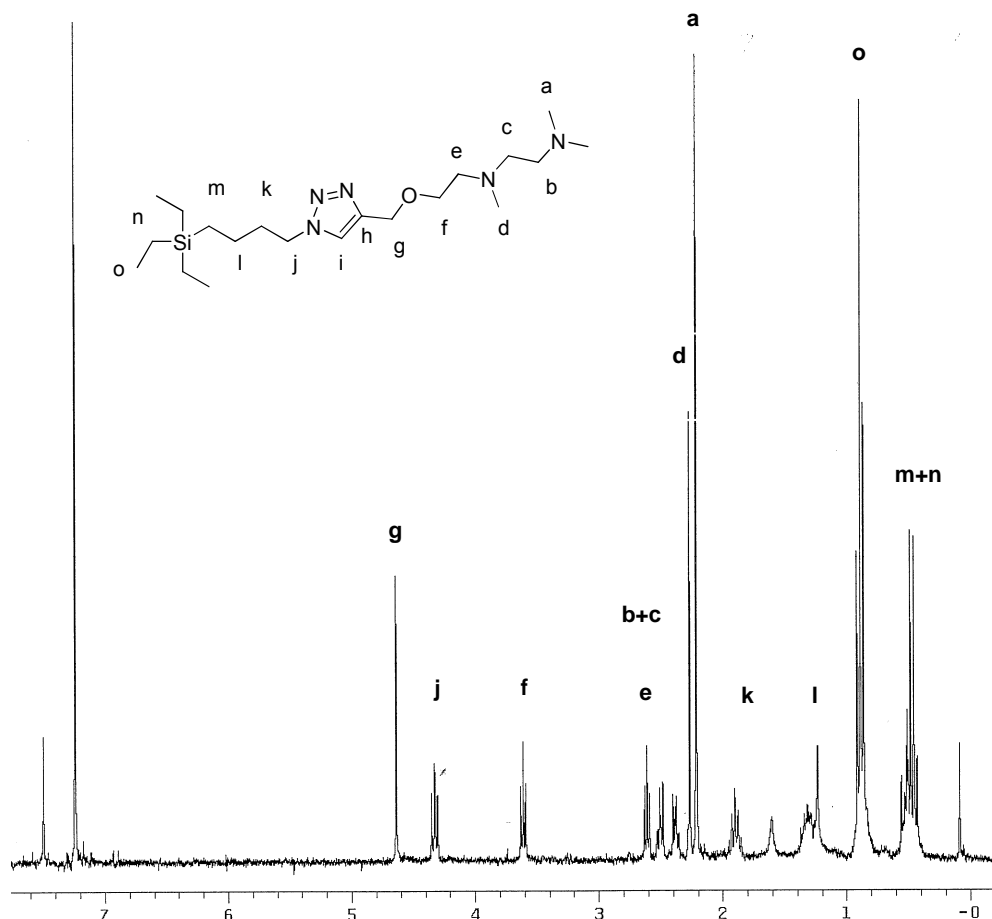


Figura II.21. Espectro de RMN- ^1H de **13** en CDCl_3 .

El espectro de RMN- ^{13}C (Figura II.22) se asigna atendiendo a las correlaciones observadas en un experimento gHSQC $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ (Figura II.23), que permite observar la conectividad directa a un solo enlace entre protones y átomos carbonos. Esto fue especialmente necesario para discernir las señales relativas a átomos de carbono con un entorno químico similar, es decir **b**, **c** y **e**, que se muestran en un margen muy estrecho de ppm en RMN- ^{13}C , concretamente a 56.9, 56.5 y 55.0 ppm. Los carbonos unidos a oxígeno **f** y **g** se encuentran ligeramente más desapantallados, a 68.1 y 64.3 ppm respectivamente, debido a la naturaleza más electronegativa del átomo de oxígeno frente a los átomos de nitrógeno. Además, cabe destacar que los átomos de carbono comunes a las estructuras **8** y **13**, es decir los átomos de carbono aromáticos

del anillo triazólico y los carbonos que unen el átomo de silicio con el anillo de triazol, además de los grupos etilo unidos directamente al átomo de silicio, poseen un desplazamiento químico muy similar y por ello son asignados consecuentemente. Para asignar las señales de los carbonos de las señales **a** y **d** también se recurrió al gHSQC $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$, una vez conocidas sus asignaciones en el espectro de RMN- ^1H se buscó su correspondencia observando los picos de cruce (Figura II.23).

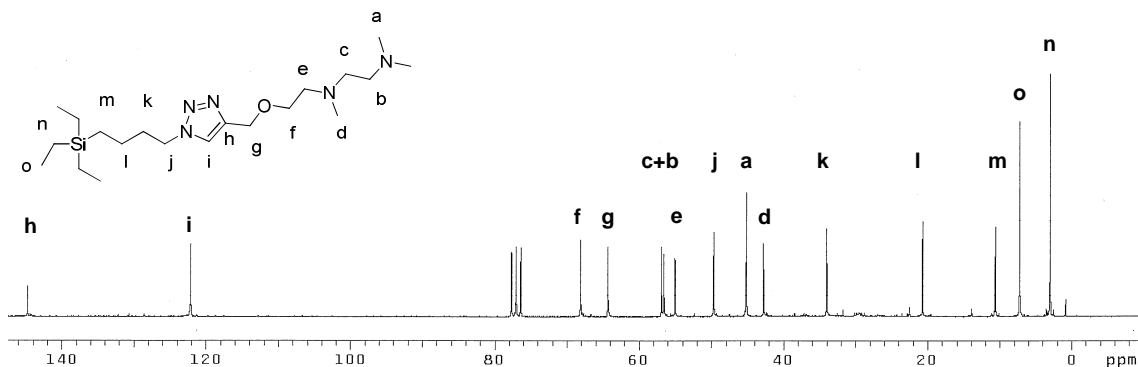


Figura II.22. Espectro de RMN- ^{13}C de **13** en CDCl_3 .

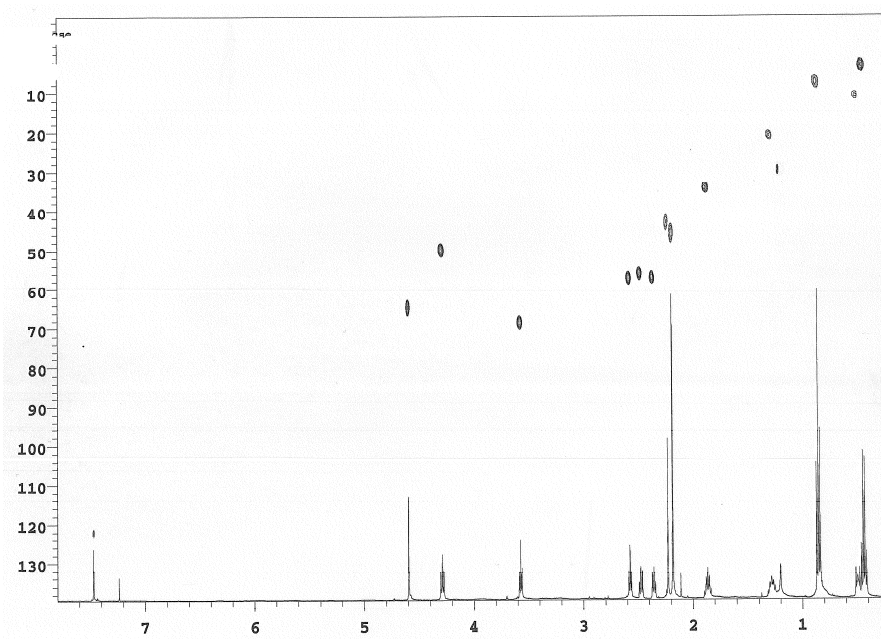


Figura II.23. Espectro de gHSQC $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ de **13** en CDCl_3 .

También se realizó un experimento de RMN gHMBC $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ de **13** (Figura II.24). En este se muestra la presencia de cinco señales atribuidas a los átomos de

nitrógeno existentes en el derivado triazólico (Figura II.24). La asignación, en base a lo comentado previamente para el derivado **8**, y de manera análoga, es la siguiente:

N(1) nitrógeno alifático: -355 ppm

N(2) nitrógeno alifático: -351 ppm

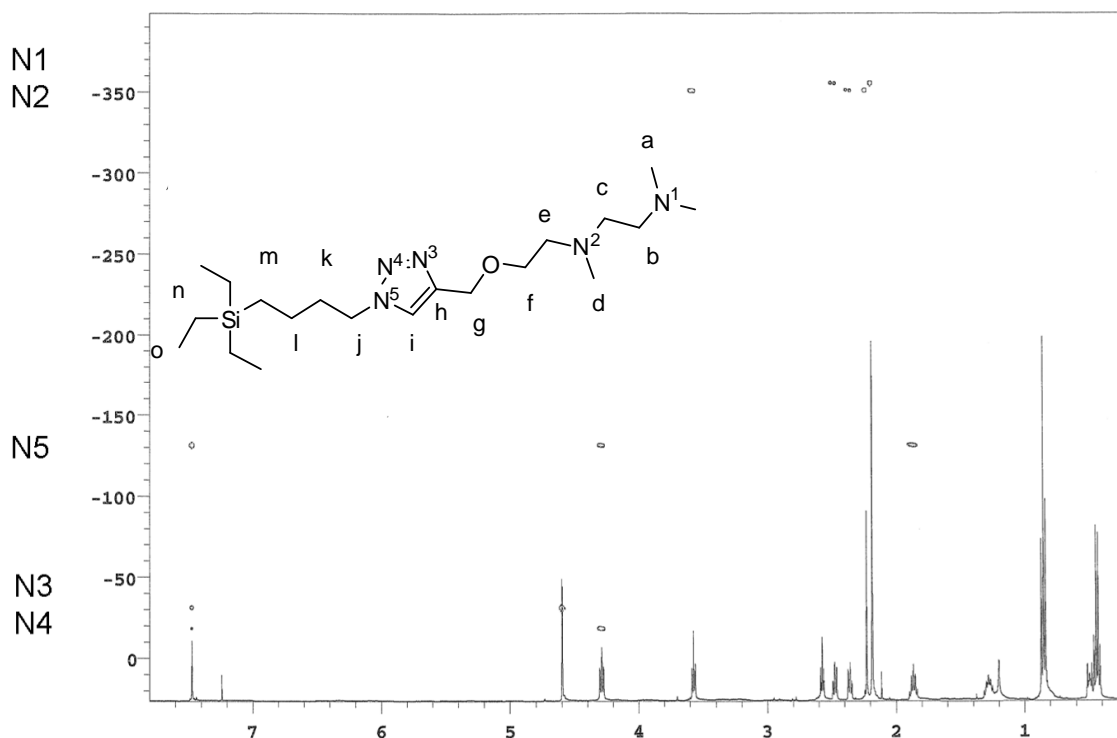
N(3) nitrógeno tipo piridina: -31 ppm

N(4) nitrógeno tipo piridina: -18 ppm

N(5) nitrógeno tipo pirrol: -131 ppm

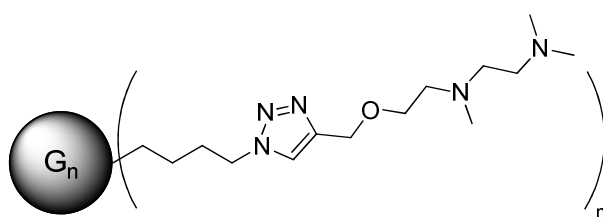
El átomo de nitrógeno N(1) presenta un pico cruzado con los átomos de hidrógeno de los fragmentos metilo adyacentes **a** (2J), así como con los átomos de hidrógeno **c** (3J), mientras que N(2) presenta sendos picos cruzados con los protones **b** (3J), **d** (2J) y **f** (3J), apareciendo ambos en una zona muy apantallada.

Por el contrario, el nitrógeno tipo pirrol N(5) presenta tres picos cruzados atribuibles a los protones **j** (2J), **k** (3J) e **i** (2J). N(3) origina dos picos cruzados con los protones **g** (3J) e **i** (3J), mientras que N(4) da lugar a dos picos cruzados con los átomos de hidrógeno **i** (3J) y (3J).


 Figura II.24. Espectro de RMN gHMBC $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ de **13**.

Caracterización de $G_n[(\text{CH}_2)_4(\text{C}_2\text{HN}_3)\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{NMe}(\text{CH}_2)_2\text{NMe}_2]_m$ (14-16**)**

En la tabla II.8 se recogen los desplazamientos químicos de las señales observadas en los espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C de los dendrímeros **14-16**.



- $n = 1; m = 4$ (**14**)
 $n = 2; m = 8$ (**15**)
 $n = 3; m = 16$ (**16**)

	ASIGNACIÓN	14	15	16
RMN- ^1H CDCl $_3$	NCHCN	7.51	7.51	7.51
	CCH $_2$ O	4.63	4.62	4.61
	SiCH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ N	4.31	4.31	4.30
	OCH $_2$ CH $_2$ N	3.61	3.61	3.60
	OCH $_2$ CH $_2$ N	2.61	2.60	2.62

	NCH ₂ CH ₂ N	2.52 y 2.40	2.50 y 2.37	2.50 y 2.37
	NCH ₃	2.26	2.26	2.26
	N(CH ₃) ₂	2.23	2.20	2.21
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	1.90	1.90	1.90
	SiCH ₂ CH ₂	1.28	1.28	1.27
	SiCH ₂	0.52	0.53	0.56
	Si(CH ₃) ₂	-0.08	-0.08	-0.09
	SiCH ₃	-	-0.10	-0.11
RMN- ¹³ C CDCl ₃	NHCN	145.0	144.9	144.9
	NHCN	122.2	122.0	122.0
	OCH ₂ CH ₂ N	68.4	68.3	68.3
	CCH ₂ O	64.4	64.4	64.4
	OCH ₂ CH ₂ N	57.1	57.1	57.1
	NCH ₂ CH ₂ N	57.0 y 55.6	57.0 y 55.6	57.0 y 55.7
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	49.9	49.7	49.8
	N(CH ₃) ₂	45.6	45.6	45.6
	NCH ₃	42.9	42.8	42.9
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	33.9	33.8	33.9
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N y SiCH ₂	20.9-14.8	20.8-14.7	20.8-14.7
	Si(CH ₃) ₂	-3.5	-3.3	-3.5
SiCH ₃	-	-5.0	-5.1	

Tabla II.8. Datos de RMN-¹H y ¹³C de los productos **14-16** en CDCl₃.

En la cicloadición para la formación de **14-16** se observa la misma pauta que en la cicloadición que conduce a **13**, por ello las asignaciones de las señales se realizaron atendiendo a las previamente mostradas en este capítulo de la memoria (Figura II.25).

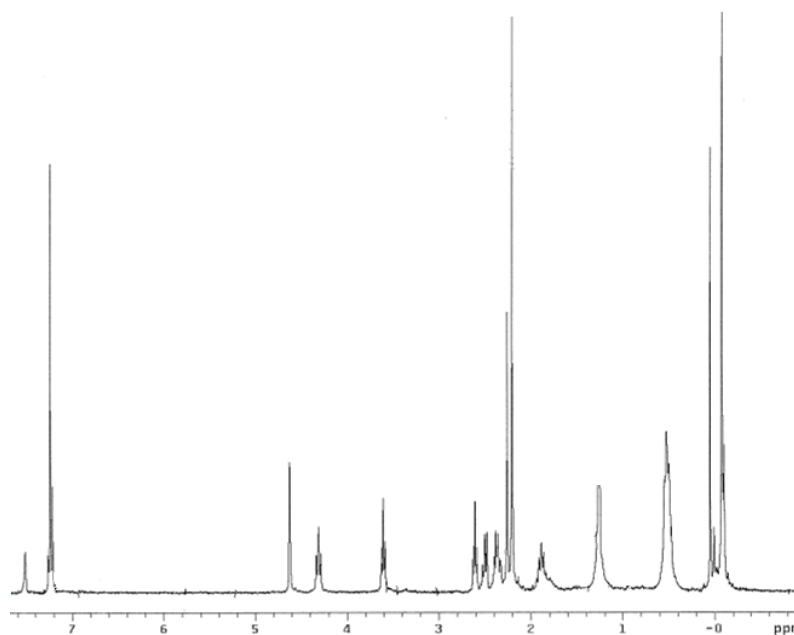


Figura II.25. Espectro de RMN- ^1H del dendrímero de segunda generación **15** en CDCl_3 .

El patrón detectado en el RMN- ^{13}C de **13** también está presente en los espectros de RMN- ^{13}C de **14-16** (Figura II.26), el entorno químico tan similar que poseen los átomos de la periferia añade mucha complejidad al espectro, sin embargo, el estudio previo realizado en la generación cero permite asignar las señales con facilidad, ya que prácticamente aparecen a los mismos desplazamientos químicos, como se refleja en la Tabla II.8.

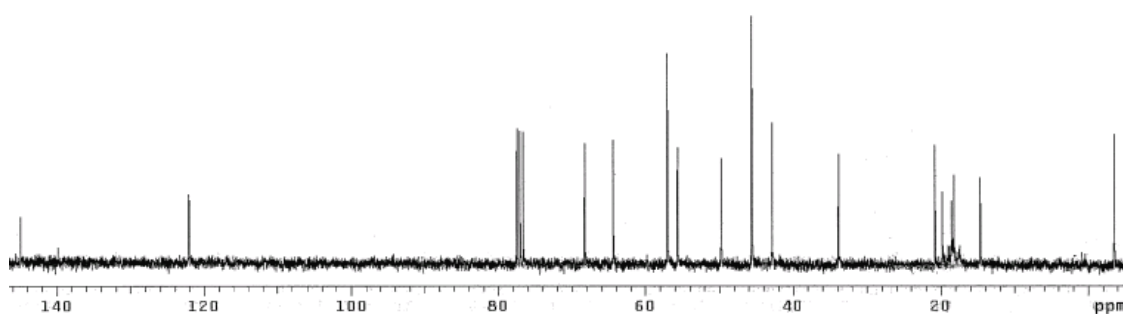


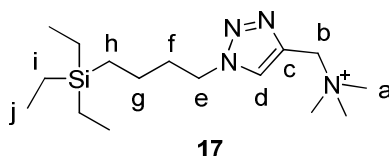
Figura II.26. Espectro de RMN- ^{13}C de **15** en CDCl_3 .

2.4.3 ESPECTROSCOPIA DE RMN DE DENDRÍMEROS TERMINADOS EN GRUPOS AMONIO

A continuación, se comentan los datos espectroscópicos de los productos funcionalizados con grupos amonio a partir de los derivados amino, mostrados anteriormente, de generación cero a tercera extraídos de los espectros de RMN de ^1H , ^{13}C y ^{15}N mono- y bidimensionales. Al igual que en el epígrafe anterior la asignación de las señales de estos espectros se realiza primero sobre el derivado de generación cero y estos datos se extrapolan a las estructuras dendríticas de generación superior.

Caracterización de $G_0[(\text{CH}_2)_4(\text{C}_2\text{HN}_3)\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3]$ (17)

En la tabla II.9 se recogen los desplazamientos químicos de las señales observadas en los espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C del compuesto **17**.

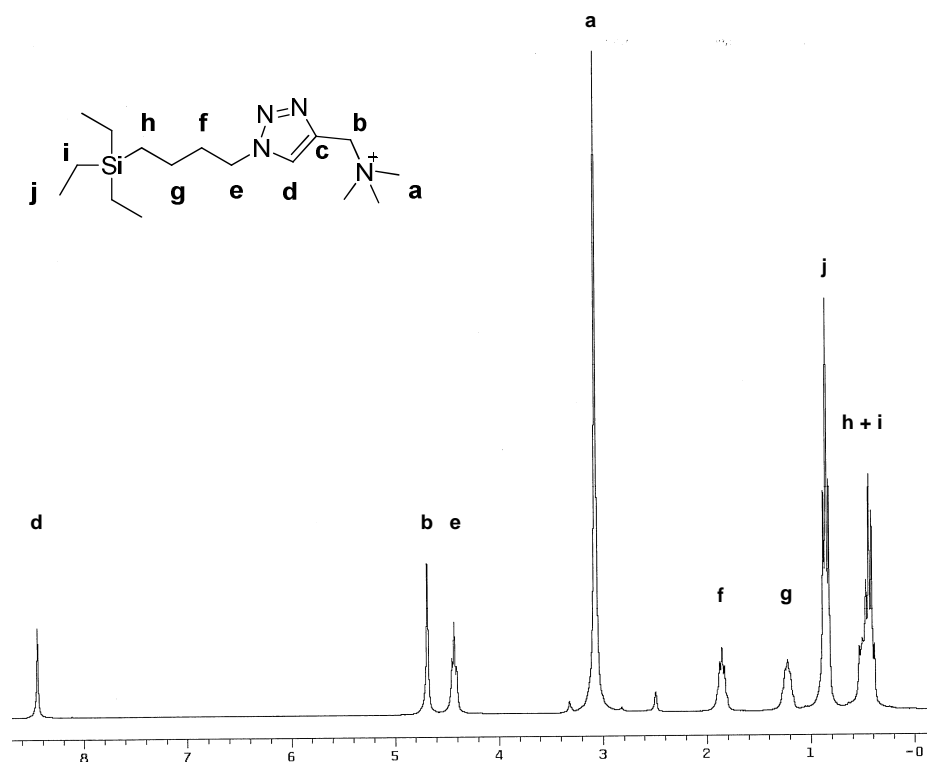


	ASIGNACIÓN	17
RMN- ^1H DMSO- d_6	NCHCN	8.44
	CCH $_2$ N	4.68
	SiCH $_2$ CHCH $_2$ CH $_2$ N	4.43
	N(CH $_3$) $_3$	3.06
	SiCH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ N	1.85
	SiCH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ N	1.22
	SiCH $_2$ CH $_3$	0.85
	SiCH $_2$ CH $_3$ y SiCH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ N	0.46
RMN- ^{13}C DMSO- d_6	NCHCN	134.7
	NCHCN	127.3
	CCH $_2$ N	58.4
	N(CH $_3$) $_2$	51.2
	SiCH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ N	48.7
	SiCH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ N	32.8
	SiCH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ N	19.6

	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	9.6
	SiCH ₂ CH ₃	6.7
	SiCH ₂ CH ₃	2.2

Tabla II.9. Datos de RMN-¹H y RMN-¹³C del derivado **17** en DMSO-d₆.

La cuaternización del nitrógeno terciario hace que la estructura soporte una carga positiva, lo que a su vez resulta en un desapantallamiento de todas las señales del espectro que se encuentren cercanas a ésta. Hay que tener en cuenta que estas variaciones de desplazamiento tanto en el RMN-¹H como en el RMN-¹³C, que se mostrará más adelante, frente al producto neutro **8** son relativas, ya que los disolventes utilizados en los espectros son distintos debido a la diferente polaridad de ambos sustratos. La asignación se realiza atendiendo al desplazamiento químico, la multiplicidad e integral de las señales. De este modo, se puede apreciar en el espectro de RMN-¹H de **17** que los restos metilo nombrados **a** se ven desplazados 0.8 ppm frente a su análogo neutro, hasta 3.06 ppm. Este mismo fenómeno se observa en las señales **d** y **b**, que se desplazan más de 1 ppm a campo bajo frente al producto neutro **8**, hasta 8.44 y 4.68 ppm respectivamente. El resto de señales en el espectro de RMN-¹H no se ven apenas alteradas, ya que el efecto de desapantallamiento se disipa a medida que los protones están a mayor distancia. Así, la señal **e** apenas se ve desplazada en 0.1 ppm y el resto de señales prácticamente conservan los mismos desplazamientos que en el derivado neutro **8** y se adjudican según la asignación realizada en este compuesto (Figura II.27).

Figura II.27. Espectro de RMN-¹H de **17** en DMSO-d₆.

En el espectro de RMN-¹³C también se aprecian los efectos de desapantallamiento producido por la carga positiva, (Figura II.28) aunque en menor medida que en el RMN-¹H. La asignación de estas señales se realizó atendiendo a los datos proporcionados por un experimento gHSQC {¹H-¹³C} (Figura II.29), observando los picos de cruce se determinan directamente a que señal en RMN-¹H corresponde cada señal en RMN-¹³C. Así, se observa en el espectro de RMN-¹³C de **17**, que la señal relativa a los fragmentos metilo más cercanos al átomo de nitrógeno, **a** en la Figura II.28, que soporta la carga positiva se ve desplazada a frecuencias más altas en comparación con los derivados neutros, hasta 51.2 ppm, al igual que la señal nombrada **b**, que también se ve ligeramente desplazada hasta 58.4 ppm. Las señales del doble enlace **c** y **d** del triazol se encuentran a 134.7 y 127.3 ppm respectivamente. Mientras que el resto de señales del espectro permanecen prácticamente inalteradas en comparación con el producto neutro **8**.

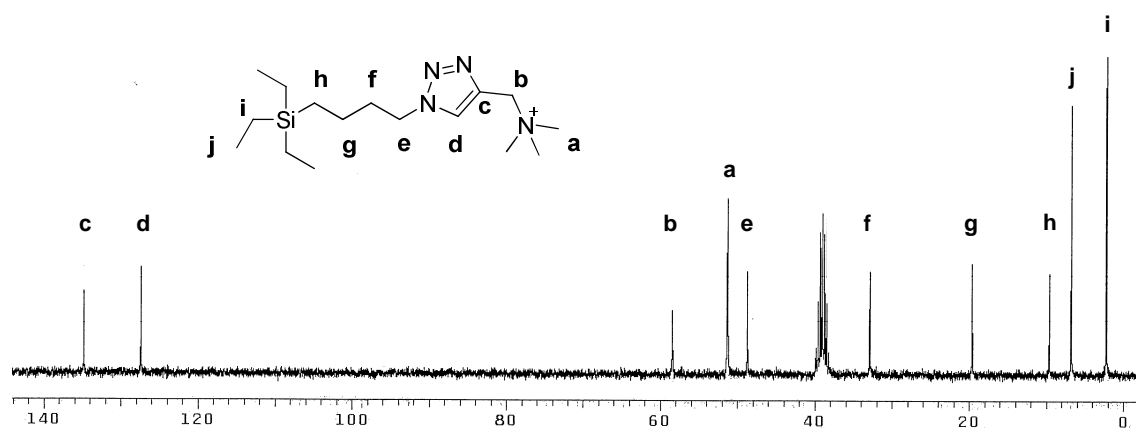


Figura II.28. Espectro de RMN- ^{13}C de **17** en DMSO- d_6 .

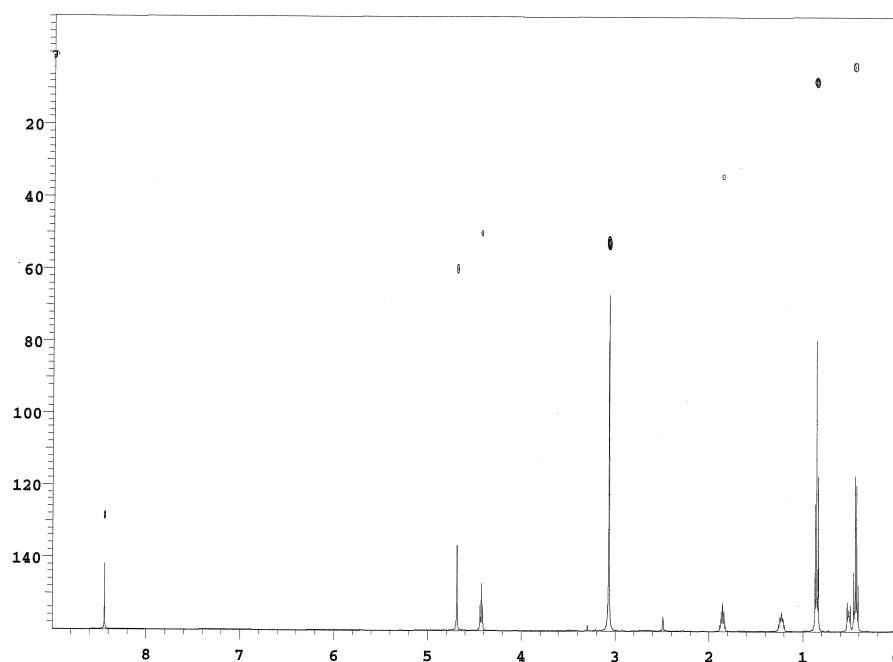


Figura II.29. Espectro gHSQC $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ de **17** en DMSO- d_6 .

Se realizó también un espectro bidimensional RMN gHMBC $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$, para la asignación de los átomos de nitrógeno en el derivado **17**. Dicha asignación es análoga a la del compuesto **8**, salvo que la señal relativa al nitrógeno cuaternizado se ve desplazada hacia frecuencias más altas como consecuencia de la presencia de una carga positiva sobre él (Figura II.30). La asignación de los átomos de nitrógeno en el derivado **17** es la siguiente:

- N(1) nitrógeno alifático: -310 ppm
- N(2) nitrógeno tipo piridina: -32 ppm
- N(3) nitrógeno tipo piridina: -22 ppm
- N(4) nitrógeno tipo pirrol: -138 ppm

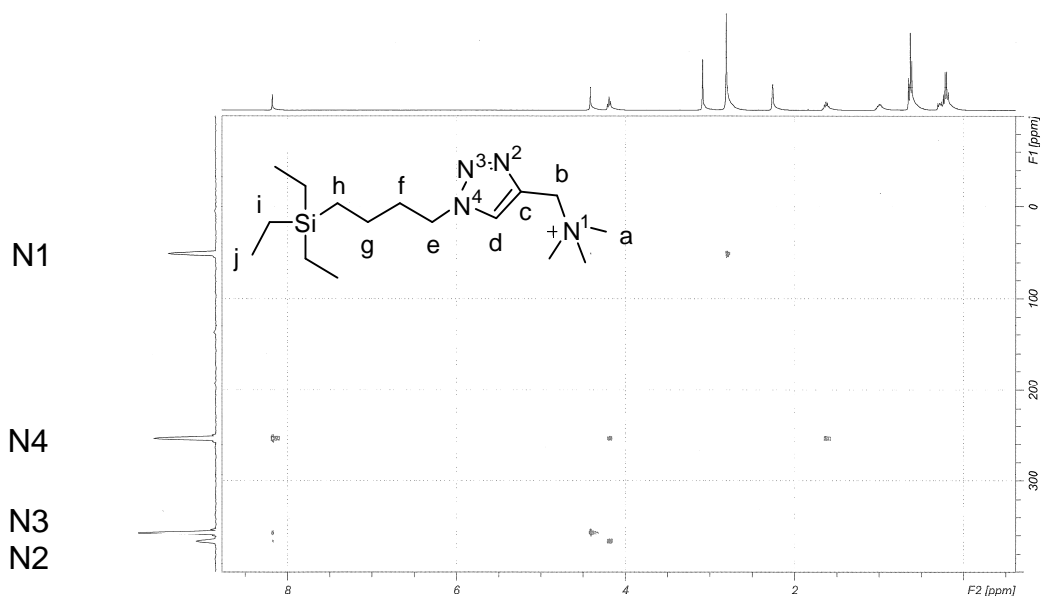
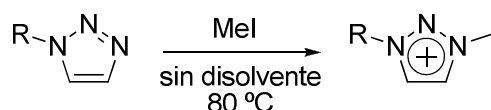


Figura II.30. Espectro bidimensional gHMBC $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ del compuesto **17** en DMSO- d_6 .

Para probar que ninguno de los nitrógenos del anillo de triazol sufría reacciones de cuaternización se probaron distintas condiciones de reacción, basándose en los experimentos de Jeong y colaboradores para la síntesis de líquidos iónicos a partir de triazoles, que consisten en calentar a 80 °C sin disolvente en un tubo cerrado para generar presión en el sistema (Esquema II.31).⁴⁶



Esquema II.31. Condiciones de reacción para la metilación del nitrógeno de un anillo de triazol.

Se ensayaron las siguientes condiciones de reacción para intentar cuaternizar el anillo heterocíclico:

1. Reacción del compuesto **8** con MeI en una proporción 1:15 respectivamente en THF y a temperatura ambiente, durante 48 h. Experimentos de RMN-¹⁵N demuestran que no existe cuaternización sobre el anillo, obteniéndose sólo el derivado **17**.

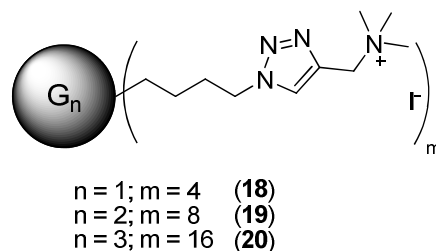
2. Reacción del compuesto **8** con MeI en una proporción 1:50 respectivamente en DMSO y a temperatura ambiente durante 48 h. Experimentos de RMN -¹⁵N demuestran que la cuaternización sobre el anillo avanza de forma muy lenta, observándose mezclas, donde el compuesto mayoritario siempre es **17**.

3. Reacción del compuesto **8** en las condiciones del experimento de Jeong, que supone calentar a 80 °C en DMSO. Tras 12h, se observa la aparición de mezclas de productos atribuidos al compuesto **17** y el de cuaternización del anillo, además de productos de descomposición sin identificar.

Se puede concluir que en las condiciones de reacción en las que se prepara el derivado **17**, es decir un ligero exceso de MeI y temperatura ambiente, no existe riesgo de cuaternización del anillo triazólico.

Caracterización de $G_n[(CH_2)_4(C_2HN_3)CH_2N^+Me_3]_m$ (**18-20**)

En la tabla II.10 se recogen los desplazamientos químicos de las señales observadas en los espectros de RMN-¹H y ¹³C de los dendrímeros **18-20**.



	ASIGNACIÓN	18	19	20
RMN- ¹ H DMSO-d ₆	NCHCN	8.39	8.44	8.38
	SiCH ₂ CHCH ₂ CH ₂ N	4.63	4.64	4.62
	CCH ₂ N	4.38	4.40	4.39
	N(CH ₃) ₂	3.03	3.05	3.04

	$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$	1.82	1.81	1.83
	SiCH_2CH_2	1.25	1.25	1.27
	SiCH_2	0.49	0.50	0.51
	$\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ y $\text{Si}(\text{CH}_3)$	-0.12	-0.10	-0.10
RMN- ^{13}C DMSO- d_6	NCHCN	134.7	134.8	134.8
	NCHCN	127.3	127.3	127.3
	CCH $_2$ N	58.5	58.5	58.4
	$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$	51.3	51.3	51.4
	$\text{N}(\text{CH}_3)_2$	48.7	48.8	48.8
	$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$	32.8	32.8	32.9
	SiCH_2CH_2 y SiCH_2	19.8-13.7	19.8-13.7	19.8-13.7
	$\text{Si}(\text{CH}_3)_2$	-3.9	-3.9	-3.9
	SiCH_3	-	No se observa	-5.1

Tabla II.10. Datos de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C de los productos **18-20** en DMSO- d_6 .

La cuaternización del átomo de nitrógeno sigue el mismo patrón que se observa en el derivado **17** de generación cero, tanto en el espectro de RMN- ^1H como en el espectro de RMN- ^{13}C (ver Figuras II.31 y II.32). Debido a que el nitrógeno está cargado positivamente las señales cercanas deben sufrir un desplazamiento hacia frecuencias más altas y el esqueleto dendrítico no debe sufrir cambios muy importantes debido a la lejanía de la carga iónica. Además, en el espectro de este derivado se observa un ensanchamiento generalizado de todas las señales debido a la carga positiva que soporta (Figura II.31 y Figura II.32).

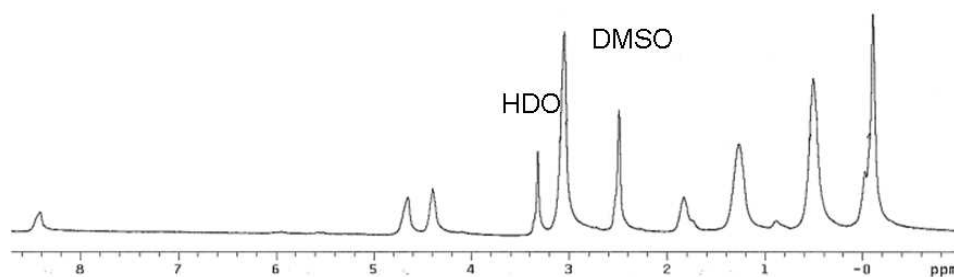


Figura II.31. Espectro de RMN-¹H del dendrímero de segunda generación **19** en DMSO-d₆.

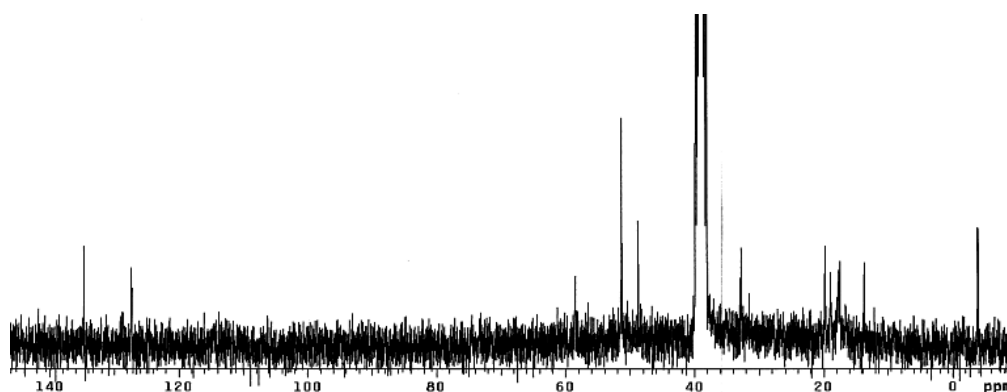
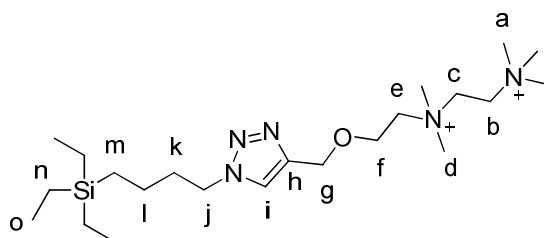


Figura II.32. Espectro de RMN-¹³C del dendrímero de segunda generación **19** en DMSO-d₆.

Caracterización de $G_0[(CH_2)_4(C_2HN_3)CH_2O(CH_2)_2N^+Me_2(CH_2)_2N^+Me_3]$ (21**)**

En la Tabla II.11 se recogen los desplazamientos químicos de las señales observadas en los espectros de RMN-¹H y ¹³C del compuesto **21**.



21

	ASIGNACIÓN	21
RMN- ¹ H DMSO-d ₆	NCHCN	8.17
	CCH ₂ O	4.63
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	4.35
	NCH ₂ CH ₂ N y OCH ₂ CH ₂ N	3.97
	OCH ₂ CH ₂ N	3.65
	N(CH ₃) ₂	3.21
	N(CH ₃) ₃	3.18
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	1.81
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	1.23
	SiCH ₂ CH ₃	0.86
	SiCH ₂ CH ₃ y SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	0.48
RMN- ¹³ C DMSO-d ₆	NCHCN	142.4
	NCHCN	123.5
	CCH ₂ O	62.7
	OCH ₂ CH ₂ N	62.6
	OCH ₂ CH ₂ N	62.4
	NCH ₂ CH ₂ N	56.4 y 55.0
	N(CH ₃) ₃	52.5
	N(CH ₃) ₂	51.2
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	48.4
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	33.1
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	19.6
	SiCH ₂ CH ₃	9.6
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	6.8
SiCH ₂ CH ₃	2.2	

Tabla II.11. Datos de RMN-¹H y RMN-¹³C del derivado 21 en DMSO-d₆.

El espectro de RMN- ^1H de **21** fue realizado en DMSO- d_6 . La señal a campo más bajo observada corresponde al protón del heterociclo **i** a 8.17 ppm, de igual modo a otros espectros descritos previamente. Al igual que en el compuesto **17** la carga positiva que soporta el derivado **21** hace que los protones más cercanos a esas cargas se vean desapantallados en mayor medida que aquellos que se encuentran a mayor distancia. Así, el singlete que se corresponde con el grupo metileno **g**, que se localiza a 4.62 ppm, es asignado debido a que la relativa distancia frente a la carga nuclear de la molécula hace que no se desplace frente a su análogo neutro en el derivado **13**. Lo mismo ocurre con los restos metilénicos nombrados **j** pudiéndose asignar al triplete a 4.35 ppm. Los grupos metilo unidos a los nitrógenos que soportan la carga positiva se ven desapantallados frente al derivado neutro y debido a su entorno químico muy similar aparecen muy cercanos el uno al otro en un rango de ppm muy estrecho. Así la señal a 3.19 ppm integra para 6 protones y se adjudica al pico **d** en la figura y la señal a 3.16 ppm que integra para 9 protones se le adjudica a los grupos metilo nombrados **a**. A continuación aparecen las señales correspondientes a la cadena alifática más cercana al átomo de silicio **k-o** que se asignan según se ha ido mostrando previamente en la memoria (Figura II.33).

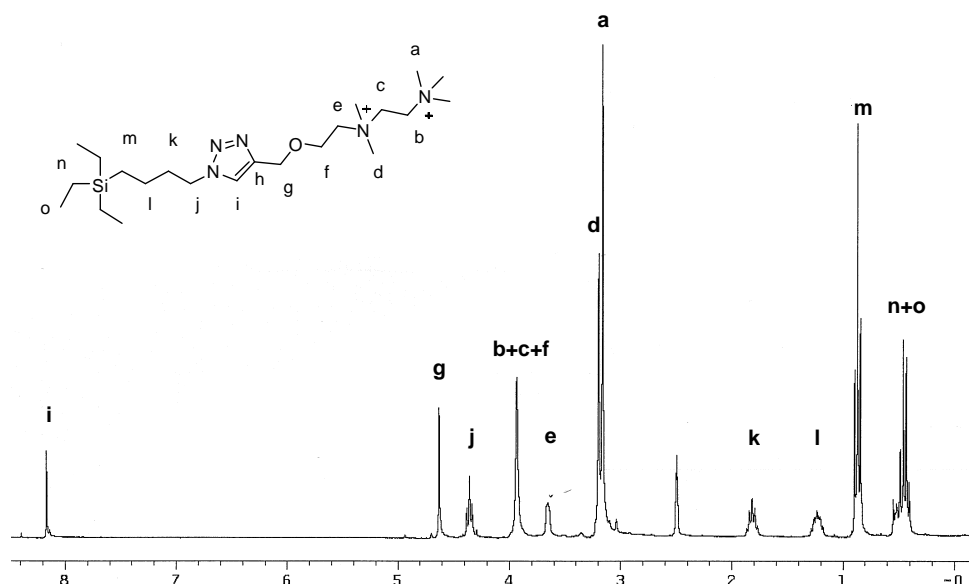


Figura II.33. Espectro de RMN- ^1H de **21** en DMSO- d_6 .

Para la determinación de las señales restantes de los grupos metileno unidos a heteroátomo hubo que recurrir a un experimento bidimensional ROESY, que permite conocer las relaciones espaciales entre protones. Con este experimento se pudo

conocer inequívocamente que la señal **g**, a 4.63 ppm, en RMN-¹H, sufría interacción con la señal a 3.97 ppm, que integra para seis protones. De ello se extrae que en esa señal está englobada la señal **f** de la figura, ya que es la que está espacialmente más cercana a ella (marcado en azul en la Figura II.34). Por otro lado la señal marcada como **e** se adjudica inequívocamente al triplete ancho a 3.65 ppm ya que en el ROESY se observa que esta señal sí posee efecto NOE sobre la señal **d** que está más cercana (marcado en rojo en la Figura II.34) y no se observa ninguna interacción con el singlete que integra para 9 protones nombrado **a**. La señal a 4.35 ppm muestra interacciones espaciales con los multipletes a 1.81, 1.23 y 0.48 ppm que pertenecen a la cadena alifática unida directamente al silicio. Esto permite asignar ese triplete inequívocamente al grupo metileno **j** (en verde en la Figura II.34). Por último, sólo quedan por asignar las señales marcadas como **b** y **c**, que poseen un entorno químico muy similar y aparecen junto a **f** en el singlete a 3.97 ppm, esto se confirma observando que esta señal posee interacciones cruzadas en el espectro de ROESY con las señales **a** y **d** (Figura II.34).

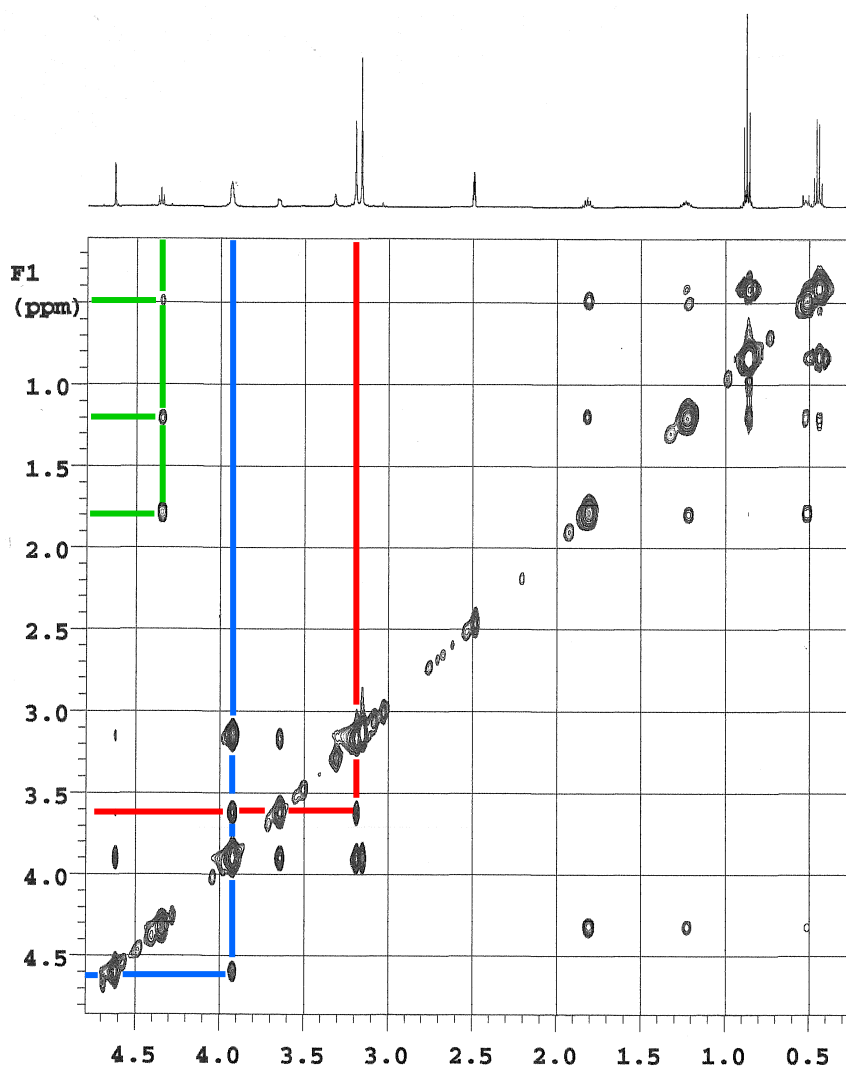


Figura II.34. Espectro ROESY $\{^1\text{H}-^1\text{H}\}$ de **21** en DMSO- d_6 .

El espectro de RMN- ^{13}C realizado en DMSO- d_6 de **21** (Figura II.35) posee cierta complejidad debido a los entornos químicos tan similares que imponen tanto el átomo de oxígeno como los dos nitrógenos cargados positivamente. Para dilucidarlo se recurrió a técnicas de RMN bidimensional $^1\text{H}-^{13}\text{C}$. Las señales de los átomos de carbono del triazol son los más desapantallados, debido a que están incluidos en el anillo aromático y éstos aparecen a 142.4 y 123.4 ppm, adjudicados a **h** y **i** respectivamente. En un margen muy estrecho aparecen las señales 62.7, 62.6 y 62.4 ppm que mediante un experimento de gHSQC $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ (Figura II.36) se asignan a **g**, **f** y **e** en la Figura II.35. Las dos señales a 56.4 y 55.5 ppm se asignan a los átomos de carbono **b** y **c**, que se sitúan entre ambos átomos de nitrógeno de la cadena. A 52.5 y 51.2 ppm aparecen los fragmentos metilo enlazados a átomos de nitrógeno **a** y **d**. Seguidamente, se observan las señales que están más próximas al átomo de silicio

que ejerce un efecto de apantallamiento a medida que los átomos de carbono están más próximos a éste. Así, los átomos de carbono **j**, **k**, **l** y **m** se asignan en la figura a las señales situadas a 48.4, 33.1, 19.6 y 9.6 ppm respectivamente. Por último, los átomos de carbono **n** y **o** se asignan a las señales a 6.8 y 2.2 ppm.

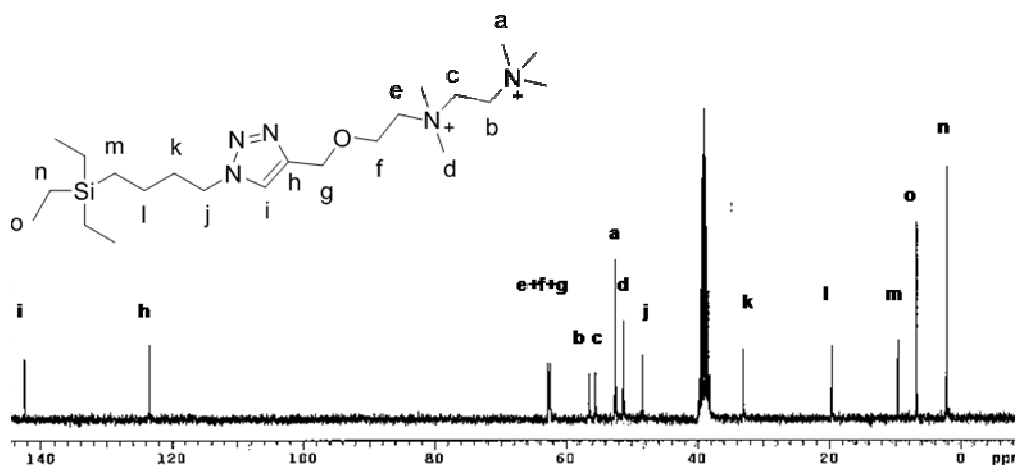


Figura II.35. Espectro de RMN-¹³C de **21**.

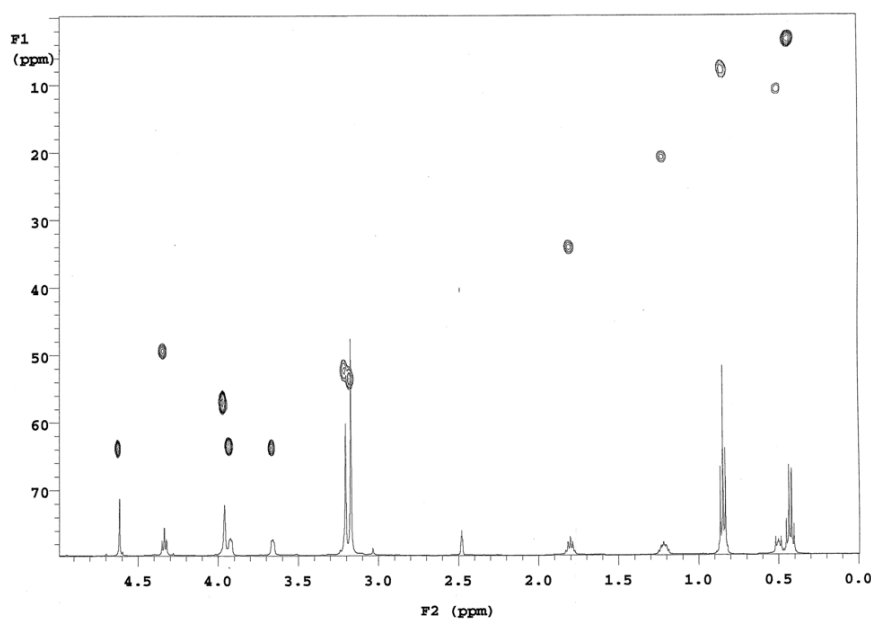


Figura II.36. gHSQC {¹H-¹³C} de **21** en DMSO-d₆.

En el espectro bidimensional RMN gHSQC {¹H-¹⁵N} para el derivado **21**, la asignación de los átomos de nitrógeno es análoga a la del compuesto **13**, salvo que las señales de los átomos de nitrógeno cuaternizados, se ven desplazadas a frecuencias más altas como consecuencia de la presencia de una carga positiva sobre

cada uno de ellos (ver Figura II.37). Tomando como base el estudio llevado a cabo para los derivados **13** y **17**, la asignación es la siguiente:

N(1) nitrógeno alifático: -331 ppm

N(2) nitrógeno alifático: -326 ppm

N(3) nitrógeno tipo piridina: -28 ppm

N(4) nitrógeno tipo piridina: -17 ppm

N(5) nitrógeno tipo pirrol: -129 ppm

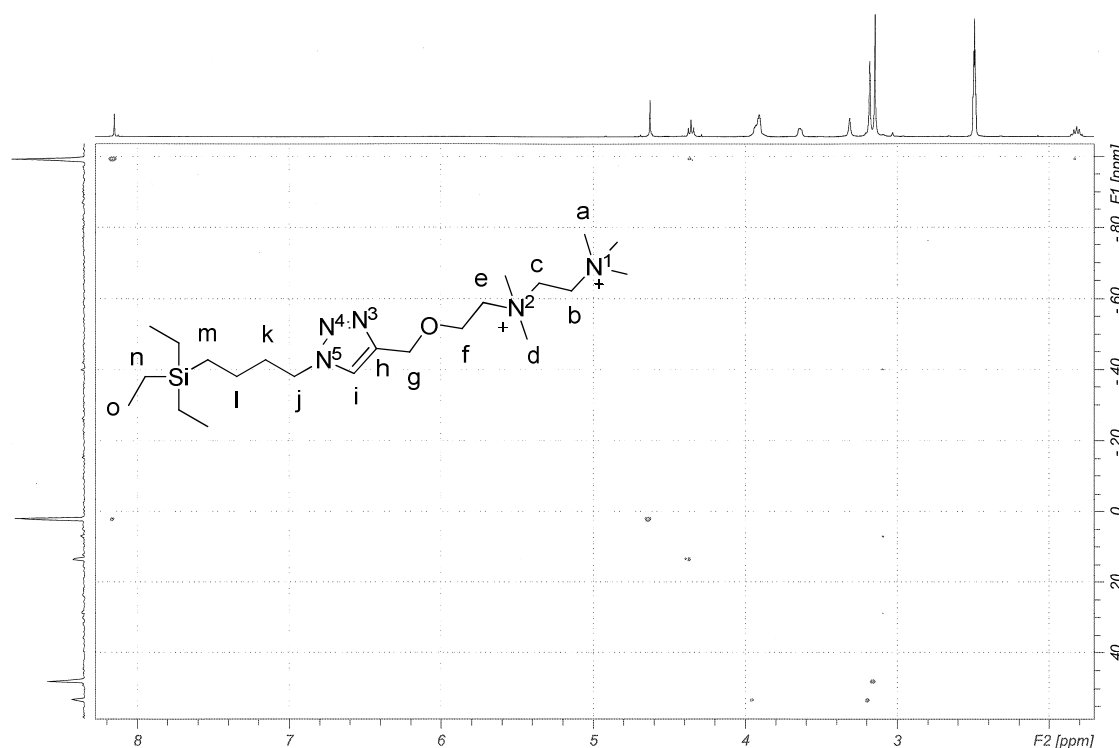
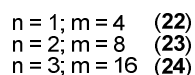
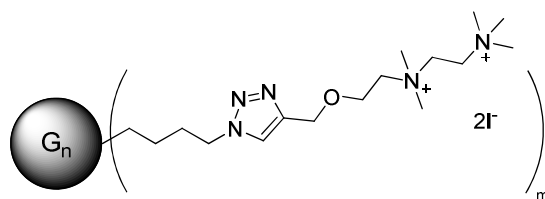


Figura II.37. Espectro de RMN gHMBC $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ de **21**.

De nuevo, cabe destacar que no existe modificación de las señales atribuidas al anillo triazol tras la adición de un exceso de MeI, lo que corrobora la no cuaternización de los átomos que conforman dicho anillo.

Caracterización de $G_n[(\text{CH}_2)_4(\text{C}_2\text{HN}_3)\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{N}^+\text{Me}_2(\text{CH}_2)_2\text{N}^+\text{Me}_3]_m$ (22-24)

En la tabla II.12 se recogen los desplazamientos químicos de las señales observadas en los espectros de RMN- ^1H y ^{13}C de los dendrímeros **22-24**.



	ASIGNACIÓN	22	23	24
RMN- ¹ H DMSO-d ₆	NCHCN	8.18	8.18	8.20
	CCH ₂ O	4.63	4.62	4.63
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	4.33	4.33	4.32
	NCH ₂ CH ₂ N y OCH ₂ CH ₂ N	3.94	3.94	3.98
	OCH ₂ CH ₂ N	3.66	3.66	3.68
	N(CH ₃) ₂	3.20	3.20	3.20
	N(CH ₃) ₃	3.17	3.20	3.20
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	1.79	1.79	1.76
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	1.24	1.27	1.26
	SiCH ₂ CH ₂	0.52	0.51	0.50
Si(CH ₃) ₂ y Si(CH ₃)	-0.10	-0.10	-0.11	
RMN- ¹³ C DMSO-d ₆	NCHCN	142.4	142.4	142.4
	NCHCN	123.4	123.4	123.5
	CCH ₂ O	62.8	62.8	62.8
	OCH ₂ CH ₂ N	62.6	62.7	62.7
	OCH ₂ CH ₂ N	62.4	62.4	62.4
	NCH ₂ CH ₂ N	56.5 y 55.5	56.4 y 55.6	56.4 y 55.6
	N(CH ₃) ₃	52.5	52.5	52.5
	N(CH ₃) ₂	51.2	51.2	51.2
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	48.5	48.5	48.5
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	33.0	33.0	33.0
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N y SiCH ₂	19.8-13.7	19.8-13.7	19.8-13.7
	Si(CH ₃) ₂	-3.8	-3.9	-3.9
SiCH ₃	-	-5.3	-5.4	

Tabla II.12. Datos de RMN-¹H y ¹³C de los productos **22-24** en DMSO-d₆.

Al igual que se ha comentado previamente, la cuaternización de los átomos de nitrógeno de **22-24** sigue el mismo patrón que se observa en el derivado **21** tanto en el espectro de RMN-¹H como en el espectro de RMN-¹³C. Sin embargo, debido a que ya

no son solubles en CDCl_3 , los espectros se han registrado en DMSO lo que impide las comparaciones con la especie análoga neutra (Figura II.38 y Figura II.39).

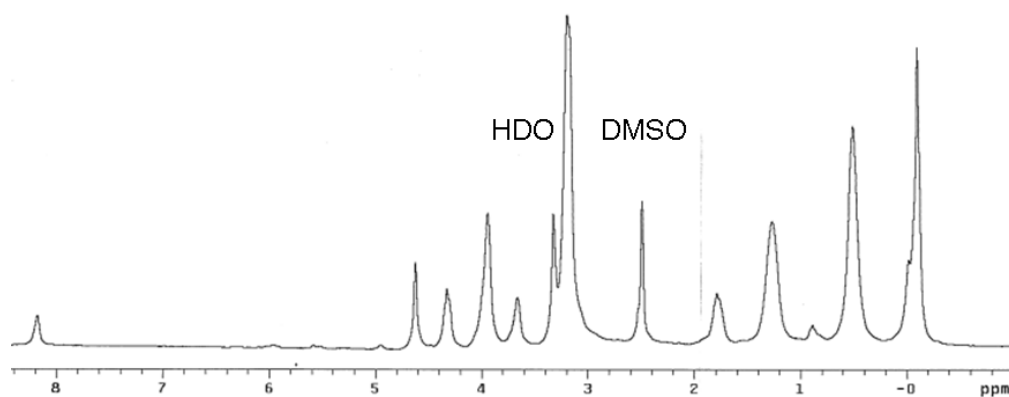


Figura II.38. Espectro de RMN^{-1}H de **23** en DMSO-d_6 .

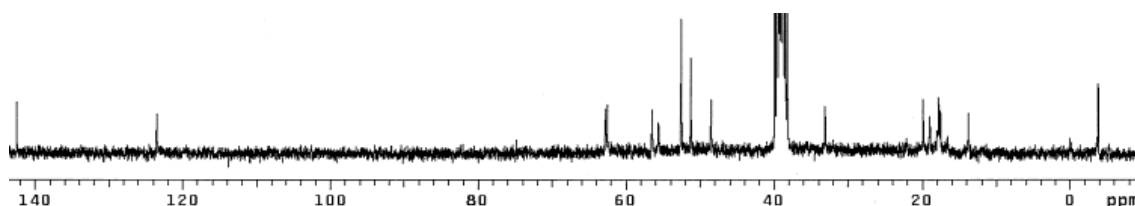


Figura II.39. Espectro de RMN^{-1}H de **23** en DMSO-d_6 .

2.4.4 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

También se han caracterizado los compuestos **9-11** y **14-16** mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Para el compuesto **9**, de primera generación se observa que el ion molecular es la señal mayoritaria, y se observan múltiples fragmentaciones, algunas de ellas debidas a pérdidas de fragmentos metilo. En el espectro de masas del compuesto de primera generación **14** se puede observar el ión molecular más un protón o más átomos de sodio o potasio dependiendo de la matriz y metodología utilizada en el proceso, aunque en ninguno de estos espectros son la señal mayoritaria, probablemente debido a que sufre numerosas fragmentaciones. Para los compuestos **10** y **15**, de segunda generación también se observan que las señales relativas a los iones moleculares son las señales de mayor proporción masa/carga, sin embargo, estas no son las de mayor intensidad. En los compuestos **11** y **16** de tercera generación, tan sólo se observan envolventes que ocupan casi la

totalidad del espectro y que no permiten distinguir señales discretas relativas a ningún compuesto.

A medida que aumenta la generación de estos dendrímeros aumenta la dificultad para volatilizarlos y también se dificulta la capacidad que tienen para desplazarse hacia el detector, obteniéndose espectros muy anchos con numerosas fragmentaciones. A modo de ejemplo se muestran los espectros de masas de los derivados neutros de segunda generación **10** y **15** en la Figura II.40.

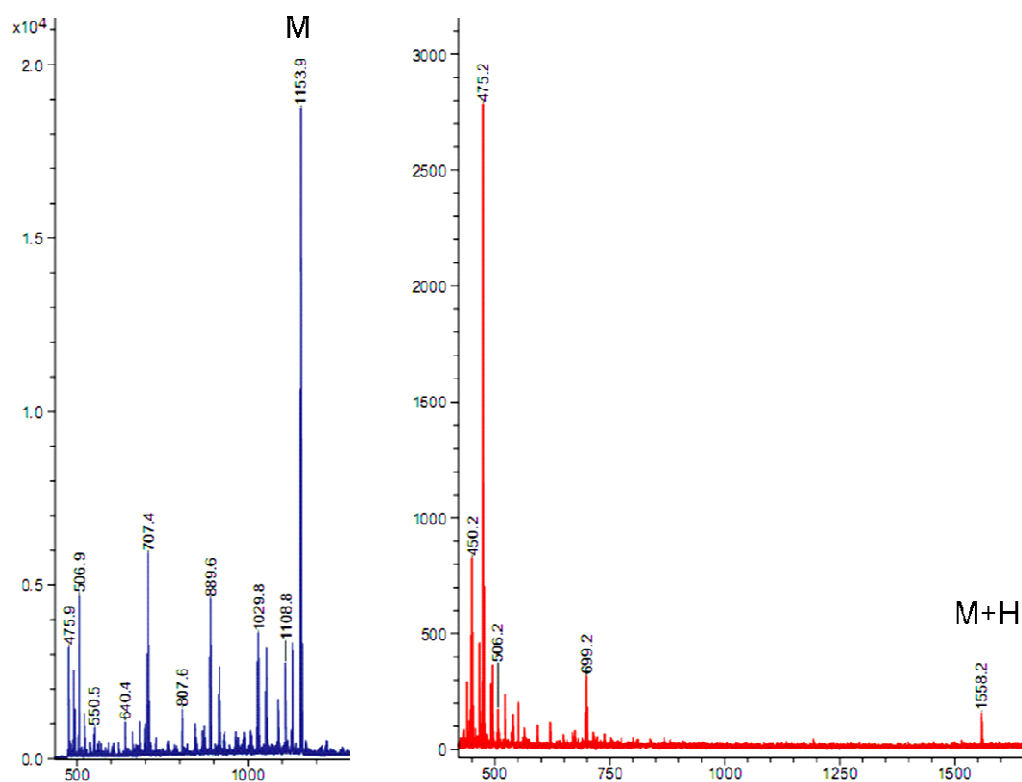


Figura II.40. Espectros MALDI-TOF de los compuestos **10** y **15**.

Hay que resaltar que también se realizaron los espectros de masas de de los compuestos catiónicos **18-20** y **22-24**, sin embargo, los experimentos realizados no mostraron resultados satisfactorios, ya que no fue posible detectar ninguna señal proveniente de dichos compuestos muy probablemente debido a la dificultad para volatilizar sustancias iónicas y a las múltiples fragmentaciones que pueden sufrir estos derivados.

2.5 BIBLIOGRAFÍA

- ¹ J. Roovers, P. M. Toporowski and L. L. Zhou, *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* **1992**, 33, 182.
- ² L. L. Zhou and J. Roovers, *Macromolecules* **1993**, 26, 963.
- ³ K. Bruning and H. Lang, *J. Organomet. Chem.* **1998**, 571, 145.
- ⁴ K. Bruning and H. Lang, *J. Organomet. Chem.* **1999**, 575, 153.
- ⁵ K. Bruning and H. Lang, *Synthesis* **1999**, 1931.
- ⁶ J. Hu and D. Y. Son, *Macromolecules* **1998**, 31, 8644.
- ⁷ M. Veith, R. Elsaesser and R.-P. Krueger, *Organometallics* **1999**, 18, 656.
- ⁸ A. Krupkova, J. Cermak, Z. Walterova and J. Horsky, *Macromolecules* **2010**, 43, 4511.
- ⁹ C. Kim and H. Kim, *Molecules* **2009**, 14, 1605.
- ¹⁰ K. Lorenz, R. Mulhaupt, H. Frey, U. Rapp and F. J. Mayerposner, *Macromolecules* **1995**, 28, 6657.
- ¹¹ M. H. Chai, Z. J. Pi, C. Tessier and P. L. Rinaldi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 273.
- ¹² J. Allgaier, K. Martin, H. J. Rader and K. Mullen, *Macromolecules* **1999**, 32, 3190.
- ¹³ Z. C. Wu and K. Biemann, *Int. J. Mass Spectrom.* **1997**, 165, 349.
- ¹⁴ P. Govender, A. K. Renfrew, C. M. Clavel, P. J. Dyson, B. Therrien and G. S. Smith, *Dalton Trans.* **2011**, 40, 1158.
- ¹⁵ J. Leveque, C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker, F. Loiseau, S. Serroni, F. Puntoriero, S. Campagna, H. Nierengarten and A. Van Dorsselaerc, *Chem. Commun.* **2004**, 878.
- ¹⁶ K. Rengan and R. Engel, *J. Chem. Soc.-Chem. Commun.* **1990**, 1084.
- ¹⁷ K. Rengan and R. Engel, *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1* **1991**, 987.
- ¹⁸ R. C. van Duijvenbode, M. Borkovec and G. J. M. Koper, *Polymer* **1998**, 39, 2657.
- ¹⁹ G. J. M. Koper, M. H. P. van Genderen, C. Elissen Roman, M. Baars, E. W. Meijer and M. Borkovec, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 6512.
- ²⁰ D. Cakara, J. Kleimann and M. Borkovec, *Macromolecules* **2003**, 36, 4201.
- ²¹ A. M. Caminade and J. P. Majoral, *Prog. Polym. Sci.* **2005**, 30, 491.
- ²² R. van de Coevering, M. Kuil, R. Gebbink and G. van Koten, *Chem. Commun.* **2002**, 1636.
- ²³ H. F. Chow, T. K. K. Mong, Y. H. Chan and C. H. K. Cheng, *Tetrahedron* **2003**, 59, 3815.
- ²⁴ Z. B. Shifrina, N. V. Kuchkina, P. N. Rutkevich, T. N. Vlasik, A. D. Sushko and V. A. Izumrudov, *Macromolecules* **2009**, 42, 9548.
- ²⁵ K. Luo, C. Li, G. Wang, Y. Nie, B. He, Y. Wu and Z. Gu, *J. Controlled Release* **2011**, 155, 77.
- ²⁶ J. W. Kriesel, S. Konig, M. A. Freitas, A. G. Marshall, J. A. Leary and T. D. Tilley, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12207.
- ²⁷ I. Angurell, G. Muller, M. Rocamora, O. Rossell and M. Seco, *Dalton Trans.* **2003**, 1194.
- ²⁸ S. W. Krska and D. Seyferth, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 3604.
- ²⁹ P. Ortega, J. F. Bermejo, L. Chonco, E. de Jesús, F. J. de la Mata, G. Fernández, J. C. Flores, R. Gómez, M. J. Serramía and M. A. Muñoz-Fernández, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, 1388.
- ³⁰ B. Rasines, J. M. Hernández-Ros, N. de las Cuevas, J. L. Copa-Patiño, J. Soliveri, M. A. Muñoz-Fernández, R. Gómez and F. J. de la Mata, *Dalton Trans.* **2009**, 8704.
- ³¹ B. Alonso, I. Cuadrado, M. Morán and J. Losada, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 2575.

- ³² I. Cuadrado, M. Morán, J. Losada, C. M. Casado, C. Pascual, B. Alonso and F. Lobete, *Adv. Dendritic Macromol.* **1996**, 3, 151.
- ³³ I. Cuadrado, M. Morán, A. Moya, C. M. Casado, M. Barranco and B. Alonso, *Inorg. Chim. Acta* **1996**, 251, 5.
- ³⁴ A. W. Van der Made and P. W. N. M. Van Leeuwen, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 1400.
- ³⁵ A. W. van der Made, P. W. N. M. van Leeuwen, J. C. de Wilde and R. A. C. Brandes, *Adv. Mater.* **1993**, 5, 466.
- ³⁶ B. Comanita and J. Roovers, *Des. Monomers Polym.* **1999**, 2, 111.
- ³⁷ S. W. Krska, D. Y. Son and D. Seyferth, *Silicon-Containing Polym.* **2000**, 615.
- ³⁸ D. Seyferth, T. Kugita, A. L. Rheingold and G. P. A. Yap, *Organometallics* **1995**, 14, 5362.
- ³⁹ D. Seyferth, D. Y. Son, A. L. Rheingold and R. L. Ostrander, *Organometallics* **1994**, 13, 2682.
- ⁴⁰ S. W. Krska and D. Seyferth, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 3604.
- ⁴¹ A. J. Cornish, M. F. Lappert, G. L. Filatovs and T. A. Nile, *J. Organomet. Chem.* **1979**, 172, 153.
- ⁴² J. Sánchez-Nieves, P. Ortega, M. A. Muñoz-Fernández, R. Gómez and F. J. de la Mata, *Tetrahedron* **2010**, 66, 9203.
- ⁴³ R. C. Storr, *Organic Reaction Mechanisms* **1969**, 179.
- ⁴⁴ T. B. Casserly and K. K. Gleason, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 13605.
- ⁴⁵ E. Pretsch, T. Clerc, J. Seibl and W. Simon, *Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos* **1998**, B15.
- ⁴⁶ Y. Jeong and J. S. Ryu, *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 4183.

Capítulo 3: Aplicaciones biomédicas de dendrimeros carboxilano catiónicos

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en la aplicación de los dendrímeros catiónicos presentados en el capítulo 2 de esta memoria, tanto como transfectantes de material genético al interior celular, como su utilización como agentes antibacterianos frente a bacterias Gram+ y bacterias Gram-.

3.1 ANTECEDENTES DE DENDRÍMEROS CATIÓNICOS COMO TRANSPORTADORES DE MATERIAL GENÉTICO

En los últimos 15 años ha habido un gran interés en el uso de material genético para el tratamiento de diversas enfermedades. Distintos tipos de ADN, ARN, péptidos y proteínas pueden ser utilizados para el desarrollo de tratamientos contra virus, cáncer y trastornos genéticos. Sin embargo, estas moléculas carecen de estabilidad una vez se encuentran en organismos vivos y pueden verse comprometidas por la presencia de ciertas enzimas o ser eliminadas mediante fagocitosis. Además, pueden tener dificultades para ser internalizadas en el citoplasma celular, lo cual impide que lleven a cabo su actividad terapéutica. Estas características hacen que, paralelo al incremento en el número de publicaciones dedicadas a la terapia con ácidos nucleicos, haya crecido también el interés en el desarrollo de transportadores, que sean capaces de proteger y trasladar el material genético hasta el lugar donde sea capaz de ejercer su función terapéutica.

3.1.1 VECTORES PARA EL TRANSPORTE DE MATERIAL GENÉTICO

Hoy en día existen dos tipos de vectores para introducir genes en el interior celular: virales y no virales.

Vectores virales

El uso de vectores virales es el más extendido debido a su gran eficiencia en la transfección en múltiples líneas celulares. Esta eficacia es debida a que los virus han evolucionado para superar barreras celulares que les permiten perpetuarse.¹⁻³ Sin embargo, existen diversos problemas asociados a este tipo de transportador:

- i) existe un espacio limitado en el genoma viral para la transfección de otros genes, por tanto no es posible transfectar cadenas genéticas de gran tamaño.
- ii) el precio de la producción de estos sistemas en grandes cantidades es muy elevado y requiere de tecnología muy avanzada, incrementando el coste final de la terapia.
- iii) la seguridad de estos sistemas es relativa, debido a que pueden ser muy tóxicos y debido a su naturaleza pueden provocar una respuesta inmune grave en un paciente e incluso procesos cancerosos al insertar el material genético al azar en la célula huésped.

Vectores no-virales

Los inconvenientes expuestos en el punto anterior son perfectamente solucionados por vectores no-virales, ya que presentan las siguientes propiedades:

- i) no suelen producir respuesta inmune, lo que supone una gran ventaja en caso de que sean administrados de manera continuada.
- ii) la síntesis de éstos suele ser sencilla y puede llevarse a cabo en grandes cantidades por un precio moderado.
- iii) la estructura de los vectores no virales puede variarse según las necesidades, cambiando el tamaño, polaridad y naturaleza de éstos.
- iv) por último, los vectores no-virales son capaces de transportar material genético de gran tamaño al interior celular.

En comparación con los vectores virales, estos sistemas no-virales podrían parecer más adecuados para su uso como transfectantes. Sin embargo, su mayor desventaja reside en que dichos vectores poseen una capacidad de transfección significativamente reducida en comparación con los vectores virales. Es por ello, que

durante los últimos años se ha incrementado el interés en el desarrollo de nuevas metodologías para la síntesis y aplicación de estas moléculas que mejoren su capacidad como transportadores de material genético al núcleo celular.

Existen numerosos agentes transfectantes previamente mencionados en el capítulo 1 de esta memoria: liposomas, polímeros y dendrímeros catiónicos. Este capítulo se centrará en este último tipo de agentes transfectantes, los dendrímeros catiónicos.

3.1.2 TIPOS DE MATERIAL GENÉTICO TRANSFECTADO Y MECANISMO DE ACCIÓN

Desde que se publicaron los primeros artículos en los años 70 sobre el uso de material genético con valor terapéutico, se han desarrollado distintas metodologías para la aplicación de los ácidos nucleicos en terapia contra diversas enfermedades, algunas de las cuales consisten en utilizar ADN plasmídico (ADNp), oligonucleótidos (ODN) y ARN pequeño de interferencia (ARNpi).

ADN plasmídico (ADNp)

Los plásmidos son moléculas de ADN circulares de origen bacteriano sobre las que se insertan genes. El ADNp es en sí mismo un transportador encargado de transfectar el material genético, que contiene el gen terapéutico y un gen promotor. Dentro del núcleo celular el ADNp, gracias al gen promotor que contiene, provoca la expresión del gen terapéutico, que puede ser “traducido” a un ARN mensajero (ARNm) que será el encargado de salir al citoplasma celular para expresar dicho gen en forma de una proteína funcional.

Este tipo de terapia fue uno de los primeros métodos utilizados en terapia génica bajo el nombre de “ADN desnudo”. Sin embargo, aunque es un método válido para ciertas líneas celulares, generalmente es muy poco eficaz para transfectar material genético al interior de una célula. Tan solo una pequeña parte del ADNp es capaz de alcanzar el núcleo celular,⁴⁻⁶ debido al gran tamaño del ADNp y su rápida degradación causada por la presencia de nucleasas.⁵⁻¹¹

La utilización de ADNp generalmente se lleva a cabo utilizando algún tipo de ayuda externa o de otro vector que lo proteja y transporte al interior celular. Este tipo de ayudas pueden ser físicas (biobalística,^{12,13} electroporación,^{14,15} inyección directa,¹⁶ etc.), aunque este tipo de medidas suelen poner en riesgo la integridad de la membrana celular. Otra metodología consiste en la utilización de un compuesto químico sintético que se una al ADNp condensándolo a su alrededor.

Oligonucleótidos

Los ODN son un tipo de secuencia de ácidos nucleicos, ya sea ADN o ARN, de pequeño tamaño, generalmente inferior a 50 pares de bases. Se suelen considerar tres mecanismos de acción para los ODN en la regulación de la expresión génica: silenciamiento de ARN mensajero (ARNm), la formación de ADN triplex, o unirse a un factor de transcripción.

1. El silenciamiento de ARNm se produce una vez se ha transcrito un gen a su forma de ARNm. La presencia de un ODN en el núcleo que posea una secuencia complementaria de un fragmento de ese ARNm, hace que ambos se unan siguiendo el modelo descubierto por Watson y Crick. La doble hélice formada impide que el ARNm se una a los ribosomas encargados de la formación de la proteína correspondiente al gen transcrito. Este tipo de terapia se la denomina terapia antisentido.
2. La formación de ADN triplex supone la unión del ODN a una parte de una molécula de ADN que contiene un gen diana. Esta asociación de tres cadenas es capaz de inhibir la transcripción del gen a ARNm anulando su expresión. Este tipo de terapia posee la ventaja, frente al silenciamiento del ARNm, que necesita de menores cantidades de ODN para ser efectivo ya que una sola molécula de ODN es capaz de bloquear cualquier formación de ARNm.
3. Los factores de transcripción son proteínas que se unen a secuencias concretas de ADN y que regulan la transcripción de la cadena de ADN a ARNm. La unión de un ODN a los factores de transcripción hace que

éste último sea incapaz de unirse al ADN y, por tanto, que comience la formación por los ribosomas de la cadena de ARNm asociada a ese gen.

Generalmente, el uso de ODN requiere la utilización de agentes transfectantes para que ejerzan su función, ya que poseen un corto tiempo de vida *in vivo* y no son capaces de atravesar la membrana celular, debido a la alta carga negativa que poseen.^{17,18} Los ODN también se benefician de los métodos físicos utilizados para la transfección de ADNp, mencionados previamente en este capítulo. Todos estos inconvenientes, hacen que aunque la terapia con ODN sea efectiva *in vitro*, tenga aplicaciones limitadas *in vivo*.¹⁹

ARN pequeño de interferencia (ARNpi)

El ARNpi es un tipo de ARN de doble cadena que puede regular la expresión selectiva de genes específicos. Este método está englobado en la terapia antisentido.

El mecanismo de silenciamiento mediante ARNpi comienza con la acción del complejo de silenciamiento inducido por ARN (en sus siglas en inglés RISC), que es un complejo que incorpora la hebra antisentido del ARNpi y la utiliza para encontrar el ARNm complementario bloqueándolo y eliminándolo mediante la acción de una ribonucleasa incluida en el complejo.²⁰ Este tipo de mecanismo, debido a que activa la acción catalítica de una proteína que degrada el material genético, es capaz de actuar a concentraciones muy por debajo de las necesarias para aplicar la terapia antisentido con ODN, siendo este mecanismo 1000 veces más efectivo que la terapia con ODN.²¹

Al igual que en otros ácidos nucleicos el ARNpi se degrada rápidamente en el organismo por la acción de las nucleasas. Aunque su tiempo de vida media es superior al de los ODN, es necesario realizar modificaciones químicas sobre éste,²² o unirlo a vectores que lo protejan y lo ayuden a atravesar membranas biológicas. Otra ventaja de este tipo de terapia con ácidos nucleicos es que la acción del ARNpi ocurre en el citosol por lo que no es necesario atravesar la membrana nuclear.

3.1.3 DENDRÍMEROS COMO VECTORES DE MATERIAL GENÉTICO

Desde 1993 se ha contemplado el uso de dendrímeros como transfectantes de material genético al interior celular, gracias al trabajo inicial de Szoka y colaboradores.²³ En este trabajo se utilizaron dendrímeros en vez de polímeros como transfectantes debido a que la estructura y peso definido de los dendrímeros conlleva ventajas a la hora de preparar las formulaciones entre los ácidos nucleicos y el dendrímero

Una de las condiciones fundamentales para que un dendrímero sea adecuado para su uso como transfectante es que éste sea catiónico. Esta carga positiva es necesaria para poder unir ácidos nucleicos, que poseen una carga efectiva negativa, mediante interacciones de tipo electrostático entre los grupos catiónicos y los grupos fosfato soportados por las ribosas o desoxirribosas que forman parte de los nucleótidos. Así, los dendrímeros se sitúan enroscándose alrededor de la cadena,²⁴⁻²⁶ aunque algunos modelos sugieren que en el interior de la doble hélice existe hueco para albergar moléculas de dendrímeros (Figura III.1).^{27,28} Este tipo de interacciones son capaces de condensar el ADN muy eficientemente y reducir el tamaño de la cadena extendida varios cientos de nanómetros. Se considera que con cada generación, el dendrímero es capaz de doblar el número de grupos fosfato que es capaz de unir electrostáticamente.²⁹

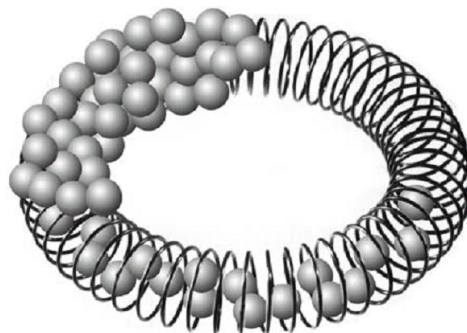


Figura III.1. Modelo de condensación de un ADNp por parte de un dendrímero catiónico.

En el proceso de condensación del material genético con las estructuras dendríméricas (también conocido como dendriplejo, por analogía a los llamados complejos formados entre liposomas y ácidos nucleicos nombrados lipoplejos), se considera que la forma y estructura del dendrímero son claves. Así, se sabe que dendrímeros más flexibles son capaces de interactuar más eficazmente con los ácidos nucleicos, lo que repercute en una mayor capacidad de transfección.³⁰

En cuanto a la entrada del complejo ácido nucleico-dendrímero en el citoplasma celular, un exceso de carga positiva ayuda a que el condensado pueda unirse electrostáticamente a las glicoproteínas y glicolípidos de naturaleza aniónica que forman parte de la envoltura celular, facilitando la entrada de éste al citoplasma, además de contribuir a la estabilidad del complejo en disolución y aumentar su solubilidad en agua. Estudios de microscopía confocal han mostrado que la entrada del complejo ocurre por endocitosis.³¹ En el interior del endosoma, el pH baja hasta 5 y el dendrímero protege al material genético de las condiciones ácidas de éste y de las nucleasas que contiene. La entrada en el núcleo es más complicada, ya que el movimiento hacia el núcleo celular se ve dificultado por lo entramado del citoesqueleto.³² Además, la entrada al núcleo no es sencilla para macromoléculas de cierto tamaño, por lo que generalmente el transporte del material genético se ve favorecido durante la mitosis celular, durante la cual la envoltura nuclear se rompe, permitiendo el paso del complejo ácido nucleico-dendrímero (Figura III.2).³³ Una alternativa a este proceso de transporte al interior nuclear, es la modificación del dendrímero con péptidos que faciliten esta entrada.³⁴

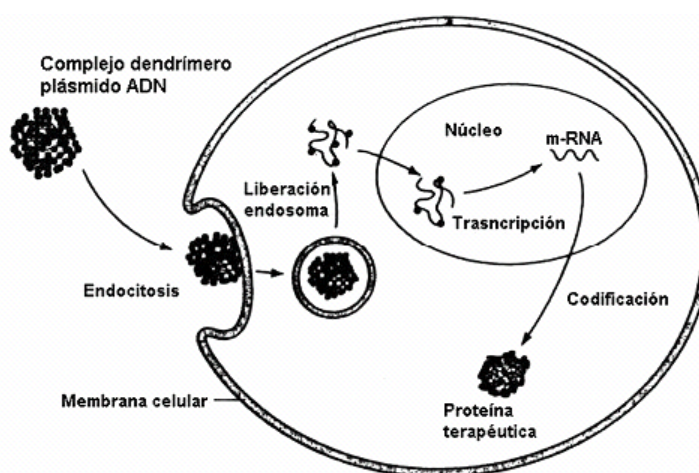


Figura III.2. Proceso de transfección de un complejo dendrímero-ácido nucleico.

La naturaleza catiónica de los dendrímeros usados en transfección también posee efectos negativos, ya que son capaces de desestabilizar la membrana celular haciendo que se formen agujeros nanométricos en la estructura que pueden comprometer la integridad de la célula. A medida que la generación aumenta, la toxicidad se incrementa, aunque el grado de esta toxicidad depende de la línea celular ensayada.³⁵⁻³⁷ Estudios realizados *in vivo* llegan a idéntica conclusión, a medida que se aumenta la generación, aumenta la toxicidad.³⁸ Se han realizado múltiples intentos de realizar modificaciones a diversos dendrímeros para disminuir la toxicidad de éstos, como por ejemplo acetilar la periferia o utilizar cadenas de polietilenglicol para tratar de ocultar las cargas positivas, pero esto, generalmente, reduce la capacidad de transfección del dendrímero.^{35,39,40}

3.1.4 TIPOS DE DENDRÍMEROS UTILIZADOS EN TRANSFECCIÓN

Debido a los resultados prometedores obtenidos con el uso de estructuras dendríméricas como vectores de transfección de material genético en el interior de distintos tipos de células, en los últimos años ha habido una gran expansión en el número de familias de dendrímeros sintetizadas para tal fin. Sin embargo, son cinco las familias sobre las que se han realizado sistemáticamente más ensayos de transfección: PAMAM, PPI, Polilisina, PPH y CBS (carbósilano).

Dendrímeros poliamidoamina (PAMAM)

Como ya se ha comentado en los capítulos previos, los dendrímeros PAMAM fueron los primeros esqueletos dendríticos en estar disponibles comercialmente, lo que provoca que la amplia mayoría de publicaciones relativas a transfección de material genético utilizando dendrímeros como vectores estén realizadas con esta familia de dendrímeros.

Szoka y colaboradores fueron los primeros en llevar a cabo ensayos de transfección con dendrímeros. En ellos consiguieron transfectar ADNp que expresaba los genes de la luciferasa y β -galactosidasa, que son utilizados como genes reporteros, permitiendo cuantificar la eficacia de la transfección. Se probaron los dendrímeros de generaciones 1-10 en diversas líneas celulares, obteniéndose los

mejores porcentajes de transfección con la estructura de sexta generación, siempre que hubiera un exceso de grupos amino/nucleótido 6:1 en el complejo ADNp-dendrímico. Estos valores mejoraban sustancialmente los datos de transfección de otros polímeros catiónicos.²³

En 1996 Roberts y colaboradores realizaron un estudio tanto *in vitro* como *in vivo* en ratones que valoraba la toxicidad, inmunogenicidad y biodistribución de dendrímeros PAMAM. En este estudio se reflejó que no causaban respuesta inmune en el organismo, y que las generaciones inferiores a la quinta sólo eran tóxicas en concentraciones muy elevadas, a diferencia de la séptima generación que causaba la muerte celular en todas las concentraciones ensayadas. La biodistribución en los órganos de los ratones resultó ser dependiente de la generación del dendrímico.³⁸

Baker y colaboradores han demostrado en diversas publicaciones que los dendrímeros PAMAM son capaces de formar complejos con ADN en condiciones fisiológicas y que además pueden transfectar numerosas líneas celulares, aunque era necesario añadir pequeñas cantidades de DEAE-dextrano (dietilaminoetil-dextrano), que son capaces de dispersar grandes agregados de ADNp-dendrímico en agregados de menor tamaño. Cuando estos agregados de mayor tamaño se forman, la eficiencia en la transfección se ve disminuida.⁴¹ Sin embargo, los resultados de los ensayos efectuados entraban en conflicto con la eficacia mostrada en los experimentos realizados por Szoka, que han sido mencionados previamente.

Una de las modificaciones más típicas realizadas en los dendrímeros PAMAM, para mejorar su capacidad de transfección, es formar conjugados con moléculas apolares. Szoka utilizó en sus ensayos originales de 1993 un péptido ambifílico que mejoraba la transfección.²³ Juliano y colaboradores conjugaron una molécula fluorescente muy apolar para poder localizar el dendrímico en la célula, lo que les permitió observar que su comportamiento era diferente a los polímeros catiónicos, ya que el complejo ADNp-dendrímico persiste después de la entrada en la célula, mientras que con la unión ADNp-polímero se rompe tras escapar del endosoma.⁴² Además, la conjugación de esta molécula provocó un incremento en la capacidad de transfección del dendrímico PAMAM. Un ejemplo reciente de esta estrategia supuso la modificación de un dendrímico PAMAM de 2ª generación con cadenas alquílicas.

Esta modificación consiguió no sólo que fuera capaz de coordinar la cadena nucleica, sino que además mostró una gran capacidad de transfección.⁴³ Otro estudio que utilizó esta aproximación conjugó aleatoriamente cadenas alquílicas de distinto tamaño a un dendrímero PAMAM de 5ª generación. Estos dendrímeros resultaron ser menos tóxicos cuanto mayor era el tamaño de la cadena alquílica conjugada.⁴⁴

Otra modificación que se ha investigado es la variación de la flexibilidad del dendrímero PAMAM. Esta característica parece ser clave en el proceso de atravesar la membrana celular. El cambio más extendido hoy en día para mejorar la flexibilidad de los dendrímeros PAMAM es la degradación térmica del dendrímero. Este proceso provoca que haya una menor congestión en la superficie y hace que las ramas tengan mayor flexibilidad al haber aumentado su movilidad.⁴⁵ Estas estructuras dendriméricas se comercializan bajo el nombre de Superfect.

El cambio del núcleo del dendrímero también puede colaborar, en cierta medida, a aumentar su flexibilidad. Zhang unió dendrones de hasta 8ª generación a núcleos que permitían enlazar 3, 4 y 6 de estas cuñas dendríticas. Esta modificación provee al dendrímero de huecos de tamaño variable cercanos al núcleo que permiten estudiar la movilidad de las ramas. La toxicidad de los dendrímeros con menor densidad de ramas resultó ser menor. Además, estos mismos dendrímeros resultaron ser los de mayor eficacia en la transfección.⁴⁶ Una aproximación similar llevada a cabo por Park y colaboradores supuso la unión de dos cuñas PAMAM mediante una cadena de PEG. La naturaleza lineal de esta cadena central incrementa la flexibilidad del compuesto en comparación con un PAMAM comercial. Esta modificación provocó una disminución de la toxicidad, aunque la capacidad de transfección de estas macro moléculas no se vio incrementada.⁴⁷

Dendrímeros polipropilenimina (PPI)

Al igual que los dendrímeros PAMAM, los PPI están disponibles comercialmente, lo que les ha conferido también una mayor difusión que otros tipos de estructuras dendríticas.

Los dendrímeros PPI de generaciones bajas, 2-5, han sido ensayados en la línea celular A431 de la epidermis, y han demostrado ser capaces de transfectar con eficiencia ADNp con los genes de la luciferasa y de la β -galactosidasa como genes reportadores.⁴⁸ Esto contrasta con los dendrímeros PAMAM de baja generación. Sin embargo, los dendrímeros PPI de alta generación son muy tóxicos y poseen una capacidad de transfección muy baja, lo que impide su utilización en este campo.

Una de las modificaciones más exitosas realizadas en esta familia de dendrímeros es la formación de cargas positivas permanentes en la periferia, mediante cuaternización con Mel de dendrímeros de 2^a-4^a generación. Esta reacción provoca que la unión al ADN sea más fuerte y hace que la macromolécula formada sea coloidalmente más estable.⁴⁹ Además, la biodistribución del complejo dendrímero-ADN se orienta hacia el hígado, a diferencia de otros nanosistemas catiónicos que se localizan en los pulmones.⁵⁰⁻⁵³

Al igual que en los dendrímeros PAMAM, se ha logrado conjugar moléculas de polietilenglicol a la superficie de los dendrímeros PPI buscando una disminución de la toxicidad causada por las cargas positivas de la estructura dendrítica. En 2006 Tack y colaboradores conjugaron la superficie de un dendrímero PPI de 5^a generación con cadenas de polietilenglicol y un péptido capaz de dirigir la transfección a células tumorales.⁵⁴ Otro ejemplo de modificaciones sobre un dendrímero PPI, para disminuir la toxicidad, fue publicado en 2009. En este trabajo se formaron los complejos dendrímero-material nucleico y posteriormente estos complejos se estabilizaron formando enlaces disulfuro cruzados entre los grupos NH₂ libres. Por último, se conjugaron cadenas de PEG y un péptido capaz de dirigir la nanopartículas hacia los receptores de células tumorales. Estas modificaciones no sólo consiguieron proteger la cadena nucleica de las nucleasas sino que aumentó la absorción por parte de las células tumorales del ARNpi en comparación con la cadena nucleica aislada.⁵⁵

En 2005 un dendrímero PPI de 3^a generación fue utilizado para transfectar ADNp al interior de células tumorales para tratar de promover la necrosis celular. El tratamiento de ratones con este nanoconjugado provocó la remisión del 100% de los tumores. Además, la inyección del dendrímero libre, sin el ADNp, mostró un

retardamiento en el crecimiento de los tumores, lo que permite concluir que el dendrímero tiene acción terapéutica *per se*.⁵⁶

Dendrímeros poli(L-lisina) (PLL)

Con el desarrollo de la química de dendrímeros, se pensó en el uso de aminoácidos como unidad repetitiva, por ejemplo lisina.⁵⁷ El uso de polímeros de lisina para la transfección tiene la desventaja de la gran toxicidad asociada a ellos, a pesar de que poseen una gran capacidad de transfección. Como regla general, al igual que en los dendrímeros PAMAM y a diferencia de los dendrímeros PPI, se considera que los dendrímeros más grandes en esta familia son los mejores agentes transfectantes.

Un ejemplo de la aplicación de estructuras dendríméricas tipo PLL supuso la utilización de dendrones de 5ª y 6ª generación como transfectantes de ADN.⁵⁸ Estos fueron ensayados en una línea celular de riñón utilizando un exceso de carga 5:1. Los niveles de transfección resultantes fueron superiores a los transfectantes Superfect (PAMAM de alta generación degradado) y Lipofectina (un tipo de liposoma).

Sobre esta familia también se han realizado modificaciones para tratar de mejorar su capacidad de transfección. Una modificación realizada fue el uso de otros aminoácidos que no fueran lisina en la superficie del dendrímero. En concreto Niidome y colaboradores utilizaron residuos de arginina, resultando en un incremento de la capacidad de transfección de 3 a 12 veces, frente a dendrímeros compuestos enteramente por lisina, en células de ovario, riñón y células HeLa.⁵⁹

Dendrímeros Polifosfohidrazona (PPH)

En los últimos años los dendrímeros PPH catiónicos sintetizados por Majoral y colaboradores han sido probados en numerosas aplicaciones, centrando su aplicación en el campo de los biomateriales,⁶⁰ además de su uso como transfectantes de material genético al interior celular.

La toxicidad relativa a esta familia de dendrímeros ha sido medida en diversas líneas celulares tumorales y los resultados obtenidos reflejaron una toxicidad moderada, ligeramente inferior a la Lipofectina comercial.⁶¹

La primera prueba de transfección de este tipo de dendrímeros fue realizada en células 3T3, internalizado el gen de la luciferasa para cuantificar en qué medida era capaz de transportar material genético al núcleo. Se probaron dendrímeros de 4^a y 5^a generación en distintas concentraciones y en un exceso de carga 5:1 y 10:1 frente a los grupos fosfato de la cadena nucleica, resultando que aquellos cuaternizados con HCl, con iones cloruro como contraión, poseían una buena capacidad de transfección, comparable a polímeros lineales polietilenimina comerciales. Sin embargo, si el dendrímero estaba cuaternizado con MeI los valores de transfección eran muy inferiores. Esta discordancia se achacó a que en los segundos la densidad de carga es estable y puede alterar la membrana de las células transfectadas, produciéndose la lisis celular. Estos experimentos se complementaron con ensayos de transfección en líneas celulares de origen humano, internalizando un plásmido que expresaba la proteína EGFP, que es fluorescente.⁶⁰

Dendrímeros Carbosilano (CBS)

En nuestro grupo de investigación se han desarrollado dendrímeros carbosilano catiónicos para aplicaciones biológicas. Como se ha señalado previamente en este capítulo, estudios con dendrímeros PAMAM han puesto de manifiesto resultados de transfección muy elevados en dendrímeros con alta flexibilidad, y con dominios apolares. Los dendrímeros carbosilano catiónicos poseen ambas características, ya que todos los enlaces de su estructura son $C(sp^3)-C(sp^3)$ o $C(sp^3)-Si(sp^3)$ y la polaridad del enlace C-Si es prácticamente nula.

En 2006 se publicó el primer ejemplo de una familia de dendrímeros carbosilano catiónicos, terminados en grupos trimetilamonio, para la transfección de material genético.⁶² Los dendrímeros aislados presentaban un buen perfil de toxicidad para las generaciones 1 y 2 hasta una concentración de 5 μ M. También se realizaron ensayos de estabilidad del complejo ODN-dendrímero mediante electroforesis en gel de agarosa. Ambas generaciones del dendrímero resultaron ser capaces de unir al

ODN electrostáticamente, incluso en relaciones de carga muy bajas manteniéndose la estabilidad de los nanoconjugados hasta 24 horas, aunque se iba observando cierto grado de liberación progresiva del ODN debido a la hidrólisis de los enlaces Si-O que forman parte de la estructura.

En otro trabajo publicado en 2007 se mostraron nuevos dendrímeros carbosilano catiónicos tanto estables como inestables en disolución acuosa.⁶³ Sobre los que se realizaron diversos ensayos de toxicidad en células mononucleares de sangre periférica, algunos de estos ensayos pusieron de manifiesto que estos dendrímeros eran menos tóxicos que un PAMAM de 4^a generación. Además, a pesar de su menor tamaño, eran capaces de retener un ODN hasta un pH inferior a 5.7. Los ensayos de microscopía confocal permitieron comprobar que estos dendrímeros eran capaces de internalizar ODN fluorescentes. Con estos dendrímeros también se han realizado experimentos que mostraban que el complejo dendrímero carbosilano-ODN es estable frente a la acción de la albúmina de suero bovino. Es este mismo trabajo se demostró, mediante un ensayo de competencia, que los dendrímeros carbosilano catiónicos eran capaces de romper las interacciones que se forman entre dicha proteína y los ODN.⁶⁴

También se han realizado ensayos similares con estos dendrímeros carbosilano y ARNpi, probando la baja toxicidad de los sistemas dendrímero-ARNpi y su eficacia en la inhibición del VIH. Además de estas características, se ha demostrado la capacidad de estos sistemas en ensayos de transfección incluso en presencia de suero y antibióticos, lo que permite pensar en el uso de los dendrímeros carbosilano en experimentos *in vivo*.⁶⁵

Ensayos similares se han llevado a cabo con otros tipos de dendrímeros carbosilano terminados en grupos trimetilamonio cuyo contraión es el anión triflato.⁶⁶ En este estudio se utilizan estos dendrímeros junto a diversos ácidos nucleicos para el tratamiento *in vitro* de VIH y hepatocarcinoma. La caracterización químico-física de los dendripejos muestra que los sistemas formados son estables en el tiempo y en un amplio rango de pH. Los ensayos biomédicos mostraron una actividad moderada en la transfección de ácidos nucleicos en la línea celular de hepatocarcinoma (HepG2), sin

embargo, los resultados obtenidos en la inhibición de VIH en CMSP mostraron un buen perfil de inhibición.

3.2 ANTECEDENTES DE DENDRÍMEROS CATIÓNICOS COMO ANTIBACTERIANOS

Es conocido que compuestos orgánicos con grupos amonio en su estructura son capaces de ejercer una capacidad antimicrobiana contra bacterias, provocando la lisis celular si se encuentran en cantidad suficiente. Se conocen diversos polímeros catiónicos que poseen esta capacidad, sin embargo, la estructura y peso bien definidos de los dendrímeros han hecho que varios grupos de investigación hayan visto en estas estructuras una buena alternativa a los polímeros catiónicos.⁶⁷

3.2.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE DENDRÍMEROS CATIÓNICOS COMO ANTIBACTERIANOS

El mecanismo de acción de las sustancias catiónicas como agentes antibacterianos está basado en la capacidad de estos de desestabilizar las membranas celulares repeliendo los cationes divalentes de la superficie. El primer paso del mecanismo de acción de este tipo de sustancias es la unión electrostática del compuesto de naturaleza catiónica a los grupos fosfolípidos de la membrana que poseen carga negativa. Una concentración elevada de cargas positivas en la superficie de la membrana bacteriana, puede hacer que los cationes de Ca^{2+} y Mg^{2+} , que son claves para mantener la integridad de la membrana, se vean desplazados formándose poros en la estructura. Si la concentración de cargas positivas es suficiente, se va produciendo la entrada del compuesto catiónico a través de la membrana lipídica, que puede concluir en la muerte de la bacteria.⁶⁸

Una de las claves del uso de dendrímeros es la multivalencia. Cada dendrímero posee varias ramas que pueden soportar grupos catiónicos, y la presencia de varios grupos en una misma estructura pueden originar un efecto superior a la suma de varias unidades aisladas. Las dimensiones de los dendrímeros puede tener también una gran influencia en la capacidad de éstos como antibacterianos, ya que si poseen

un gran tamaño pueden encontrar dificultades a la hora de atravesar el esqueleto de la membrana bacteriana.⁶⁸

3.2.2 EJEMPLOS DE DENDRÍMEROS CATIÓNICOS CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Existen diversos ejemplos de dendrímeros con capacidad antimicrobiana entre los que se encuentran los dendrímeros aniónicos, dendrímeros que poseen algún tipo de metal en su estructura, dendrímeros con unidades de carbohidratos en su estructura o dendrímeros conjugados a algún principio activo. Aunque la gran mayoría de los dendrímeros utilizados como agentes antibacterianos son de naturaleza catiónica. Sin embargo, todavía no existen suficientes trabajos como para generalizar sus propiedades según familias.

Los primeros dendrímeros catiónicos en ser ensayados como antibacterianos fueron los dendrímeros PPI con un núcleo diaminobutano, que demostraron ser el doble de potentes frente a la bacteria Gram- *Escherichia coli*, que su análogo monofuncional. Siguiendo este ejemplo Cooper y colaboradores funcionalizaron un dendrímero PPI con cadenas lineales alquílicas de 12 unidades de carbono. Este dendrímero fue probado contra bacterias *E. coli*, obteniéndose que los valores de concentración mínima bactericida (concentración mínima a la que una sustancia es capaz de matar una bacteria, CMB) y concentración mínima inhibitoria (concentración mínima a la que una sustancia es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, CMI) eran 100 veces mayores que los obtenidos con el cloruro de dodeciltrimetilamonio (DTAC), su análogo monofuncional.⁶⁹ Para comprobar que este efecto no dependía del tipo de bacteria se probaron también contra la bacteria Gram+ *Staphylococcus aureus*, mostrando tener una gran capacidad biocida también en este tipo de bacterias.

Los dendrímeros PAMAM también han resultado efectivos como agentes antibacterianos. En 2007 se presentó un estudio sobre el uso de dendrímeros PAMAM de 5ª generación como antibacterianos contra infecciones en células epiteliales de la cornea.⁷⁰ Estas estructuras resultaron ser ligeramente tóxicas, por lo que se modificaron parcialmente con cadenas de PEG. Esta modificación redujo la toxicidad,

manteniendo el efecto bactericida frente a cepas de *Pseudomonas*, que son las más frecuentes en infecciones oculares. Sin embargo, se redujo la efectividad antibacteriana en las cepas de estafilococos. Más tarde, en un estudio similar se compararon dendrímeros de distintas generaciones de esta familia, observando que los PAMAM de 3ª generación con cadenas de PEG en su estructura son más potentes como agentes antibacterianos que los de 5ª generación.⁷¹

Los dendrímeros carbosilano también han demostrado poseer capacidad antibacteriana. En nuestro grupo de investigación se han encontrado indicios similares con respecto al tamaño del dendrímero y su capacidad como agente antibacteriano. Se ha observado que un dendrímero carbosilano catiónico de primera generación, con grupos aromáticos en la periferia, era más potente en su actividad antibacteriana, frente a bacterias tanto Gram+ como Gram-, que el de segunda generación y a su vez mucho más potente que su análogo monofuncional.⁷²

En nuestro grupo de investigación se llevó a cabo un estudio similar utilizando dendrímeros carbosilano con dos grupos amonio por rama en la periferia.⁷³ Se encontraron diferencias en cuanto a la generación más activa dependiendo del tipo de membrana que poseyeran las bacterias. Así, en bacterias Gram- los dendrímeros de mayor generación resultaron ser biocidas más efectivos. Sin embargo, en bacterias Gram+ los mejores resultados se obtuvieron con los dendrímeros de generaciones más bajas. Esta contradicción puede explicarse atendiendo a que los fenómenos de disrupción de membrana dependen de dos factores, el número de cargas de la superficie y procesos de biopermeabilidad, que están favorecidos por la apolaridad del compuesto biocida. La actividad de un dendrímero como agente antibacteriano, por tanto, está basada en un equilibrio entre ambos factores. Es muy probable que en bacterias con doble membrana (Gram-) se necesite una mayor densidad de carga positiva para romper la membrana antes de que entren en juego los procesos de biopermeabilidad y por ello sea más efectivo el dendrímero de tercera generación.

3.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS DENDRÍMEROS

En esta sección del capítulo se describen los experimentos que evalúan la capacidad de los dendrímeros catiónicos **18-20**, con una carga positiva por rama, y los

dendrímeros **22** y **23**, con dos cargas positivas por rama, descritos en el capítulo 2 de esta memoria, como vectores no virales para transfectar material genético al interior celular y su uso como agentes antibacterianos de amplio espectro.

3.3.1 VECTORES NO VIRALES EN TRANSPORTE DE MATERIAL GENÉTICO CONTRA EL CÁNCER

Los dendrímeros carbosilano descritos en el capítulo 2 de esta memoria pueden ser utilizados para la transfección de material genético en células tumorales que ayuden al tratamiento contra el cáncer. En esta sección se muestra la caracterización de la unión dendrímero-ADNp, la estabilidad del nanosistema formado, medidas de tamaño de éste, así como una evaluación de la toxicidad celular y de la capacidad de transfección de los dendrímeros **18-20**, **22** y **23** en células tumorales.

El ADNp utilizado en todos los experimentos expresa el gen de la luciferasa. Este gen permite valorar cuantitativamente mediante luminiscencia la cantidad de plásmido transportado al interior celular y con ello la capacidad del vector utilizado, en este caso el dendrímero catiónico.

Todos estos experimentos fueron realizados en colaboración con el grupo dirigido por la Dra. Concepción Tros de Ilarduya del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Navarra.

3.3.1.1 Capacidad de unión del dendrímero al ADNp y caracterización químico-física

Para la realización de los ensayos de unión para la formación del nanoconjugado, se hace reaccionar el dendrímero con el ADNp en una disolución tampón durante 15 minutos a las relaciones de carga dendrímero-ADN 1:1, 5:1 y 20:1 para los compuestos **18-20** y 1:1, 5:1, 20:1 y 30:1 para los compuestos **22** y **23**.

Electroforesis en gel de agarosa

Con estas disoluciones se realizan pruebas de electroforesis en gel de agarosa. Esta técnica es un proceso de separación basado en el tamaño y carga de las muestras sometidas a un campo eléctrico. De este modo, las partículas catiónicas se desplazarán hacia el polo negativo y la velocidad con que lo hagan dependerá de su tamaño. Si el nanoconjugado ADNp-dendrímero se ha formado no habrá migración, mientras que si no se forma el nanoconjugado, el ADNp migrará hacia el polo positivo.

En la Figura III.3 se muestran varias columnas: en la primera se colocó a modo de control el ADNp desnudo, en la segunda columna se añadió un complejo ADNp-PAMAM G4, en el resto de las columnas se añadieron las disoluciones de los dendrímeros carboxilano junto al ADNp según se muestra en la Tabla III.1.

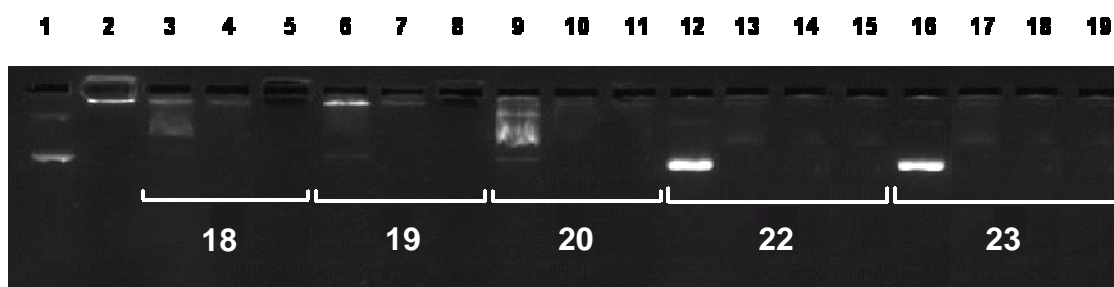


Figura III.3. Estabilidad de los dendriplejos en gel de retención de agarosa.

Columna	Dendrímero	Proporción de cargas	Columna	Dendrímero	Proporción de cargas
1	ADNp	-	11	20	20:1
2	G4PAMAM	5:1	12	22	1:1
3	18	1:1	13	22	5:1
4	18	5:1	14	22	20:1
5	18	20:1	15	22	30:1
6	19	1:1	16	23	1:1
7	19	5:1	17	23	5:1
8	19	20:1	18	23	20:1
9	20	1:1	19	23	30:1
10	20	5:1	-	-	-

Tabla III.1. Proporciones de carga ensayadas según dendrímero.

Se puede observar que todos los dendrímeros no son capaces de formar el nanoconjugado con el ADNp a las relaciones de carga 1:1 (entradas 3, 6, 9, 12 y 16 de la Tabla III.1) y en cierta extensión a 5:1 (entradas 13 y 17 de la Tabla III.1), en el resto de proporciones ensayadas se observa la formación del nanosistema dendrímero-ADNp. A relaciones de carga bajas es probable que se esté formando el complejo, pero la escasa cantidad de dendrímero añadido no es capaz de compensar con eficacia las cargas negativas del ADNp. Esto puede ser debido a que la morfología globular del dendrímero impide que ramas de lados opuestos interaccionen eficazmente con los grupos fosfato de la cadena nucleica, y por ello sea necesaria una mayor cantidad de dendrímero para formar el nanosistema y por tanto impedir que ésta migre hacia el polo negativo.

Medidas de dispersión dinámica de luz (DLS)

También se realizaron medidas del tamaño de los complejos dendrímero-ADNp mediante dispersión dinámica de luz (DLS en sus siglas en inglés). Esta técnica analiza los patrones de difracción de un haz de luz láser al ser dispersada por las partículas que se encuentran en disolución. Las medidas realizadas a los nanosistemas formados con los dendrímeros **18-20** a relaciones de carga 1:1 presentan valores muy elevados de 169, 182 y 283 nm respectivamente. Se puede concluir que la menor proporción de cargas induce una menor condensación del material nucleico (ver Tablas III.2 y III.3). Este fenómeno va desapareciendo, generalmente, a medida que las relaciones de carga aumentan, ya que el tamaño de los nanosistemas va disminuyendo debido a que el exceso de carga positiva es capaz de atraer con más fuerza las hebras de ADN, compactándolas con mayor eficacia.

De modo general, también se observa que los dendrímeros de generaciones más altas forman nanoconjugados con el ADNp de mayor tamaño (Tabla III.2).

Tamaño de partícula				
Relación de cargas	PAMAM G4	18	19	20
1:1	-	169 ± 18	182 ± 7	283 ± 15
5:1	138 ± 11	116 ± 15	202 ± 15	217 ± 16
10:1	-	108 ± 12	158 ± 5	163 ± 11
20:1	-	77 ± 2	119 ± 20	301 ± 18
30:1	-	93 ± 3	68 ± 1	100 ± 0

Tabla III.2. Valores de tamaño de las nanopartículas dendrímero-ADNp medidos por DLS.

Para los dendrímeros **22** y **23**, con dos cargas positivas por rama dendrítica, se realizaron las mismas medidas en idénticas condiciones. Se puede observar un comportamiento similar al observado para los compuestos **18-20**. A medida que se añade mayor proporción de dendrímero para formar el nanoconjugado, el tamaño del mismo va disminuyendo, debido a que una mayor densidad de carga positiva, condensa el ADNp con mayor eficacia (Tabla III.3).

También se puede destacar, que los dendrímeros de primera generación de ambas familias son capaces de condensar el ADNp más eficazmente que los de generaciones más altas.

Tamaño de partícula			
Relación de cargas	PAMAM G4	22	23
1:1	-	107 ± 4	226 ± 9
5:1	147 ± 3	88 ± 7	131 ± 2
10:1	-	86 ± 8	121 ± 7
20:1	-	84 ± 5	99 ± 11
30:1	-	57 ± 2	78 ± 1

Tabla III.3. Valores de tamaño de las nanopartículas dendrímero-ADNp medidos por DLS.

Los valores obtenidos para el nanoconjugado formado por el plásmido y el dendrímero PAMAM son consistentes con los establecidos en la literatura con ADNp.

Así, a una relación de cargas 4:1, se estableció que el valor por DLS era de 130 ± 15 nm,³⁰ mientras que para relación 6:1 está establecido en 246 ± 2 nm.⁷⁴ Comparando esos valores con los obtenidos con los dendrímeros carbosilano se puede concluir, que a ratios similares, los dendrímeros de primera generación de ambas familias carbosilano condensan el ADNp con más eficacia y que el tamaño obtenido por el dendrímero **23** de segunda generación y con dos cargas positivas por rama, es similar al del PAMAM comercial. Hay que mencionar que estos dendrímeros son capaces de condensar el material genético hasta tamaños muy inferiores a los necesarios para el mecanismo de endocitosis mediada por receptor, establecida en 150 nm.⁷⁵ Sin embargo, los dendrímeros **19** y **20** son menos eficaces en este proceso que un dendrímero PAMAM de cuarta generación.

Estas comparaciones se pueden realizar también con dendrímeros PPI cuaternizados con Mel unidos al mismo ADNp que el utilizado con los dendrímeros carbosilano. Los valores de tamaño recogidos en la bibliografía para estos nanoconjugados a ratio 5:1 son de 144 nm y 259 nm, para dendrímeros PPI de 8 y 16 cargas respectivamente. Estos valores son comparables a los obtenidos para los nanoconjugados formados con **18-20**, con una carga positiva por rama. Sin embargo, los nanocompuestos formados con los dendrímeros **22** y **23** son capaces de compactar el ADNp más eficazmente que los dendrímeros PPI cuaternizados.⁴⁹

Si comparamos la familia de los dendrímeros **18-20** con la familia de los dendrímeros **22** y **23** entre sí, a igual generación, aquella con dos grupos amonio por rama es capaz de compactar el ADNp con más eficacia que la que posee un sólo grupo amonio. Esto es debido a que poseen una mayor densidad de carga positiva que atrae más eficazmente a las hebras de ADN.

Medidas de potencial ζ

Sobre estos mismos conjugados dendrímero-ADNp, se realizaron medidas de potencial ζ . El potencial ζ es un parámetro que determina la densidad de carga superficial en una partícula, a través de la medida de la velocidad de la misma cuando es sometida a un campo eléctrico. El resultado será un número positivo, en el caso de que la carga superficial sea positiva, y negativo cuando ésta sea negativa.

En la Tabla III.4 se puede observar que en proporción 1:1, en todos los dendrímeros de distintas generaciones, a excepción del dendrímero **23**, se obtienen valores negativos. Estos valores indican que, las cargas de los dendrímeros no pueden compensar las cargas de los grupos fosfato de los nucleótidos a pesar de encontrarse en cantidad suficiente, muy probablemente debido a que la forma esférica de éstos hace que no todas las cargas positivas interaccionen eficazmente con las cadenas de ADNp, que son lineales. Además, la proximidad a la electroneutralidad de estas estructuras puede contribuir a su inestabilidad, lo que a su vez puede conducir a valores anómalos.

A medida que la proporción de dendrímero en el nanoconjugado aumenta también lo hace la relación de cargas, y con ello el valor del potencial ζ cambia a valores positivos, ya que el exceso de grupos amonio no sólo compensa las cargas negativas del ADNp sino que confieren carga positiva neta al complejo (Tabla III.4). Hay que destacar que el conjugado formado con **23** en proporción 1:1 se sitúa directamente en valores positivos, probablemente debido a su mayor tamaño, ya que esto hace que la cadena de ADNp tenga una mayor facilidad para enroscarse alrededor de estas estructuras que con dendrímeros de menor diámetro.

POTENCIAL ζ						
Relación de cargas	PAMAM	18	19	20	22	23
1:1	-	-28 ± 8	-26 ± 10	-7 ± 4	-34 ± 1	9 ± 10
5:1	11 ± 1	12 ± 3	14 ± 2	-21 ± 1	36 ± 0	34 ± 1
10:1	-	22 ± 5	18 ± 3	15 ± 3	33 ± 5	39 ± 3
20:1	-	29 ± 3	20 ± 6	22 ± 5	31 ± 3	42 ± 8
30:1	-	41 ± 2	29 ± 10	15 ± 4	30 ± 3	41 ± 0

Tabla III.4. Potencial ζ para ADNp unido electrostáticamente a los dendrímeros carbosilano **18-20, 22 y 23**.

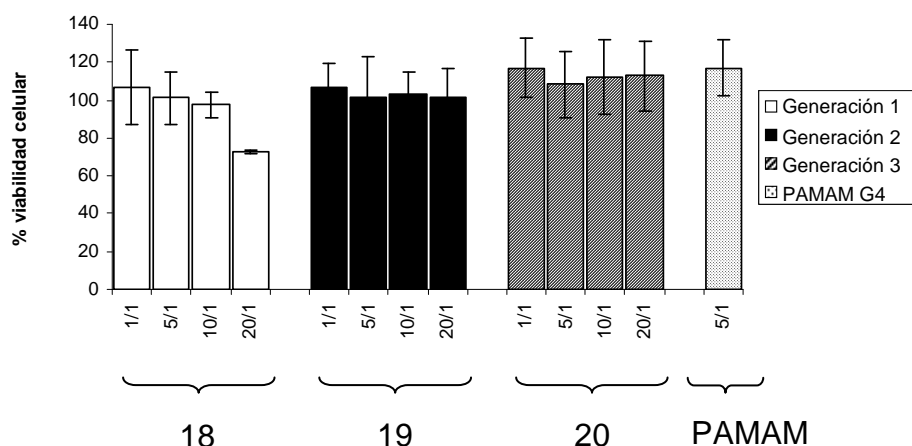


Figura III.4. Viabilidad celular de nanopartículas formadas con ADNp y los dendrímeros **18-20** en la línea celular HeLa.

La toxicidad también fue evaluada para la familia de los dendrímeros **22** y **23** en las mismas líneas celulares. En la Figura III.5 se puede observar que la viabilidad celular tras el tratamiento con estos dendrímeros, con dos cargas por rama, se sitúa por encima del 75% en todas las proporciones ensayadas. En la línea celular HeLa la viabilidad celular resultó ser muy similar a la familia con una carga por rama.

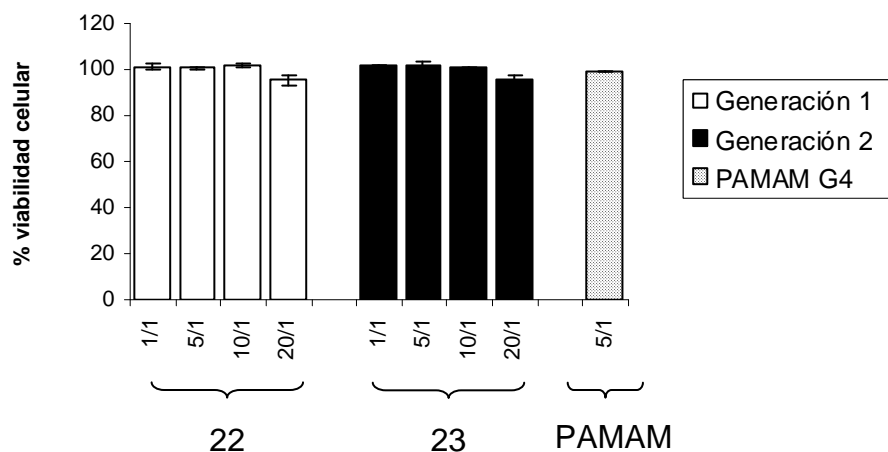


Figura III.5. Viabilidad celular de complejos formulados con dendrímeros carboxilano **22** y **23**, en las líneas celulares HepG2.

En conclusión los dendrímeros **18-20**, **22** y **23** no son tóxicos hasta proporciones 1:20, siendo su viabilidad celular prácticamente idéntica a la del PAMAM comercial de cuarta generación, a una concentración significativamente menor.

Ensayos de transfección

Los ensayos de transfección se realizaron en las mismas líneas en las que se estableció la toxicidad de los complejos dendrímero-ADNp, HepG2 y HeLa. La capacidad de internalización se realizó midiendo la expresión del gen de la luciferasa, incluido en el ADNp transfectado. En todos los experimentos se utilizó un conjugado PAMAM-ADNp 5:1 como control.

En la Figura III.6A, para la línea HepG2, se muestran los ratios a los que la transfección era óptima para los nanoconjugados formados con los dendrímeros **18-20**. En la figura se puede observar que el dendrímero de segunda generación **19** posee una capacidad de transfección muy superior al resto de las formulaciones. Cabe destacar que la capacidad de internalización de este dendrímero en esta línea celular casi triplica la del PAMAM comercial.

En la Figura III.6B se muestra un barrido de proporciones dendrímero-ADN en la línea HeLa con los dendrímeros **18-20** unidos al ADNp. De modo general, se puede concluir que en esta línea celular la capacidad de transfección aumenta a medida que aumenta la proporción dendrímero/ADNp. Hay que destacar la capacidad de transfección del dendrímero **20** en proporción 20:1. Sin embargo, estos dendrímeros tienen una capacidad como vector de transfección inferior a la formulación con un dendrímero PAMAM de 4^a generación, si bien conviene recordar, que en este caso el dendrímero es tan sólo de 2^a generación.

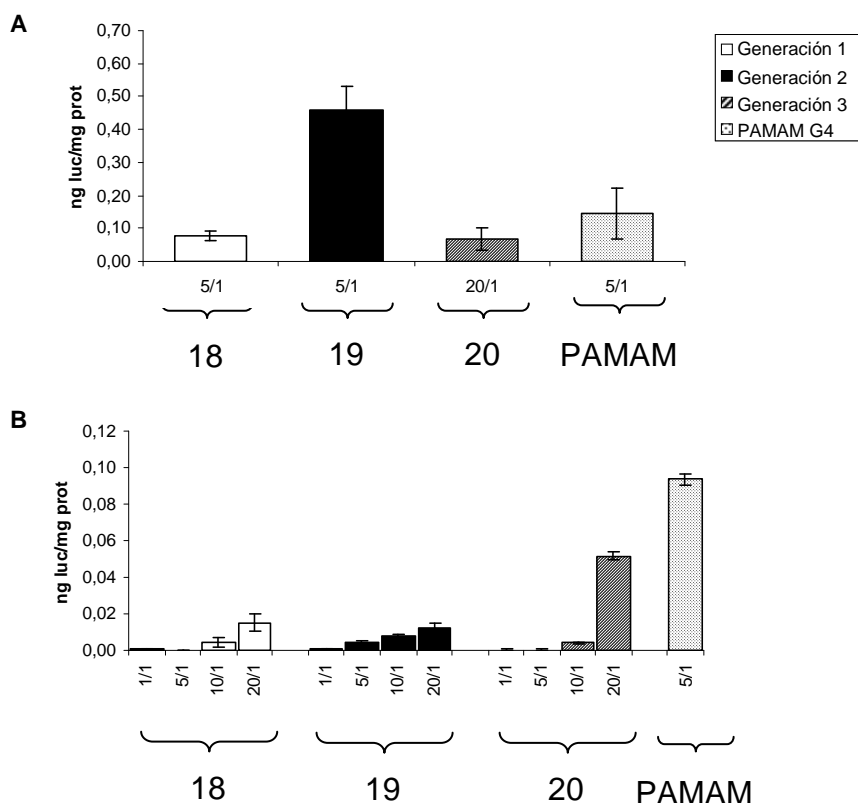


Figura III.6. Transfección de los dendrímeros **18-20** en las líneas celulares HepG2 (**A**) y HeLa (**B**).

Estos mismos ensayos se repitieron para los dendrímeros **22** y **23** en iguales condiciones y líneas celulares. De estos resultados se puede concluir que la expresión de la luciferasa es moderada en comparación con la observada para el dendrímero PAMAM en ambas líneas celulares. En la línea celular HepG2 se muestran las proporciones a las que la transfección es máxima (Figura III.7A). En la Figura III.7B se muestra un barrido en las proporciones dendrímero-ADNp en células tipo HeLa obteniéndose un máximo de expresión génica en la proporción 10:1. También puede observarse que si se aumenta la proporción a 20:1 la transfección disminuye ligeramente.

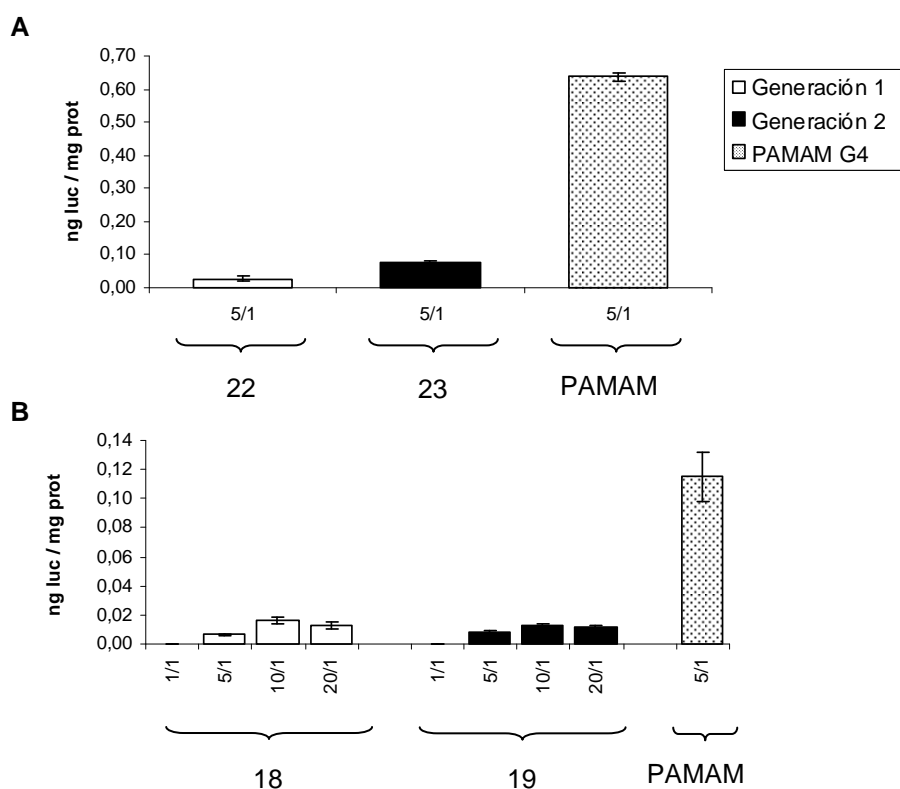


Figura III.7. Transfección de los dendrímeros **22** y **23** en células HepG2 (**A**) y HeLa (**B**).

Todos estos ensayos permiten concluir que, aunque los sistemas dendrímero-ADNp no son tóxicos a ratios inferiores a 20:1, el grado de internalización del plásmido es dependiente, no solo de la familia del dendrímero, sino también de la línea celular ensayada. De modo general, los resultados de transfección pueden ser atribuidos al pequeño tamaño de los dendrímeros carbosilano que no es el más adecuado para transportar ADNp de gran tamaño, salvo en ciertas excepciones.

También se han realizado experimentos in vivo con el dendrímero **19** a una relación de carga 20:1 y se compararon con la formulación con PAMAM comercial de 4^a generación a proporción de carga 5:1. Los resultados muestran que estos dendruplejos formados con los dendrímeros carbosilano conducen a una mayor expresión del gen de la luciferasa que aquellos formados con el dendrímero PAMAM en hígado y pulmón (Figura III.8).

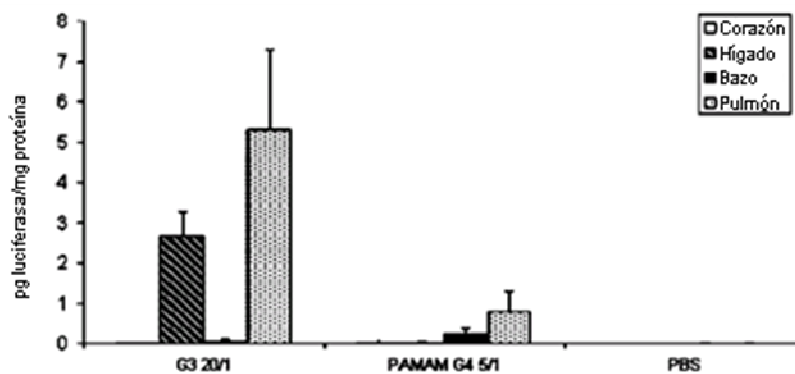


Figura III.8. Expresión génica in vivo del dendrímero 20.

3.3.2 VECTORES NO VIRALES EN TERAPIA CON ÁCIDOS NUCLEICOS CONTRA EL VIH

Además de ser utilizados en terapia contra el cáncer, los dendrímeros carbosilano catiónicos pueden ser utilizados para internalizar material genético en células infectadas con el virus del SIDA. En la siguiente sección se muestra una evaluación de la toxicidad celular, la caracterización de la unión de dendrímeros con ARNpi y por último la inhibición del VIH de los compuestos **18-20**, **22** y **23** unidos a material genético. Para los ensayos de inhibición se utilizó un ARNpi complementario del ARNm que codifica la producción de proteína NEF, llamado siNEF en sus siglas en inglés. Esta proteína posee varias funciones clave en los procesos de infección del VIH, encargándose de mantener la carga viral en niveles elevados y de regular negativamente la expresión de ciertas proteínas de membrana.⁷⁶⁻⁷⁸ Además, colabora en la multiplicación viral.^{79,80}

Todos estos experimentos fueron llevados a cabo en colaboración con el grupo de la Dra. M^a Ángeles Muñoz-Fernández del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

3.3.2.1 Caracterización de la unión dendrímero ARNpi

Electroforesis en gel de agarosa

Se realizó un ensayo de electroforesis en gel de agarosa para comprobar que el dendrímero era capaz de retener el ARNpi. Al igual que lo expuesto en el apartado 3.3.1.1, si el complejo se ha formado no debe observarse migración hacia el polo negativo, pero si el complejo no se ha formado o no es estable en el tiempo, debe observarse la migración del ADNpi hacia dicho polo.

Esta prueba se realizó con los sistemas formados con siNEF y con los dendrímeros de segunda generación **19** y **23**, con una y dos cargas positivas por rama respectivamente, tras 3 y 24 horas de incubación. En la Figura III.9 se muestra que, tras un periodo de incubación de 3 horas, el dendrímero **19** es capaz de formar el nanocompuesto en proporciones 4:1 y 8:1 ya que no se observa una banda de migración (entradas 4 y 5 de la Tabla III.5). Sin embargo, a 3 horas el dendrímero **23** sólo es capaz de interaccionar y formar el nanosistema en proporción 8:1 (entrada 10 de la Tabla III.6).

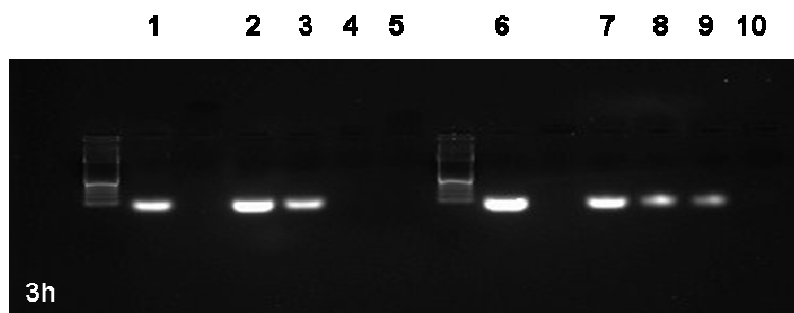


Figura III.9. Gel de electroforesis de los complejos **19**-siNEF y **23**-siNEF con un tiempo de incubación de 3 horas.

Columna	Dendrímero	Proporción
1	-	ARNpi
2	19	1:1
3	19	2:1
4	19	4:1
5	19	8:1
6	-	ARNpi
7	23	1:1
8	23	2:1
9	23	4:1
10	23	8:1

Tabla III.5. Proporciones de los complejos **19**-siNEF y **23**-siNEF con un tiempo de incubación de 3 horas.

En la Figura III.10 se muestran los experimentos para un tiempo de incubación de 24 horas. Ambos dendrímeros, tanto el dendrímero **19** (entradas 4 y 5 de la Tabla III.6) como el dendrímero **23**, (entradas 9 y 10 de la Tabla III.6) son capaces de retener el ARNpi y evitar que este migre hacia el polo negativo. Un mayor tiempo de incubación resultó ser necesario para la formación del nanoconjugado en proporción 4:1, si se compara con el experimento realizado con 3h de incubación. Esto puede ser debido en parte a que el ARNpi debe enroscarse alrededor de la estructura, un tiempo adicional de incubación mayor permite que la cadena nucleica se amolde al dendrímero.

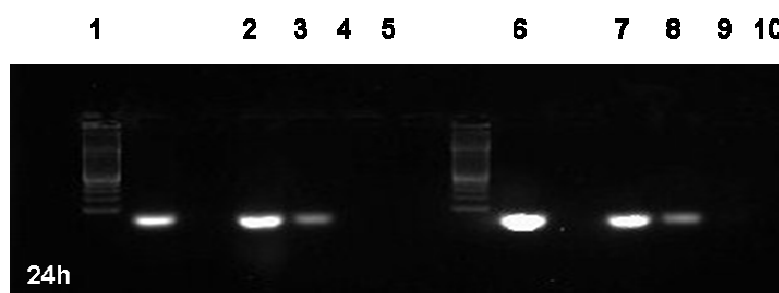


Figura III.10. Gel de electroforesis de los complejos **19**-siNEF y **23**-siNEF con un tiempo de incubación de 24 horas.

Columna	dendrímero	proporción
1	-	ARNpi
2	19	1:1
3	19	2:1
4	19	4:1
5	19	8:1
6	-	ARNpi
7	23	1:1
8	23	2:1
9	23	4:1
10	23	8:1

Tabla III.6. Proporciones de los complejos **19**-siNEF y **23**-siNEF con un tiempo de incubación de 24 horas.

3.3.2.2 Evaluación de la toxicidad de los sistemas dendrímero-ADNpi y de la capacidad de transfección

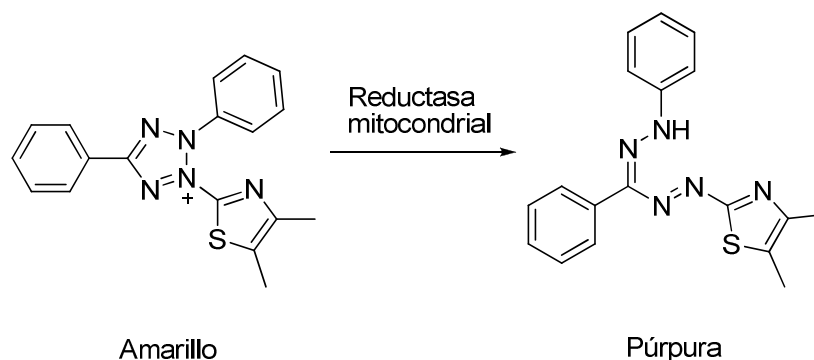
Ensayos de viabilidad celular

La medida de la toxicidad se llevó a cabo mediante tinción con Azul de Tripano y ensayos MTT en las líneas celulares T Jurkat, SupT1 y en células mononucleares de sangre periférica (CMSP).

El primer ensayo que se llevó a cabo consistió teñir las células previamente mencionadas con Azul de Tripano. Una vez tratadas con concentraciones crecientes de dendrímero en disolución. Este colorante es capaz de teñir las células muertas permitiendo realizar una evaluación bajo el microscopio de la toxicidad de manera visual. Las células mostraron tinción azul superior al control a partir de 15 μ M de dendrímero, por lo que se decidió centrar los estudios de viabilidad en una concentración de 10 μ M.

El efecto tóxico de los dendrímeros por sí solos también se ha medido a través del ensayo MTT, que evalúa la actividad metabólica. Se trata de un ensayo colorimétrico basado en la capacidad selectiva de las células viables para reducir el MTT, bromuro de (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, en cristales de

formazán insolubles en agua y solubles en DMSO, que se analizan mediante colorimetría (Esquema III.2).



Esquema III.2. Reacción colorimétrica sobre la que se basa el ensayo MTT.

En este experimento se incubaron células del tipo Jurkat y SupT1 con los compuestos **18** y **19** con una sola carga por rama de dendrímero y con los compuestos **22** y **23** con dos cargas por rama (Figura III.11). Los resultados muestran que cantidades crecientes de los dendrímeros disminuyen la viabilidad en las líneas celulares ensayadas. Hasta 10 μM , los porcentajes de actividad mitocondrial se sitúan por encima del límite del 80% que establece la biocompatibilidad de los sistemas. De manera general, a partir de 15 μM estos porcentajes se ven disminuidos por debajo del 80%, y por tanto se muestra que los dendrímeros **18**, **19**, **22** y **23** son citotóxicos a esa concentración. No obstante, esta situación puede cambiar según la línea celular utilizada, a la vista de la diferencia de toxicidad encontrada en las líneas celulares SupT1 y Jurkat.

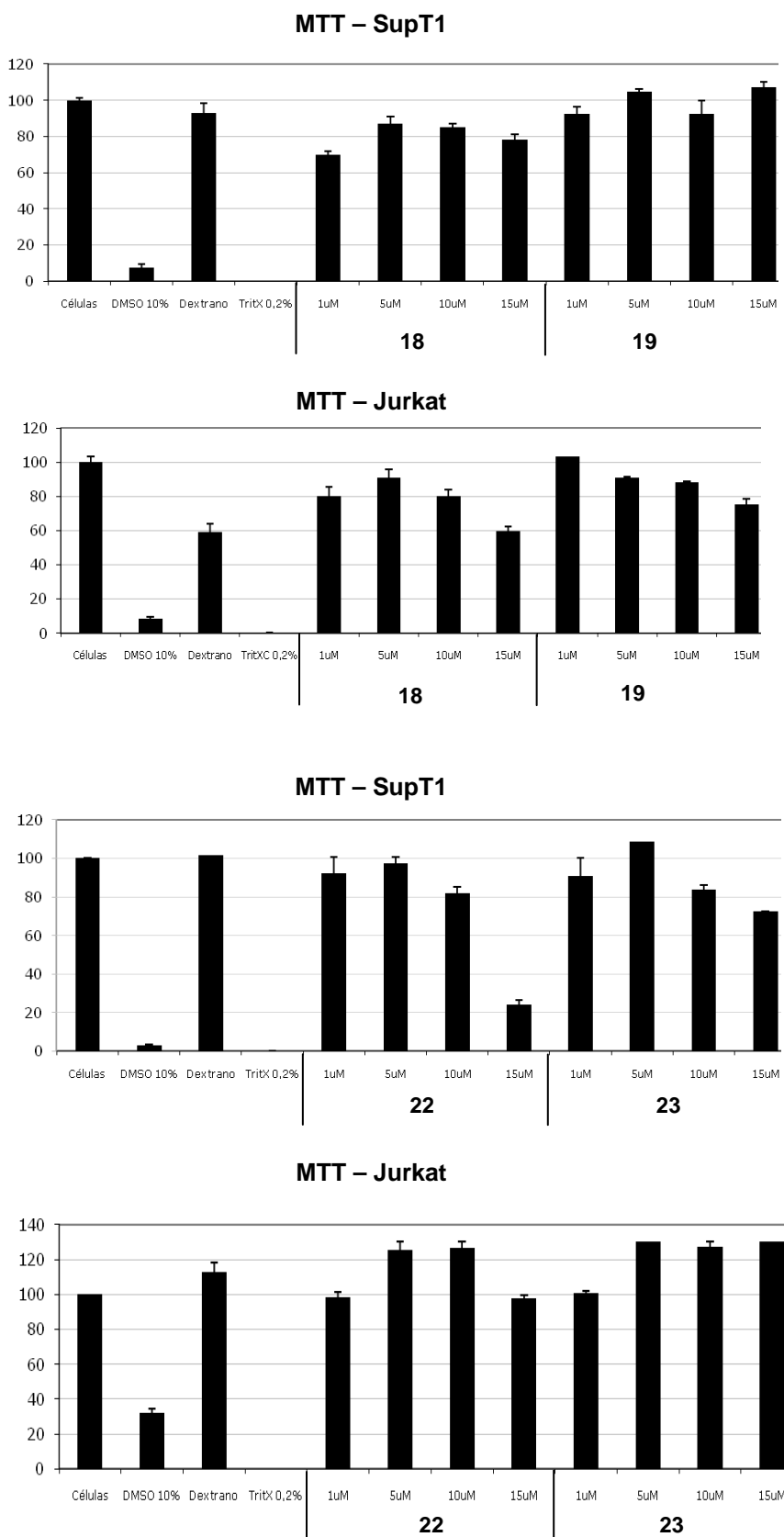


Figura III.11. Ensayos de toxicidad de los dendrímeros **18**, **19**, **22** y **23** en células SupT1 y Jurkat.

Para determinar la biocompatibilidad en una línea más fisiológica, se evaluó la toxicidad de los dendrímeros de segunda generación, **19** y **23** en CMSP. La viabilidad celular en este caso fue similar a la obtenida en líneas celulares inmortalizadas observándose el punto de inflexión a partir de 10 μ M (Figura III.12). El bajo daño que produce a la membrana de células fisiológicas como las CMSP, unido a la adecuada actividad mitocondrial de las células en presencia de una concentración de 10 μ M, determinó que los compuestos **19** y **23** se seleccionaran para poner a punto los ensayos de inhibición del VIH en CMSP.

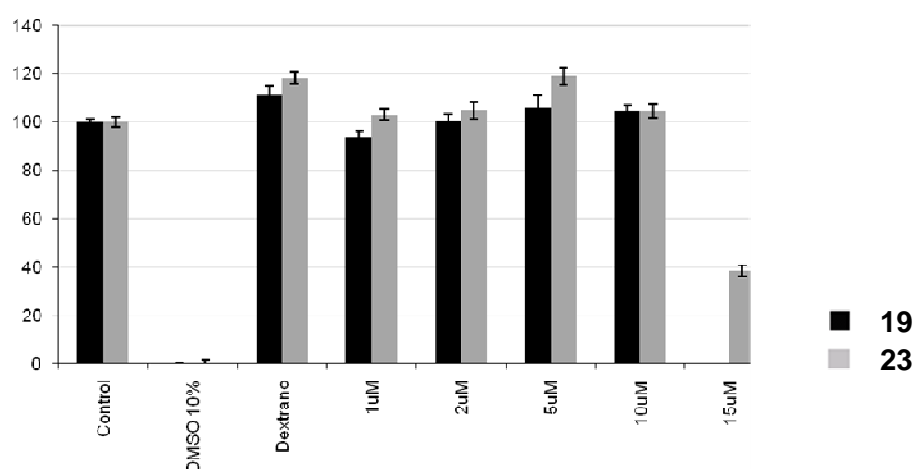


Figura III.12. Ensayos de toxicidad de los dendrímeros **19** y **23** en células mononucleares de sangre periférica.

Ensayos de inhibición

Una vez conocido el límite de concentración a la que los dendrímeros no son tóxicos, se procede a realizar ensayos de inhibición del antígeno p24 del VIH. Para ello se incuban las distintas formulaciones de los dendrímeros **19** o **23**, o los sistemas dendrímero-ARNpi con CMSP previamente infectadas con el VIH. En la Figura III.11 se puede observar que el ARNpi aislado tan solo inhibe la acción del VIH hasta un 22%. Sin embargo, la inhibición observada de los nanoconjugados fue muy similar a la de los dendrímeros sin ningún tipo de ARNpi unido electrostáticamente, 84% para el sistema **19**-siNEF y 88% para el nanocompuesto **23**-siNEF frente a 77% para el dendrímero **19** y 87% para el dendrímero **23** por sí solos. Esto permite concluir que estos dendrímeros poseen efecto terapéutico *per se*, y que gran parte de la inhibición

del conjugado con siNEF es debida a la acción del dendrímero. Esto queda confirmado con los valores obtenidos con los dendrímeros unidos a secuencias RANDOM, que son capaces de inhibir la acción del VIH a niveles similares a los obtenidos con el nanoconjugado dendrímero/siNEF (Figura III.13).

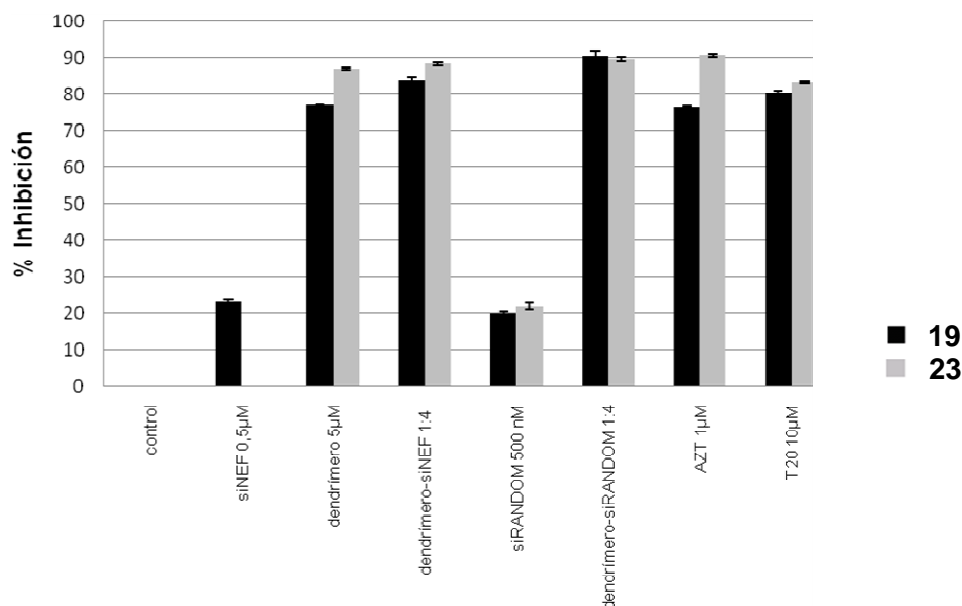


Figura III.13. Experimentos de inhibición del antígeno p24 del VIH por parte de los sistemas **19**-siNEF y **23**-siNEF.

Con estos ensayos se determina que los dendrímeros carboxilano no son tóxicos hasta una concentración de 10 µM y que son capaces de internalizar ARNpi en las líneas ensayadas. A pesar de que son los dendrímeros aniónicos los que tradicionalmente se conoce que poseen actividad antiviral, estos dendrímeros catiónicos son capaces de inhibir por si solos la actividad del VIH. Este comportamiento ha sido observado en una serie de polipéptidos catiónicos y dendrímeros,⁸¹⁻⁸³ además, en nuestro grupo de investigación hemos observado una pauta similar por parte de dendrímeros carboxilano catiónicos sintetizados con anterioridad.⁸⁴ Hoy en día se desconoce el modo de acción de este tipo sustancias catiónicas aunque parece tener lugar en las primeras fases de la infección y que la actividad de estas sustancias es más pronunciada en aquellas que poseen una mayor densidad de carga.⁸²

3.3.3 COMPORTAMIENTO ANTIBACTERIANO DE DENDRÍMEROS CARBOSILANO CATIÓNICOS

Las pruebas para determinar la actividad antibacteriana de los dendrímeros carbosilano se realizaron sobre las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, bacterias que son Gram- y Gram+ respectivamente. Además, cabe mencionar que las bacterias Gram- se caracterizan por poseer una doble membrana celular que las hace más resistentes a la acción de agentes antibacterianos, a diferencia de las Gram+ que tan sólo poseen una membrana simple. Para ello, se incubaron las placas que contenían las bacterias durante 3 días en presencia de una disolución del correspondiente compuesto catiónico. En estos ensayos se utilizaron los dendrímeros **18-20** y **23** así como el derivado monofuncional **17**, descrito en el capítulo 2 de esta memoria, para comparar el efecto de la multivalencia.

Todos estos experimentos fueron realizados en colaboración con el grupo de los Dres. José Luis Copa-Patiño y Juan Soliveri del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Alcalá.

Los experimentos realizados con la bacteria Gram- *E. coli* se resumen en la Tabla III.7. En ésta puede verse que el dendrímero de primera generación **18** es varias veces más potente contra este tipo de bacterias que el derivado monofuncional **17**, esto es debido al efecto multivalente aportado por las varias ramas de la estructura dendrítica. No obstante la actividad de **18** debe ser considerada como moderada en comparación con formulaciones comerciales u otros dendrímeros carbosilano.⁷³ El resto de dendrímeros con una sola carga por rama, **19** y **20**, apenas poseen efecto antibacteriano, ya que como se ha mencionado en la introducción de este capítulo, la capacidad antibacteriana se ve supeditada a una situación de compromiso entre el tamaño y el número de cargas que soporta la estructura. Así, un aumento del número de cargas, aumenta la capacidad antibacteriana, como puede observarse por el aumento de ésta en el dendrímero **23** que posee una estructura y tamaño similar pero con el doble de cargas positivas con respecto a **19**.

E. COLI	CMI		CMB	
	mg/ml	μM	mg/ml	μM
17	256	584	256	584
18	16	9.3	16	9.3
19	512	136.3	512	136.3
20	>512	>65.4	>512	>65.4
23	128	22.5	128	22.5

Tabla III.7. CMI y CMB de dendrímeros carboxilano frente a bacterias *E. coli*.

La Tabla III.8 refleja los experimentos realizados con los dendrímeros **17-20** y **23** con la bacteria Gram+ *S. aureus*. Comparando los resultados con los de la Tabla III.7, se puede observar que los dendrímeros carboxilano probados son mucho más activos frente a bacterias Gram+ que frente a bacterias Gram-, donde únicamente el dendrímero **18** posee una actividad importante. Esto es debido a que las bacterias Gram- poseen una doble membrana que las hace más resistentes a agentes antibacterianos en comparación con la membrana simple que presentan las bacterias Gram+.

S. AUREUS	CMI		CMB	
	mg/ml	μM	mg/ml	μM
17	16	36.5	16	36.5
18	4	2.3	4	2.3
19	16	4.2	16	4.2
20	32	4	64	8.0
23	32	5.6	32	5.6

Tabla III.8. CMI y CMB de dendrímeros carboxilano frente a bacterias *S. aureus*.

Ensayos de sinergia

De los datos anteriormente mostrados, se concluye que aunque estas sustancias son moderadamente activas frente a bacterias Gram+, no poseen una actividad reseñable frente a bacterias Gram-, a diferencia de otros dendrímeros carbosilano publicados.^{73,85} A la vista de la escasa actividad antibacteriana mostrada por alguno de los dendrímeros se decidió aprovechar este hecho para realizar experimentos de sinergia. De este modo, se utilizó un dendrímero sin actividad antibacteriana frente a *E. coli* y un antibiótico, que tampoco poseyera actividad frente a esta bacteria, para tratar de observar que la colaboración de ambas sustancias mejorase sus actividades como agentes antibacterianos.

El diseño del experimento supuso tomar el dendrímero **19** sin actividad frente a *E. coli* y añadir cantidades crecientes de penicilina V, antibiótico cuya capacidad antibacteriana es también muy limitada en bacterias Gram-. Como puede observarse en la Tabla III.9 con una cantidad de 32 mg/mL del dendrímero, la concentración mínima inhibitoria de la penicilina pasa de 256 mg/mL a 64 mg/mL. Este comportamiento es idéntico para la concentración mínima bactericida.

<i>E. COLI</i>	CMI		CMB	
	mg/ml	μM	mg/ml	μM
Penicilina	256	766.0	256	766.0
19	512	136.3	512	136.3
Penicilina (512-0.125 mg/ml) + 19 (32 mg/ml)	64	191.4	64	191.4

Tabla III.9. Experimentos de sinergia entre el dendrímero **19** y penicilina V.

Este efecto sinérgico puede ser atribuido a interacciones de los dendrímeros catiónicos con la penicilina. En estudios realizados en nuestro grupo de investigación se puso de manifiesto, mediante experimentos de fluorescencia que existía interacción entre ambos, muy probablemente de tipo electrostático entre el grupo carboxilato de la penicilina y los grupos amonio de la periferia del dendrímero. Los dendrímeros catiónicos pueden debilitar la membrana externa y permitir que la penicilina realice su

acción contra la membrana interna facilitando de este modo realizar su función como agente antibacteriano.⁸⁶

Este resultado puede encontrar aplicaciones prácticas, ya que la sinergia entre dendrímeros y la penicilina permite utilizar dosis cuatro veces menores, lo que a su vez haría que la resistencia a los antibióticos fuera menor. Además, podrían diseñarse sistemas en los que el dendrímero carbosilano podría actuar protegiendo a la penicilina en su interior, vehiculizándola con mayor eficacia hasta el lugar de la infección bacteriana.

3.4 BIBLIOGRAFÍA

- ¹ W. F. Anderson, *Nature* **1998**, 392, 25.
- ² A. E. Smith, *Annu. Rev. Microbiol.* **1995**, 49, 807.
- ³ M. A. Kay, J. C. Glorioso and L. Naldini, *Nat. Med.* **2001**, 7, 33.
- ⁴ A. Coonrod, F. Q. Li and M. Horwitz, *Gene Ther.* **1997**, 4, 1313.
- ⁵ W. C. Tseng, F. R. Haselton and T. D. Giorgio, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 25641.
- ⁶ M. B. James and T. D. Giorgio, *Mol. Ther.* **2000**, 1, 339.
- ⁷ V. Escriou, M. Carriere, F. Bussone, P. Wils and D. Scherman, *J. Gene. Med.* **2001**, 3, 179.
- ⁸ D. Lechardeur, K. J. Sohn, M. Haardt, P. B. Joshi, M. Monck, R. W. Graham, B. Beatty, J. Squire, H. O'Brodovich and G. L. Lukacs, *Gene Ther.* **1999**, 6, 482.
- ⁹ O. Zelphati, X. Liang, C. Nguyen, S. Barlow, S. Sheng, Z. Shao and P. L. Felgner, *Biotechniques* **2000**, 28, 304.
- ¹⁰ H. Pollard, G. Toumaniantz, J. L. Amos, H. Avet-Loiseau, G. Guihard, J. P. Behr and D. Escande, *J. Gene. Med.* **2001**, 3, 153.
- ¹¹ G. A. Banks, R. J. Roselli, R. Chen and T. D. Giorgio, *Gene Ther.* **2003**, 10, 1766.
- ¹² M. T. S. Lin, L. Pulkkinen, J. Uitto and K. Yoon, *Int. J. Dermatol.* **2000**, 39, 161.
- ¹³ E. F. Fynan, R. G. Webster, D. H. Fuller, J. R. Haynes, J. C. Santoro and H. L. Robinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, 90, 11478.
- ¹⁴ H. Potter, *Anal. Biochem.* **1988**, 174, 361.
- ¹⁵ L. M. Mir, M. F. Bureau, J. Gehl, R. Rangara, D. Rouy, J. M. Caillaud, P. Delaere, D. Branellec, B. Schwartz and D. Scherman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, 96, 4262.
- ¹⁶ J. A. Wolff, R. W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani and P. L. Felgner, *Science* **1990**, 247, 1465.
- ¹⁷ S. Akhtar and S. Agrawal, *Trends Pharmacol. Sci.* **1997**, 18, 12.
- ¹⁸ R. I. Mahato, Y. Takakura and M. Hashida, *J. Drug Target.* **1997**, 4, 337.
- ¹⁹ D. Reischl and A. Zimmer, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2009**, 5, 8.
- ²⁰ T. Tokatlian and T. Segura, *Nanomed. Nanobiotechnol.* **2010**, 2, 305.
- ²¹ J. E. Summerton, *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, 7, 651.
- ²² S. Akhtar and I. F. Benter, *J. Clin. Invest.* **2007**, 117, 3623.
- ²³ J. Haensler and F. C. Szoka, *Bioconjugate Chem.* **1993**, 4, 372.
- ²⁴ C. Plank, K. Mechtler, F. C. Szoka and E. Wagner, *Hum. Gene Ther.* **1996**, 7, 1437.
- ²⁵ T. Okuda, S. Kidoaki, M. Ohsaki, Y. Koyama, K. Yoshikawa, T. Niidome and H. Aoyagi, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 1270.
- ²⁶ B. Nandy and P. K. Maiti, *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115, 217.
- ²⁷ J. Dennig, *Top. Curr. Chem.* **2003**, 228, 227.
- ²⁸ M. X. Tang and F. C. Szoka, *Gene Ther.* **1997**, 4, 823.
- ²⁹ W. Chen, N. J. Turro and D. A. Tomalia, *Langmuir* **2000**, 16, 15.
- ³⁰ M. X. Tang, C. T. Redemann and F. C. Szoka, *Bioconjugate Chem.* **1996**, 7, 703.
- ³¹ W. T. Godbey, K. K. Wu and A. G. Mikos, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, 96, 5177.
- ³² D. Lechardeur, A. S. Verkman and G. L. Lukacs, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, 57, 755.
- ³³ A. L. Parker, L. Eckley, S. Singh, J. A. Preece, L. Collins and J. W. Fabre, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2007**, 1770, 1331.
- ³⁴ C. W. Pouton, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1998**, 34, 51.
- ³⁵ H. T. Chen, M. F. Neerman, A. R. Parrish and E. E. Simanek, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 10044.

- ³⁶ H. B. Agashe, T. Dutta, M. Garg and N. K. Jain, *J. Pharm. Pharmacol.* **2006**, *58*, 1491.
- ³⁷ R. B. Kolhatkar, K. M. Kitchens, P. W. Swaan and H. Ghandehari, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 2054.
- ³⁸ J. C. Roberts, M. K. Bhalgat and R. T. Zera, *J. Biomed. Mater. Res.* **1996**, *30*, 53.
- ³⁹ V. Mishra, U. Gupta and N. K. Jain, *J. Biomater. Sci.-Polym. Ed.* **2009**, *20*, 141.
- ⁴⁰ K. Fant, E. K. Eshjorner, A. Jenkins, M. C. Grossel, P. Lincoln and B. Norden, *Mol. Pharm.* **2010**, *7*, 1734.
- ⁴¹ J. F. KukowskaLatallo, A. U. Bielinska, J. Johnson, R. Spindler, D. A. Tomalia and J. R. Baker, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 4897.
- ⁴² H. Yoo and R. L. Juliano, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 4225.
- ⁴³ J. Morales-Sanfrutos, A. Megía-Fernández, F. Hernández-Mateo, M. D. Girón-González, R. Salto-González and F. Santoyo-González, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 851.
- ⁴⁴ J. L. Santos, H. Oliveira, D. Pandita, J. Rodrigues, A. P. Pego, P. L. Granja and H. Tomas, *J. Control. Release* **2010**, *144*, 55.
- ⁴⁵ C. C. Lee, J. A. MacKay, J. M. J. Frechet and F. C. Szoka, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1517.
- ⁴⁶ X. Q. Zhang, X. L. Wang, S. W. Huang, R. X. Zhuo, Z. L. Liu, H. Q. Mao and K. W. Leong, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 341.
- ⁴⁷ T. Kim, H. J. Seo, J. S. Choi, H. S. Jang, J. Baek, K. Kim and J. S. Park, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 2487.
- ⁴⁸ B. H. Zinselmeyer, S. P. Mackay, A. G. Schatzlein and I. F. Uchegbu, *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 960.
- ⁴⁹ A. G. Schatzlein, B. H. Zinselmeyer, A. Elouzi, C. Dufes, Y. T. A. Chim, C. J. Roberts, M. C. Davies, A. Munro, A. I. Gray and I. F. Uchegbu, *J. Control. Release* **2005**, *101*, 247.
- ⁵⁰ Y. K. Song, F. Liu, S. Y. Chu and D. X. Liu, *Hum. Gene Ther.* **1997**, *8*, 1585.
- ⁵¹ D. Goula, C. Benoist, S. Mantero, G. Merlo, G. Levi and B. A. Demeneix, *Gene Ther.* **1998**, *5*, 1291.
- ⁵² Y. K. Song, F. Liu and D. Liu, *Gene Ther.* **1998**, *5*, 1531.
- ⁵³ L. G. Barron, L. Gagne and F. C. Szoka, Jr., *Hum. Gene Ther.* **1999**, *10*, 1683.
- ⁵⁴ F. Tack, A. Bakker, S. Maes, N. Dekeyser, M. Bruining, C. Elissen-Roman, M. Janicot, M. Brewster, H. M. Janssen, B. F. M. De Waal, P. M. Fransen, X. Lou and E. W. Meijer, *J. Drug Targeting* **2006**, *14*, 69.
- ⁵⁵ O. Taratula, O. B. Garbuzenko, P. Kirkpatrick, I. Pandya, R. Savla, V. P. Pozharov, H. X. He and T. Minko, *J. Control. Release* **2009**, *140*, 284.
- ⁵⁶ C. Dufes, W. N. Keith, A. Bilsland, I. Proutski, J. F. Uchegbu and A. G. Schatzlein, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 8079.
- ⁵⁷ R. G. Denkwalter, J. Kolc and W. J. Lukasavage in *Macromolecular highly branched homogeneous compound based on lysine units* (Allied Corp., USA). Application: US, **1981**, p. 8.
- ⁵⁸ D. S. Shah, T. Sakthivel, I. Toth, A. T. Florence and A. F. Wilderspin, *Int. J. Pharm.* **2000**, *208*, 41.
- ⁵⁹ T. Okuda, A. Sugiyama, T. Niidome and H. Aoyagi, *Biomaterials* **2004**, *25*, 537.
- ⁶⁰ A. M. Caminade and J. P. Majoral, *Prog. Polym. Sci.* **2005**, *30*, 491.
- ⁶¹ M. Maszewska, J. Leclair, M. Cieslak, B. Nawrot, A. Okruszek, A. M. Caminade and J. P. Majoral, *Oligonucleotides* **2003**, *13*, 193.
- ⁶² P. Ortega, J. F. Bermejo, L. Chonco, E. de Jesus, F. Javier de la Mata, G. Fernández, J. C. Flores, R. Gómez, M. J. Serramía and M. A. Muñoz-Fernández, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, 1388.

- ⁶³ J. F. Bermejo, P. Ortega, L. Chonco, R. Eritja, R. Samaniego, M. Mullner, E. de Jesus, F. J. de la Mata, J. C. Flores, R. Gómez and M. Á. Muñoz-Fernández, *Chem.-Eur. J.* **2007**, *13*, 483.
- ⁶⁴ D. Shcharbin, E. Pedziwiatr, L. Chonco, J. F. Bermejo-Martin, P. Ortega, F. J. De la Mata, R. Eritja, R. Gómez, B. Klajnert, M. Bryszewska and M. Á. Muñoz-Fernández, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2059.
- ⁶⁵ N. Weber, P. Ortega, M. I. Clemente, D. Shcharbin, M. Bryszewska, F. J. de la Mata, R. Gómez and M. A. Muñoz-Fernández, *J. Control. Release* **2008**, *132*, 55.
- ⁶⁶ N. de la Cuevas, B. Rasines, S. García-Gallego, F. J. de la Mata, L. G. Guijarro, M. Á. Muñoz-Fernández and R. Gómez, *Curr. Med. Chem.* **2012**, en prensa.
- ⁶⁷ C. Z. Chen and S. L. Cooper, *Polym. Mater. Sci. Eng.* **1999**, *81*, 483.
- ⁶⁸ C. Z. S. Chen and S. L. Cooper, *Biomaterials* **2002**, *23*, 3359.
- ⁶⁹ C. Z. Chen, N. C. B. Tan and S. L. Cooper, *Chem. Commun.* **1999**, 1585.
- ⁷⁰ M. K. Calabretta, A. Kumar, A. M. McDermott and C. Z. Cai, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1807.
- ⁷¹ A. I. Lopez, R. Y. Reins, A. M. McDermott, B. W. Trautner and C. Z. Cai, *Mol. Biosyst.* **2009**, *5*, 1148.
- ⁷² P. Ortega, J. L. Copa-Patiño, M. A. Muñoz-Fernández, J. Soliveri, R. Gómez and F. J. de la Mata, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3264.
- ⁷³ B. Rasines, J. M. Hernández-Ros, N. de las Cuevas, J. L. Copa-Patiño, J. Soliveri, M. A. Muñoz-Fernández, R. Gómez and F. J. de la Mata, *Dalton Trans.* **2009**, 8704.
- ⁷⁴ J. S. Choi, K. Nam, J. Park, J. B. Kim, J. K. Lee and J. Park, *J. Control. Release* **2004**, *99*, 445.
- ⁷⁵ J. C. Perales, T. Ferkol, M. Molas and R. W. Hanson, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *226*, 255.
- ⁷⁶ K. Saksela, G. H. Cheng and D. Baltimore, *Embo J.* **1995**, *14*, 484.
- ⁷⁷ R. Mariani and J. Skowronski, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 5549.
- ⁷⁸ A. Mangasarian and D. Trono, *Res. Virol.* **1997**, *148*, 30.
- ⁷⁹ H. W. Kestler, D. J. Ringler, K. Mori, D. L. Panicali, P. K. Sehgal, M. D. Daniel and R. C. Desrosiers, *Cell* **1991**, *65*, 651.
- ⁸⁰ J. C. Learmont, A. F. Geczy, J. Mills, L. J. Ashton, C. H. Raynes-Greenow, R. J. Garsia, W. B. Dyer, L. McIntyre, R. B. Oelrichs, D. I. Rhodes, N. J. Deacon and J. S. Sullivan, *N. Engl. J. Med.* **1999**, *340*, 1715.
- ⁸¹ N. Venkataraman, A. L. Cole, P. Svoboda, J. Pohl and A. M. Cole, *J. Immunol.* **2005**, *175*, 7560.
- ⁸² J. A. Martellini, A. L. Cole, N. Venkataraman, G. A. Quinn, P. Svoboda, B. K. Gangrade, J. Pohl, O. E. Sorensen and A. M. Cole, *FASEB J.* **2009**, *23*, 3609.
- ⁸³ S. Asaftei and E. De Clercq, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3480.
- ⁸⁴ B. Rasines, *Tesis Doctoral, Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Alcalá* **2010**.
- ⁸⁵ P. Ortega, B. M. Cobaleda, J. M. Hernández-Ros, E. Fuentes-Paniagua, J. Sánchez-Nieves, M. P. Tarazona, J. L. Copa-Patiño, J. Soliveri, F. J. de la Mata and R. Gómez, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 5238.
- ⁸⁶ B. Rasines, J. Sánchez-Nieves, I. T. Molina, M. Guzmán, M. Á. Muñoz-Fernández, R. Gómez and F. J. de la Mata, *New J. Chem.* **2012**, *36*, 360.

Capítulo 4: Dendrímeros carboxilano aniónicos

En este capítulo se describe la síntesis de derivados dendríticos aniónicos así como sus precursores correspondientes. Para la síntesis de estas estructuras se han utilizado los dendrímeros precursores y los dendrímeros terminados en grupos azida 5-7 mencionados en el capítulo 2 de esta memoria.

4.1 ANTECEDENTES

Al igual que los sistemas dendríticos catiónicos, los dendrímeros aniónicos han sido estudiados con mucho interés en las dos últimas décadas. Como se ha comentado en capítulos anteriores de esta memoria las características quimicofísicas de los dendrímeros y su comportamiento en sistemas biológicos están fuertemente influenciadas por la naturaleza de los grupos terminales. El cambio de grupos catiónicos por aniónicos en la periferia confiere a los dendrímeros propiedades muy diferenciadas. Estas características hacen de los dendrímeros aniónicos un objeto de estudio muy interesante en numerosos campos de la química, especialmente en el campo de la química médica y como ligandos para ser unidos a centros metálicos para la formación de metalodendrimeros.

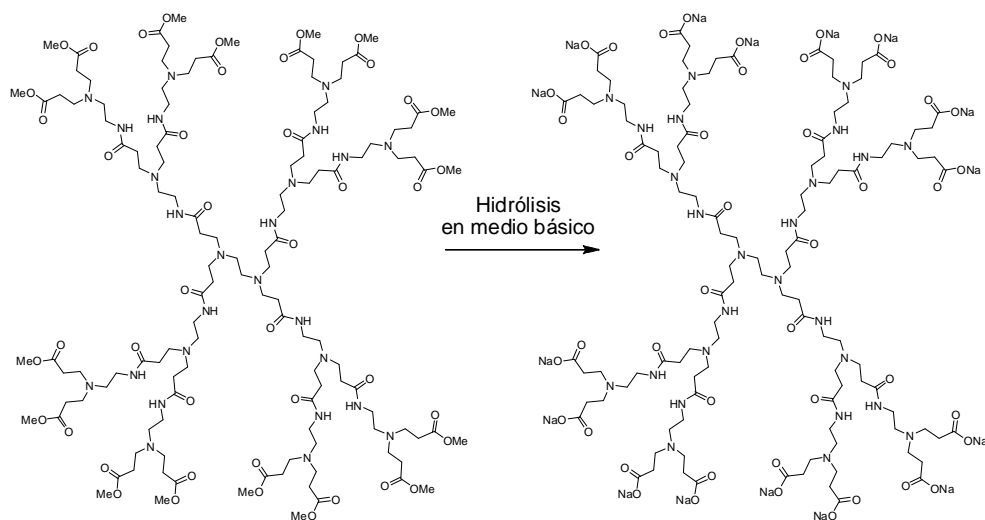
4.1.1 SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS ANIÓNICOS

A diferencia de los dendrímeros catiónicos, existe una mayor variedad de tipos de dendrímeros aniónicos, esto es debido a que existen numerosos grupos funcionales capaces de soportar una carga negativa, lo que origina una gran diversidad de estructuras con diferentes grupos terminales. Sin embargo, la mayoría de los dendrímeros aniónicos poseen grupos carboxilato, grupos fosfonato o grupos funcionales derivados de azufre (sulfato o sulfonato) en la superficie.

Dendrimeros con grupos carboxilato

Los dendrímeros con grupos carboxilato en la periferia son los dendrímeros aniónicos de uso más extendido en la literatura debido a que las reacciones implicadas en su síntesis son probablemente las más sencillas y, principalmente, a que están disponibles comercialmente dendrímeros PAMAM decorados con grupos carboxilato. Estos se preparan fácilmente debido a que uno de los pasos intermedios

del crecimiento de la estructura es un producto terminado en grupos éster, transformables en grupos carboxilato mediante una reacción de hidrólisis en medio básico (Esquema IV.1).



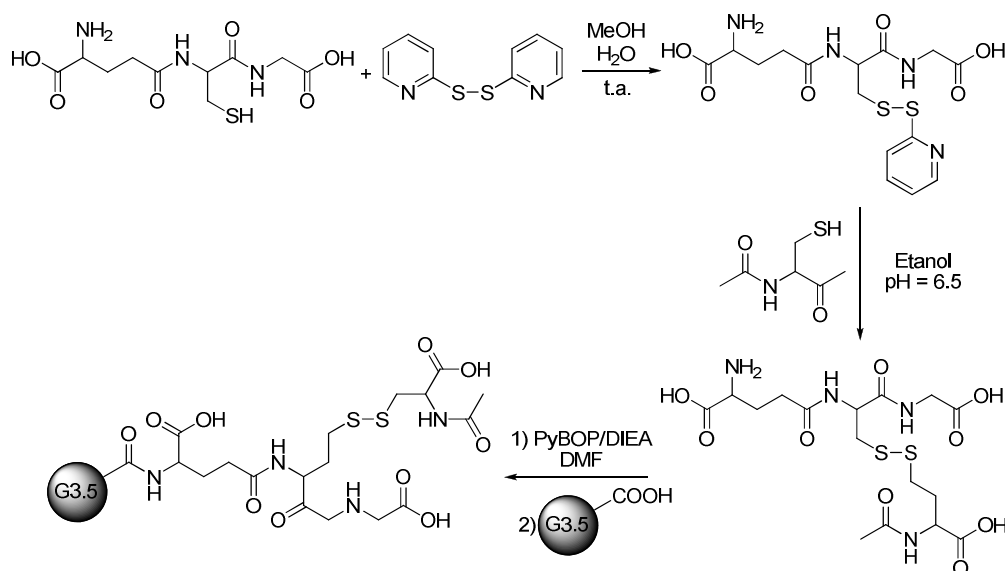
Esquema IV.1. Síntesis de un dendrímero PAMAM aniónico.

Estos dendrímeros también se suelen transformar a su forma de ácido carboxílico debido a que de este modo se pueden realizar modificaciones sobre ellos con mayor facilidad. Estos dendrímeros debido al pK_a de sus grupos terminales, cercano a 4, al ser disueltos en agua se disocian parcialmente, obteniéndose estructuras con carga negativa.

Existen numerosos ejemplos en los que se han utilizado estos dendrímeros sin ningún tipo de modificación para el transporte de moléculas al interior de diversas células, del mismo modo que sus análogos catiónicos aprovechando sus características diferenciadoras. Recientemente, se ha publicado un trabajo en el que se expone la capacidad de estos sistemas con la periferia aniónica para unir, mediante interacciones electrostáticas, fármacos catiónicos basados en compuestos de coordinación de platino y rutenio.¹ En este estudio se comprobó la existencia de una interacción electrostática entre los grupos ácido del dendrímero y el fármaco mediante experimentos NOESY y se reforzó mediante experimentos DOSY. Sin embargo, se halló que las constantes de unión dendrímero-complejo eran demasiado bajas para tener utilidad práctica.

A pesar de que los dendrímeros PAMAM con periferia decorada con grupos carboxilato tienen carga global aniónica, el interior sigue siendo susceptible de ser protonado en medio acuoso. Esta característica fue aprovechada por Nagati y colaboradores para encapsular derivados naftalensulfonato, que son fluorescentes, en el interior de la estructura dendrítica. Se determinó que a pH inferiores a 6 la carga global del dendrímero es positiva pudiendo encapsular los derivados naftalensulfonato. Sin embargo a pH superiores a 8 el dendrímero no era capaz de incorporar los derivados aniónicos a su interior.²

La disponibilidad comercial de estos dendrímeros también hace que sean idóneos como plataforma para diversas modificaciones. Por ello se han utilizado para formar conjugados con un derivado de N-acetilcisteína utilizando una unión tipo amida, previa modificación del grupo carboxilato en el derivado ácido carboxílico reduciendo el pH. La liberación de la N-acetilcisteína se realiza colocando un puente disulfuro intermedio que en presencia de glutatión se rompe con facilidad, permitiendo que la N-acetilcisteína realice su acción antiinflamatoria y antioxidante con mayor actividad que el fármaco aislado (Esquema IV.2).^{3,4}



Esquema IV.2. Conjugación de N-acetilcisteína a un dendrímero PAMAM.

Otra estrategia a seguir es el empleo de dendrímeros PAMAM catiónicos y modificar su periferia con un grupo aniónico. Un ejemplo de esto es la unión a la periferia de dendrímeros PAMAM comerciales de grupos de ácido siálico. La

conjugación de estos grupos se llevó a cabo utilizando uno de estos azúcares modificados con un grupo isotiocianato, el ataque por parte de los grupos amino terminales de la estructura dendrímica permite la unión de ambos fragmentos a través de un espaciador tipo tiourea como se observa en la Figura IV.1.^{5,6}

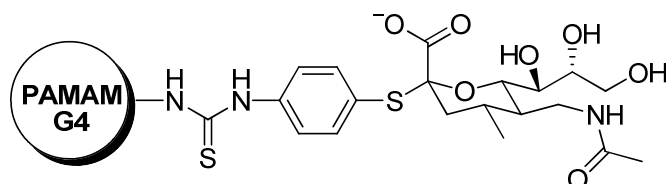


Figura IV.1. Dendrímero PAMAM conjugado con ácido siálico.

Al margen de estos ejemplos con ácido siálico conjugado a dendrímeros PAMAM existen varios ejemplos de otros dendrímeros con este grupo funcional decorando su periferia. En 1993 se sintetizó alguna de las primeras estructuras dendríticas que soportaban grupos sialósidos en su periferia. Roy y colaboradores utilizaron técnicas de síntesis en fase sólida para sintetizar estos esqueletos.⁷ Para ello se anclaron núcleos de polilisina a una resina de poliestireno que actuaba como soporte sólido utilizando un espaciador de β -alanina entre ambos. El crecimiento de la estructura se realizó secuencialmente utilizando un agente acoplante con derivados de lisina protegidos con el grupo protector Fmoc (grupo fluorenilmetiloxicarbonilo) y posterior desprotección con piperidina. A continuación se trató el dendrón con un tioderivado de ácido siálico, para dar la estructura final y se liberó del soporte sólido tratándolo con ácido trifluoroacético (Figura IV.2).

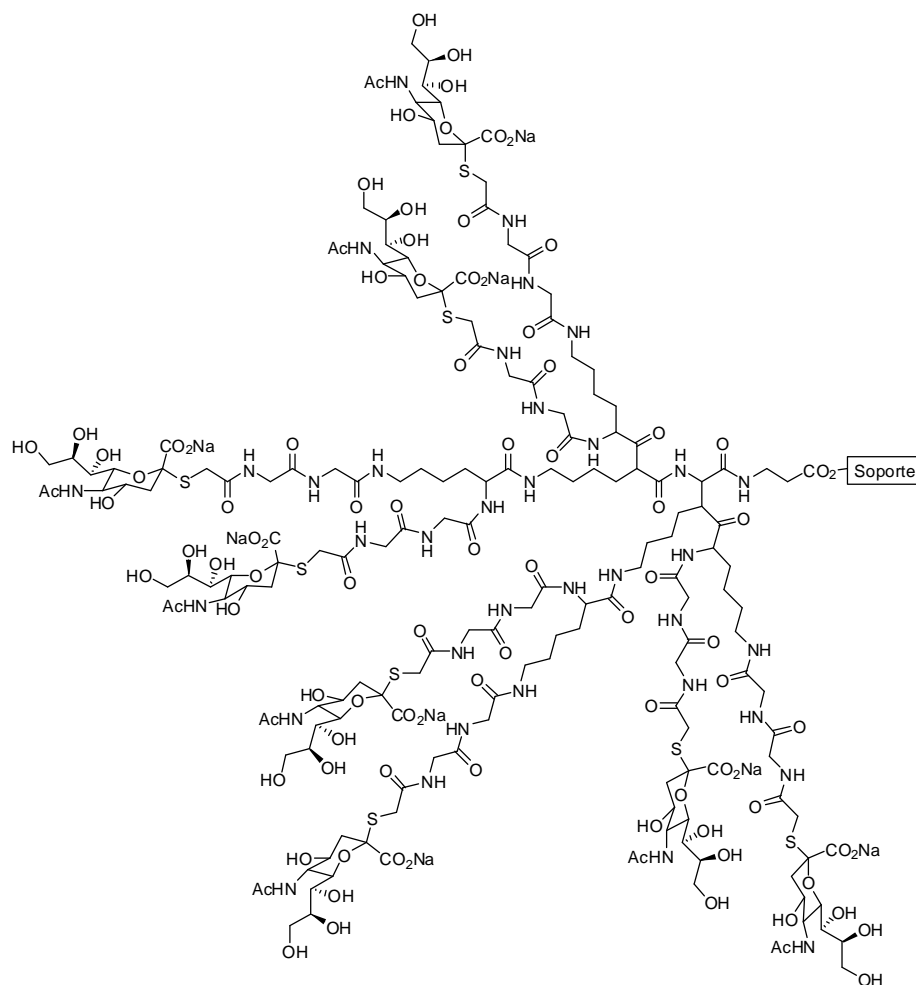


Figura IV.2. Dendrón tipo polilisina decorado con grupos de ácido siálico.

Más recientemente se han sintetizado dendrímeros con un núcleo de pentaeritritol aprovechándose de la alta eficacia de la reacción de Huisgen para la formación de triazoles englobada dentro de la “click chemistry”. Para ello se modificó la estructura del pentaeritritol tratándolo con potasa y bromuro de propargilo, para posteriormente unirlos a los derivados de ácido siálico mediante un espaciador tipo triazol. Esta aproximación hace que se consiga sintetizar el dendrímero en un rendimiento muy elevado (Figura IV.3).⁸

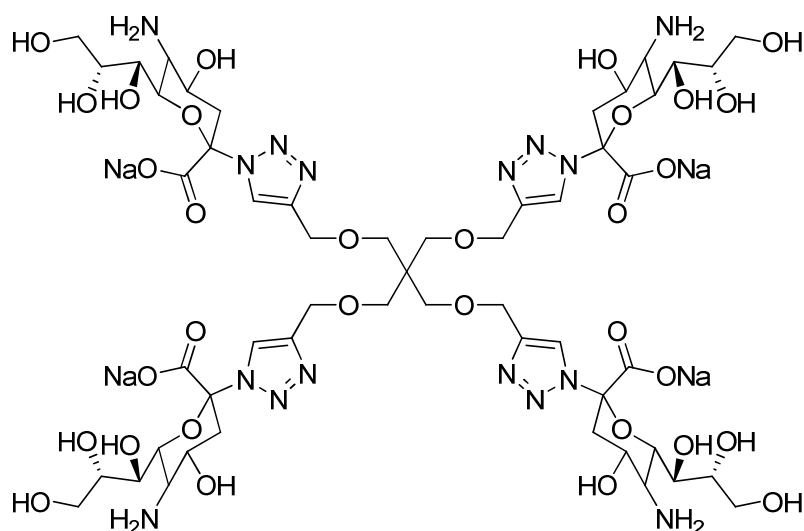


Figura IV.3. Dendrimero modificado con unidades de ácido siálico mediante “click chemistry”.

Otra estrategia para decorar dendrimeros con grupos carboxilato, supone el uso de un anillo aromático como espaciador entre el grupo funcional y el esqueleto dendrítico. Un ejemplo temprano de este tipo de síntesis fue publicado por Fréchet y colaboradores en 1993. Utilizando una metodología desarrollada por su grupo de investigación sintetizaron dendrimeros poliarileter capaces de solubilizar sustancias orgánicas en medio acuoso aprovechando el interior apolar de sus estructuras.⁹ Más tarde, la síntesis de dendrimeros con anillos aromáticos formando parte de la estructura ha sido llevada a cabo por numerosos grupos de investigación. En un ejemplo reciente se funcionalizó un dendrimer basado en difenilacetileno como unidad repetitiva. La estructura aromática con grupos acetileno permitió el uso de la reacción de Sonogashira para llevar a cabo su síntesis con buenos rendimientos. La estructura de este dendrimer ha posibilitado que sea utilizado como sensor fluorescente para detectar la presencia de Hg²⁺ en medio acuoso, gracias a los grupos carboxilato de su estructura que no sólo le confieren solubilidad en agua sino que sirven para coordinar al centro metálico como se observa en la Figura IV.4.¹⁰

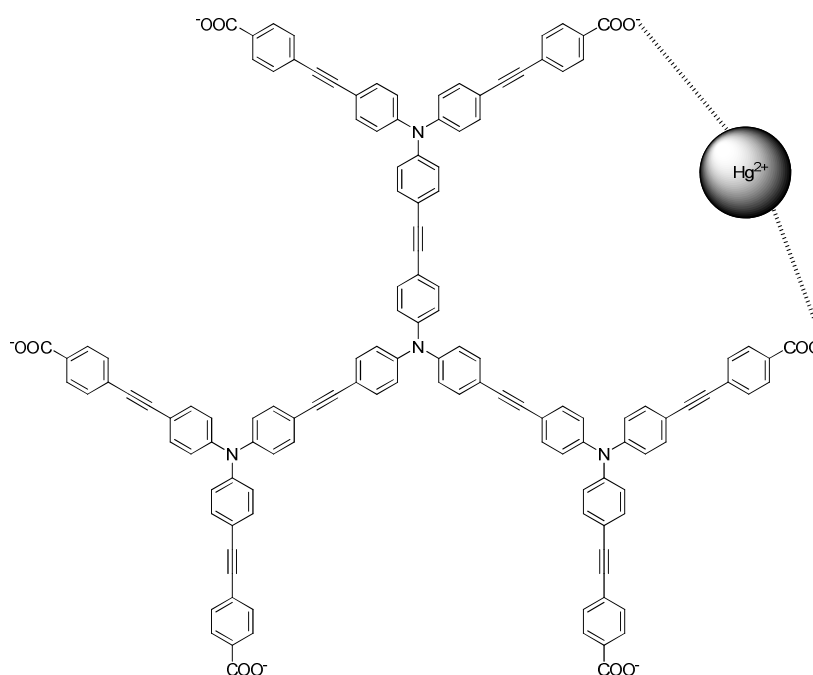


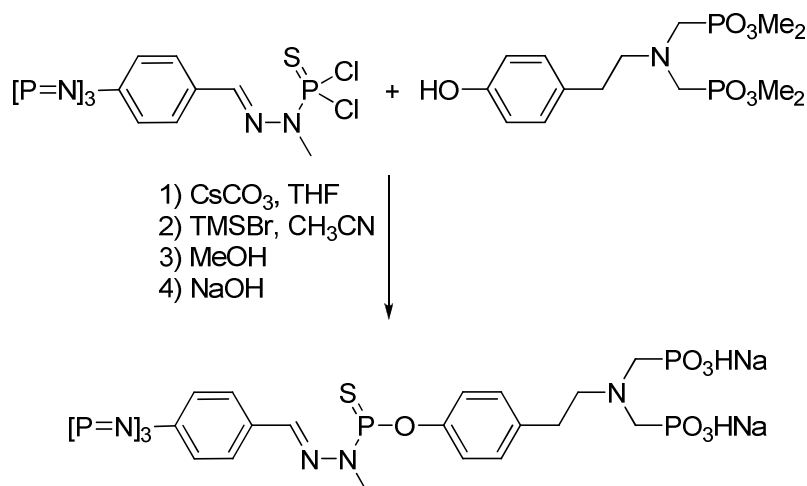
Figura IV.4. Dendrímtero basado en unidades fenilacetileno capaz de detectar la presencia de Hg^{2+} .

Otro tipo de dendrímeros que han sido utilizados como soporte para grupos carboxilato son los dendrímeros basados en triazina. El grupo de Simanek se ha mantenido muy activo en el desarrollo de este tipo de dendrímeros. Este esqueleto puede sintetizarse en escala de kilogramos con alta pureza,¹¹ además, la síntesis de este dendrímtero deja como grupo terminal grupos amina que reaccionan con numerosos electrófilos en buenos rendimientos, lo que los convierte en un soporte muy versátil para conseguir propiedades diversas conferidas por los grupos terminales.¹²⁻¹⁴

Dendrímeros con grupos fosfonato

Los grupos fosfonato aplicados a la modificación de la periferia de dendrímeros fueron desarrollados por Majoral y colaboradores para decorar sus dendrímeros de esqueleto polifosfohidrazona, de los que se ha hablado en capítulos anteriores de esta memoria. Desde entonces ha sido su grupo de investigación el que ha estado aplicando estos dendrímeros más activamente al campo de la biomedicina con resultados notables. De modo general los grupos fosfonato se hacen reaccionar con distintos derivados aromáticos. El resultado de esta reacción se ancla al dendrímtero

utilizando una base para arrancar un protón al grupo fenólico que ahora soporta los fosfonatos y éste realiza una sustitución nucleófila sobre el dendrímero decorado con grupos cloruro.¹⁵



Esquema IV.3. Dendrímero polifosfohidrazona con grupos fosfonato en la periferia.

Este método tan directo de síntesis ha permitido de modo sencillo conseguir una amplia variedad de dendrímeros terminados en grupos fosfonato que son fácilmente transformados en su equivalente de ácido fosfónico por reacción con haluros de trimetilsililo y posterior tratamiento con metanol. A su vez el ácido fosfónico resultante se transforma en la sal correspondiente con la cantidad estequiométrica de hidróxido de sodio.¹⁶ En la figura IV.5 se muestran varios de los grupos terminales sintetizados por Majoral.

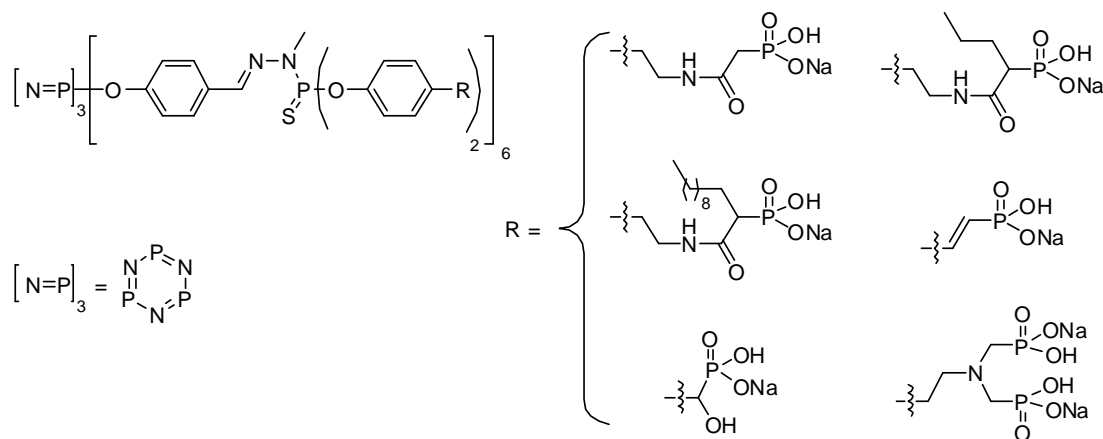
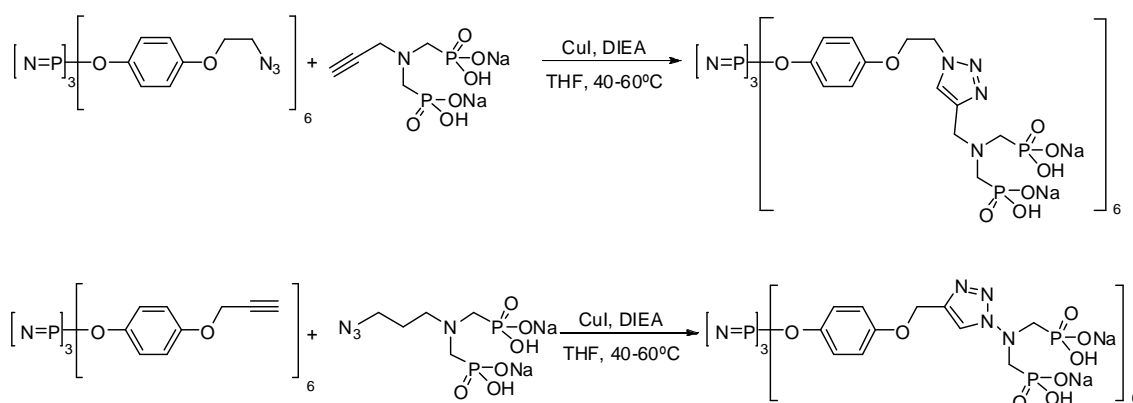


Figura IV.5. Dendrímeros con diversos grupos fosfonato terminales

En el grupo de Majoral también se ha utilizado “click chemistry” para decorar los dendrímeros basados en fósforo con grupos fosfonato que más tarde se transforman en sus sales sódicas. Debido al tipo de crecimiento de los dendrímeros de fósforo, es muy sencillo modificar la superficie con grupos fenólicos y sustituir éstos con grupos azida o acetileno mediante una sustitución nucleófila como se muestra en el esquema siguiente. A continuación, la reacción de formación de un triazol catalizada por cobre brinda buenos rendimientos que decrecen a medida que aumenta la generación del esqueleto dendrítico (Esquema IV.4).¹⁷



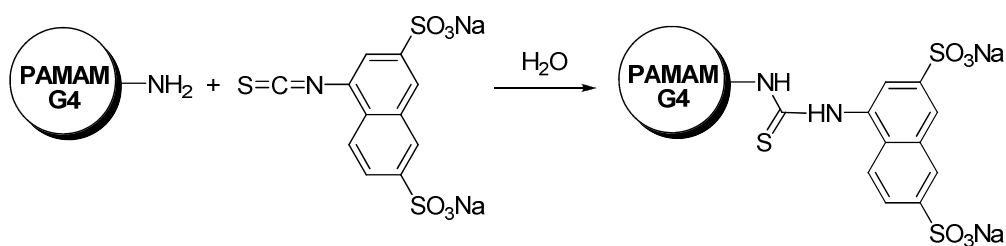
Esquema IV.4. Dendrímeros polifosfohidrazona con la periferia funcionalizada mediante “click chemistry”.

Aunque la mayoría de los dendrímeros polifosfonato están desarrollados por el grupo de Majoral, existe un pequeño número de dendrímeros de estructura interna diferente a la polifosfohidrazona que incorporan grupos fosfonato en la periferia. En 2004 se presentó un artículo en que se sintetizaban dendrímeros con diversos grupos funcionales en la periferia, entre ellos grupos tipo ácido fosfónico que en medio acuoso están en su forma aniónica. El núcleo al que éstos estaban anclados era un esqueleto tipo triazina. Estos dendrímeros, como se ha comentado en el apartado anterior, pueden sintetizarse con aminas como punto reactivo en la periferia, de modo que mediante una reacción tipo Michael utilizando vinilfosfonato de dietilo y posterior hidrólisis, se pueden conseguir estructuras dendriméricas con grupos fosfonato en la periferia.¹⁸

Dendrímeros con grupos funcionales derivados de azufre

Los dendrímeros con grupos funcionales aniónicos en la periferia derivados de azufre han obtenido una gran atención en el campo de la química biomédica en los últimos años debido a su efectividad para evitar la infección contra diversos virus, entre ellos el VIH. De entre todos estos candidatos los más eficaces en estos tratamientos son aquellos que son de naturaleza polisulfato y polisulfonato, y dentro de estos últimos cabe destacar en particular a los dendrímeros polinaftilsulfonato. Estos grupos terminales los posee un nuevo candidato a fármaco llamado VivaGel que está fase III de ensayos clínicos. Este fármaco posee como principio activo una estructura dendrímica con esqueleto tipo lisina cuyos grupos terminales son anillos naftalensulfonato, siendo actualmente el único dendrímero que se encuentra en esta fase de estudio biomédico.¹⁹⁻²¹

La síntesis de estos productos generalmente se realiza preparando el producto sulfatado o sulfonado previamente que después se ancla al dendrímero utilizando generalmente una funcionalidad tipo amina de la periferia de la estructura dendrímica. Además, una gran parte de los productos sulfonados están disponibles comercialmente, generalmente unidos a un anillo aromático, lo que facilita aún más la síntesis de este tipo de dendrímeros. Un ejemplo de esta estrategia se publicó en el año 2000 para funcionalizar dendrímeros PAMAM de cuarta generación con anillos naftalensulfonato en la periferia utilizando una técnica ampliamente utilizada en bioconjugación. Para ello, se hizo reaccionar un isotiocianato aromático con el grupo amino primario terminal del dendrímero para dar el esqueleto dendrítico aniónico con un espaciador tipo tiourea entre la estructura dendrímica y el anillo naftalénico (Esquema IV.5).²²



Esquema IV.5. Dendrímero PAMAM modificado utilizando un derivado isotiocianato.

Otra aproximación supone la formación de un enlace tipo amida como el utilizado por Porter y colaboradores en 2007. En esta publicación utilizaron ácido 4-sulfobenzoico y ácido 3,5-disulfobenzoico comerciales junto a pyBOP como agente acoplante para unirlos a una estructura dendrítica con unidades de lisina como unidad repetitiva. Utilizando esta técnica sintetizaron dendrímeros de primera y segunda generación para observar su tiempo de vida en un sistema biológico y su biodistribución (Figura IV.6).²³

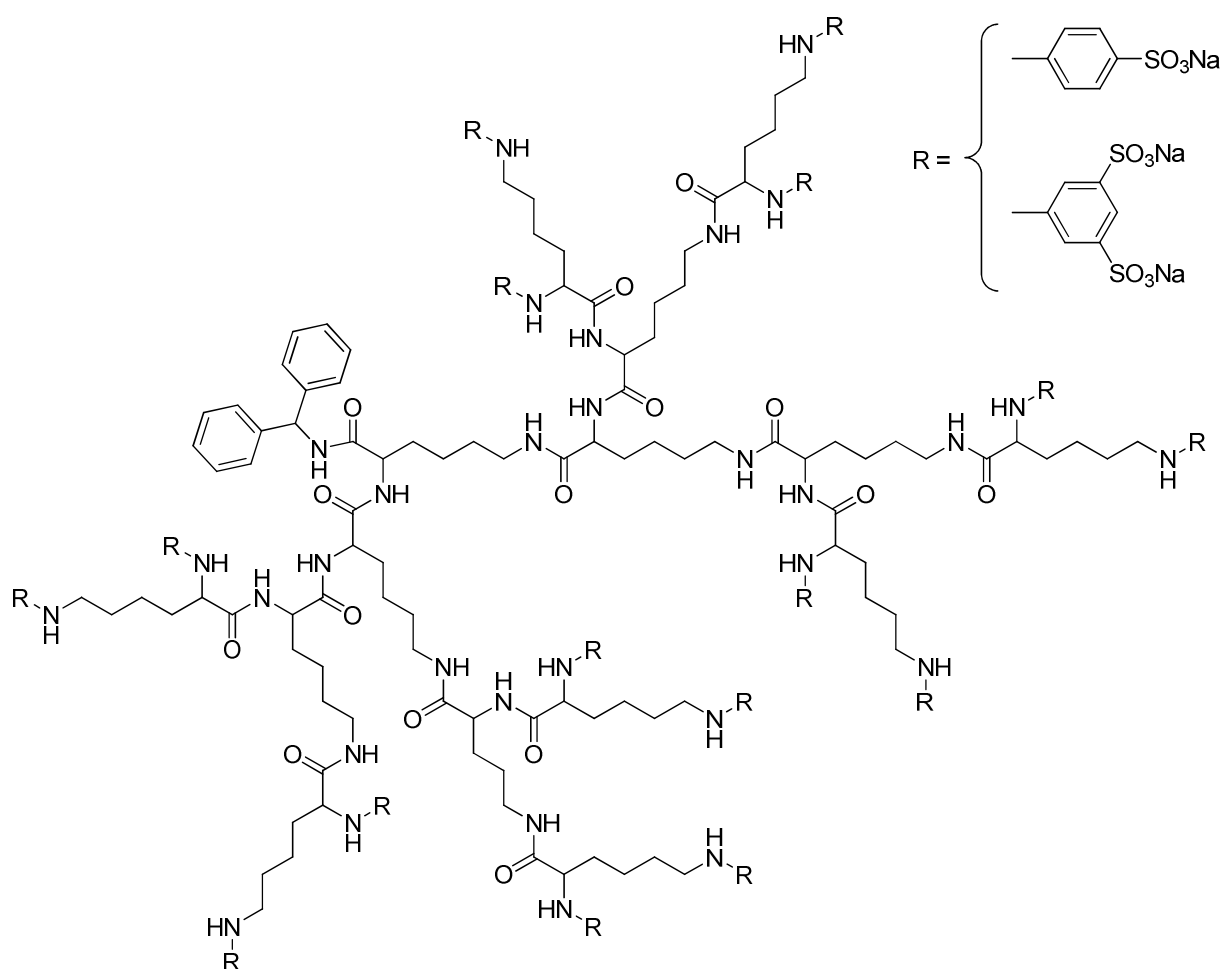


Figura IV.6. Dendrímeros polilisina con grupos bencilsulfonato terminales.

Simanek y colaboradores también han sintetizado diversos dendrímeros aniónicos, entre ellos se encuentran estructuras con grupos sulfonato en la periferia. Para este fin utilizaron la funcionalidad externa de dendrímeros triazina, desarrollados por ellos, atacando moléculas de propanosulfona provocando la apertura del anillo que conduce a estructuras con un grupo sulfonato por cada rama de dendrímero.¹⁸ En

la figura IV.7 se muestra la estructura final de uno de estos dendrímeros decorados con grupos sulfonato.

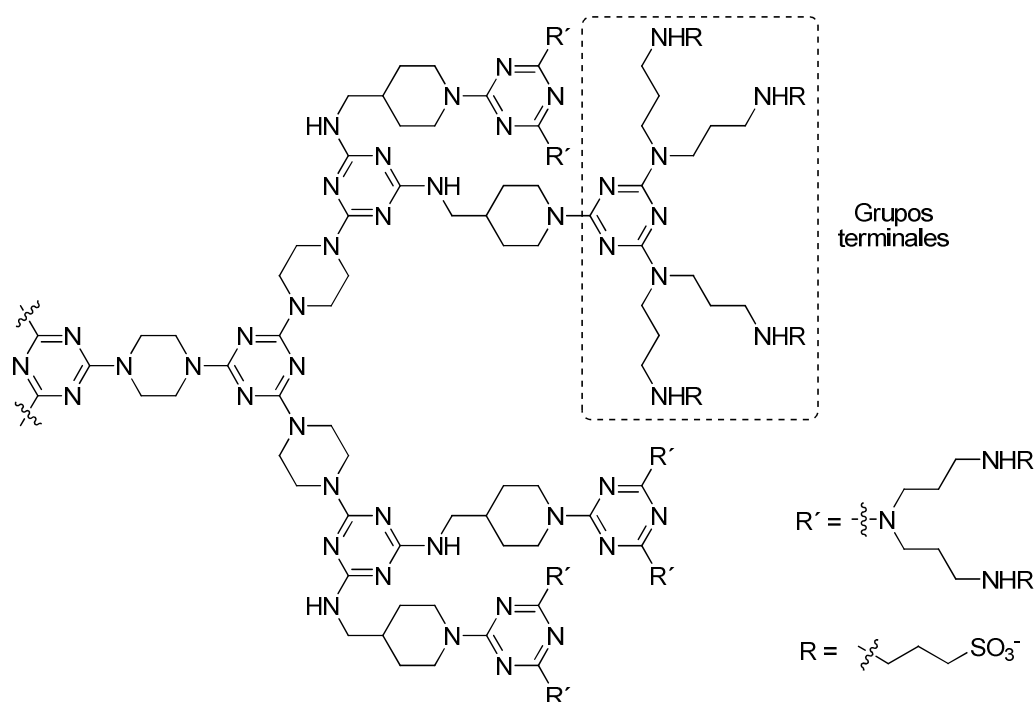


Figura IV.7. Dendrímeros sintetizados por Simanek terminados en grupos sulfonato.

Además de estos métodos, también se ha recurrido a la metodología “click chemistry” para unir este tipo de fragmentos aniónicos a dendrímeros. Fernández-Megía y colaboradores han sintetizado dendrímeros basados en unidades de ácido gálico con fragmentos polietilenglicol sobre los que se realiza una cicloadición entre un derivado naftalensulfonato funcionalizado con un grupo alquino y el dendrímero terminado en grupos azida. Las reacciones se producen en rendimientos excelentes, siempre superiores al 90%. En este mismo trabajo también se sintetizan dendrímeros terminados en grupos sulfato. Para ello se preparó un derivado alquino que contenía el grupo sulfato y se llevó a cabo la cicloadición en idénticas condiciones, observándose también rendimientos superiores al 90 % (Figura IV.8).²⁴

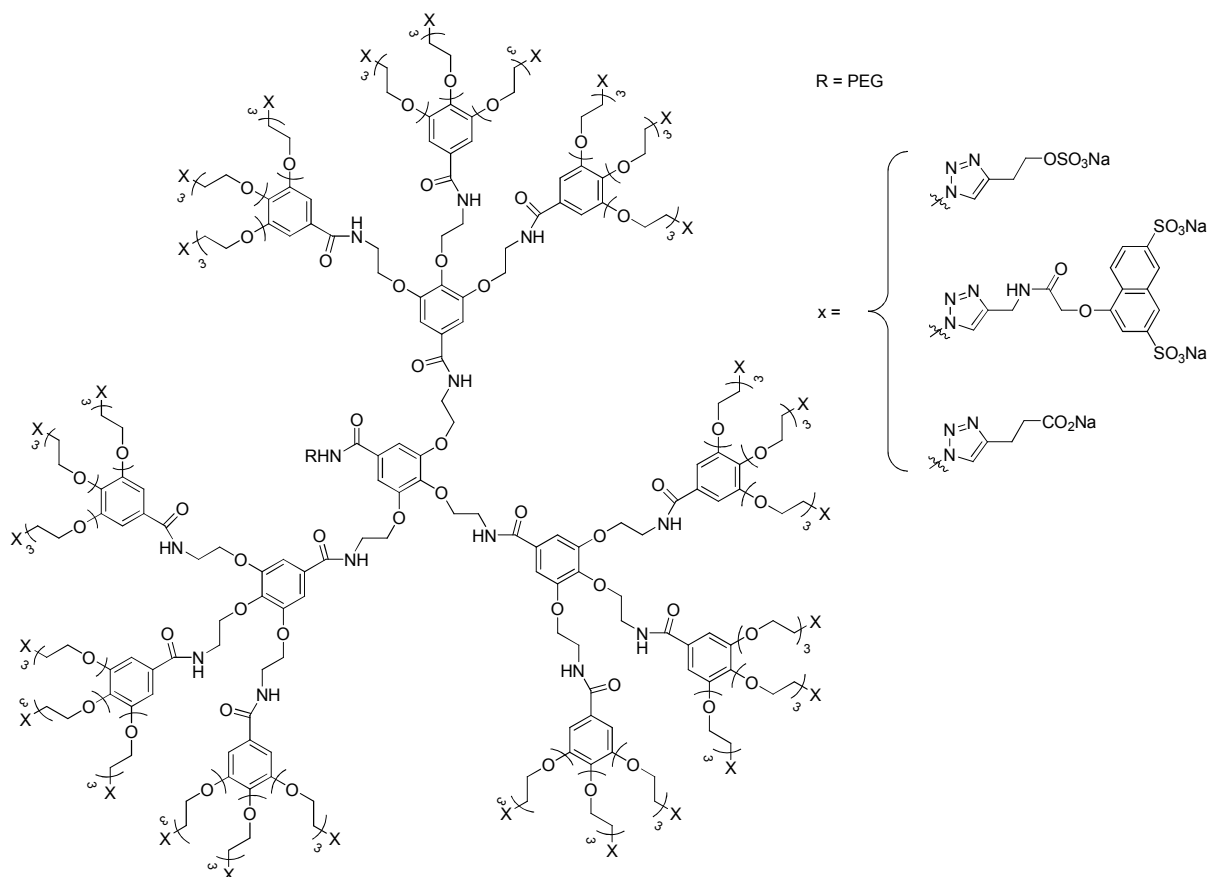
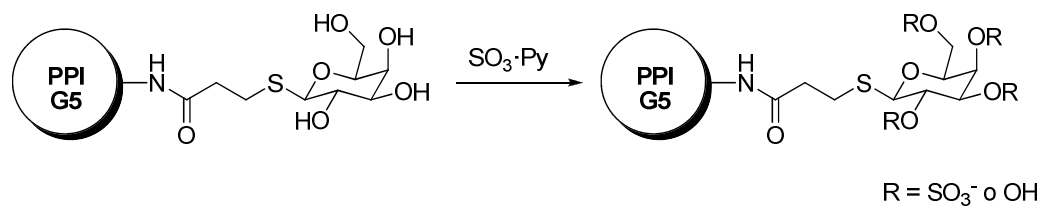


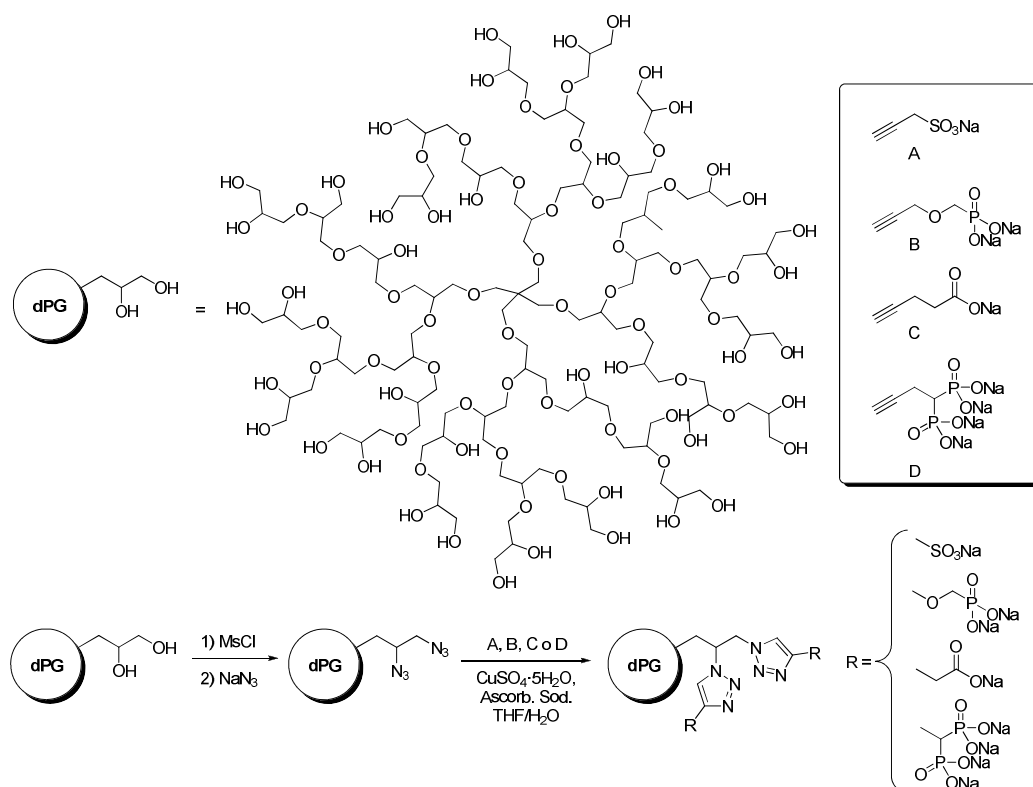
Figura IV.8. Dendrímico aniónico de tercera generación basado en ácido gálico funcionalizado mediante “click-chemistry”.

Otro ejemplo de dendrímeros con grupos externos tipo sulfato fue publicado por Schengrund y colaboradores para ser probado como agente antiviral. Así, sintetizaron dendrímeros con grupos galactosa en la periferia, que forman parte de receptores que están involucrados en la adhesión a las membranas celulares. Utilizando grupos sulfato para tratar de reforzar esta característica. Para ello conjugaron a un dendrímero PPI de quinta generación grupos galactosa utilizando un enlace tipo amida para unir ambos residuos. Posteriormente se procedió a transformar parte de las funcionalidades OH de los grupos galactosa en grupos sulfato de forma aleatoria, añadiendo el complejo trióxido de azufre piridina. Por último se transformaron los ácidos en sus sales sódicas (Esquema IV.6). Así se consiguió un dendrímero con 84 grupos sulfato por molécula de media.²⁵



Esquema IV.6. Dendrímero polipropilenimina con un núcleo diaminobutano modificado con grupos galactosa.

Muy recientemente, el grupo de Haag ha utilizado una aproximación similar a la de Fernández-Megía para formar dendrímeros con grupos aniónicos en la periferia, utilizando la cicloadición de Huisgen. Para ello se sintetizó un dendrímero basado en unidades de glicerol terminado en grupos azida que se unieron a alquinos de naturaleza aniónica utilizando la reacción de Huisgen para la formación de triazoles catalizada por cobre, obteniendo dendrímeros terminados en grupos fosfonato, carboxilato y también sulfonato y sulfato (Esquema IV.7).²⁶



Esquema IV.7 Esqueleto dendrimérico modificado por Haag mediante “click chemistry” con diversos grupos aniónicos.

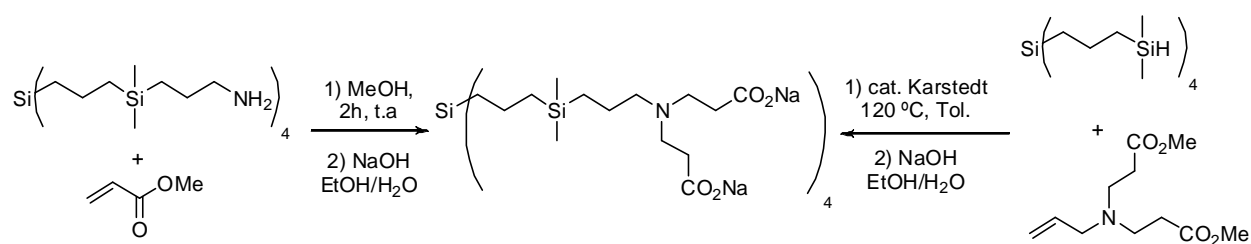
4.1.2 SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS CARBOSILANO ANIÓNICOS

Los dendrímeros aniónicos con estructura interna tipo carbosilano se sintetizan utilizando las mismas técnicas y reacciones que el resto de dendrímeros. Sin embargo, apenas existen ejemplos de dendrímeros aniónicos que utilicen este tipo de esqueletos, en parte debido a la mayor difusión que poseen los dendrímeros comerciales y en mayor medida debido a que su baja polaridad puede hacer que no sean solubles en agua incluso con las cargas que soporta la estructura. Aunque es esta lipofilia la que puede ayudar en ciertas aplicaciones prácticas, como por ejemplo el atravesar barreras biológicas o su uso como ligandos en la formación de metalodendrímeros para la catálisis de reacciones orgánicas, que han de ser llevadas a cabo en disolventes apolares.

Dendrímeros carbosilano con grupos carboxilato

Un ejemplo de dendrímeros carbosilano solubles en agua fue publicado por Astruc y colaboradores utilizando un esqueleto carbosilano con anillos aromáticos en el esqueleto. Para la síntesis se recurrió a reacciones de hidrosililación para formar la estructura y se decoró la periferia con grupos benzoato, que mediante una hidrólisis básica condujo a un dendrímero con 81 grupos carboxilato en la periferia.²⁷

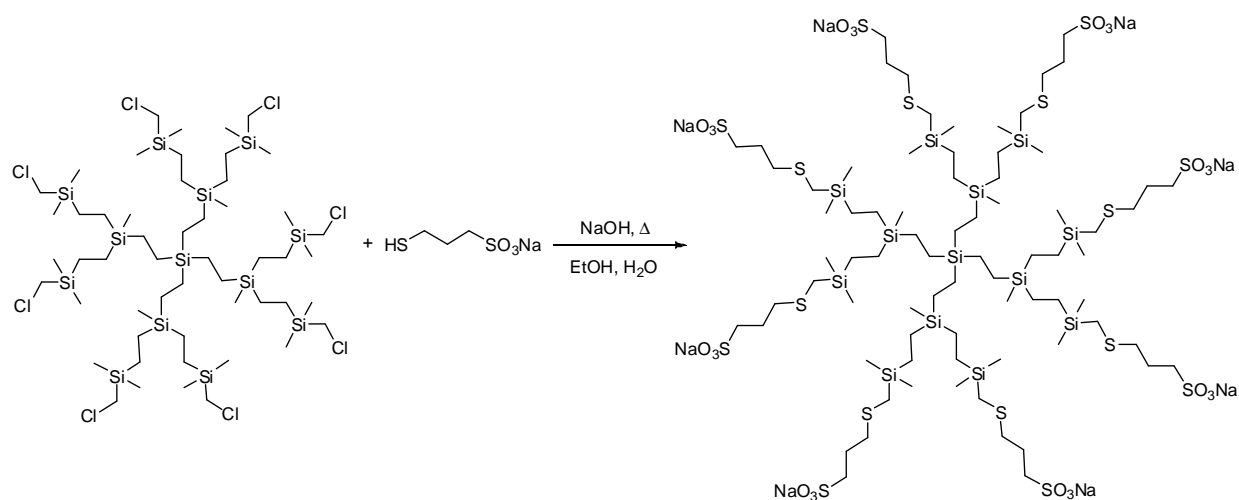
Recientemente en nuestro grupo de investigación se han sintetizado diversas estructuras dendríticas que poseen grupos carboxilato en la periferia.²⁸ Así, se sintetizaron dendrímeros de primera a tercera generación partiendo de grupos Si-H terminales que se transformaron en grupos amino a través de una reacción de hidrosililación con alilamina. Posteriormente mediante una reacción de tipo Michael sobre acrilato de metilo en metanol y posterior hidrólisis básica. Los grupos terminales fueron transformados en grupos carboxilato. Este proceso también se puede llevar a cabo realizando la adición de tipo Michael previamente sobre la alilamina y seguidamente la hidrosililación sobre el dendrímero terminado en grupos Si-H (Esquema IV.8).



Esquema IV.8. Distintas aproximaciones a la síntesis de dendrímeros carbosilano con dos grupos carboxilato terminales.

Dendrímeros carbosilano con grupos funcionales derivados de azufre

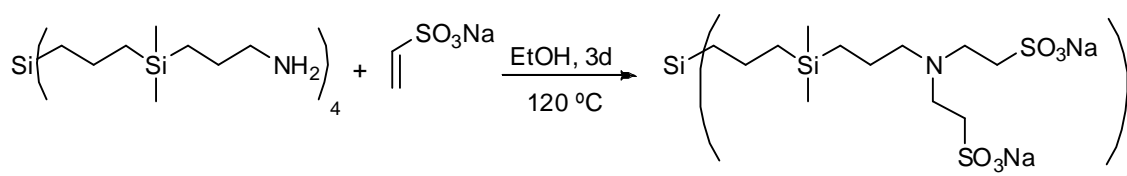
El primer dendrímero carbosilano aniónico soluble en agua que puede englobarse dentro de este grupo, fue preparado en 1998 por Seyferth y colaboradores, utilizando un dendrímero con enlaces SiCH₂Cl en la periferia. Sobre éstos se realizó un ataque con una molécula que soportaba un grupo sulfonato y un grupo tiol en cada extremo. La síntesis de dendrímeros carbosilano de primera y segunda generación utilizando tioéteres como espaciador resulta muy sencilla y con ella se obtienen los productos finales con buenos rendimientos (Esquema IV.9).²⁹



Esquema IV.9. Primera familia de dendrímeros carbosilano aniónicos sintetizados por Seyferth.

En nuestro grupo de investigación también se han llevado a cabo la síntesis de dendrímeros decorados con grupos sulfonato, utilizando una técnica similar a la utilizada en la síntesis de dendrímeros terminados en grupos carboxilato mostrada en

el apartado anterior. Se utilizaron dendrímeros terminados en grupos amino y se hicieron reaccionar con vinilsulfonato sódico en una reacción tipo Michael a 120 °C en etanol (Esquema IV.10). Esto condujo a dendrímeros de primera a tercera generación con 8, 16 y 32 grupos sulfonato respectivamente en la periferia con excelente rendimiento solubles en agua.^{28,30}



Esquema IV.10. Síntesis de la primera generación de dendrímeros carboxilano sulfonato mediante una reacción de adición tipo Michael.

4.2 SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS CON GRUPOS ANIÓNICOS TERMINALES MEDIANTE “CLICK CHEMISTRY”

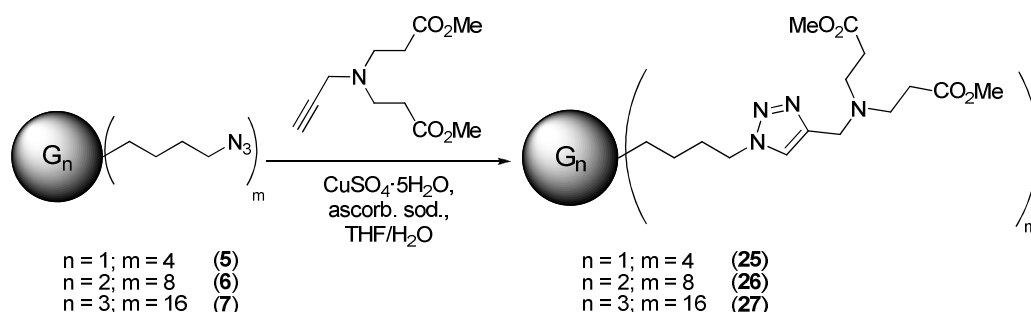
En este apartado de la memoria se describe la síntesis de diversas familias de dendrímeros carboxilato, fosfonato, naftalensulfonato y sulfato de varias generaciones. Este trabajo continúa con el interés del grupo de investigación de sintetizar dendrímeros aniónicos que exploten las características de monodispersidad y multivalencia que poseen estas estructuras. Al igual que en el capítulo 2 de esta memoria se ha utilizado la reacción de cicloadición dipolar entre alquinos y azidas para el anclaje de sustituyentes aniónicos o precursores de grupos funcionales aniónicos. Al igual que en el caso de la síntesis de dendrímeros catiónicos, el uso de esta reacción viene apoyada por sus características, es decir, versatilidad y compatibilidad con numerosos grupos funcionales, simplicidad de la metodología empleada, conversiones muy elevadas y métodos de purificación sencillos. Las propiedades de esta reacción nos han permitido dotar a nuestros dendrímeros con las características deseadas.

Para decorar los esqueletos dendríticos con estos grupos funcionales se ha recurrido a los dendrímeros precursores con grupos terminales tipo azida, descritos en el capítulo 2 de esta memoria y las condiciones de reacción allí explicadas. Debido a

la dificultad de separar los derivados denominados de generación cero de los productos de partida, éstos no se presentan en esta memoria.

4.2.1 SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS CON GRUPOS CARBOXILATO TERMINALES

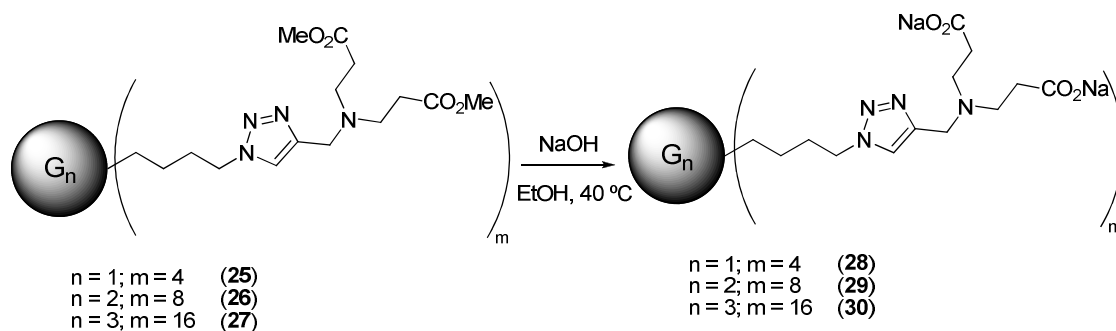
Para llevar a cabo la síntesis de una familia de dendrímeros terminados en grupos carboxilato es necesario preparar dendrímeros precursores con funcionalidades tipo éster en la periferia. Para acometer la síntesis de estas estructuras neutras, primero se ha preparado el derivado amino que soporta un grupo alquino y dos grupos éster (Esquema IV.11).³¹ Con esta amina y los dendrímeros **5-7** se realiza la cicloadición de Huisgen. Las condiciones de reacción que se utilizaron para la síntesis de estas estructuras son análogas a las desarrolladas en el capítulo de 2 de esta memoria. Primero se disuelve el dendrímero decorado con grupos azida y el derivado propargilado de la amina en THF y se añaden una disolución de sulfato de cobre al 5% y una disolución al 10% de ascorbato sódico, ambas en agua. Transcurrido el tiempo de reacción se interrumpe la reacción con hidróxido amónico y la mezcla se extrae y se lleva a cabo una cromatografía de exclusión de tamaños, obteniéndose los productos $G_n[(CH_2)_4(C_2HN_3)CH_2N((CH_2)_2COOMe)_2]_m$ ($n = 1, m = 4$, **(25)**; $n = 2, m = 8$, **(26)**; $n = 3, m = 16$, **(27)**) en buenos rendimientos que decrecen a medida que aumenta la generación del dendrímero (Esquema IV.11). Esta reproducibilidad de las condiciones ejemplifica una de las características más importantes de la “click chemistry”, es decir compatibilidad con numerosos grupos funcionales y versatilidad.



Esquema IV.11. Reacción de cicloadición para la formación de los derivados triazol

25-27.

Por último, es necesario realizar una reacción de hidrólisis en medio básico para obtener los compuestos dendríticos con grupos carboxilato en la periferia. La hidrólisis de **25-27** se realiza añadiendo una cantidad estequiométrica de hidróxido sódico en EtOH y calentando a 40 °C obteniéndose los dendrímeros $G_n[(CH_2)_4(C_2HN_3)CH_2N((CH_2)_2COONa)_2]_m$ ($n = 1, m = 4$, (**28**); $n = 2, m = 8$, (**29**); $n = 3, m = 16$, (**30**)) en buenos rendimientos (Esquema IV.12).



Esquema IV.12. Hidrólisis de los derivados éster para la formación de los derivados aniónicos **28-30**.

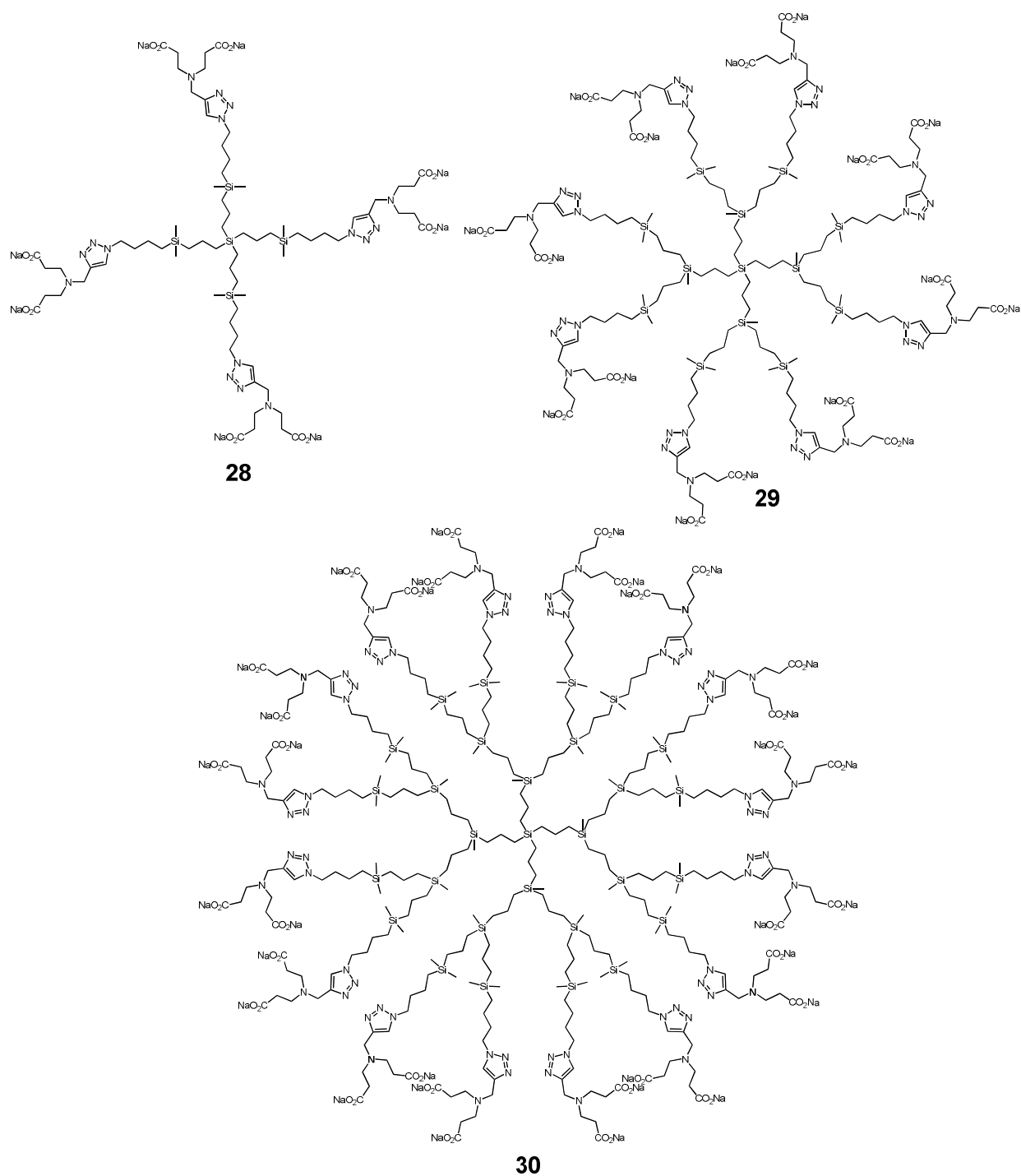
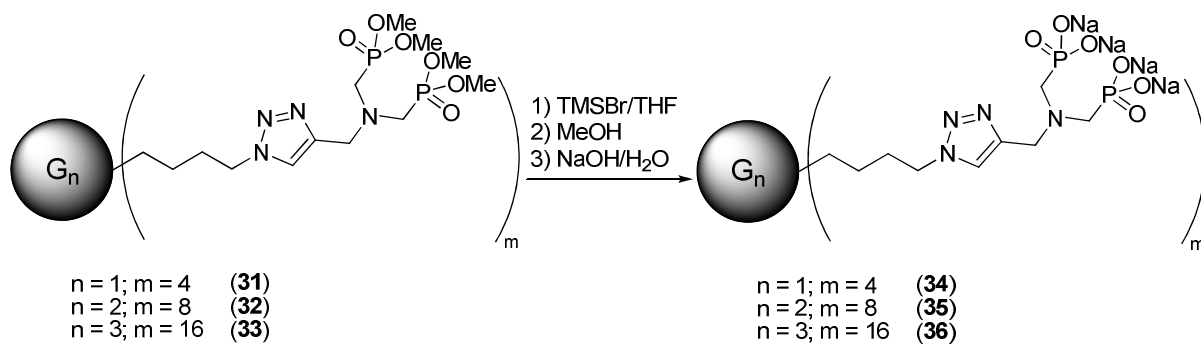


Figura IV.9. Dendrimeros carbosilano terminados en grupos carboxilato sintetizados mediante “click chemistry”.

4.2.2 SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS CON GRUPOS FOSFONATO TERMINALES

Al igual que la preparación de los dendrimeros **25-27**, para estructuras dendríticas terminadas en grupos fosfonato se llevó a cabo la síntesis de una



Esquema IV.14. Preparación de los compuestos polianiónicos **34-36** a partir de los precursores fosfonato.

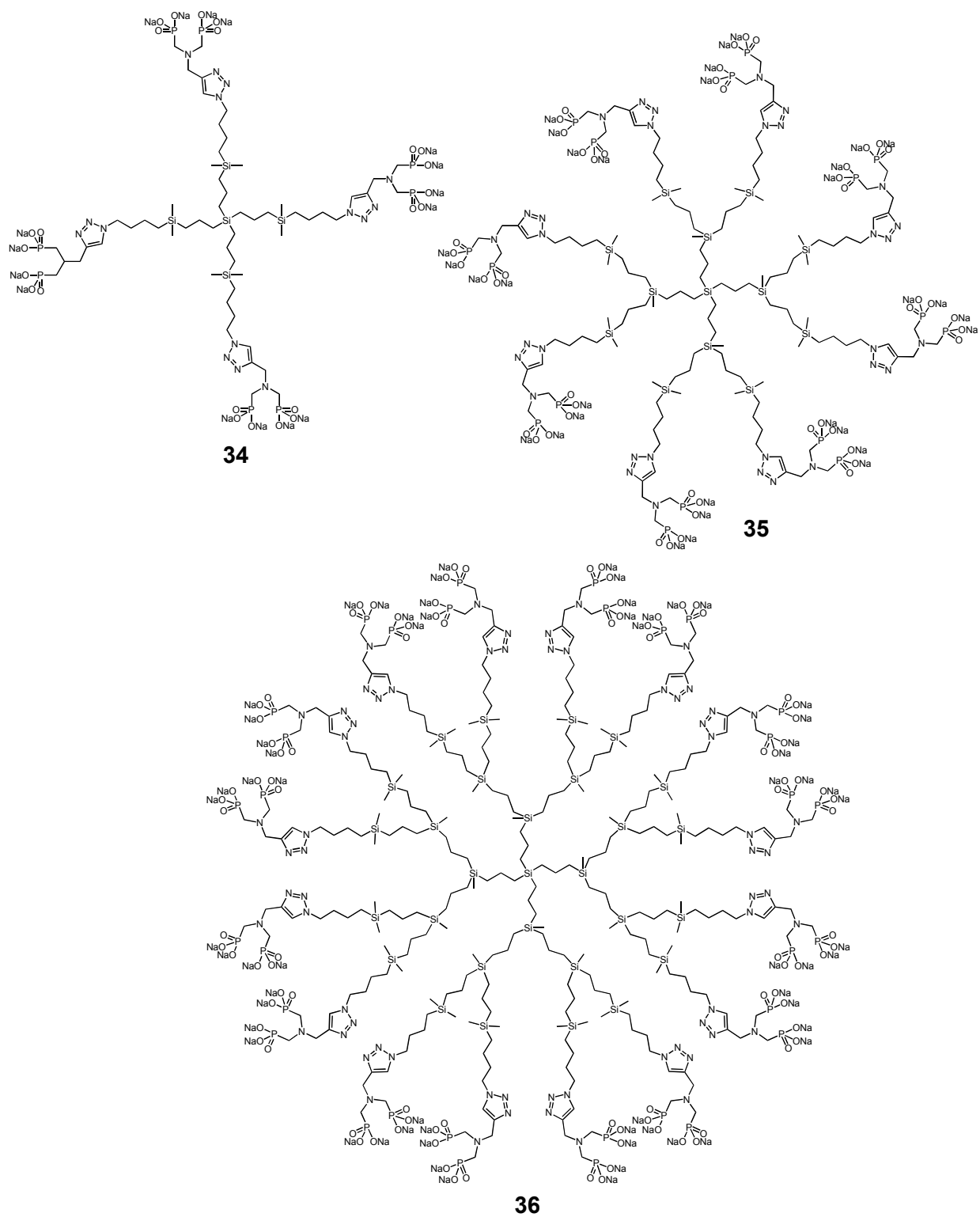
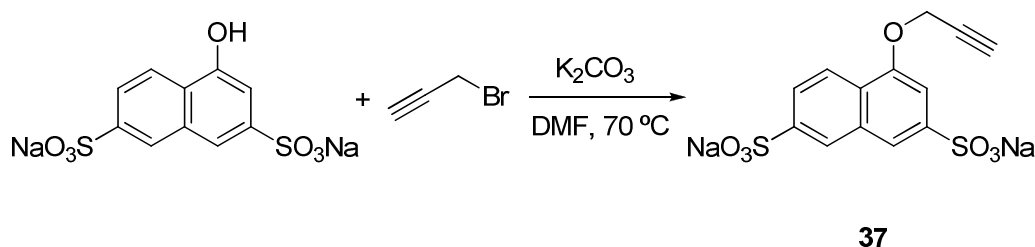


Figura IV.10. Dendrimeros carbosilano terminados en grupos fosfonato sintetizados mediante “click chemistry”.

4.2.3 SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS CON GRUPOS NAFTILSULFONATO Y SULFATO TERMINALES

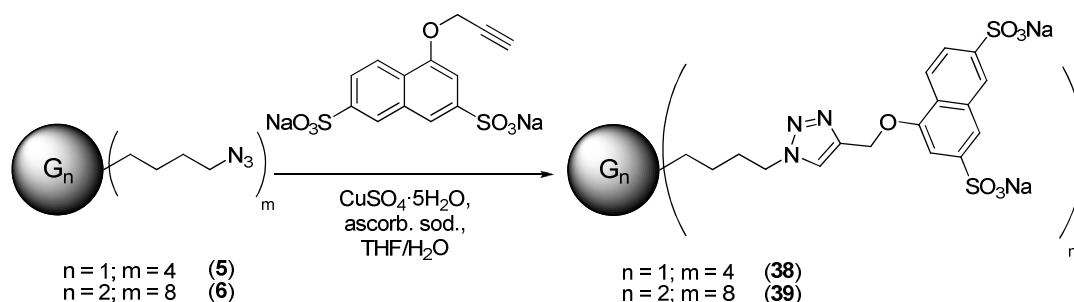
i) Síntesis de dendrimeros terminados en grupos naftalensulfonato

La síntesis de dendrimeros naftalensulfonato parte de la sal disódica del ácido 1-naftol-3,6-disulfónico. Sobre el grupo fenólico libre se realiza una alquilación con bromuro de propargilo en presencia de K_2CO_3 (Esquema IV.15). El compuesto resultante, **37**, se purifica mediante una cromatografía en gel de sílice con MeOH/DCM (3:1) como eluyente.



Esquema IV.15. Síntesis de **37** mediante la propargilación en medio básico de un derivado naftol.

Para funcionalizar la parte externa de los dendrimeros carbosilano se volvió a utilizar la cicloadición entre azidas y alquinos. Sin embargo, debido a la naturaleza aniónica de **37** y la apolaridad de los dendrimeros precursores **5-7** se tuvo que recurrir a condiciones más severas que las hasta ahora ensayadas, ya que las distintas solubilidades de los compuestos de partida dificultan el progreso de la reacción. La preparación de los dendrimeros terminados en grupos naftalensulfonato se llevó a cabo disolviendo un exceso del derivado propargilado **37** en agua y el dendrímtero terminado en azida en THF, ambas disoluciones se mezclan, y se añaden dos disoluciones de ascorbato sódico y sulfato de cobre al 30% y al 15% respectivamente. La mezcla se calienta a 60 °C durante 3 días (Esquema IV.16). La purificación se realiza mediante nanofiltración hasta que por RMN- 1H no se observa el derivado **37**, que ha sido añadido en exceso, obteniéndose los compuestos $G_n[(CH_2)_4(C_2HN_3)CH_2ONaft(SO_3Na)_2]_m$ ($n = 1, m = 4$, (**38**); $n = 2, m = 8$, (**39**)).



Esquema IV.16. Obtención de las especies **38** y **39** mediante una cicloadición de Huisgen.

Las cantidades de catalizador utilizadas en la preparación de los compuestos **38** y **39** se pueden considerar subestequiométricas, pero si la preparación se lleva a cabo en condiciones catalíticas la reacción no progresa o lo hace muy lentamente. A pesar que la mezcla THF/H₂O es miscible en todas las proporciones puede que no sea suficiente para poner en contacto eficazmente a compuestos de partida de polaridad tan diferente como **37** y **5-6** y por ello se requieran condiciones de reacción más severas.

El compuesto de tercera generación no puede sintetizarse utilizando estas condiciones de reacción y requiere de condiciones más enérgicas que implican calentar a 120 °C durante diez días y añadir una mayor cantidad de catalizador. Sin embargo, después de las etapas de purificación de este compuesto se observan señales en los espectros de RMN no identificables. Además, también se aprecia que el sólido resultante tiene un color marrón verdoso que puede ser indicativo de que hayan quedado atrapados átomos de cobre en la estructura dendrítica que no pueden ser eliminados por lo que se decidió no incluirlo en estudios posteriores.

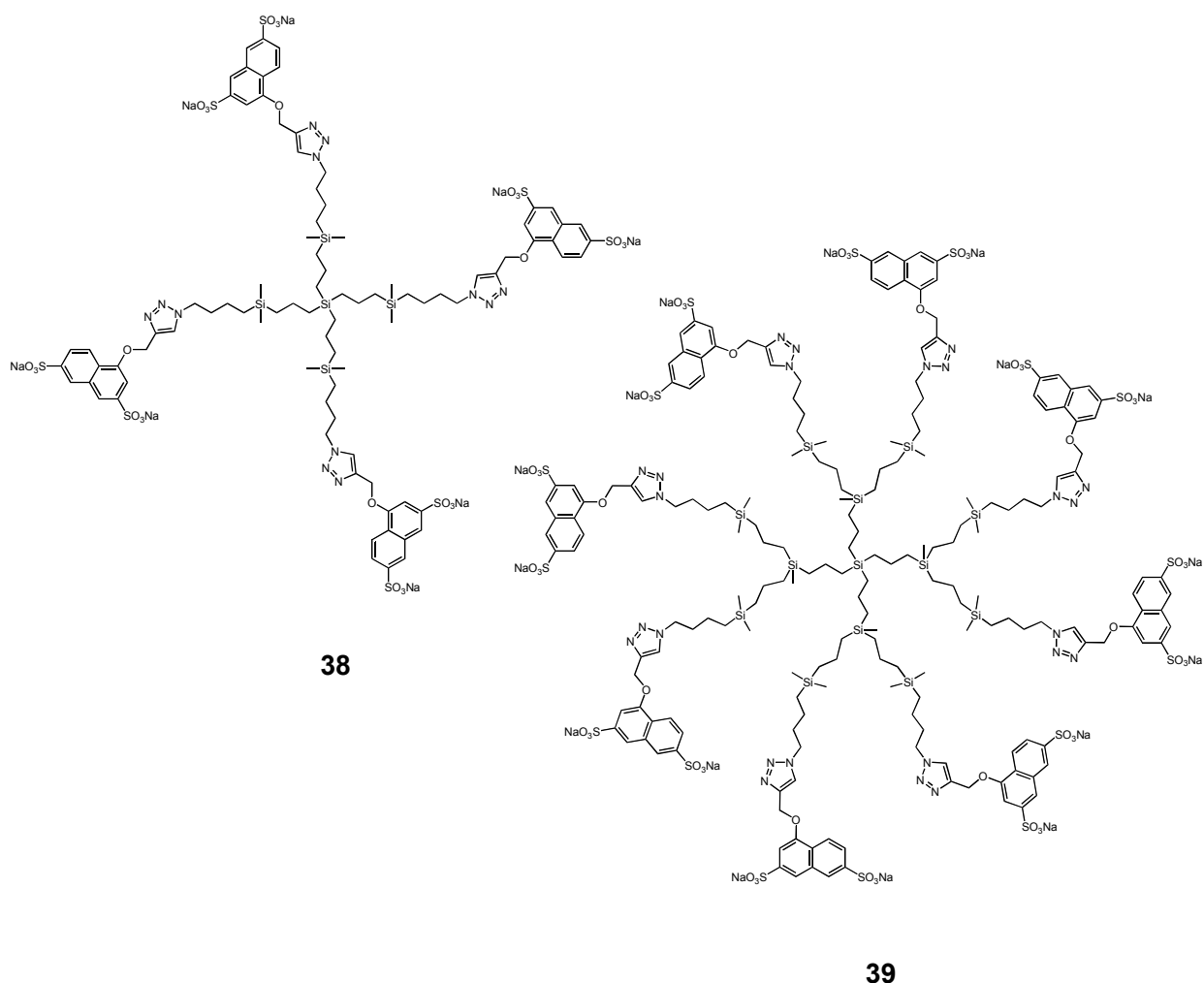
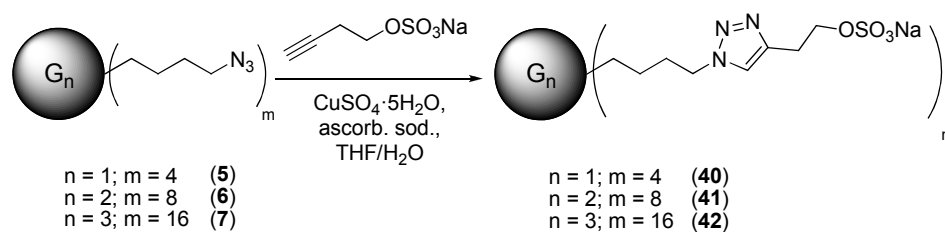


Figura IV.11. Dendrímeros carbosilano terminados en grupos naftalensulfonato sintetizados mediante “click chemistry”.

ii) Síntesis de dendrímeros terminados en grupos sulfato

Para la preparación de dendrímeros decorados con grupos sulfato en la periferia se recurrió a un derivado alquino sintetizado por Fernández-Megía y colaboradores.²⁴ La cicloadición entre el 3-buten-1-sulfato sódico y los dendrímeros **5-7** terminados en grupos azida se llevó a cabo utilizando la misma metodología que se ha expuesto en la síntesis de **38-39**. Esta metodología es necesaria debido a que la naturaleza aniónica hace que la solubilidad del fragmento sulfato se asemeje en mayor medida al derivado **37**, en vez de a otros fragmentos neutros sobre los que se ha llevado a cabo la cicloadición entre azidas y alquinos contemplados en esta memoria. Así, utilizando las mismas condiciones de reacción que para la síntesis de los dendrímeros **38** y **39** se obtienen los compuestos

$G_n[(CH_2)_4(C_2HN_3)(CH_2)_2OSO_3Na]_m$ ($n = 1, m = 4$, **(40)**; $n = 2, m = 8$, **(41)**; $n = 3, m = 16$, **(42)**) (Esquema IV.17).



Esquema IV.17. Cicloadición 1,3 de Huisgen catalizada por cobre que conduce a los derivados **40-42**.

En el caso de esta familia de dendrímeros sí se pudo obtener el compuesto de tercera generación en las mismas condiciones de reacción que los derivados de primera y segunda generación.

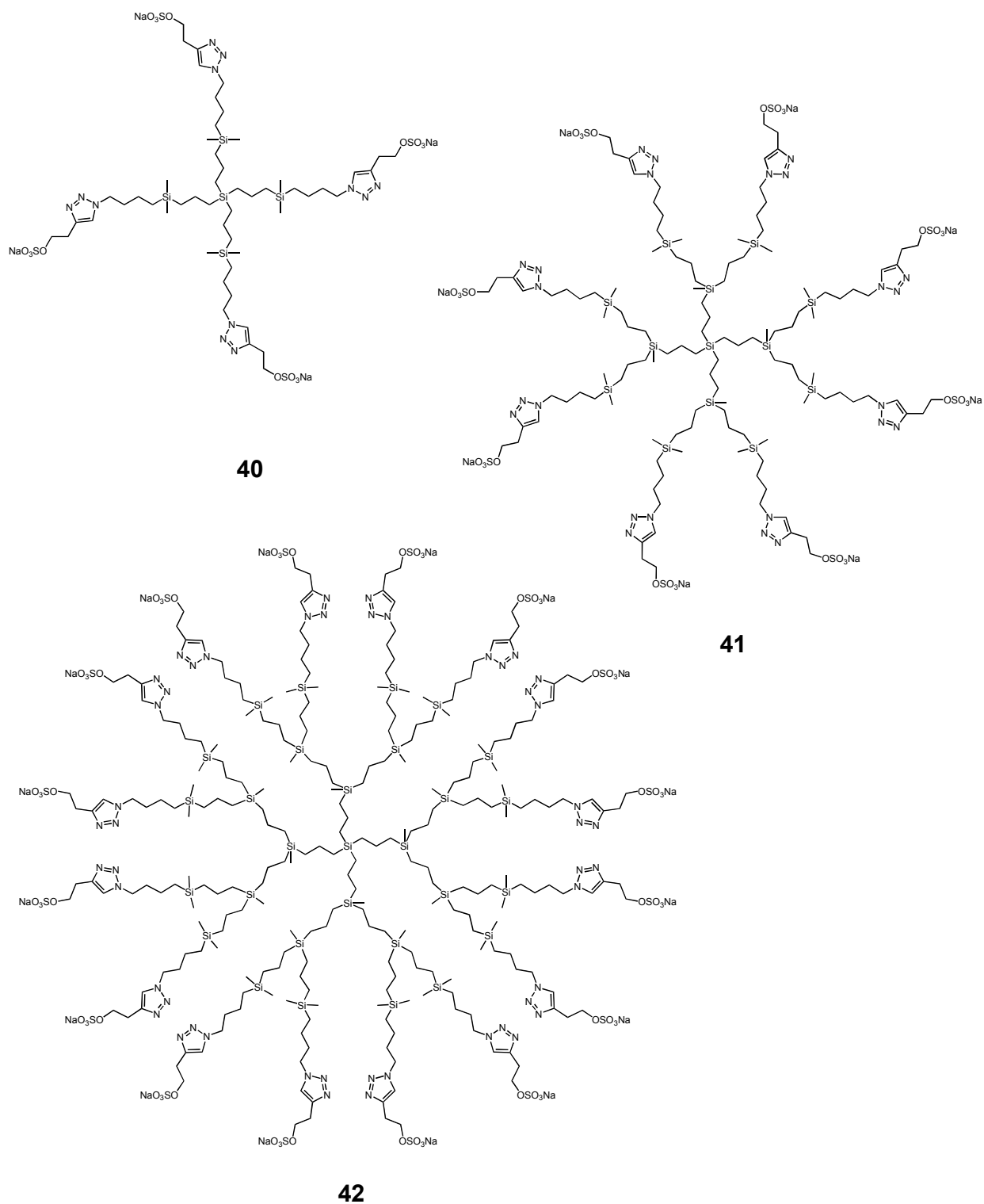


Figura IV.12. Dendrimeros carbosilano terminados en grupos naftalensulfonato sintetizados mediante “click chemistry”.

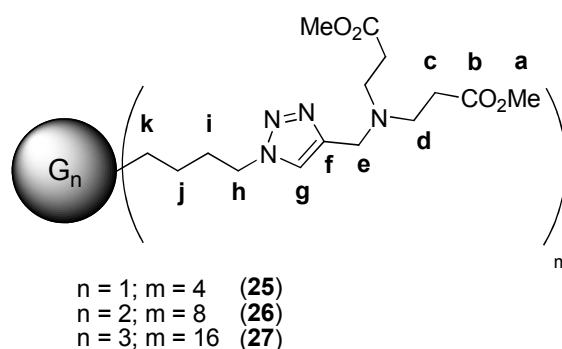
4.3 ESTUDIO ESTRUCTURAL

Los dendrímeros sintetizados en este capítulo han sido caracterizados mediante análisis elemental de C, H, N y espectroscopía de RMN de ^1H y ^{13}C . En todo este apartado se muestran los espectros de segunda generación como ejemplo representativo de la familia de dendrímeros. Además, se ha completado la caracterización mediante el uso de espectroscopía de RMN- ^{29}Si y RMN- ^{31}P cuando fue necesario, los datos completos de estos espectros se muestran en la parte experimental de esta memoria, tal y como se indicó en el capítulo 2, así como los datos obtenidos mediante espectrometría MALDI-TOF.

4.3.1 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE DENDRÍMEROS CON GRUPOS CARBOXILATO EN LA PERIFERIA

En esta sección se describen los espectros de primera, segunda y tercera generación de los dendrímeros **25-27** terminados en grupos éster y los dendrímeros **28-30** acabados en sales sódicas de ácidos carboxílicos.

Caracterización $G_n[(\text{CH}_2)_4(\text{C}_2\text{HN}_3)\text{CH}_2\text{N}((\text{CH}_2)_2\text{COOMe})_2]_m$ (25-27)



	ASIGNACIÓN	25	26	27
RMN- ^1H CDCl $_3$	NCHCN	7.42	7.41	7.42
	SiCH $_2$ CHCH $_2$ CH $_2$ N	4.31	4.28	4.29
	CCH $_2$ N	3.78	3.74	3.76
	CO $_2$ CH $_3$	3.64	3.60	3.61
	NCH $_2$ CH $_2$ CO $_2$ CH $_3$	2.78	2.74	2.76
	NCH $_2$ CH $_2$ CO $_2$ CH $_3$	2.47	2.44	2.46

	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	1.86	1.87	1.88
	SiCH ₂ CH ₂	1.27	1.25	1.26
	SiCH ₂	0.52	0.50	0.50
	Si(CH ₃) ₂ y Si(CH ₃)	-0.08	-0.11	-0.10
RMN- ¹³ C CDCl ₃	CO ₂ CH ₃	172.8	172.7	172.7
	NCHCN	144.6	144.5	144.4
	NCHCN	122.2	122.2	122.2
	CO ₂ CH ₃	51.5	51.5	51.5
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	49.9	49.8	49.9
	NCH ₂ CH ₂ CO ₂ CH ₃	48.9	48.8	48.9
	CCH ₂ N	48.6	48.5	48.6
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	34.0	34.0	34.0
	NCH ₂ CH ₂ CO ₂ CH ₃	32.6	32.5	32.6
	SiCH ₂ CH ₂ y SiCH ₂	21.0 -14.9	20.9 -14.8	21.0 -14.9
	Si(CH ₃) ₂	-3.4	-3.5	-3.4
	SiCH ₃	-	-5.1	-4.9

Tabla IV.1. Datos de RMN-¹H y ¹³C de los derivados **25-27** en CDCl₃.

En el espectro de RMN-¹H se refleja la formación del anillo de triazol con el singlete característico, **g**, en torno a 7.42 ppm. Las siguientes señales en el espectro son aquellas que sufren un desapantallamiento debido a la proximidad del anillo de triazol, en torno a 4.30 ppm el triplete correspondiente a la señal nombrada como **h**, debido a que es la única señal que puede ser triplete e integrar para dos protones, y la señal en torno a 3.75 ppm se asigna a **e** debido a que integra para dos protones y es un singlete, ya que ese metileno no puede acoplarse a ningún protón de alrededor. El singlete que integra para seis protones por rama, **a**, se sitúa en torno a 3.60 ppm. Los grupos metilénicos **c** y **d** se asignan tentativamente atendiendo a su entorno químico. Así, el metileno más próximo al átomo de nitrógeno, **d**, se observa a campo más alto, asignándose como el triplete a 2.75 ppm. El grupo carboxilato posee un menor efecto desapantallante haciendo que la señal **c**, se sitúe a campo más bajo, concretamente a 2.45 ppm. El resto de las señales corresponden al esqueleto carbosilano y se asignan siguiendo el mismo patrón que en el resto de esta memoria (Figura IV.13).

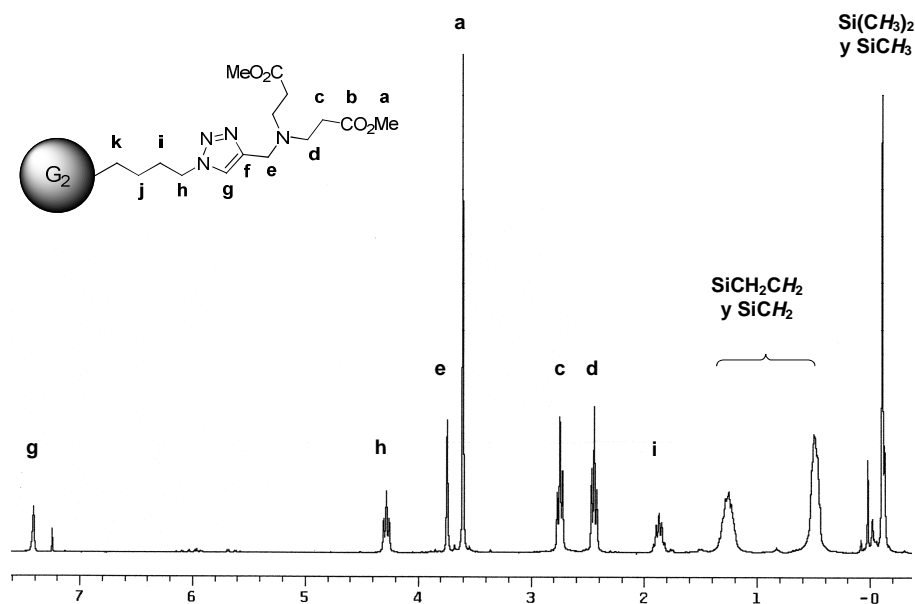


Figura IV.13. Espectro de RMN-¹H del compuesto **26** en CDCl₃.

En el RMN-¹³C (Figura IV.14) se adjudican las señales **b**, **f** y **g** con facilidad atendiendo a su entorno químico. Así, **b** aparece en la zona de los compuestos carbonílicos en torno a 172.7 ppm, mientras que **f** y **g** se muestran en la zona de carbonos aromáticos, en torno a 144.5 y 122.0 ppm respectivamente.

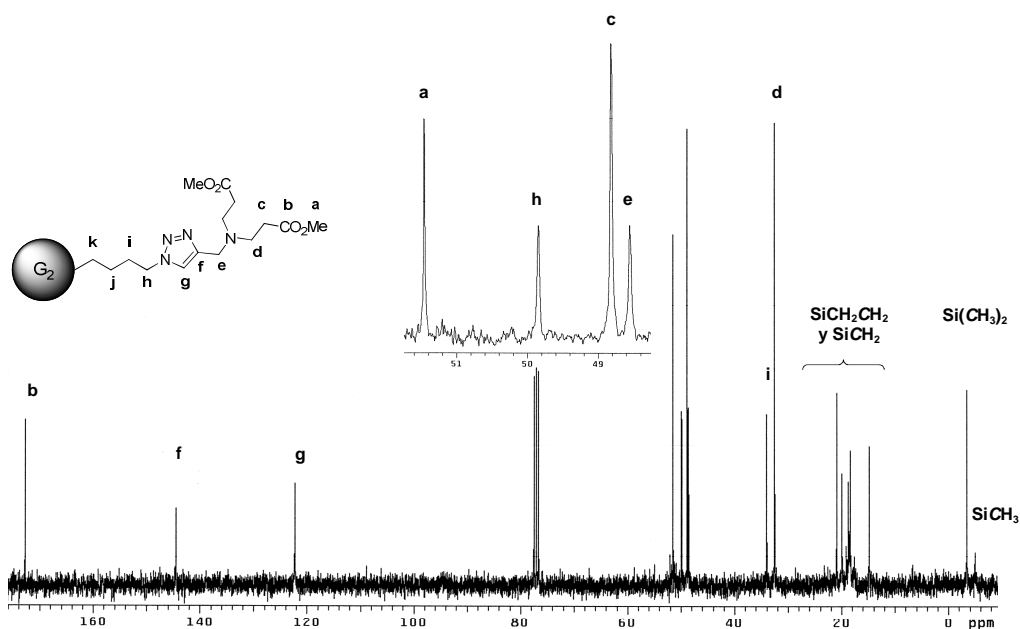


Figura IV.14. Espectro de RMN-¹³C del compuesto **26** en CDCl₃.

Para asignar los siguientes carbonos hubo que recurrir a un experimento gHSQC $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ (Figura IV.15). Éste, como se ha mencionado en capítulos anteriores, muestra la conectividad directa entre carbonos y protones a un sólo enlace. De este modo se observa que la señal **a**, situada a 3.64 ppm en RMN- ^1H , posee un pico cruzado con la señal de carbono a 51.5 ppm. Los carbonos **d**, **e** y **h** poseen un entorno químico similar al estar unidos directamente a átomos de nitrógeno, localizándose sus señales en un margen muy estrecho de ppm. En el espectro de gHSQC $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ se observa que la señal en torno a 4.30 ppm posee interacción con la señal en torno a 49.9 ppm formando un pico cruzado, lo que permite asignar a esta señal como **h**. La señal **d** se asigna atendiendo al pico cruzado entre el triplete en torno a 2.76 ppm, previamente asignado en RMN- ^1H y la señal en torno a 48.9 ppm. A igual que en las señales anteriores se observa un pico cruzado entre el singlete a 3.76 ppm en RMN- ^1H y la señal a 48.6 ppm en RMN- ^{13}C , lo que permite asignarla como **e**. Por último, el multiplete situado a 2.47 ppm, **c**, se correlaciona con el carbono en torno a 32.6 ppm.

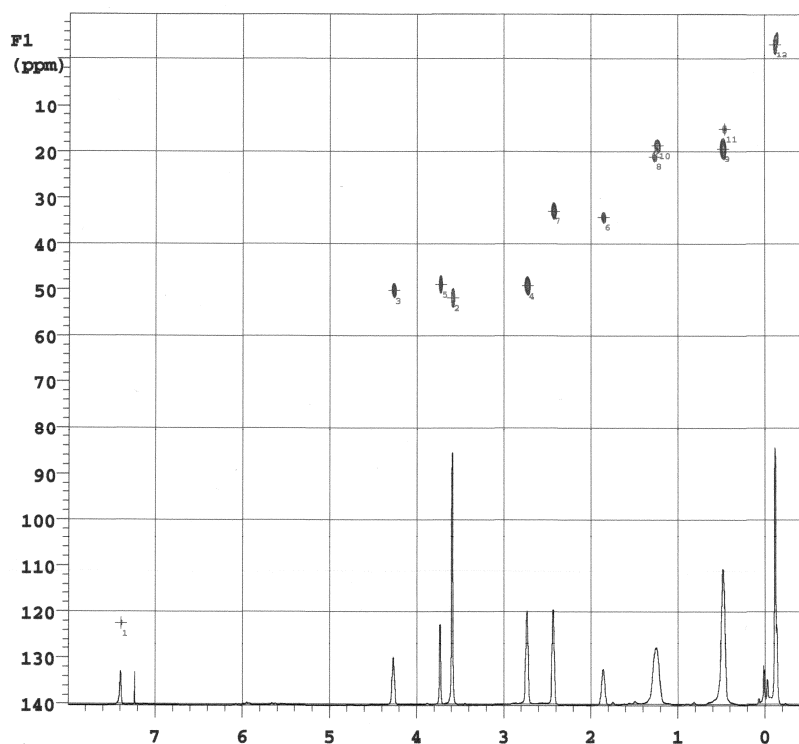
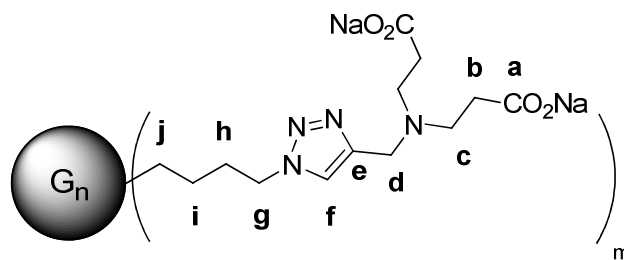


Figura IV.15. Espectro de correlación gHSQC $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ de **26**.

Caracterización $G_n[(CH_2)_4(C_2HN_3)CH_2N((CH_2)_2COONa)_2]_m$ (28-30)


$$n = 1; m = 4 \quad (28)$$

$$n = 2; m = 8 \quad (29)$$

$$n = 3; m = 16 \quad (30)$$

	ASIGNACIÓN	28	29	30
RMN- ¹ H D ₂ O	NCHCN	7.78	7.79	7.79
	SiCH ₂ CHCH ₂ CH ₂ N	4.19	4.19	4.19
	CCH ₂ N	3.56	3.55	3.55
	NCH ₂ CH ₂ CO ₂ Na	2.52	2.52	2.51
	NCH ₂ CH ₂ CO ₂ Na	2.20	2.20	2.18
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	1.68	1.68	1.68
	SiCH ₂ CH ₂	1.10	1.14	1.13
	SiCH ₂	0.31	0.35	0.36
	Si(CH ₃) ₂ y Si(CH ₃)	-0.3	-0.25	-0.24
RMN- ¹³ C D ₂ O	CO ₂ Na	180.8	180.8	180.8
	NCHCN	142.3	142.4	142.3
	NCHCN	124.8	124.8	124.8
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	49.9	49.9	49.8
	NCH ₂ CH ₂ CO ₂ Na	49.2	49.2	49.2
	CCH ₂ N	46.9	47.0	46.9
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	34.4	34.4	34.3
	NCH ₂ CH ₂ CO ₂ Na	33.4	33.6	33.4
	SiCH ₂ CH ₂ y SiCH ₂	20.5-14.2	20.6-14.4	20.4-14.2
	Si(CH ₃) ₂	-3.5	-3.4	-3.5
	SiCH ₃	-	-5.1	-5.1

 Tabla IV.2. Datos de RMN-¹H y ¹³C de los productos **28-30** en D₂O.

El espectro de RMN-¹H de **28-30** se caracteriza fundamentalmente por la desaparición de la señal relativa al grupo metilo del carboxilato, si se compara con sus precursores neutros **25-27**, tras la reacción de hidrólisis. Hay que destacar también

que en comparación con los derivados **25-27**, se observa un apantallamiento generalizado de las señales, debido a la presencia de cargas negativas en la superficie de los dendrímeros, aunque este desplazamiento es moderado. A pesar de que estos derivados son aniónicos y es necesario utilizar disolventes polares para llevar a cabo los espectros de resonancia, el hecho de que las señales apenas ven alteradas su posición permite realizar la asignación con facilidad utilizando como modelo los compuestos neutros **25-27** (Figura IV.16).

La presencia del singlete centrado en 7.79 ppm indica la presencia del anillo de triazol, señal **f**. Además, la presencia de dos señales localizadas a 2.52 y 2.20 ppm que integran para cuatro protones cada una, indica la presencia de los metilenos **b** y **c**. El resto de señales de la estructura aparecen a los desplazamientos químicos esperados.

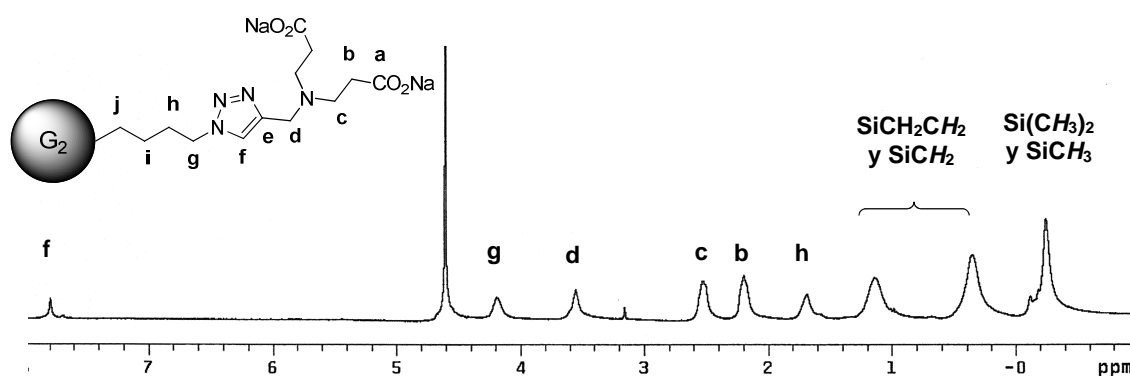


Figura IV.16. Espectro de RMN- ^1H del compuesto **29** en CDCl_3 .

En cuanto al espectro de RMN- ^{13}C (Figura IV.17), la señal centrada en 180.8 ppm indica la presencia de los átomos de carbono carbonílicos de la estructura, **a**. Las señales aromáticas del anillo de triazol se observan a 142.3 ppm el átomo de carbono cuaternario **e** y a 124.8 ppm el átomo de carbono **f**.

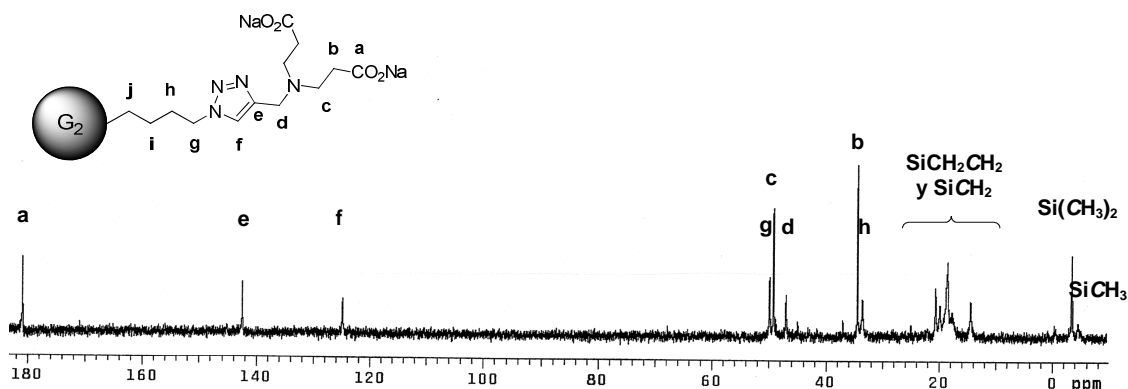


Figura IV.17. Espectro de RMN- ^{13}C de **29**.

El resto de átomos de carbono se asignan basándose en un espectro de correlación gHSQC $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$, y utilizando las tablas de elucidación estructural (Figura IV.18).³² Una vez conocida la asignación del espectro de RMN- ^1H , las correlaciones con las señales obtenidas del espectro bidimensional permiten observar a que átomo de carbono están unidos directamente esos protones. Comparando con el espectro del precursor **26** se observa un apantallamiento de la señal más cercana a la carga negativa, además de la desaparición de la señal relativa a los metilos del grupo éster.

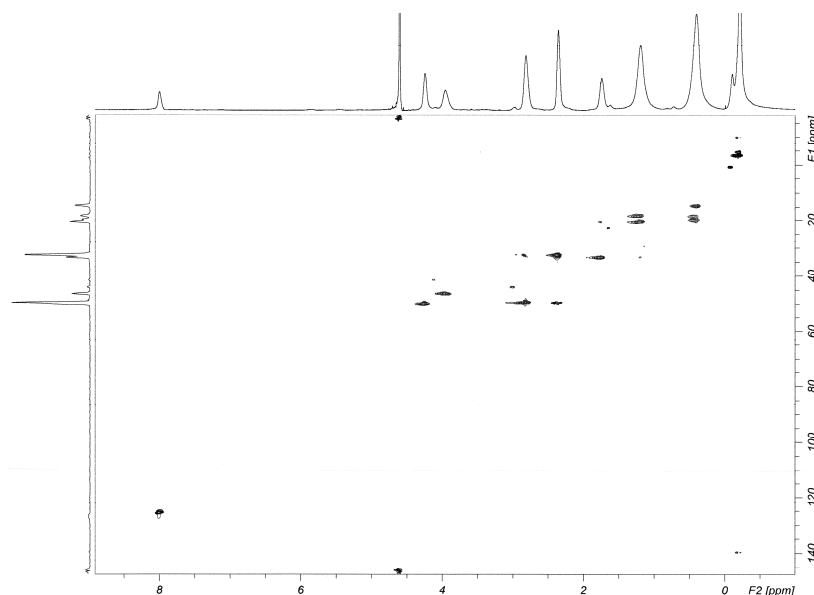
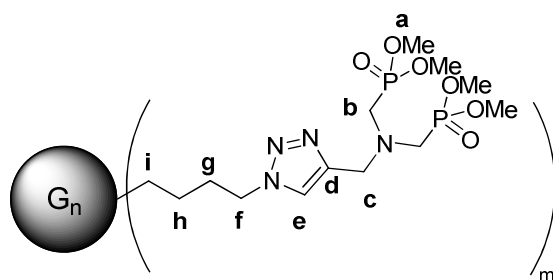


Figura IV.18. Espectro gHSQC $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ de **29**.

4.3.2 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE DENDRÍMEROS CON GRUPOS FOSFONATO EN LA PERIFERIA

En esta parte se describen los espectros de los dendrímeros **31-33** de primera, segunda y tercera generación terminados en grupos fosfonato y las sales sódicas de los ácidos fosfónicos **34-36**.

Caracterización de $G_n[(CH_2)_4(C_2HN_3)CH_2N((CH_2)_2N(CH_2P(O)(OMe)_2)_2)_m]$ (**31-33**)



$$\begin{aligned} n = 1; m = 4 & \quad (\mathbf{31}) \\ n = 2; m = 8 & \quad (\mathbf{32}) \\ n = 3; m = 16 & \quad (\mathbf{33}) \end{aligned}$$

	ASIGNACIÓN	31	32	33
RMN- ¹ H CDCl ₃	NCHCN	7.58	7.57	7.61
	SiCH ₂ CHCH ₂ CH ₂ N	4.28	4.25	4.32
	CCH ₂ N	4.09	4.06	4.13
	POCH ₃	3.72	3.69	3.76
	NCH ₂ P	3.12	3.09	3.15
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	1.81	1.83	1.89
	SiCH ₂ CH ₂	1.22	1.24	1.28
	SiCH ₂	0.48	0.46	0.51
	Si(CH ₃) ₂ y Si(CH ₃)	-0.12	-0.14	-0.08
RMN- ¹³ C CDCl ₃	NCHCN	143.1	143.0	142.8
	NCHCN	123.3	123.2	123.1
	POCH ₃	52.8	52.7	52.6
	CCH ₂ N	51.2	51.1	52.0
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	50.0	49.9	49.8
	NCH ₂ P	49.0	49.0	47.7
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	34.0	34.0	33.9
	SiCH ₂ CH ₂ y SiCH ₂	21.1-14.9	20.9-14.9	20.8-14.7

	Si(CH ₃) ₂	-3.5	-3.4	-3.6
	SiCH ₃	-	-5.0	-5.2

Tabla IV.3. Datos de RMN-¹H y ¹³C de los productos **31-33** en CDCl₃.

La asignación del espectro RMN-¹H se realiza fundamentalmente observando las multiplicidades de las señales y sus integrales. Así, el singlete que integra para dos protones se identifica **c**. La señal característica, que se ha venido detallando en toda esta memoria, de los metilenos en α al anillo de triazol, se observa esta vez en torno a 4.28 ppm, y se asigna a **f**. En el espectro también se observan dos dobletes relativos a acoplamiento ¹H-³¹P. Las distintas integrales de los dobletes, para doce y dos protones respectivamente, permite asignar la señal en torno a 3.72 ppm a los grupos metóxido, **a**, y aquella a 3.12 ppm con **b**. El resto de la estructura sigue el mismo patrón que se ha venido describiendo a lo largo de esta memoria con ligeros desplazamientos en las señales. (Figura IV.19).

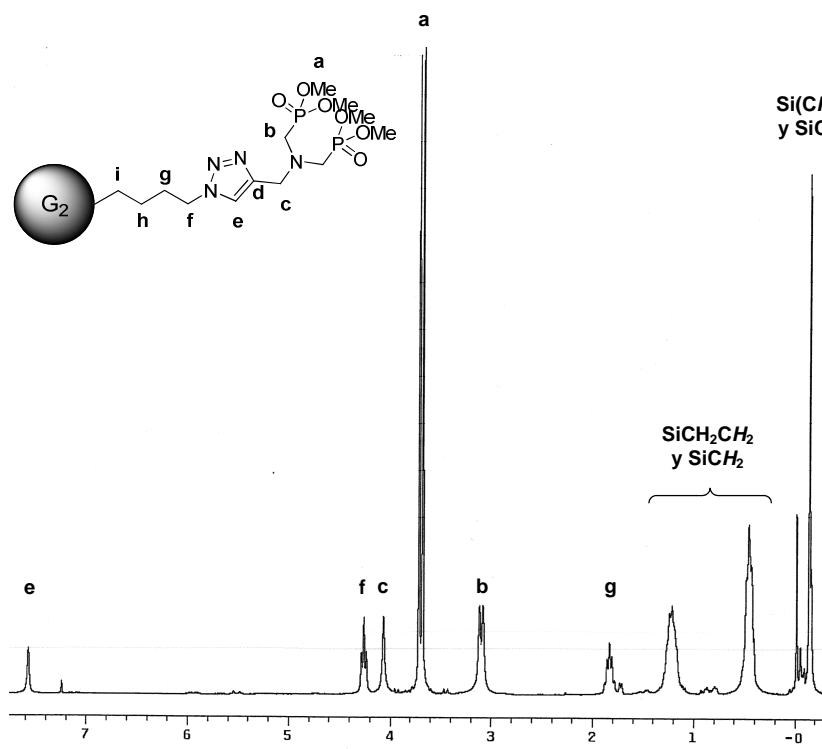


Figura IV.19. Espectro de RMN-¹H del compuesto **31**.

En cuanto al espectro de RMN- ^{13}C las señales del triazol se sitúan en torno a 143.0 ppm para el átomo de carbono cuaternario **e** y 123.2 ppm la señal nombrada **d**. A continuación, el espectro muestra varios multipletes que surgen debido al acoplamiento de los átomos de carbono con los átomos de fósforo cercanos. Así, se observa un doblete que surge por acoplamiento de los grupos metilo **a** con el átomo de fósforo contiguo, seguida de un triplete centrado en torno a 51.1 ppm, que se identifica con el átomo de carbono metilénico **c**, que surge por acoplamiento con ambos átomos de fósforo. Además, se observa un doblete de dobletes debido al acoplamiento inequivalente entre los átomos de carbono **b** con ambos átomos de fósforo en un sistema de espín AXX' alrededor de 50.0 ppm. Entre el doblete de dobletes, mencionado previamente, se sitúa la señal correspondiente al átomo de carbono metilénico **f** a 49.0 ppm. El resto de las señales corresponden al esqueleto dendrítico (Figura IV.20).

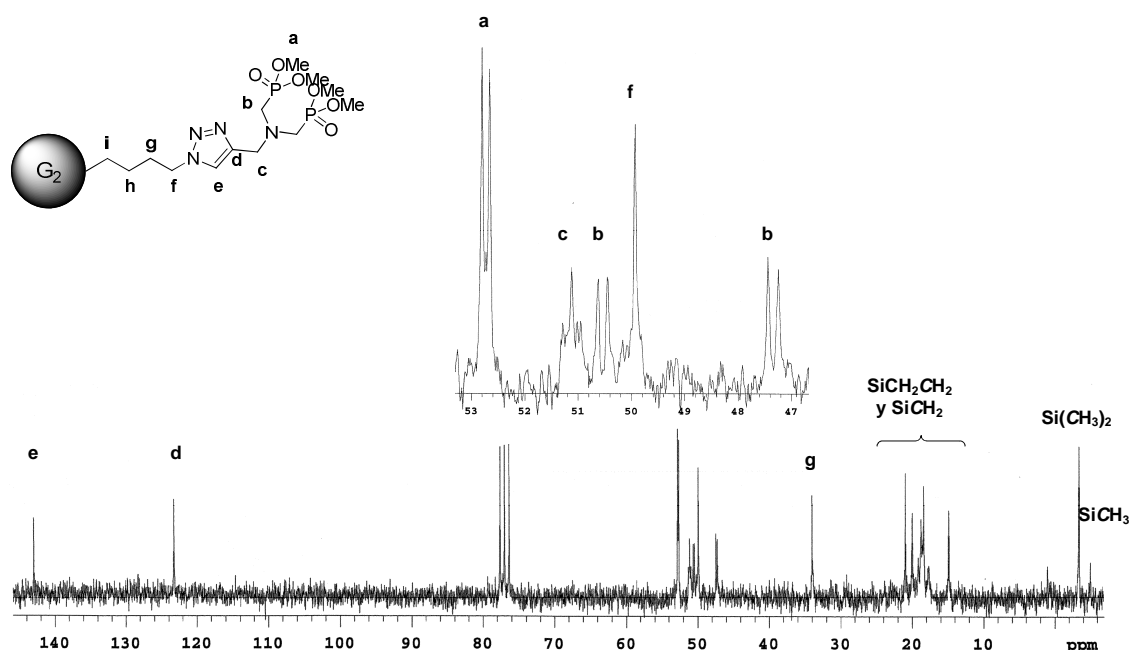


Figura IV.20. Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto **31**.

Hay que mencionar que en el espectro de RMN- ^{13}C de tercera generación no se puede calcular con exactitud el desplazamiento del doblete de dobletes correspondiente a los átomos de carbono **b** debido a que el ensanchamiento típico de las señales de los dendrímeros de alta generación hace que la señal correspondiente a **f** solape con la señal más desapantallada del doblete de dobletes.

Para reforzar la asignación del RMN- ^{13}C realizada observando las multiplicidades del espectro, se llevó a cabo un experimento gHSQC $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$. Los datos obtenidos son similares a los publicados por Majoral y colaboradores en los dendrímeros sintetizados en su grupo de investigación (Figura IV.21).^{15,17}

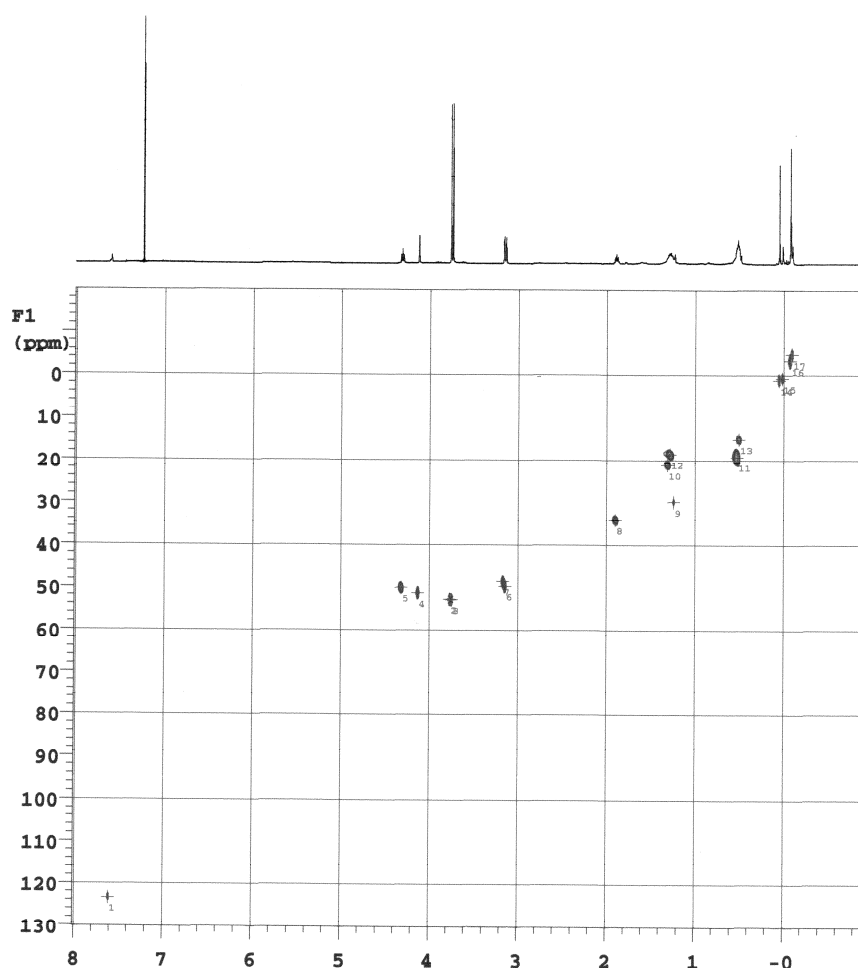
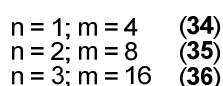
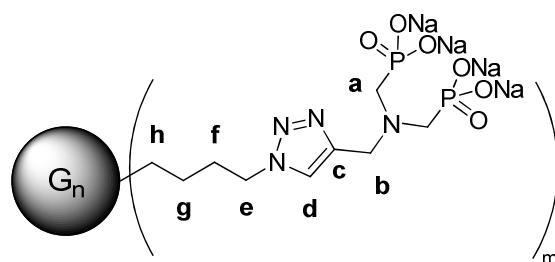


Figura IV.21. Espectro de gHSQC $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ del compuesto **31**.

Por último, la formación de los derivados **31-33** se siguió mediante experimentos de RMN- ^{31}P . La señal de fósforo de los derivados dendríticos **31-33** se observa a 27.0 ppm, mientras que el precursor alquino, con el cual se lleva a cabo la cicloadición de Huisgen, aparece a un desplazamiento de 25.9 ppm.¹⁷

Caracterización de $G_n[(CH_2)_4(C_2HN_3)CH_2N((CH_2)_2N(CH_2P(O)(ONa)_2)_2)]_m$ (34-36)



	ASIGNACIÓN	34	35	36
RMN- ¹ H D ₂ O	NCHCN	7.95	7.96	7.98
	CCH ₂ N	4.48	Solapado con H ₂ O	Solapado con H ₂ O
	SiCH ₂ CHCH ₂ CH ₂ N	4.21	4.20	4.21
	NCH ₂ P	3.85	3.86	3.82
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	1.73	1.73	1.70
	SiCH ₂ CH ₂	1.17	1.17	1.17
	SiCH ₂	0.38	0.39	0.37
	Si(CH ₃) ₂ y Si(CH ₃)	-0.27	-0.26	-0.24
RMN- ¹³ C D ₂ O	NCHCN	142.9	143.0	142.8
	NCHCN	125.8	125.2	125.4
	NCH ₂ P	54.1	54.2	54.1
	CCH ₂ N	50.1	Solapado con el metileno e	Solapado con el metileno e
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	50.0	49.8	49.8
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	33.1	33.2	33.0
	SiCH ₂ CH ₂ y SiCH ₂	20.3-14.0	20.3-14.2	20.2-14.0
	Si(CH ₃) ₂	-4.0	-3.6	-3.6
SiCH ₃	-	-5.1	-5.2	

Tabla IV.4. Datos de y RMN-¹³C de los productos **34-36** en D₂O.

Para la asignación de las señales observadas en los espectros de RMN de los compuestos **34-36** se recurrió a los espectros de primera generación, ya que el

ensanchamiento de las señales en los espectros de generaciones superiores impide apreciar la multiplicidad de las señales que es necesaria para una correcta asignación e incluso hace que las señales solapen con el disolvente.

La transformación de las estructuras neutras **31-33**, en las estructuras aniónicas **34-36**, supone la eliminación del fragmento metóxido. Esto se refleja en la desaparición del doblete que integraba para doce protones en las estructuras neutras en el espectro de RMN-¹H. En los dendrímeros aniónicos el singlete característico del anillo de triazol, **d**, se sitúa en torno a 7.97 ppm. La señal **b** aparece como un singlete junto a la señal del agua deuterada mientras que el triplete **e** se localiza en la misma zona en la que se ha estado mostrando a lo largo de esta memoria, en concreto en torno a 4.21 ppm. Alrededor de 2.68 ppm se sitúa un multiplete ancho que integra para cuatro protones por rama, de tal forma que el valor de esta integral, junto a su desplazamiento químico y la multiplicidad, sugieren que se encuentra acoplado con ambos átomos de fósforo, lo que hace que la adjudicación como el grupo metileno **a** sea inequívoca. El resto de valores de las señales se asocian a la estructura dendrímica (Figura IV.22)

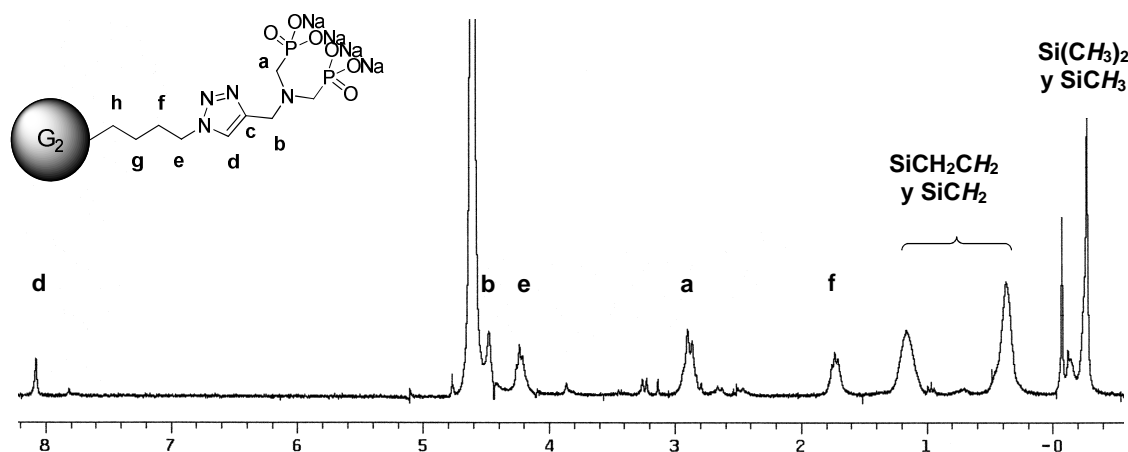


Figura IV.22. Espectro de RMN-¹H del compuesto **34**.

Al igual que en todos los espectros de RMN-¹³C de los derivados triazólicos presentados en esta memoria se observan las señales relativas al anillo de triazol en la zona atribuida a los átomos de carbono aromáticos (ver Figura IV.23). En la asignación del espectro de RMN-¹³C también se tuvo en cuenta la multiplicidad de las señales para la asignación. Así, al igual que en los espectros de los dendrímeros

neutros **31-33**, se puede ver el doblete de dobletes relativo a los carbonos en α a los átomos de fósforo asignado al carbono **a**. Seguidamente, se observan dos señales solapadas, que en la primera generación pueden distinguirse como un triplete centrado en 50.1 ppm asignado a **b** y un singlete en torno a 50.0 ppm que se asigna a **e**. El resto de señales pertenecen al esqueleto dendrítico y se asignan en consecuencia.

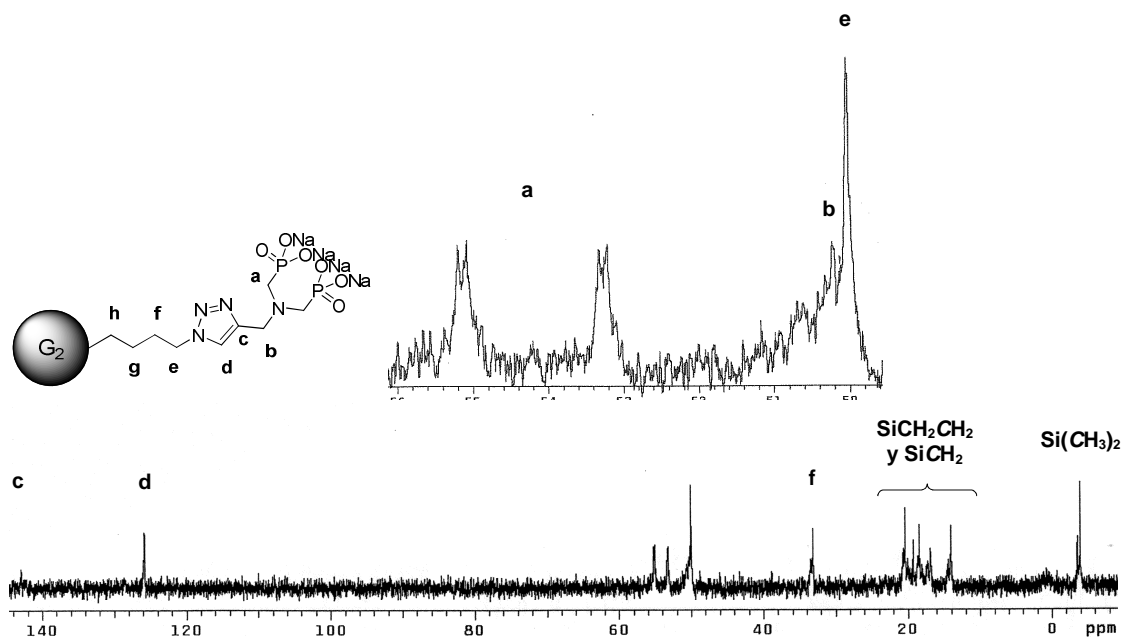


Figura IV.23. Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto **34**.

De nuevo se realizó un experimento gHSQC $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ para corroborar las asignaciones previamente mostradas. El espectro que se muestra es el de la primera generación en el que, por supresión de la señal del agua, se pudo observar la señal del grupo metileno **b** entre el anillo de triazol y el átomo de nitrógeno externo (Figura IV.24).

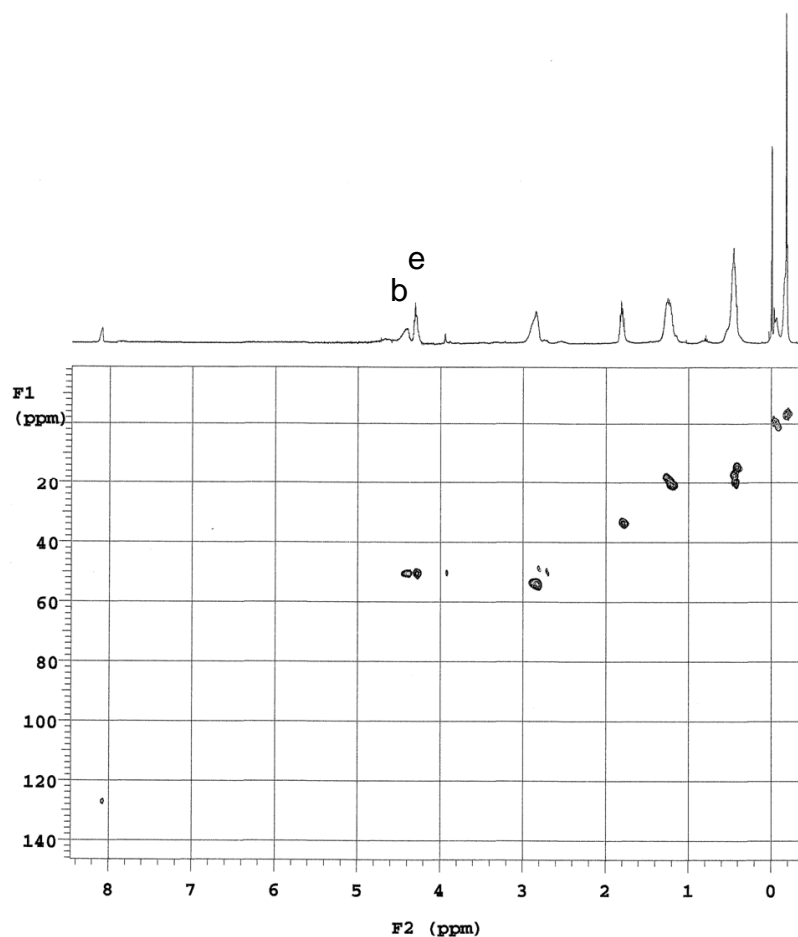
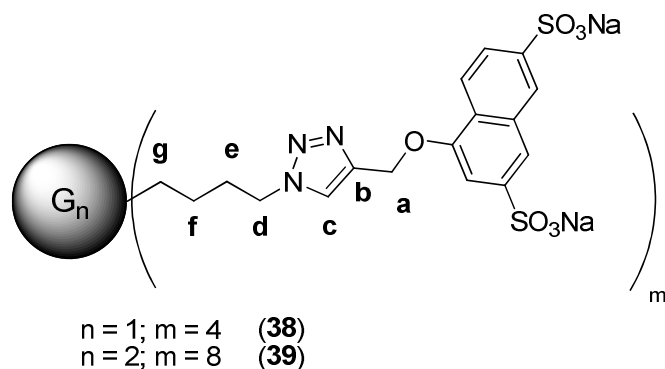


Figura IV.24. Espectro de gHSQC $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ del compuesto **34**.

Estos derivados también se han caracterizado mediante experimentos de RMN- ^{31}P . Como se ha comentado en el epígrafe anterior, los desplazamientos de las señales de fósforo de los derivados **31-33** se sitúan en torno a 27.0 ppm. Sin embargo, una vez que se transforman en las sales sódicas la señal sufre un desplazamiento a frecuencias más bajas debido a la carga negativa que soportan, desplazándose hasta 8.8 ppm aproximadamente.

4.3.3 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE DENDRÍMEROS CON GRUPOS NAFTALENSULFONATO EN LA PERIFERIA

En esta sección se describen los espectros de los dendrímeros terminados en grupos naftalensulfonato **38** y **39** de primera y segunda generación.

Caracterización de $G_n[(CH_2)_4(C_2HN_3)CH_2ONaft(SO_3Na)_2]_m$ (**38** y **39**)

	ASIGNACIÓN	38	39
RMN- ¹ H DMSO-d ₆	<i>H_{ar}</i>	8.32, 8.06, 8.01, 7.74, 7.69, 7.32	8.37, 8.08, 8.01, 7.76, 7.70, 7.33
	CCH ₂ O	5.29	5.30
	SiCH ₂ CHCH ₂ CH ₂ N	4.38	4.38
	SiCH ₂ CHCH ₂ CH ₂ N	1.86	1.83
	SiCH ₂ CH ₂	1.30	1.29
	SiCH ₂	0.54	0.53
	Si(CH ₃) ₂ y Si(CH ₃)	-0.07	-0.08
RMN- ¹³ C DMSO-d ₆	<i>C_{ar}</i>	152.7, 146.0, 145.8, 131.5, 124.0, 123.4, 120.8, 116.8, 103.5	152.7, 145.7, 131.8, 124.0, 123.4, 120.8, 116.8, 103.4
	CCH ₂ O	61.4	61.4
	SiCH ₂ CHCH ₂ CH ₂ N	48.7	48.7
	SiCH ₂ CHCH ₂ CH ₂ N	33.1	33.1
	SiCH ₂ CH ₂ y SiCH ₂	20.0-13.8	19.9-13.8
	Si(CH ₃) ₂	-3.8	-3.8
	SiCH ₃	-	No se observa

Tabla IV.5. Datos de RMN-¹H y ¹³C de los productos **38** y **39** en DMSO-d₆.

En los espectros de RMN-¹H se observa una gran cantidad de señales aromáticas que hace difícil distinguir el protón del grupo triazol **c**, aunque su asignación se puede inferir mediante experimentos gHMBC {¹H-¹³C} y gHSQC {¹H-¹³C}, como se explicará posteriormente, distinguiéndose que éste es la señal que se encuentra a mayor desplazamiento químico en el espectro, en torno a 8.35 ppm. La

señal en torno 5.30 ppm se adjudica al grupo metileno **a**, que se encuentra entre el triazol y el anillo de naftalénico, mientras que la señal a 4.38 ppm se identifica con **d**, unido directamente al triazol, debido a que se expresa como un triplete ancho. Las señales en torno a 1.86 ppm se identifican como **e**. El resto de señales son relativas al esqueleto carbosilano y a la cadena que une el anillo de triazol y el átomo de silicio más externo (Figura IV.25).

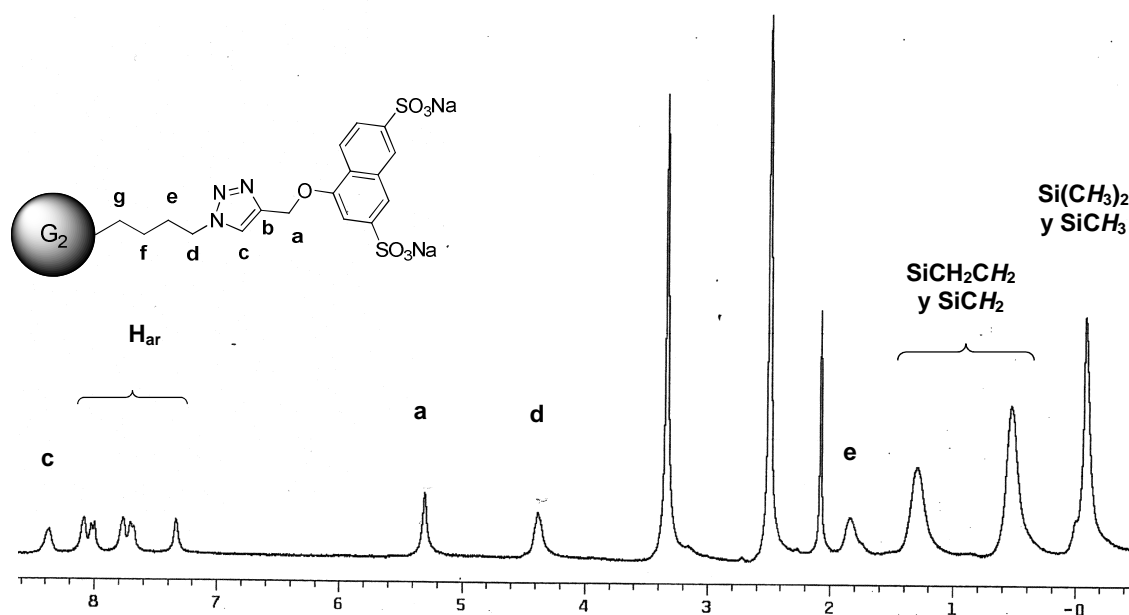


Figura IV.25. Espectro de RMN-¹H del compuesto **39**.

En cuanto al RMN-¹³C también pueden apreciarse un gran número de señales aromáticas. Sin embargo, debido a que la estructura posee seis átomos de carbono cuaternarios no todas pueden distinguirse con facilidad. Además, en el espectro de segunda generación, en torno a 146.0 ppm, tan sólo puede apreciarse una señal a causa del ensanchamiento generalizado de las señales provocado por su naturaleza aniónica, mientras que en el de primera generación se observan dos señales. A pesar de la complejidad de la zona aromática de estos compuestos, mediante experimentos gHMBC {¹H-¹³C} y gHSQC {¹H-¹³C} se puede determinar qué señales corresponden a las del grupo triazol. La asignación de estas señales se comentará más adelante. Así, se nombra **c** la señal a 124.0 ppm, además el átomo de carbono situado a 145.8 ppm se identifica como **b**. El resto de señales se asignan fácilmente, en torno a 64.1 ppm se sitúa el átomo de carbono situado entre el anillo de triazol y el átomo de oxígeno, **a** en la figura. En torno a 48.7 ppm se observa la señal del átomo de carbono, **d**,

contigua al anillo de triazol. A 33.1 ppm se sitúa el átomo de carbono en β al heterociclo, **e**. El resto de señales aparecen agrupadas entre 20.3 y 13.8 ppm y pertenecen al esqueleto dendrítico (Figura IV.26).

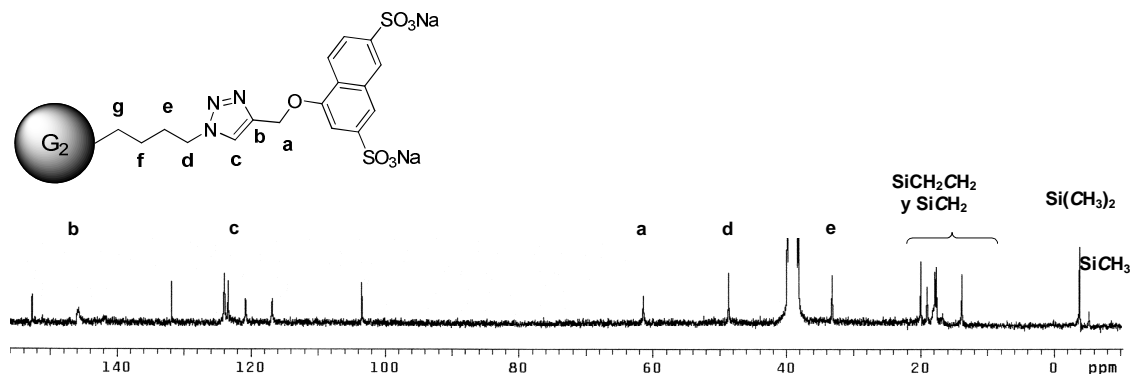


Figura IV.26. Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto **38**.

Las asignaciones tanto de protones como de átomos de carbono fueron realizadas atendiendo a los espectros de gHSQC $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ (Figura IV.27) como gHMBC $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ (Figura IV.28). En este último espectro se aprecia la complejidad de las correlaciones entre las señales aromáticas. Estos experimentos permiten determinar cuales son las señales correspondientes al anillo triazol. Observando el experimento gHMBC $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ se percibe que la señal a 5.30 ppm asignada a **a**, que está fuera de la zona aromática, tiene una interacción con el átomo de carbono a 146.0 ppm (en azul en la Figura IV.28), y esto permite asignar a esta señal con el átomo de carbono cuaternario del triazol nombrado **b**, así como la señal 124.0 ppm que se corresponde con el átomo de carbono **c**. Esta última señal además, tiene una interacción cruzada con el protón a 8.35 ppm lo que permite identificar esta señal como el protón **c**, (en verde en la Figura IV.28). Por último, observando el espectro de gHSQC $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ se determina que la señal a 8.35 en el espectro de RMN- ^1H posee una interacción cruzada con el átomo de carbono a 124.0 ppm identificándolo inequívocamente con el átomo de carbono **c** de la figura (en rojo en la Figura IV.27).

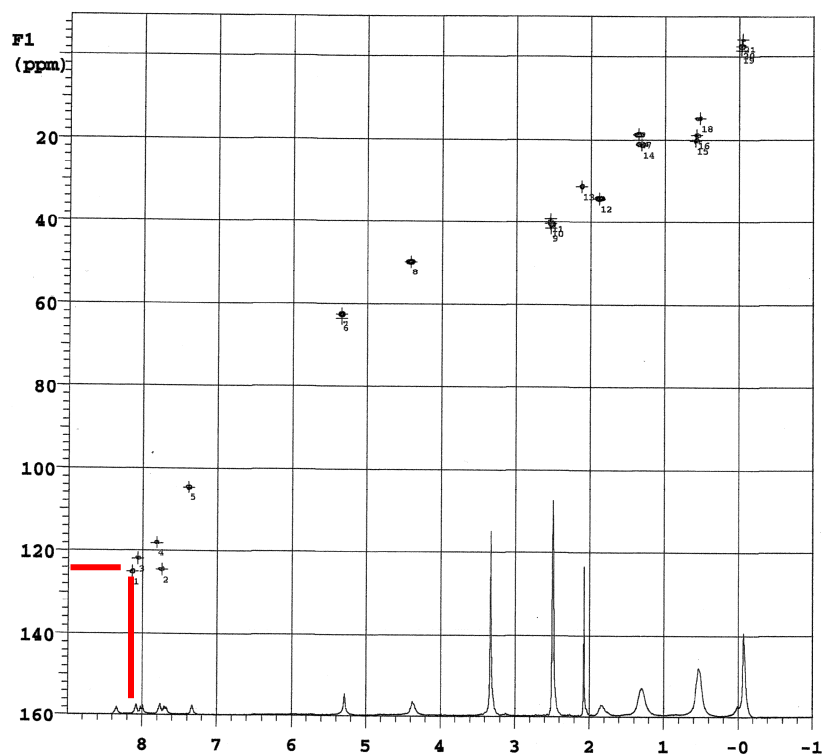


Figura IV.27. Espectro de gHSQC $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ del compuesto **38**.

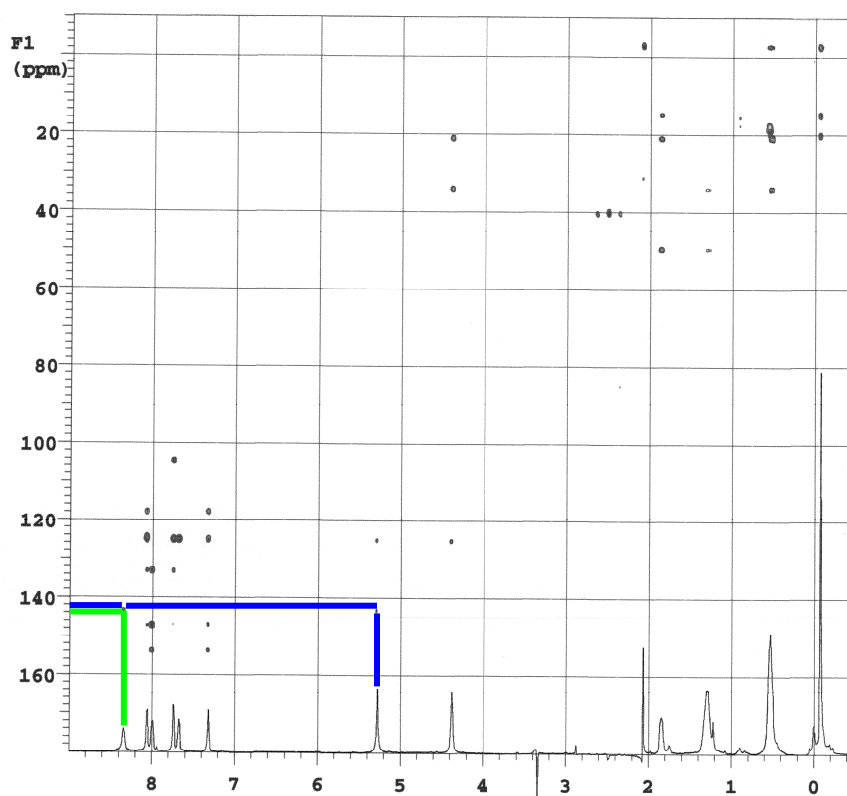
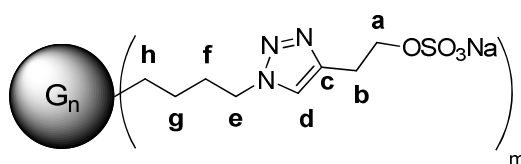


Figura IV.28. Espectro de gHMBC $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ del compuesto **38**.

4.3.4 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE DENDRÍMEROS CON GRUPOS SULFATO EN LA PERIFERIA

En este apartado se describen los espectros de primera, segunda y tercera generación de los dendrímeros terminados en grupos sulfato **40-42**.

Caracterización de $G_n[(CH_2)_4(C_2HN_3)(CH_2)_2OSO_3Na]_m$ (**40-42**)



$$n = 1; m = 4 \quad \text{(40)}$$

$$n = 2; m = 8 \quad \text{(41)}$$

$$n = 3; m = 16 \quad \text{(42)}$$

	ASIGNACIÓN	40	41	42
RMN- ¹ H DMSO-d ₆	NCHCN	7.85	7.86	7.82
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	4.26	4.27	4.23
	CCH ₂ CH ₂ OSO ₃ ⁻	3.91	3.91	3.93
	CCH ₂ CH ₂ OSO ₃ ⁻	2.85	2.84	2.84
	SiCH ₂ CHCH ₂ CH ₂ N	1.77	1.76	1.73
	SiCH ₂ CH ₂	1.25	1.26	1.22
	SiCH ₂	0.50	0.49	0.46
	Si(CH ₃) ₂ y Si(CH ₃)	-0.10	-0.10	-0.10
RMN- ¹³ C DMSO-d ₆	NCHCN	143.1	142.9	143.0
	NCHCN	121.8	121.8	121.9
	CCH ₂ CH ₂ OSO ₃ ⁻	64.3	64.2	64.3
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	48.3	48.3	48.3
	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	33.1	33.1	33.1
	CCH ₂ CH ₂ OSO ₃ ⁻	25.5	25.5	25.4
	SiCH ₂ CH ₂ y SiCH ₂	19.9 -13.8	19.9 -13.8	20.0 -13.6
	Si(CH ₃) ₂	-3.8	-3.8	-3.9
	SiCH ₃	-	-4.2	-4.3

Tabla IV.6. Datos de RMN-¹H y ¹³C de los productos **40-42** en DMSO-d₆.

En el espectro de RMN- ^1H se aprecia el singlete característico de la formación del anillo de triazol **d** en torno a 7.84 ppm, y ligeramente más apantallado se observa un multiplete ensanchado cuyo desplazamiento alrededor de 4.25 ppm es característico del grupo metileno contiguo al triazol **e**. Por otro lado, los dos tripletes en torno a 3.91 y 2.84 ppm evidencian la unión del fragmento sulfato, el primero de éstos se asigna al grupo metileno **a** que sufre el desapantallamiento de la señal debido la unión directa al átomo de oxígeno del grupo sulfato, mientras que **b** sufre en menor medida dicho efecto. Las señales del esqueleto dendrítico se sitúan a desplazamientos químicos similares a los que se han ido describiendo a lo largo de esta memoria (Figura IV.29).

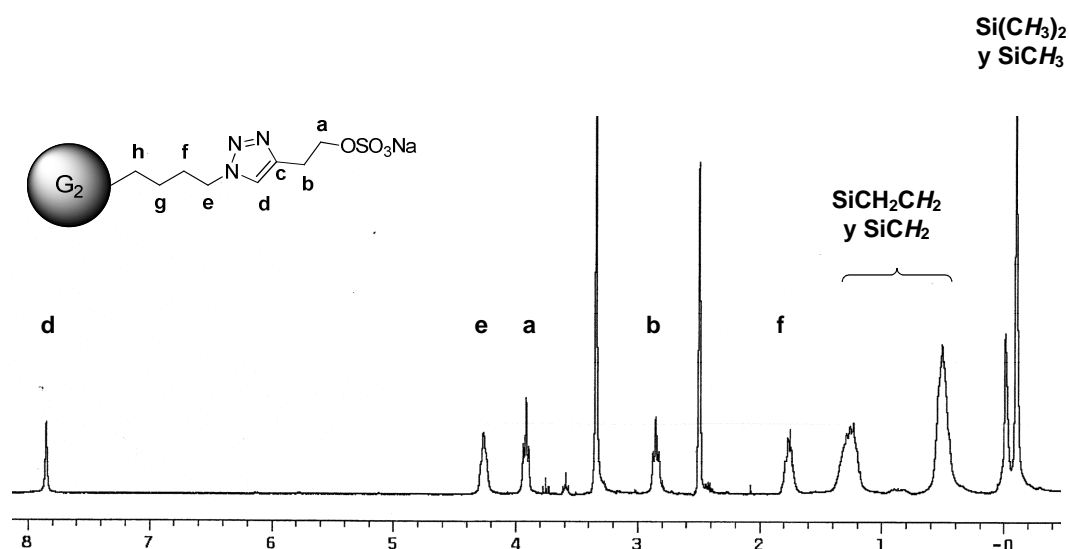


Figura IV.29. Espectro de RMN- ^1H del compuesto **41**.

En cuanto al espectro de RMN- ^{13}C (ver Figura IV.25), las primeras señales que se aprecian son las relativas a los átomos de carbono que forman parte del triazol. En torno a 143.0 y 123.8 ppm se sitúan los átomos de carbono **c** y **d** de la estructura respectivamente. La siguiente señal se corresponde con el grupo metileno **a** en la figura a 64.3 ppm que se encuentra más desapantallado comparado con el metileno **b**, debido a que el primero se encuentra más alejado del grupo sulfato. A continuación, se encuentran las señales en α y β al heterociclo relativa a los átomos de carbono de la cadena que conecta el triazol con el átomo de silicio más externo a 48.3 y 33.1 ppm respectivamente y que se corresponden con los átomos de carbono denominados **e** y **f** de la figura. El átomo de carbono en β al grupo sulfato es la siguiente señal

observada en torno a 25.5 ppm nombrada **b** en la figura. El resto de señales pertenecen al esqueleto dendrítico y se asignan correspondientemente ateniendo al criterio descrito a lo largo de esta memoria (Figura IV.30).

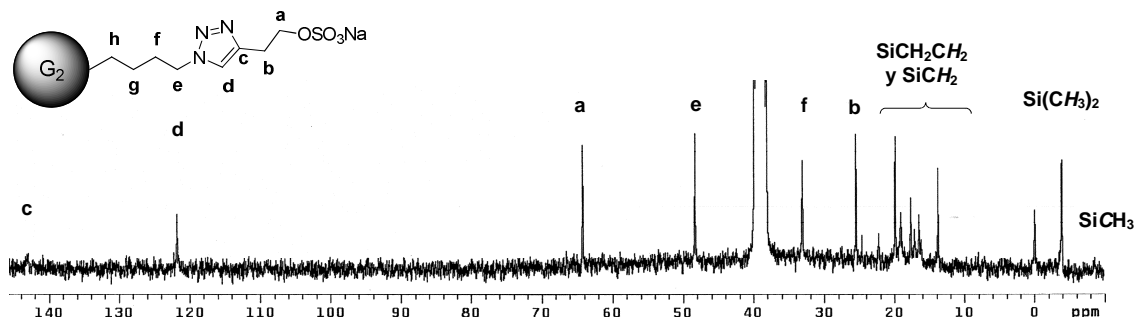


Figura IV.30. Espectro de RMN-¹³C del compuesto **41**.

Todas las asignaciones descritas en este apartado se realizaron a partir de experimentos gHSQC {¹H-¹³C} (Figura IV.31). En la figura se observan dos señales anchas alrededor de 3.8 ppm que resultaron de utilizar un experimento para la supresión de la señal de HDO.

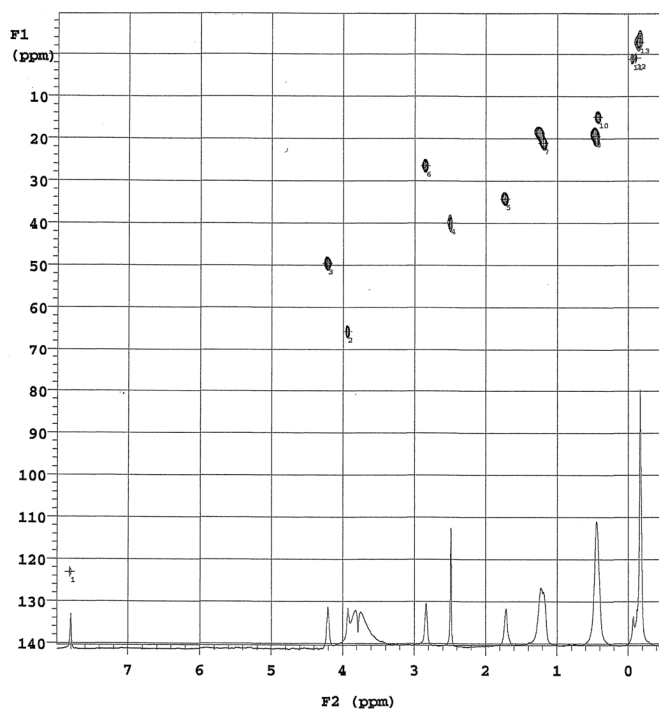


Figura IV.31. Espectro de gHSQC {¹H-¹³C} del compuesto **41**.

4.3.5 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Además de la caracterización por RMN de diversos núcleos se han realizado espectros de masas utilizando la técnica de espectrometría MALDI-TOF para todos los compuestos presentados en este capítulo. Sin embargo, debido a la naturaleza de estos dendrímeros tan sólo se han podido observar señales de los productos de las estructuras neutras de las generaciones más bajas dado que las especies iónicas son más difíciles de volatilizar.

Para el compuesto **25** de primera generación con grupos éster en la periferia se puede observar que el ión molecular más sodio es la señal de mayor intensidad del espectro. El resto de señales del espectro resultan de fragmentaciones que no pueden ser identificadas (Figura IV.32). En cuanto a los espectros de masas de **26** y **27**, aunque fueron realizados en idénticas condiciones no se pudieron identificar señales relativas a ninguno de ellos.

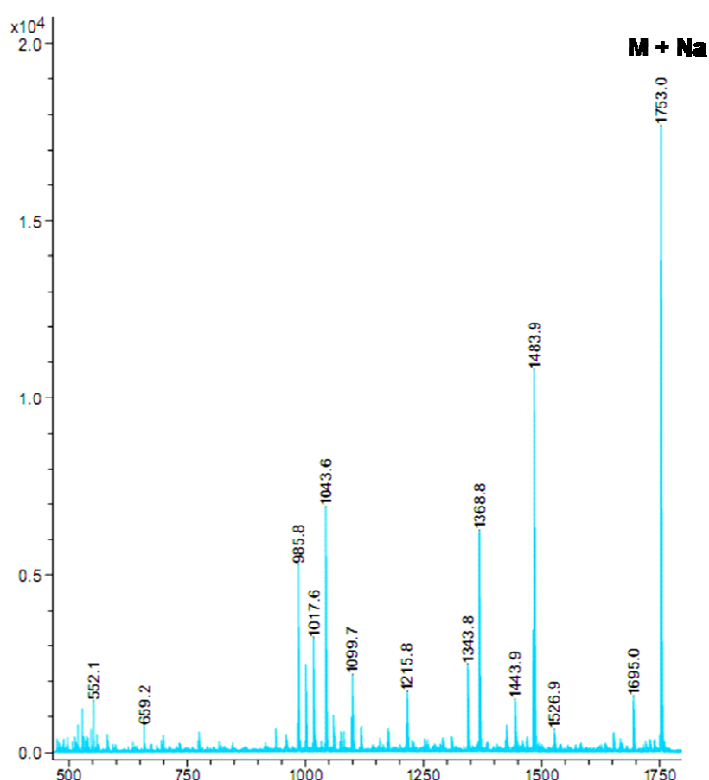


Figura IV.32. Espectro de masas MALDI-TOF del compuesto **25**.

Los espectros de masas de familia de dendrímeros con grupos fosfonato en la periferia, se llevaron a cabo de igual modo y se observaron los mismos fenómenos. Se pudo observar que la señal a mayor relación de masa/carga era la del ión molecular más sodio de **31**, aunque en este caso el dendrímero debe sufrir un mayor número de fragmentaciones, ya que el pico de este ión no es abundante en el espectro (Figura IV.33).

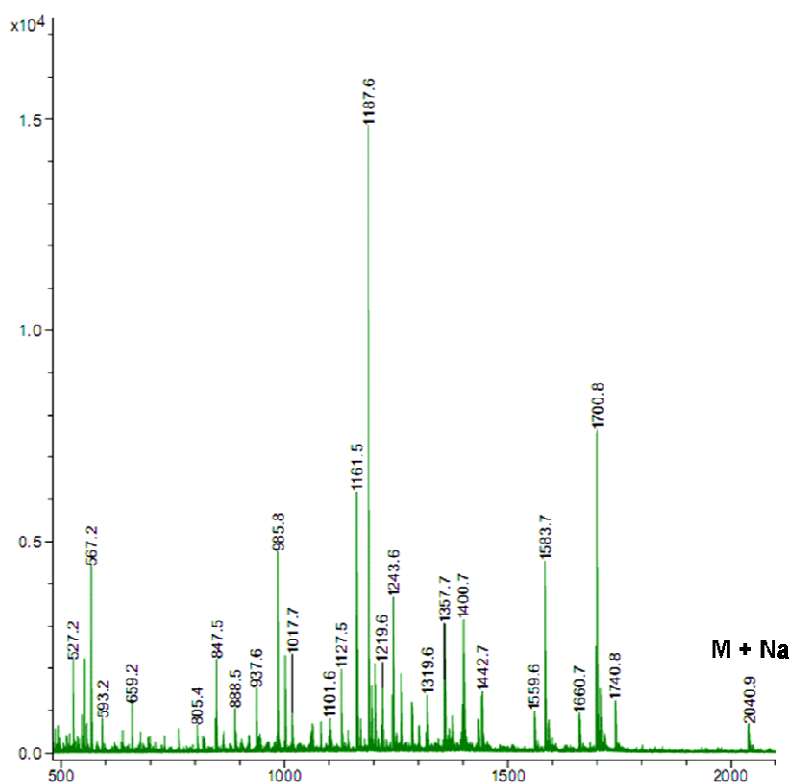


Figura IV.33. Espectro de masas MALDI-TOF del compuesto **31**.

Todos los intentos realizados para llevar a cabo los espectros de masas para las especies aniónicas resultaron ser infructuosos, como se ha comentado, probablemente debido a la dificultad de vuelo de dichas especies.

4.4 BIBLIOGRAFÍA

- ¹ M. J. Pisani, N. J. Wheate, F. R. Keene, J. R. Aldrich-Wright and J. G. Collins, *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 373.
- ² H. Nagatani, T. Sakamoto, T. Torikai and T. Sagara, *Langmuir* **2010**, *26*, 17686.
- ³ R. S. Navath, Y. E. Kurtoglu, B. Wang, S. Kannan, R. Romero and R. M. Kannan, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2446.
- ⁴ O. P. Perumal, R. Inapagolla, S. Kannan and R. M. Kannan, *Biomaterials* **2008**, *29*, 3469.
- ⁵ J. D. Reuter, A. Myc, M. M. Hayes, Z. Gan, R. Roy, D. Qin, R. Yin, L. T. Piehler, R. Esfand, D. A. Tomalia and J. R. Baker, Jr., *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 271.
- ⁶ J. J. Landers, Z. Cao, I. Lee, L. T. Piehler, P. P. Myc, A. Myc, T. Hamouda, A. T. Galecki and J. R. Baker, Jr., *J. Infect. Dis.* **2002**, *186*, 1222.
- ⁷ R. Roy, D. Zanini, S. J. Meunier and A. Romanowska, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, *24*, 1869.
- ⁸ M. Weiwer, C.-C. Chen, M. M. Kemp and R. J. Linhardt, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *16*, 2611.
- ⁹ C. J. Hawker, K. L. Wooley and J. M. J. Frechet, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, *12*, 1287.
- ¹⁰ N. Niamnont, W. Siripornnoppakhun, P. Rashatasakhon and M. Sukwattanasinitt, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2768.
- ¹¹ A. Chouai and E. E. Simanek, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2357.
- ¹² J. Lim, A. Chouai, S.-T. Lo, W. Liu, X. Sun and E. E. Simanek, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 2154.
- ¹³ J. Lim and E. E. Simanek, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 201.
- ¹⁴ J. Lim, V. J. Venditto and E. E. Simanek, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 5749.
- ¹⁵ O. Rolland, L. Griffe, M. Poupot, A. Maraval, A. Ouali, Y. Coppel, J.-J. Fournie, G. Bacquet, C.-O. Turrin, A.-M. Caminade, J.-P. Majoral and R. Poupot, *Chem. Eur. J* **2008**, *14*, 4836.
- ¹⁶ A. Perez-Anes, C. Stefaniu, C. Moog, J.-P. Majoral, M. Blanzat, C.-O. Turrin, A.-M. Caminade and I. Rico-Lattes, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 242.
- ¹⁷ E. Cavero, M. Zablocka, A.-M. Caminade and J. P. Majoral, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *14*, 2759.
- ¹⁸ H.-T. Chen, M. F. Neerman, A. R. Parrish and E. E. Simanek, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10044.
- ¹⁹ R. Rupp, S. L. Rosenthal and L. R. Stanberry, *Int. J. Nanomed.* **2007**, *2*, 561.
- ²⁰ S. Telwatte, K. Moore, A. Johnson, D. Tyssen, J. Sterjovski, M. Aldunate, P. R. Gorry, P. A. Ramsland, G. R. Lewis, J. R. A. Paull, S. Sonza and G. Tachedjian, *Antiviral Res.* **2011**, *90*, 195.
- ²¹ J. O'Loughlin, I. Y. Millwood, H. M. McDonald, C. F. Price, J. M. Kaldor and J. R. A. Paull, *Sex. Transm. Dis.* **2010**, *37*, 100.
- ²² M. Witvrouw, V. Fikkert, W. Pluymers, B. Matthews, K. Mardel, D. Schols, J. Raff, Z. Debyser, E. De Clercq, G. Holan and C. Pannecouque, *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 1100.
- ²³ L. M. Kaminskas, B. J. Boyd, P. Karellas, S. A. Henderson, M. P. Giannis, G. Y. Krippner and C. J. H. Porter, *Mol. Pharmaceutics* **2007**, *4*, 949.
- ²⁴ A. Sousa-Hervés, E. Fernández-Megía and R. Riguera, *Chem. Commun.* **2008**, *27*, 3136.
- ²⁵ R. D. Kensinger, B. J. Catalone, F. C. Krebs, B. Wigdahl and C.-L. Schengrund, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 1614.

- ²⁶ M. Weinhart, D. Groger, S. Enders, J. Dervedde and R. Haag, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2502.
- ²⁷ C. Ornelas, E. Boisselier, V. Martinez, I. Pianet, J. Ruiz Aranzaes and D. Astruc, *Chem. Commun.* **2007**, *47*, 5093.
- ²⁸ B. Rasines, *Tesis Doctoral, Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Alcalá* **2010**.
- ²⁹ S. W. Krska and D. Seyferth, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3604.
- ³⁰ F. J. de la Mata, R. Gómez, M. Á. Muñoz, J. Sánchez Nieves, P. Ortega, L. Chonco, B. Rasines, E. Arnáiz and M. J. Serramía, *PCT/ES2011/070104* **2011**.
- ³¹ H. Yu, Y. Nie, C. Dohmen, Y. Li and E. Wagner, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2039.
- ³² E. Pretsch, T. Clerc, J. Seibl and W. Simon, *Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos* 1998 C191 y H135.

Capítulo 5: Aplicaciones biomédicas de dendrímeros aniónicos

En este capítulo se presentan las pruebas biomédicas realizadas con dendrímeros aniónicos tipo carbosilano descritos en el capítulo 4 de esta memoria que incluyen tanto ensayos de toxicidad como su aplicación como posibles agentes antivirales.

5.1 ANTECEDENTES

Según el informe publicado por la OMS en 2009 hay más de 33 millones de personas en el planeta infectadas por el VIH, y se producen 1.8 millones de muertes anuales debidas al desarrollo del SIDA.¹ Hoy en día el acceso a la terapia antirretroviral ha prolongado la vida de los pacientes infectados, llegando incluso a detener el avance de la enfermedad. Sin embargo, más del 80% de los infectados se encuentran en zonas del planeta subdesarrolladas o en vías de desarrollo, lo que les impide tener acceso a la terapia antirretroviral. Además de este último factor, la aparición de cepas resistentes a las terapias actuales y el desarrollo de efectos secundarios a los antirretrovirales hacen que la preparación de nuevos fármacos sea esencial hoy en día para combatir el VIH.

5.1.1 ESTRUCTURA DEL VIH Y MECANISMO DE INFECCIÓN

El VIH tiene forma esférica con un tamaño entre 100-120 nm. La parte externa del virión está formada por una bicapa de fosfolípidos en la que sobresale un complejo proteico, formado por la asociación de las proteínas gp120 y gp41. La interacción entre estas proteínas es de naturaleza no covalente y se asocian formando trímeros,² de modo que la proteína gp41 queda anclada en la bicapa fosfolipídica, mientras que la proteína gp120 queda en el exterior del virus.³

En el interior del virión se encuentra una cápside formada por la proteína p24 y en el interior de ésta se encuentran dos copias de una cadena de ARN íntimamente asociada con diversas proteínas, incluidas la transcriptasa inversa y la integrasa que son esenciales para la replicación viral.

El mecanismo de la infección comienza con la unión específica de la proteína gp120 del VIH a los receptores de membrana CD4 (ver Figura V.1), esto provoca

cambios conformacionales en la proteína gp120 que permiten la interacción de ésta con el correceptor CXCR4 (en células T) o CCR5 (en macrófagos) de la membrana celular.^{4,5} La unión al correceptor produce un nuevo cambio conformacional que permite que la proteína gp41 se acerque a la membrana celular, favoreciendo la formación de un poro en ésta.^{3,6} A través de este poro el virus es capaz de transferir su núcleo al interior de la célula. Este mecanismo de infección hace que las células del sistema inmune, que expresan el receptor CD4, sean las más vulnerables al ataque del VIH, especialmente las células T y los macrófagos.

A continuación el ARN viral se transforma mediante la acción de la transcriptasa inversa, utilizando los orgánulos celulares de la célula huésped en ADN viral que se traslada al núcleo celular donde se incorpora al ADN de la célula infectada mediante la enzima integrasa.

El siguiente paso de la replicación del virus es la expresión de los genes virales. Esto se lleva a cabo mediante la transformación de éstos en ARNm. Este tipo de material genético es transportado al citosol, donde es el encargado de utilizar la maquinaria celular de la célula huésped para la formación de las proteínas, que a su vez forman los nuevos viriones, completando la replicación viral (Figura V.2).³

La consecuencia de este mecanismo de infección es que el sistema inmune del paciente se debilita y por tanto acaba muriendo por el ataque de una enfermedad oportunista.

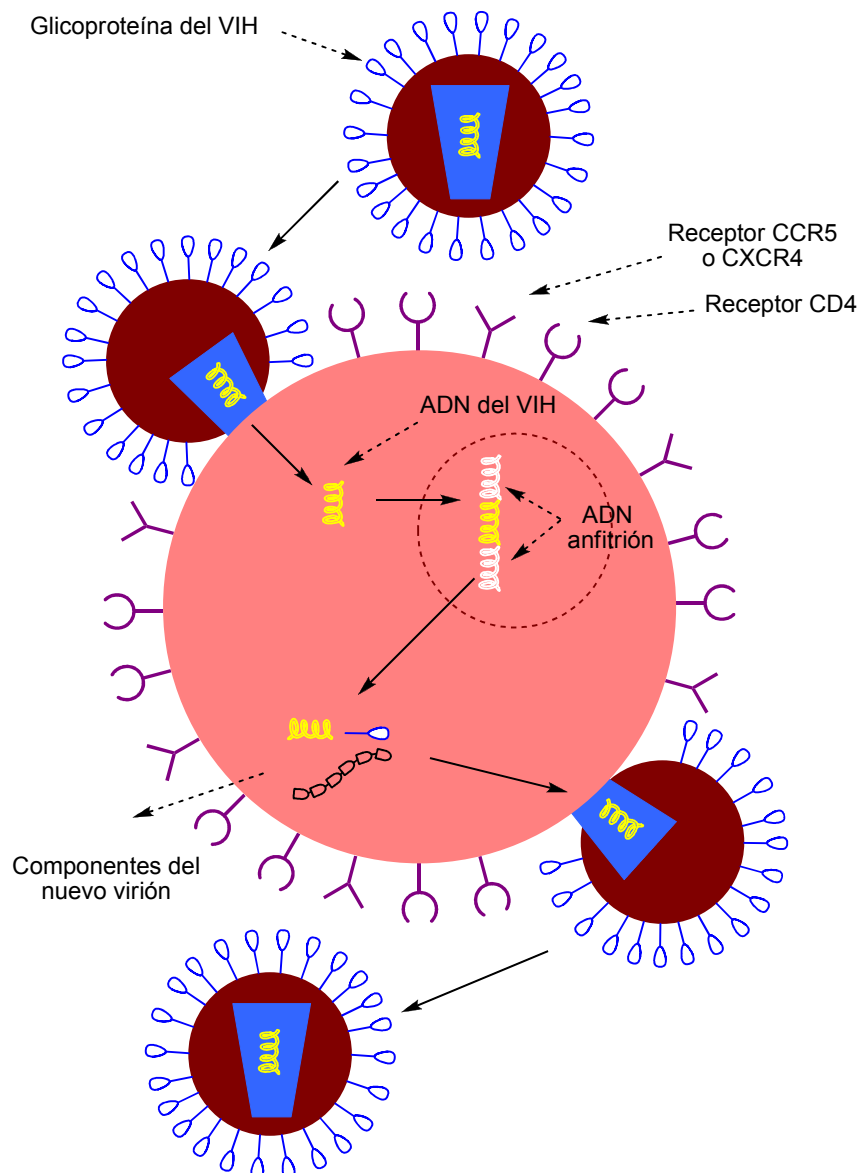


Figura V.1. Ciclo replicativo del VIH.

Todas estas fases de la replicación pueden ser utilizadas como puntos de ataque para la inhibición del virus. Este trabajo se ha centrado en la aplicación de dendrímeros aniónicos en la inhibición de la entrada del material genético del virus en el citosol.

5.1.2 MICROBICIDAS ANIÓNICOS: ANTECEDENTES Y MECANISMO DE ACCIÓN

Se considera que las sustancias microbicidas son aquellas que son capaces de reducir o eliminar la capacidad infecciosa de virus o bacterias. Los mecanismos

utilizados son muy variados. En el caso del VIH toman especial relevancia sustancias de carácter polianiónico.

Desde el comienzo de la epidemia del SIDA se han descubierto diversos compuestos con acción antiVIH con distintos mecanismos de acción. La estructura de varios de estos compuestos está basada en péptidos,^{7,8} glicocompuestos⁹⁻¹¹ o derivados polianiónicos,^{12,13} aunque hay compuestos que pueden encajar en varias de estas categorías, como por ejemplo los derivados de ácido siálico.

La mayoría de los compuestos polianiónicos poseen ciertas ventajas frente a otros tipos de microbicidas ya que poseen un amplio espectro de actividad contra numerosos virus y no provocan resistencia viral. En un principio se creía que el mecanismo de acción de los primeras sustancias polianiónicas probadas contra el VIH consistía en inhibir la acción de la transcriptasa inversa,¹⁴⁻¹⁶ bloqueando de este modo la replicación. Sin embargo, más tarde se descubrió que estas sustancias evitaban la formación de sincitios, lo que sugiere que impide que el virión llegue siquiera a unirse a los receptores celulares de las células atacadas.^{17,18}

Paralelamente a estas investigaciones, se descubrió que se puede evitar la fusión del virus con la membrana nuclear utilizando anticuerpos de la región V3 de la proteína gp120.¹⁹ El bucle V3 es un dominio de la proteína gp120 que se ha identificado como una región clave en la unión a los correceptores de la célula huésped.²⁰ Esta región, además, está cargada positivamente en los virus que utilizan el receptor CXCR4 para la fusión con la célula, lo que explica que los compuestos polianiónicos sean especialmente efectivos bloqueando la entrada de éstos y evitando la infección en células del epitelio vaginal.²¹⁻²³ Sin embargo, los compuestos polianiónicos también son efectivos, aunque en menor medida, bloqueando la fusión de algunos tipos de VIH que utilizan el correceptor CCR5 para la entrada en la célula, a pesar de que éstos poseen menor cantidad de restos positivos en el bucle V3.²²

Numerosos compuestos polianiónicos se han probado contra el VIH para bloquear la unión al bucle V3. Un enfoque muy popular supone el uso de polímeros como soporte de las cargas aniónicas. Esta estrategia permite anclar un gran número de grupos funcionales a la estructura, lo que a su vez permite maximizar la sinergia de

los restos aniónicos entre sí. Así, se han llevado a cabo ensayos médicos con diversas estructuras como por ejemplo la familia de los carragenanos, polímeros derivados de celulosa, heparina, dextrano sulfato, etc, además sobre estos esqueletos poliméricos se han soportado una gran variedad de grupos funcionales aniónicos, entre ellos grupos carboxilato, sulfonato, sulfato y en menor medida fosfato (Figura V.2).^{24,25}

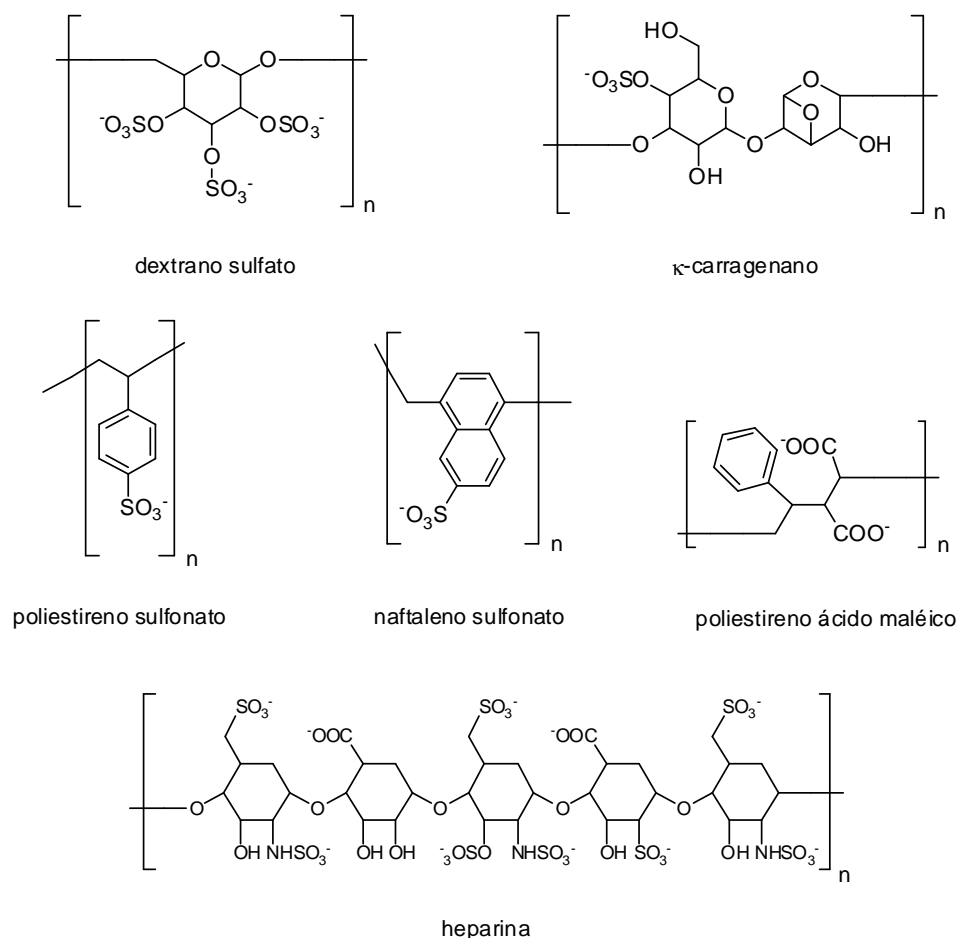


Figura V.2. Polímeros aniónicos probados como microbicidas.

De modo general, se puede afirmar que el factor más importante en estos polímeros es su carga electrostática negativa, que puede ser modulada por diversos factores, entre los que se encuentran la densidad de carga del polímero y la conformación que adquiere éste en disolución. Además, otro factor de suma importancia en la actividad antiviral de un microbicida es la cepa del virus a la que se enfrenta. Así, dependiendo del virus y de la línea celular una sustancia polianiónica puede tener una capacidad antiviral variable.²⁶

Sin embargo, la farmacocinética de los compuestos polianiónicos hace que, generalmente, su permanencia en sangre sea muy baja y se necesiten grandes cantidades de los principios activos para ser detectados en un análisis. Además, se sabe que ciertas sustancias polianiónicas poseen actividad anticoagulante.¹⁸ Todos estos factores impiden que sean utilizados como inhibidores de la fusión del VIH a células sanas. Sin embargo, todos estos factores no son de importancia en el caso de que estas sustancias polianiónicas sean de uso tópico. La formulación de geles con principios activos de naturaleza polianiónica para su utilización tópica puede ser de suma importancia para evitar la transmisión del VIH.

5.1.3 DENDRÍMEROS ANIÓNICOS COMO MICROBICIDAS

Como se ha ido describiendo a lo largo de esta memoria los polímeros convencionales se caracterizan por poseer una polidispersidad elevada, además, la reproducibilidad de las condiciones de reacción de la síntesis es crítica, ya que una pequeña variación en éstas puede conducir a estructuras con pesos moleculares distintos, lo que puede a su vez producir problemas en la estandarización de las características finales del fármaco. Por el contrario, el interés de los dendrímeros surge, fundamentalmente, de su baja polidispersidad y de que se conoce con exactitud su peso molecular. Todas estas características vienen derivadas del control ejercido durante toda la síntesis de la estructura. De ahí que recientemente se hayan comenzado a desarrollar dendrímeros como alternativa a los polímeros para su aplicación como microbicidas.¹²

Aunque existen numerosos ejemplos en la bibliografía de dendrímeros aniónicos, las estructuras con grupos terminales con grupos carboxilato y con grupos terminales derivados de azufre, sulfato y sulfonato, son las que poseen hoy en día mayor prevalencia en los ensayos médicos, ya que son estos grupos aniónicos con los que se han encontrado resultados más satisfactorios como microbicidas cuando han sido incorporados a excipientes convencionales como soporte.

Dendrímeros carboxilato

Debido al relativo éxito obtenido con soportes poliméricos con grupos sulfonato no se han explorado suficientemente otros grupos aniónicos como son los grupos carboxilato. No obstante existen algunos ejemplos relevantes, contra el virus de la gripe en forma de grupos periféricos tipo ácido siálico.²⁷⁻²⁹

Un ejemplo de un dendrímero PAMAM con grupos carboxilato en la periferia aplicado contra el VIH, fue presentado por de Clercq y colaboradores. En este trabajo se utilizó un dendrímero de cuarta generación como soporte que resultó no ser tóxico en células MT-4 en todos los rangos de concentración ensayados, hasta 250 mg/ml con un valor de EC₅₀ en VIH tipo 1 de 1 mg/ml, 3 veces inferior a otro dendrímero similar con grupos naftilsulfonato en la periferia también presentado en el artículo. Otro factor relevante de este dendrímero es que la inhibición es efectiva en rangos de concentración muy bajos no sólo en el VIH tipo 1, sino en un rango amplio de cepas de VIH, incluidas las cepas VIH tipo 2. Comparando este dendrímero con el polímero comercial dextrano sulfato se puede concluir que poseen un nivel de inhibición similar en las cepas VIH tipo 1.³⁰

El mismo grupo periférico que en el caso anterior, ha sido anclado a soportes dendríticos del tipo polilisina para ser ensayados contra el virus del herpes *in vivo*. Varios ratones fueron tratados con este derivado dendrítico tras ser expuestos intravaginalmente con varias cepas del virus del herpes.³¹ Este compuesto fue capaz de reducir la infección cuando se realizan lavados vaginales con una disolución de concentración 100 mg/ml.

Sobre diversas estructuras dendríticas, entre ellas un dendrímero PAMAM de cuarta generación, se han anclado residuos de ácido siálico para su aplicación como agentes contra el virus de la gripe *in vivo* en ratones. El mecanismo de infección del virus de la gripe comienza con la adhesión viral a la célula huésped mediante unas glicoproteínas denominadas hemaglutinina. Sin embargo, el monómero de ácido siálico, aunque eficaz *in vitro*, no puede ser aplicado *in vivo* debido a su toxicidad.³² En este estudio se demostró la eficacia de este tipo de estructuras para evitar la infección, y posterior muerte, por parte de la cepa H3N2 del virus de la gripe a partir

de 1.8 mg del derivado dendrítico por cada gramo de ratón. Desafortunadamente, este derivado fue incapaz de evitar la mortalidad en ninguna proporción para las cepas H1N1 y H2N2.

En nuestro grupo de investigación también se han aplicado dendrímeros carboxilato terminados en grupos carboxilato contra el VIH. Diversos ensayos de toxicidad determinaron la integridad de la membrana y la actividad mitocondrial, estableciendo una concentración de 10 μM como la concentración de trabajo a la que no son tóxicas estas estructuras *in vitro* en células HEC-1 y CMSP. Con células HEC-1 pre-tratadas con el dendrímero se llevaron a cabo estudios de internalización, determinando una reducción en la entrada del virus del orden del 60% con respecto al control.³³

Dendrímeros fosfonato

Los dendrímeros con grupos fosfonato en la periferia son los menos investigados hoy en día. Majoral y colaboradores han sido los que han desarrollado la mayoría de los dendrímeros de esta naturaleza que existen en la literatura.³⁴ Sin embargo, la casi totalidad de éstos no han sido probados como microbicidas, y hasta la fecha sólo existe una publicación relevante del uso de estos dendrímeros en aplicaciones antiVIH.³⁵

En 2009 se presentó una publicación en la que se muestran varios dendrímeros de primera generación cuyas terminaciones poseen grupos fosfonato, además de cadenas alquílicas de diferente tamaño (Figura V.3). La evaluación *in vitro* de estos dendrímeros permitió concluir que no poseen citotoxicidad en las líneas celulares ensayadas, MT-4 y CEM-SS, hasta una concentración de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

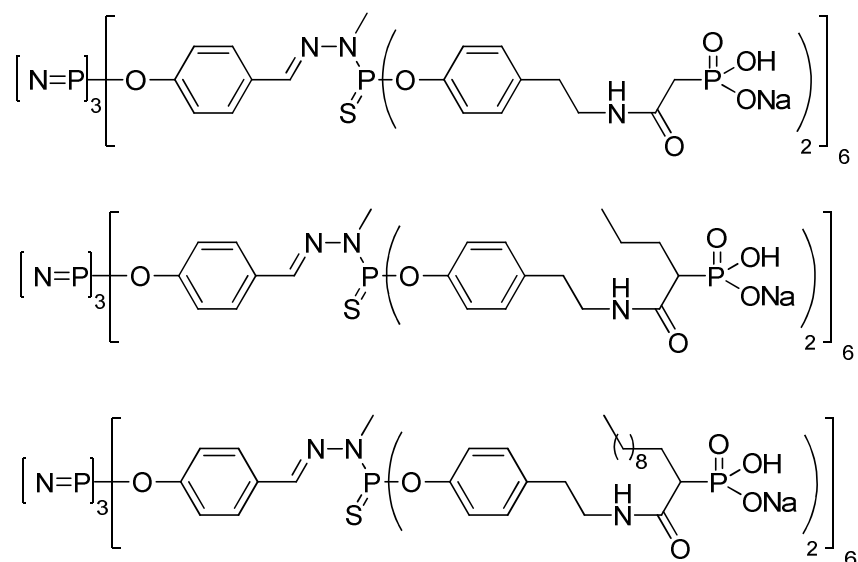


Figura V.3. Dendrímeros fosfonato con cadenas hidrofóbicas en la periferia.

En los ensayos realizados se observó que estos dendrímeros eran capaces de inhibir la replicación viral a medida que aumentaba la concentración, hasta llegar al 100% de inhibición a una concentración de 1×10^{-4} mol L⁻¹. La estructura dendrímica con la cadena alquílica más corta resultó ser el más efectivo de todos llegando a una inhibición del 100% a una concentración de 1×10^{-5} mol L⁻¹.

Dendrímeros sulfato y sulfonato

Debido a los éxitos *in vitro* obtenidos con polímeros convencionales con diversos grados de sulfatación o sulfonación, los dendrímeros que soportan estos grupos terminales son los más estudiados en la bibliografía. Cabe destacar, además, que el único dendrímero en fase III de ensayos clínicos es una estructura con grupos naftalenosulfonato con propiedades antiVIH del que se hablará posteriormente.

En el caso de los grupos sulfato, éstos han sido generalmente utilizados en forma de glicoderivados. En los años 90 se descubre que algunos azúcares de membrana pueden ser utilizados como receptores del VIH para infectar células que no poseen receptores CD4.^{19,36}

Es bien conocido el efecto de ciertos azúcares para bloquear los receptores de algunas células. En el año 2004 se realizó un estudio en el que se utilizaban

dendrímeros PPI con núcleo diaminobutano de quinta generación para anclar galactosas sulfatadas.³⁷ La conclusión obtenida es que los glicoderivados sulfatados son capaces de unirse a la proteína gp120 con una gran efectividad, lo que puede bloquear la fusión de la cápside del virus con la célula. Además, el dendrímero con menos grupos sulfatados es capaz de inhibir al mismo nivel que el dextrano sulfato, de lo que se deduce que existe una unión específica entre las galactosas sulfatadas y las proteínas virales.

Los dendrímeros polilisina también se han utilizado como soporte para el anclaje de oligosacáridos y posterior sulfatación de la estructura final. La actividad biológica como agentes antiVIH de este tipo de dendrímeros resultó ser tres y veinticuatro veces inferior a la de los controles dextrano sulfato y curdlano sulfato respectivamente (inhibidores basados en polímeros aniónicos) y 170 veces inferior al AZT (fármaco cuya actividad está basada en la inhibición de la transcriptasa inversa). Sin embargo, este dendrímero posee la ventaja de ser mucho menos tóxico que estos mismos controles.³⁸

Como se ha comentado en el comienzo de este apartado, los dendrímeros con la periferia con grupos sulfonato han cobrado un gran interés debido al éxito obtenido por el dendrímero denominado SPL7013. Este dendrímero basado en unidades de lisina de cuarta generación y con terminaciones tipo naftilsulfonato ha logrado superar los ensayos clínicos de Fase I y II para ser utilizado contra la vaginosis de origen bacteriano y los ensayos de Fase I contra el VIH, convirtiéndose en el primer candidato de naturaleza dendrítica con capacidad de llegar a ser comercializado. El dendrímero se formula como fármaco en forma de gel que debe ser aplicado intravaginalmente previo al coito. Los ensayos de toxicidad en CMSP han determinado que son seguros para su aplicación hasta un porcentaje del 5%.³⁹ Ensayos *in vivo* muestran que este dendrímero es capaz de bloquear la entrada del VIH de tipo 1 y tipo 2 en un porcentaje superior al 95%.⁴⁰ Los ensayos *in vivo* utilizando este porcentaje en macacos, determinaron que no poseen efectos negativos, protegiendo al 100% de los monos de la infección con VIS (virus de inmunodeficiencia en simios).⁴¹

El dendrímero SPL7013 no sólo posee actividad antiVIH, sino que es capaz de inhibir la internalización del virus del herpes cuando está presente en una concentración de 3 µg/L en células HeLa y Hep-2. Además, el dendrímero posee capacidad contra el virus del herpes en células previamente infectadas. Sin embargo, las dosis para estos experimentos de post-tratamiento fueron superiores a las dosis establecidas en pre-tratamiento.⁴²

En nuestro grupo de investigación también hemos llevado a cabo la síntesis de dendrímeros carbosilano de primera a tercera generación con grupos sulfonato en la periferia. Estas estructuras resultaron no ser tóxicas a concentraciones de 10 µM y no causaban daño a la integridad de la membrana celular tanto en células HEC-1A como en CMSP.³³ (Figura V.4)

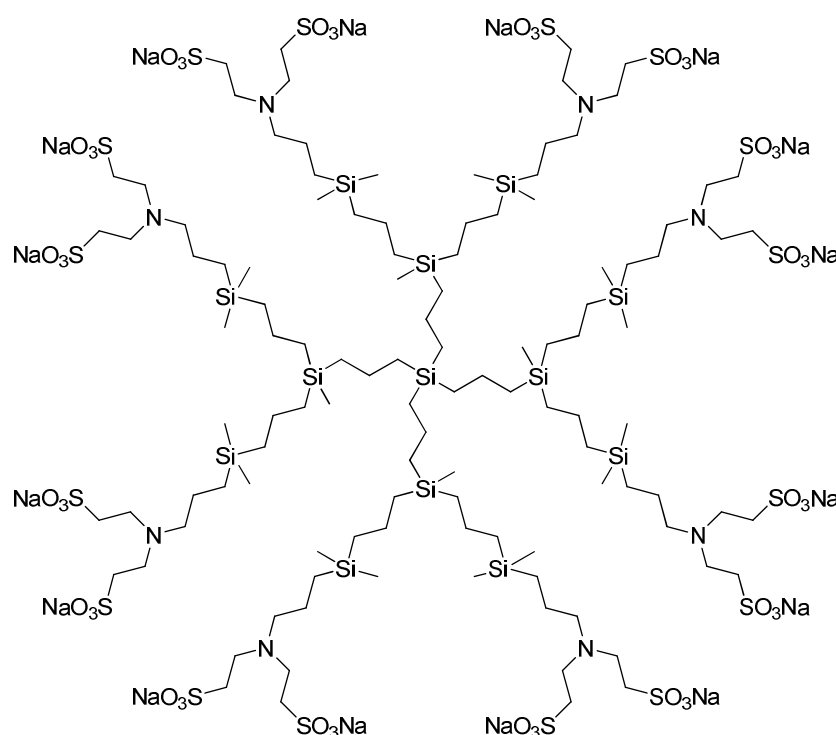


Figura V.4. Dendrímero carbosilano de segunda generación con grupos sulfonato en la periferia.

En el ensayo de inhibición llevado a cabo con el dendrímero de segunda generación se observó que con células HEC-1A pre-tratadas con el dendrímero una hora antes se reducía la capacidad de infección del virus en un 70%.

Con perspectiva de utilizar este dendrímero como un gel de uso tópico se realizó un ensayo con un dispositivo de Transwell, que imita el epitelio vaginal disponiendo una monocapa de células, tal y como se muestra en la Figura V.5. Este dispositivo permite observar si hay transcitosis, es decir transporte de una macromolécula de la cara apical a la cara transbasal. Las conclusiones extraídas del estudio fueron que el dendrímero, depositado sobre las células epiteliales, no sólo era capaz de reducir el paso de las dos cepas de virus ensayadas, VIH1 NL4.3 y VIH1 Bal (que utilizan los correceptores CXCR4 y CCR5 respectivamente para infectar las células), sino que en la cepa VIH1 Bal la reducción del virus en la cara basal era superior al fármaco Suramin comercial, compuesto polisulfonado capaz de inhibir la unión del VIH a los receptores CD4.⁴³

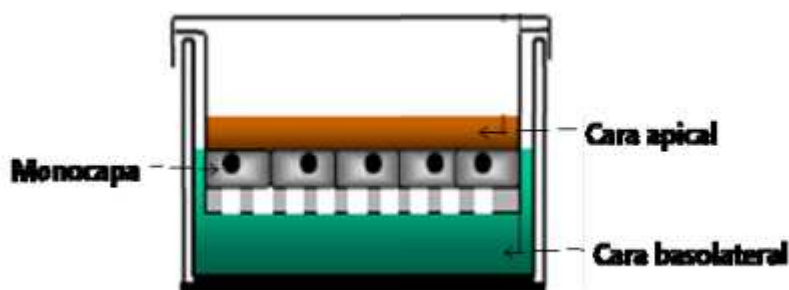


Figura V.5. Esquema de un dispositivo Transwell.

Por último se realizaron estudios en CMSP tanto en pre-tratamiento como en post-tratamiento. En este experimento se obtuvo una reducción de la infección en pretratamiento del 80% a una hora y del 60% en post-tratamiento a veinticuatro horas contra la cepa VIH1 NL4.3. Esto confirma que el dendrímero presenta no sólo un carácter profiláctico sino también terapéutico.

5.2 ENSAYOS BIOMÉDICOS

En este apartado del capítulo se describen los ensayos de citotoxicidad mediante ensayos MTT y los ensayos de inhibición del VIH tanto en pre-tratamiento como en post-tratamiento de los dendrímeros aniónicos descritos en el capítulo 4 de esta memoria, **28-30, 34-36, 38-39 y 40-42.**

5.2.1 ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD

Se ha utilizado un ensayo MTT con el fin de evaluar la toxicidad de los dendrímeros aniónicos previamente sintetizados. Estos ensayos fueron llevados a cabo en CMSP a veinticuatro y cuarenta y ocho horas para cada una de las familias de los dendrímeros aniónicos.

Para los dendrímeros terminados en grupos carboxilato, **28-30**, se observa que la viabilidad celular se sitúa por encima del 80%, para la primera y tercera generación hasta una concentración de 20 μM a ambos tiempos. Sin embargo, el dendrímero de segunda generación comienza a alejarse del límite del 80% a partir de 2 μM (Figura V.6).

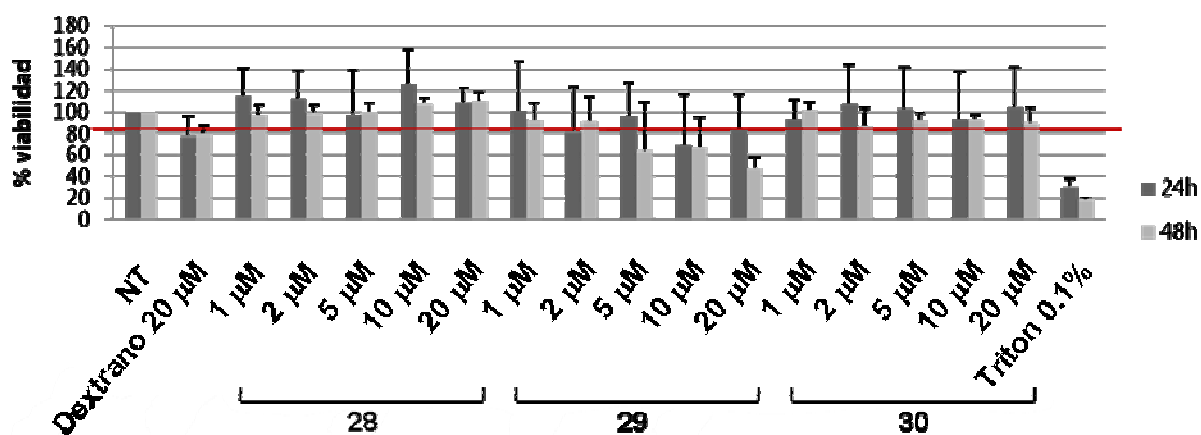


Figura V.6. Viabilidad celular para los compuestos **28-30** en CMSP.

Los ensayos realizados con los dendrímeros terminados en grupos fosfonato, **34-36**, mostraron que no eran tóxicos en ninguna de las concentraciones ensayadas, tanto a veinticuatro y cuarenta y ocho horas, al situarse por encima del valor de viabilidad del 80% (Figura V.7).

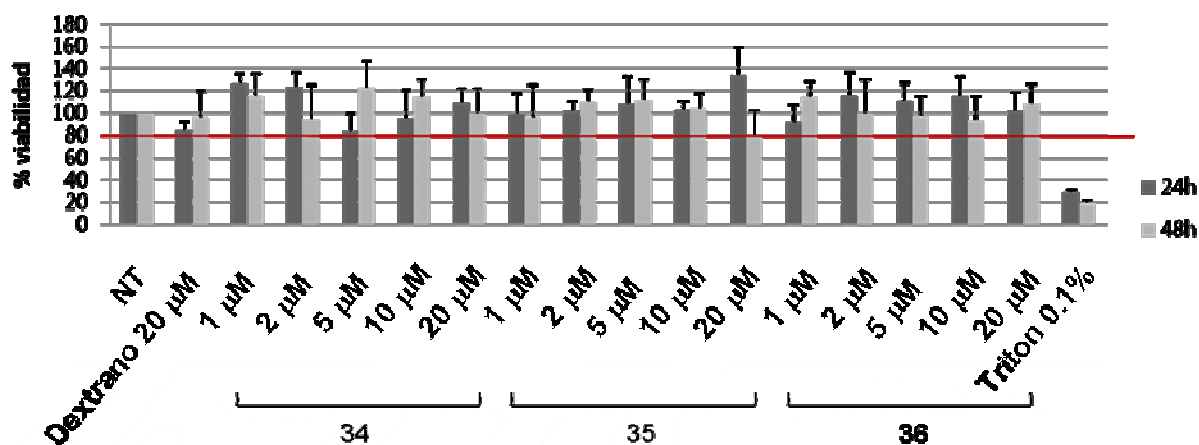


Figura V.7. Viabilidad celular para los compuestos 34-36 en CMSP.

Los dendrímeros con grupos naftilsulfonato, **38** y **39**, en la periferia no son tóxicos para la primera generación en ninguna de las proporciones ensayadas ni a veinticuatro ni a cuarenta y ocho. Sin embargo, un aumento del tamaño hasta la segunda generación hace que a 10 µM la viabilidad celular se sitúe cercana al límite del 80% y a 20 µM directamente sea tóxico tanto veinticuatro como a cuarenta y ocho horas. Este aumento de la toxicidad probablemente sea debido al aumento del tamaño y del número de grupos de la periferia (Figura V.8).

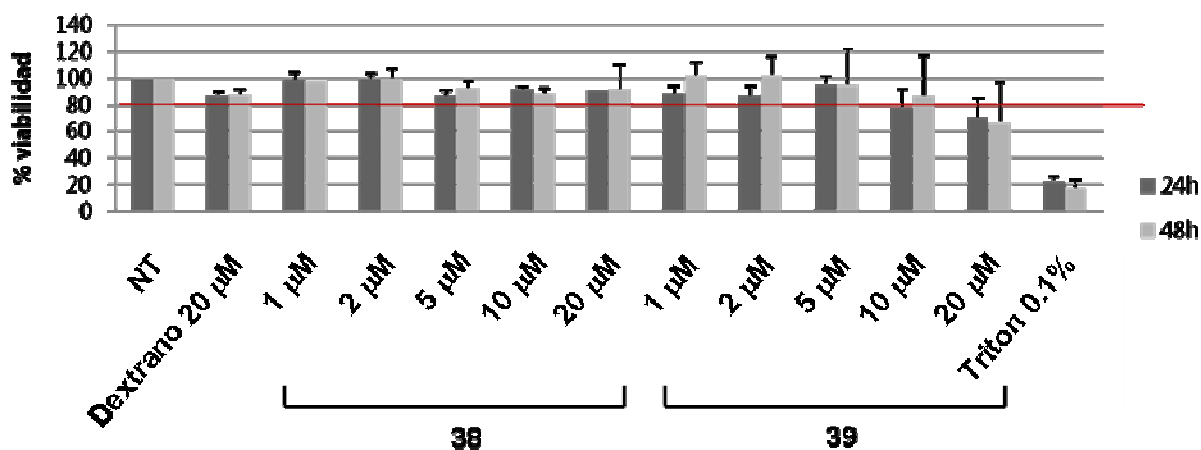


Figura V.8. Viabilidad celular para los compuestos 38-39 en CMSP.

En las pruebas realizadas con los dendrímeros sulfato **40-42**, se observa un fenómeno similar al de los dendrímeros terminados en grupos naftilsulfonato. Existe una dependencia de la toxicidad con la concentración y el tamaño. En la primera

generación la viabilidad celular se sitúa por encima del 80% desde 1 hasta 20 μM . En la segunda y tercera generación se observa un fenómeno similar, de este modo, a medida que aumenta la concentración disminuye la viabilidad, y además, la toxicidad va aumentando con el tiempo, siendo los valores de viabilidad celular inferiores a cuarenta y ocho que a veinticuatro horas. (Figura V.9).

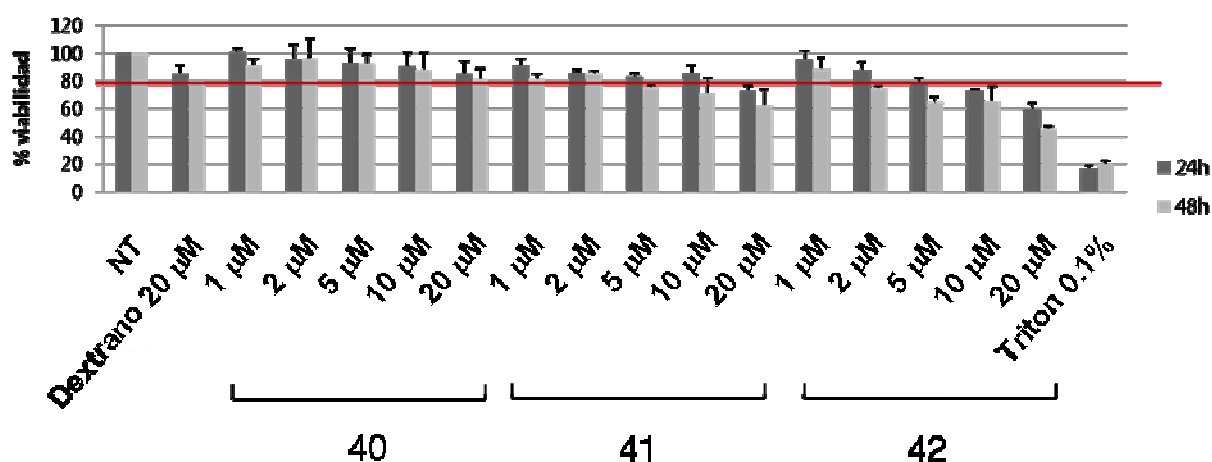


Figura V.9. Viabilidad celular para los compuestos 40-42 en CMSP.

5.2.2 ESTUDIO DE INHIBICIÓN

Una vez conocidos los límites de toxicidad se procedió a realizar ensayos para conocer si los compuestos dendríticos eran capaces de inhibir la infección (ensayos de pretratamiento) o inhibir la replicación (ensayos de post-tratamiento). Para estos estudios se escogieron los dendrímeros de mayor generación de cada familia, ya que una mayor cantidad de grupos funcionales suele implicar una mayor inhibición.²⁶

En el ensayo de pretratamiento se tratan las CMSP con el dendrímero durante una hora. Posteriormente se procede a la incubación con el virus y se valora el grado de infección mediante un ensayo ELISA. En este ensayo un anticuerpo se une específicamente a la proteína p24 del virus, posteriormente se añade una enzima marcada que se une al anticuerpo-antígeno indicando por fluorescencia la presencia del antígeno p24 e indirectamente que la célula huésped ha sintetizado viriones del VIH. En el ensayo se aprecia que el dendrímero de tercera generación terminado en grupos carboxilato, **30**, no es capaz de evitar la infección por parte del VIH a 1 μM , mientras que a 5 y 10 μM se observa un porcentaje de inhibición cercano al 60%

(Figura V.5). El dendrímero **36**, con grupos fosfonato en la periferia, no parece ser capaz de detener la infección en un grado inferior al 15% en ninguna concentración ensayada.

Sin embargo, los dendrímeros con mejor actividad en los ensayos de pre-tratamiento fueron los dendrímeros terminados en grupos sulfato y naftilsulfonato. Con estos dendrímeros no se detectan niveles de infección apreciables incluso a la concentración de 1 μM , la menor concentración ensayada (Figura V.10).

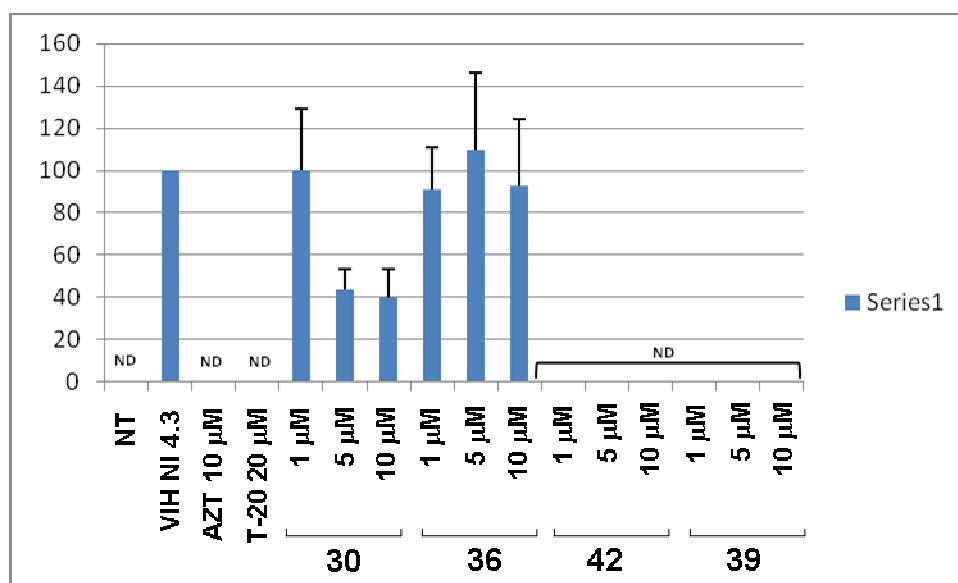


Figura V.10. Ensayo de inhibición de los dendrímeros **30**, **36**, **39**, **42** en pre-tratamiento en CMSP.

En el caso del postratamiento se procede primero a la infección con el VIH durante tres horas. Tras este tiempo, se lavan las células y se las trata con el dendrímero, dejándolas en condiciones de cultivo durante tres días, tras los cuales se recoge el sobrenadante y se procede a la cuantificación del antígeno p24 mediante un ensayo ELISA.

Los resultados de la Figura V.11 reflejan que tanto el dendrímero **30**, como el **36**, no muestran porcentajes de inhibición significativos. Si se incrementa la concentración de los dendrímeros hasta 10 μM tampoco es posible apreciar una disminución del grado de infección.

Por otra parte, los dendrímeros **39** y **42**, sí muestran capacidad antiviral. El dendrímero **42** con grupos sulfato en el exterior de la estructura muestra una capacidad viricida apreciable incluso a concentraciones bajas, obteniéndose una inhibición del 60%, a una concentración de 1 μM . Si la concentración aumenta hasta 5 μM ya no se detecta infección. El dendrímero **39** a la concentración de 1 μM es incluso más eficaz que el compuesto **42** y es capaz de reducir la infección hasta en un 80%. Si la concentración se aumenta hasta 5 μM el porcentaje de infección se reduce en un 90%. Por último, si se lleva la concentración hasta 10 μM . la infección no se detecta.

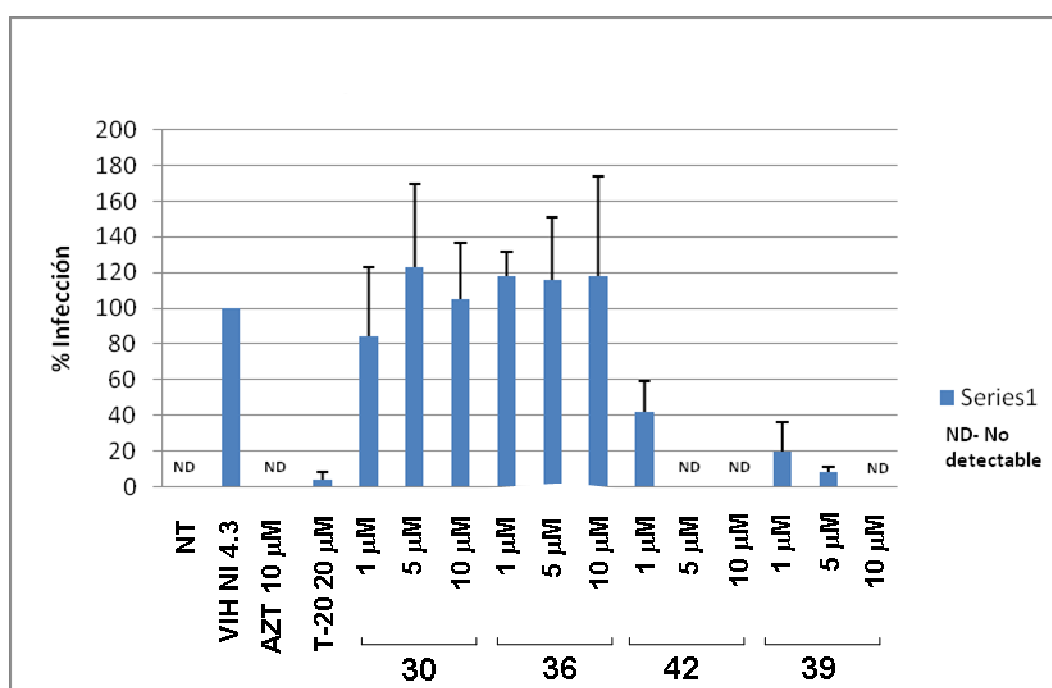


Figura V.11. Ensayo de inhibición de los dendrímeros de mayor generación sintetizados **30**, **36**, **39**, **42** en post-tratamiento en CMSP.

Debido a la actividad mostrada por los dendrímeros **39** y **42** se decidió analizar su potencial capacidad como microbicidas de estas estructuras mediante un ensayo de pretratamiento en CMSP con los dos dendrímeros de tipo naftilsulfonato (**38** y **39**) y con los dos dendrímeros de tipo sulfato de mayor generación (**41** y **42**) en un rango de concentraciones muy bajas, que oscilan de 0.25 a 1.5 μM , con el fin de establecer una curva dosis-respuesta y ver si se repite el fuerte efecto de inhibición.

En el caso de los dendrímeros de tipo sulfato se obtiene una curva de dosis-respuesta en la que se observa cómo el compuesto **41**, de segunda generación, es capaz de alcanzar una inhibición de aproximadamente un 50% a 1.25 μM , mientras que en el caso del compuesto de tercera generación, **42**, se alcanza una inhibición de un 90% a concentraciones de 1 μM , obteniéndose una eficacia similar a la de experimentos anteriores (Figura V.12). Este último dato está en concordancia con estudios realizados con polímeros donde estructuras con un mayor grado de sulfatación poseen mayor capacidad de inhibición.²⁶

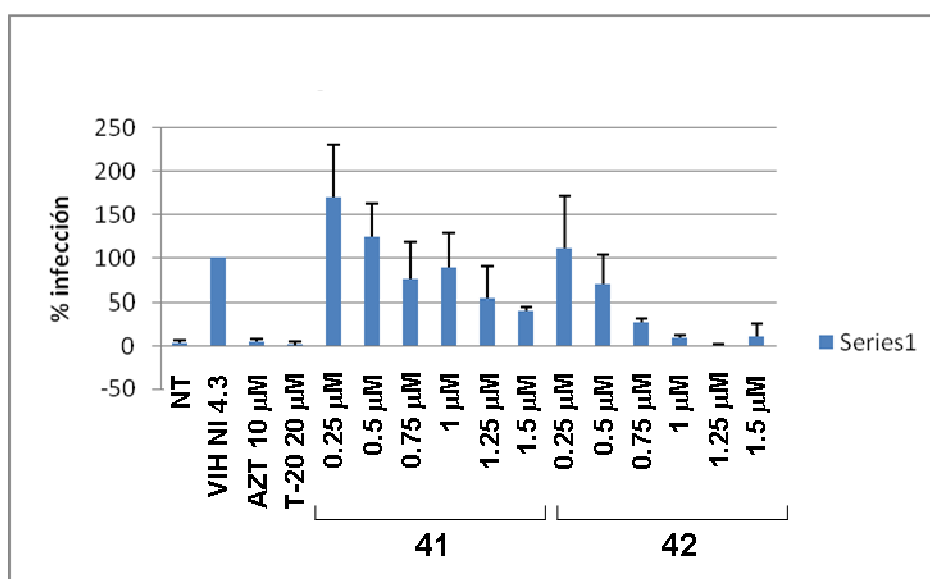


Figura V.12. Curva dosis-respuesta para los dendrímeros acabados en grupos sulfato, **41** y **42**.

En el caso de los derivados tipo naftilsulfonato (ver Figura V.13), se ve como a concentraciones tan bajas como 0.25 μM se obtiene una inhibición del 65-70% con el compuesto de primera generación **38**. Siendo aún mayor la inhibición obtenida a la misma concentración con el compuesto **39**, de segunda generación. A concentraciones de 1 μM , en ambos casos, se alcanza una inhibición del 90%.

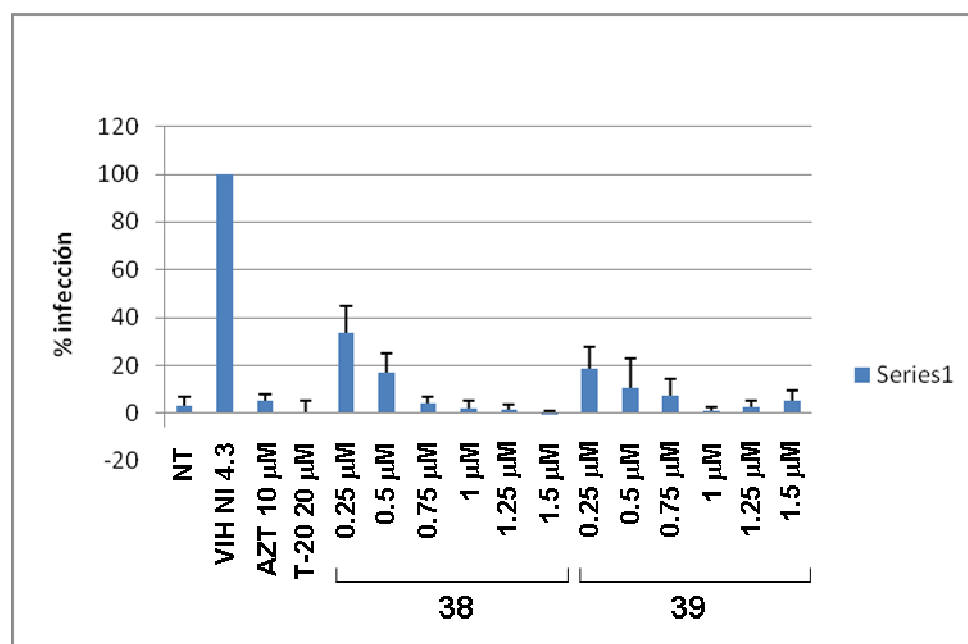


Figura V.13. Curva dosis-respuesta para los dendrímeros acabados en grupos naftilsulfonato, **38** y **39**.

A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que al aumentar la generación, en las familias de dendrímeros terminados en grupos sulfonato y sulfato, se observa un aumento gradual de su actividad antiVIH. Además, si se comparan los datos para los derivados **39**, con grupos naftilsulfonato en la periferia, y **41**, con grupos sulfato en la superficie, se puede concluir que los restos naftilsulfonato son más activos, a igual concentración, evitando la infección del VIH.

Teniendo en cuenta los resultados de inhibición contra el VIH obtenidos con los dendrímeros **30** y **36**, terminados en grupos carboxilato y fosfonato respectivamente, en pre- y post-tratamiento a las concentraciones ensayadas, se decidió realizar un nuevo ensayo a mayores concentraciones (Figura V.14), siempre dentro del rango de biocompatibilidad establecido, en linfocitos de sangre periférica (PBL en sus siglas en inglés) para establecer si la actividad antiviral mejoraba. Estos ensayos mostraron que, al igual que en los experimentos en CMSP, los dendrímeros con grupos carboxilato en la periferia de primera y segunda generación son más eficaces inhibiendo la infección por parte del virus que el dendrímero de tercera generación. A una concentración de 20 µM se consiguen inhibiciones de 95% para el derivado **28** y

del 90 para el derivado **29**, obteniéndose una actividad moderada del 50% para el compuesto **30**.

Los dendrímeros decorados con grupos fosfonato no mostraron ningún grado de inhibición en esta línea celular incluso a concentraciones elevadas (Figura V.14).

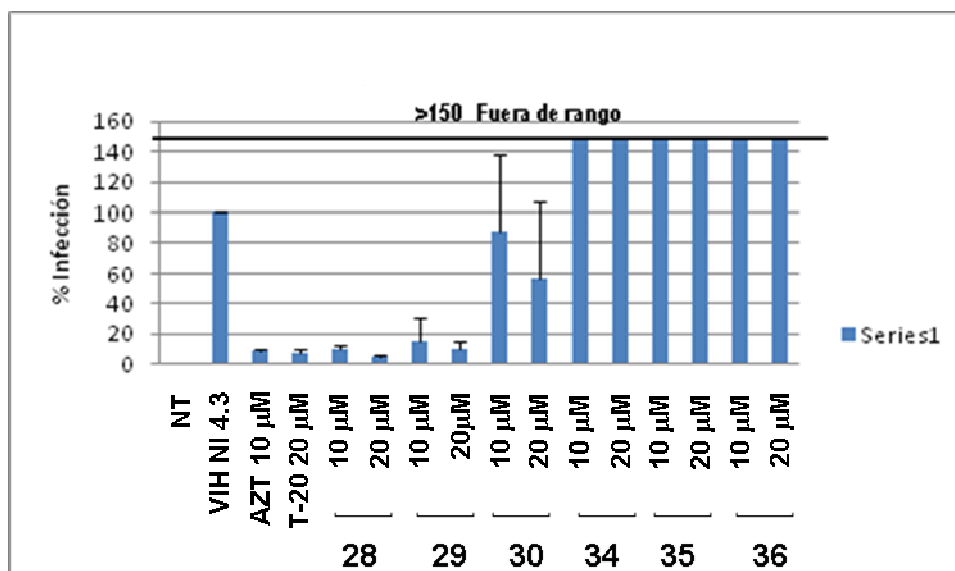


Figura V.14. Ensayo de inhibición de las familias de dendrímeros con grupos tipo carboxilato y fosfonato de primera a tercera generación en células PBL.

Como conclusión se puede decir que el carácter iónico de los dendrímeros parece estar relacionado con su capacidad antiviral. Así, los derivados tipo fosfonato poseen una menor capacidad antiviral que los carboxilatos, y éstos una menor capacidad que los naftilsulfonato y sulfato.

Este hecho puede relacionarse con la posibilidad de generar especies zwitteriónicas en los sistemas fosfonato y carboxilato al protonarse el nitrógeno situado en la parte externa de la estructura. Esta característica puede disminuir la presencia de la carga negativa efectiva en la superficie de estos dendrímeros. De este modo la menor exposición de una carga neta negativa explicaría también la menor actividad antiviral que se observa en estos sistemas.³³

Además, en un estudio teórico realizado con dendrímeros sintetizados en nuestro grupo de investigación se constataba que los dendrímeros terminados en

grupos carboxilato eran capaces de establecer interacciones de mayor fuerza con el contraión sodio que otros grupos aniónicos. Sin embargo, los grupos sulfonato mostraban la capacidad de disociarse de su contraión con mayor facilidad, lo que podría permitir que éstos se unieran más libremente a fragmentos catiónicos como los pertenecientes a la region V3 del VIH y por tanto su mayor actividad antiviral.⁴⁴

5.3 BIBLIOGRAFÍA

- ¹ WHO, www.who.int/entity/hiv/data/2010_globalreport_core_en.ppt, **2009**.
- ² P. Zhu, J. Liu, J. Bess, E. Chertova, J. D. Lifson, H. Grise, G. A. Ofek, K. A. Taylor and K. H. Roux, *Nature* **2006**, *441*, 847.
- ³ S. Sierra, B. Kupfer and R. Kaiser, *J. Clin. Virol.* **2005**, *34*, 233.
- ⁴ J. F. Berson, D. Long, B. J. Doranz, J. Rucker, F. R. Jirik and R. W. Doms, *J. Virol.* **1996**, *70*, 6288.
- ⁵ B. J. Doranz, Z. H. Lu, J. Rucker, T. Y. Zhang, M. Sharron, Y. H. Cen, Z. X. Wang, H. H. Guo, J. G. Du, M. A. Accaviti, R. W. Doms and S. C. Peiper, *J. Virol.* **1997**, *71*, 6305.
- ⁶ S. A. Gallo, C. M. Finnegan, M. Viard, Y. Raviv, A. Dimitrov, S. S. Rawat, A. Puri, S. Durell and R. Blumenthal, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2003**, *1614*, 36.
- ⁷ W. Pang, S.-C. Tam and Y.-T. Zheng, *Antiviral Chem. Chemother.* **2009**, *20*, 1.
- ⁸ M. Dettin, C. Scarinci, A. Pasquato and C. Di Bello, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2002**, *102*, 41.
- ⁹ B. M. Swarts and Z. Guo, *Carbohydr.-Based Vaccines Immunother.* **2009**, 167.
- ¹⁰ A. Pashov, S. Garimalla, B. Monzavi-Karbassi and T. Kieber-Emmons, *Immunotherapy* **2009**, *1*, 777.
- ¹¹ C. N. Scanlan, J. Offer, N. Zitzmann and R. A. Dwek, *Nature* **2007**, *446*, 1038.
- ¹² V. Pirrone, B. Wigdahl and F. C. Krebs, *Antiviral Res.* **2011**, *90*, 168.
- ¹³ M. Luscher-Mattli, *Antivir. Chem. Chemother.* **2000**, *11*, 249.
- ¹⁴ E. De Clercq, *Antiviral Res.* **1987**, *7*, 1.
- ¹⁵ R. Ueno and S. Kuno, *Lancet* **1987**, *2*, 796.
- ¹⁶ R. Ueno and S. Kuno, *Lancet* **1987**, *1*, 1379.
- ¹⁷ D. Schols, M. Baba, R. Pauwels and E. De Clercq, *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* **1989**, *2*, 10.
- ¹⁸ H. Mitsuya, D. J. Looney, S. Kuno, R. Ueno, F. Wong-Staal and S. Broder, *Science* **1988**, *240*, 646.
- ¹⁹ S. Bhat, S. L. Spitalnik, F. Gonzalez-Scarano and D. H. Silberberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 7131.
- ²⁰ C.-c. Huang, M. Tang, M.-Y. Zhang, S. Majeed, E. Montabana, R. L. Stanfield, D. S. Dimitrov, B. Korber, J. Sodroski, I. A. Wilson, R. Wyatt and P. D. Kwong, *Science* **2005**, *310*, 1025.
- ²¹ D. Batinic and F. A. Robey, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 6664.
- ²² M. Moulard, H. Lortat-Jacob, I. Mondor, G. Roca, R. Wyatt, J. Sodroski, L. Zhao, W. Olson, P. D. Kwong and Q. J. Sattentau, *J. Virol.* **2000**, *74*, 1948.
- ²³ S. Fletcher Patricia, S. Wallace Gregory, M. M. Mesquita Pedro and J. Shattock Robin, *Retrovirology* **2006**, *3*, 46.
- ²⁴ V. Pirrone, B. Wigdahl and F. C. Krebs, *Antiviral Res.* **2011**, *90*, 168.
- ²⁵ C. E. Hart and T. Evans-Strickfaden, *Entry Inhibitors in HIV Therapy* **2007**, 99.
- ²⁶ M. Witvrouw and E. De Clercq, *Gen. Pharmacol.* **1997**, *29*, 497.
- ²⁷ R. Roy, F. O. Andersson, G. Harms, S. Kelm and R. Schauer, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1551.
- ²⁸ G. B. Sigal, M. Mammen, G. Dahmann and G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3789.
- ²⁹ R. Roy, D. Zanini, S. J. Meunier and A. Romanowska, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 1869.

- ³⁰ M. Witvrouw, V. Fikkert, W. Pluymers, B. Matthews, K. Mardel, D. Schols, J. Raff, Z. Debysers, E. De Clercq, G. Holan and C. Pannecouque, *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 1100.
- ³¹ N. Bourne, L. R. Stanberry, E. R. Kern, G. Holan, B. Matthews and D. I. Bernstein, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 2471.
- ³² J. J. Landers, Z. Cao, I. Lee, L. T. Piehler, P. P. Myc, A. Myc, T. Hamouda, A. T. Galecki and J. R. Baker, Jr., *J. Infect. Dis.* **2002**, *186*, 1222.
- ³³ B. Rasines, *Tesis Doctoral, Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Alcalá* **2010**.
- ³⁴ A.-M. Caminade, C.-O. Turrin and J.-P. Majoral, *New J. Chem.* **2010**, *34*, 1512.
- ³⁵ A. Perez-Anes, G. Spataro, Y. Coppel, C. Moog, M. Blanzat, C.-O. Turrin, A.-M. Caminade, I. Rico-Lattes and J.-P. Majoral, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3491.
- ³⁶ J. M. Harouse, S. Bhat, S. L. Spitalnik, M. Laughlin, K. Stefano, D. H. Silberberg and F. Gonzalez-Scarano, *Science* **1991**, *253*, 320.
- ³⁷ R. D. Kensinger, B. J. Catalone, F. C. Krebs, B. Wigdahl and C.-L. Schengrund, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 1614.
- ³⁸ S. Han, Y. Dai, T. Kanamoto, H. Nakashima, T. Uryu and T. Yoshida, *Carbohydr. Polym.* **2010**, *80*, 1111.
- ³⁹ S. R. Abner, P. C. Guenther, J. Guarner, K. A. Hancock, J. E. Cummins, Jr., A. Fink, G. T. Gilmore, C. Staley, A. Ward, O. Ali, S. Binderow, S. Cohen, L. A. Grohskopf, L. Paxton, C. E. Hart and C. S. Dezzutti, *J. Infect. Dis.* **2005**, *192*, 1545.
- ⁴⁰ C. S. Dezzutti, V. N. James, A. Ramos, S. T. Sullivan, A. Siddig, T. J. Bush, L. A. Grohskopf, L. Paxton, S. Subbarao and C. E. Hart, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 3834.
- ⁴¹ Y.-H. Jiang, P. Emau, J. S. Cairns, L. Flanary, W. R. Morton, T. D. McCarthy and C.-C. Tsai, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **2005**, *21*, 207.
- ⁴² E. Gong, B. Matthews, T. McCarthy, J. Chu, G. Holan, J. Raff and S. Sacks, *Antiviral Res.* **2005**, *68*, 139.
- ⁴³ D. Hammache, O. Delezay, J. Fantini and N. Yahi, *Perspect. Drug Discovery Des.* **1996**, *5*, 225.
- ⁴⁴ B. Rasines, L. Chonco, J. Sánchez-Nieves, M. Maiolo, M. Maly, J. L. Jimenez, M. Á. Muñoz-Fernández, F. J. de la Mata and R. Gómez, resultados sin publicar.

Parte experimental

6.1 CONDICIONES GENERALES DE TRABAJO

Dada la sensibilidad a la humedad de algunas de los productos utilizados en este trabajo, las reacciones que conducen a su preparación fueron realizadas en condiciones de atmósfera inerte utilizando para ello técnicas de Schlenk en líneas de vacío/argón (argón de tipo UN-45 de Air-Liquide con cantidades de O₂ y H₂O menores de 3 ppm). Cuando la sensibilidad al aire o a la humedad de los productos manipulados era mayor, se empleó una caja seca MBraun, modelo MB150-GII (O₂ < 1ppm y H₂O < 0.1 ppm).

6.2. PRODUCTOS DE PARTIDA UTILIZADOS

Los disolventes empleados en las reacciones descritas en esta memoria, a excepción del MeOH y EtOH, que se emplearon sin tratamiento alguno, se secaron mediante un sistema de purificación de disolventes MB-SPS. En la Tabla VI.1 se reflejan los disolventes con los que se utilizaron otros métodos de purificación.

Disolvente	Desecante
CDCl ₃	CaH ₂
DMSO-d ₆	Tamiz molecular de 4 Å
DMF	Tamiz molecular de 4 Å

Tabla VI.1. Desecantes empleados en la purificación de disolventes.

En la siguiente tabla se reflejan los productos de partida, tanto dendrímeros como compuestos orgánicos, utilizados en la memoria junto a la referencia bibliográfica en la que se describe el método para su preparación (Tabla VI.2).

Compuesto	Referencia
G _n Cl _m	1
G _n H _m	1, 2
3,3'-(prop-2-inilazanodiiil)dipropanoato de dimetilo	3
(2-propinilazanodiiil) bis(metilen)difosfonato de tetrametilo	4
3-butinil sulfato sódico	5

Tabla VI.2. Métodos de preparación de los productos de partida utilizados.

En la Tabla VI.3 se recogen los productos de partida comerciales empleados, indicando la casa comercial que los suministra.

Compuesto	Casa comercial	Compuesto	Casa comercial
4-bromobuteno	Aldrich	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Panreac
NaN_3	Aldrich	Cat. Karstedt	Aldrich
NH_3	Panreac	Nal	Panreac
MgSO_4	Panreac	Mel	Aldrich
{[2(dimetilamino)etil]metilamino}etanol	Panreac	NaH	Aldrich
1-naftol-3,6-disulfonato sódico	Aldrich	Bromuro de propargilo	Aldrich
TMSBr	Aldrich	K_2CO_3	Aldrich
Ascorbato sódico	Aldrich	3-dimetilamino-1-propino	Aldrich
NaOH	Panreac	-	-

Tabla VI.3. Compuestos comerciales empleados.

6.3. TÉCNICAS INSTRUMENTALES

6.3.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS DENDRÍTICOS

i) Análisis elemental de C, H, N y S

Los análisis cuantitativos de C, H, N y S, se han realizado en el Centro de Apoyo a la Investigación en Química de la Universidad de Alcalá en los microanalizadores LECO CHNS-932.

ii) Espectroscopía de RMN

Los espectros de RMN se registraron en equipos Varian modelos Unity-500+, Unity-300, Mercury-300 o Gemini-200 del Centro de Apoyo a la Investigación en Química de la Universidad de Alcalá. Todos ellos se han realizado a temperatura ambiente (25°C). Los desplazamientos químicos (δ), se expresan en ppm tomando como referencia interna la señal residual de ^1H y ^{13}C de los disolventes deuterados, mientras que los desplazamientos químicos de ^{15}N se referencian respecto a CH_3NO_2

como referencia externa. Los espectros de RMN-²⁹Si se han registrado utilizando la referencia interna del espectrómetro.

iii) Espectrometría de masas

Los espectros de masas obtenidos por la técnica Maldi-TOF se llevaron a cabo en el Servicio Interdepartamental de Investigación (Sidl), en el área de espectrometría de masas de la Universidad Autónoma de Madrid. Las muestras se prepararon en una matriz de ditranol, ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) y en ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (ACC), cuando la muestra así lo requería. Los espectros se registraron en un espectrómetro Ultraflex III de Bruker equipado con un láser de nitrógeno que emite a 337 nm, operando en modo de reflexión con un voltaje acelerado en el rango de 23-25 kV.

6.3.2 ENSAYOS BIOMÉDICOS DE LOS DENDRÍMEROS EN APLICACIONES CONTRA EL CÁNCER

Los ensayos biomédicos con los dendrímeros para aplicaciones contra el cáncer fueron realizados en la Universidad de Navarra en el departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica en colaboración con el grupo dirigido por la Dr. Concepción Tros de Ilarduya. Las líneas celulares utilizadas fueron HepG2 (células de hepatocarcinoma humano) y HeLa (células de carcinoma cervical) y fueron obtenidas de Invitrogen Technologies (Reino Unido). El plásmido utilizado fue el pCMVLuc, obtenido a partir del crecimiento de bacterias *E. coli* modificadas. La preparación de los nanoconjugados dendrímero/ADN se llevó a cabo incubando ambos a temperatura ambiente durante quince minutos hasta una concentración final de 5 μ M variando las cantidades del dendrímero para conseguir distintas proporciones de carga. La determinación del tamaño y potencial ζ se midió por difracción de láser en un Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Reino Unido) por triplicado. Para la caracterización de la unión dendrímero/ADN se prepararon nanoconjugados dendrímero/ADN. Se depositó en gel de agarosa y se sometieron a electroforesis a un voltaje constante de 80 mV durante dos horas. Para los estudios de transfección sobre las líneas celulares previamente mencionadas, se incuban los nanosistemas dendrímero/ADN, más tarde se lisan las células y se mide tanto la cantidad de

luciferasa como de proteína total. Los experimentos de toxicidad se llevaron a cabo mediante el ensayo "Alamar Blue" que cuantifica la viabilidad celular mediante medidas de absorbancia de las células tratadas con el dendrímero.

6.3.3 ENSAYOS BIOMÉDICOS DE LOS DENDRÍMEROS PARA APLICACIONES ANTI-VIH

Los experimentos con los dendrímeros para aplicaciones contra el VIH se llevaron a cabo en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón en colaboración con el grupo de la Dra. M^a Ángeles Muñoz-Fernández. Las CMSP se obtuvieron de sangre de donantes sanos tras tratamiento para aislarlas. Las células Jurkat y SupT1 se obtuvieron de Biochrom KG Seromed, Berlín, Alemania y American Type Culture Collection y se incubaron de forma rutinaria para su crecimiento. La evaluación de la toxicidad de los dendrímeros se cuantificó mediante un experimento MTT. Se incubó el dendrímero con las distintas líneas celulares y posteriormente se añadió el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT, Sigma®), y a continuación el sobrenadante se trató y se midió la concentración de formazán por espectrofotometría. La capacidad de retención de ARNpi con los distintos dendrímeros se midió mediante electroforesis en gel de agarosa. Para ello se formaron nanocompuestos entre los dendrímeros y la cadena nucleica siNEF (5'-GUGCCUGGCUAGAAGCACAdTdT-3', marcado con cianina 3 (cy3) en el extremo 5' de la hebra sentido y el siNEF antisentido: 3'-UGUGCUUCUAGCCAGGCACdTdT-5') a distintas proporciones de carga y se corrieron a 90 V durante treinta minutos. Los geles se visualizaron con luz UV. Los ensayos de inhibición del VIH se llevaron a cabo con la cepa de VIH X4 VIH-1NL4-3, la expansión de los virus y la titulación de estos se llevaron a cabo por los métodos estándar. La medida de la infección en células fue evaluada del siguiente modo, previamente se infectaron las células incubando el virus junto a ellas y se lavan, eliminando aquellos virus no integrados en el genoma celular. A continuación, se añaden los nanocompuestos dendrímero/siNEF, trascurrido el tiempo de incubación se recoge el sobrenadante para cuantificar antígeno p24 por ELISA.

6.3.4 ENSAYOS BIOMÉDICOS DE LOS DENDRÍMEROS PARA APLICACIONES COMO ANTIBACTERIANOS

Los experimentos como antibacterianos fueron llevados a cabo en el departamento de microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Alcalá en colaboración con el grupo de los Dres. José Luis Copa-Patiño y Juan Soliveri. La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) tras incubar las bacterias con los dendrímeros el tiempo requerido. Para los ensayos se utilizaron las bacterias *Escherichia coli* (Gram-) y *Staphylococcus aureus* (Gram+). Ambas cepas fueron proporcionadas por la “Colección Española de Cultivos Tipo” (CECT).

6.4. DESCRIPCIÓN DE LAS PREPARACIONES

G₀[(CH₂)₄N₃] (1)

En una ampolla de vidrio se disuelven 1.09 g de (bromobutil)trimetilsilano (4.33 mmol) en DMF (30 ml), a continuación se añaden 1.41 g de azida sódica (21.65 mmol) y una punta de espátula de ioduro sódico. La mezcla se calienta a 90 °C durante 16 horas. A continuación, se deja enfriar a temperatura ambiente y la mezcla se concentra a sequedad. El residuo resultante se disuelve en diclorometano (30 ml) y se lava con agua destilada (15 ml). La fase orgánica se seca sobre MgSO₄, y se concentra a vacío obteniéndose el producto final como un aceite amarillento (0.74 g, 80%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 3.24 (2H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃), 1.60 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃), 1.35 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 0.91 (9H, t, SiCH₂CH₃), 0.50 (8H, m, SiCH₂CH₃ y SiCH₂).

RMN-¹³C{¹H} (CDCl₃): δ 51.0 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃), 32.8 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃), 21.1 (SiCH₂CH₂), 10.9 (SiCH₂), 7.4 (SiCH₂CH₃), 3.2 (SiCH₂CH₃).

Análisis Elemental: C₁₀H₂₃N₃Si; calculado %: C, 56.28; H, 10.86; N, 19.69; encontrado %: C, 56.07; H, 10.61; N, 16.96.

G₁[(CH₂)₄Br]₄ (2)

En una ampolla de vidrio se disuelven 1.52 g del dendrímero G₁(H)₄ (3.52 mmol) en hexano (5 ml) y se le añaden 1.61 ml de 4-bromobuteno (15.85 mmol). A continuación, se adicionan 5 gotas de una disolución del catalizador de Karstedt en poli(dimetilsiloxano) y se agita vigorosamente durante 5 días a 60 °C. Transcurrido este tiempo, la reacción se deja enfriar y se concentra a sequedad. Seguidamente el residuo se redissuelve en diclorometano y se filtra por carbón activo y celite y se elimina el disolvente para dar un sólido aceitoso de color blanco (2.32 g, 68%) que se identifica como **2**.

RMN-¹H (CDCl₃): δ 3.40 (8H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂Br), 1.85 (8H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂Br), 1.37 (16H, m, SiCH₂CH₂), 0.51 (24H, m, SiCH₂), -0.05 (24H, s, Si(CH₃)₂).

RMN-¹³C{¹H} (CDCl₃): δ 36.4 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂Br), 33.7 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂Br), 22.5 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂Br), 20.2 (SiCH₂), 18.6 (SiCH₂), 17.6 (SiCH₂), 14.5 (SiCH₂), -3.3 (Si(CH₃)₂).

RMN-²⁹Si (CDCl₃): δ 1.9 (Si(CH₃)₂).

Análisis Elemental: C₃₆H₈₀Br₄Si₅; calculado %: C, 44.44; H, 8.29; encontrado %: C, 44.24; H, 8.18.

G₂[(CH₂)₄Br]₈ (3)

Seguendo un procedimiento similar para la síntesis de **2** se prepara el compuesto **3**, a partir de G₂(H)₈ (0.38 g, 3.18 mmol), 4-bromobuteno (0.28 ml, 2.7 mmol) y 2 gotas del catalizador de Karstedt todo ello disuelto en hexano (10 ml). La mezcla se agita vigorosamente durante 16 horas a 60 °C. Por último, se realiza un proceso de purificación similar al llevado a cabo en el derivado **2**, obteniéndose un sólido aceitoso (0.61 g, 83%) que se identifica como **3**.

RMN-¹H (CDCl₃): δ 3.40 (16H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂Br), 1.85 (16H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂Br), 1.31 (40H, m, SiCH₂CH₂), 0.53 (64H, m, SiCH₂), -0.05 (48H, s, Si(CH₃)₂), -0.09 (12H, s, SiCH₃).

RMN-¹³C{¹H} (CDCl₃): δ 36.8 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂Br), 34.0 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂Br), 22.93 (SiCH₂CH₂), 20.5(SiCH₂CH₂), 19.6 (SiCH₂CH₂), 19.3 (SiCH₂), 19.1 (SiCH₂), 18.9 (SiCH₂), 18.2 (SiCH₂), 14.9 (SiCH₂), -2.8 (Si(CH₃)₂), -4.5 (SiCH₃).

RMN-²⁹Si (CDCl₃): δ 1.7 (Si(CH₃)₂), 1.0 (SiCH₃).

Análisis Elemental: C₈₈H₁₉₆Br₈Si₁₃; calculado %: C, 46.79; H, 8.75; encontrado %: C, 46.51; H, 8.75.

G₃[(CH₂)₄Br]₁₆ (4)

Para la preparación de **4** se siguen las mismas condiciones que para la síntesis del derivado de primera generación **2**, a partir de G₃(H)₁₆ (0.81 g, 0.31 mmol) y 4-bromobuteno (0.51 ml, 5.04 mmol), todo disuelto en hexano (20 ml) y 2 gotas del catalizador de Karstedt. La mezcla se agita vigorosamente durante 16 horas a 60 °C.

Por último, se realiza un proceso de purificación similar al llevado a cabo en el derivado **2**, obteniéndose un sólido aceitoso (1.27 g, 86%) que se identifica como **4**.

RMN-¹H (CDCl₃): δ 3.40 (32H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂Br), 1.85 (32H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂Br), 1.30 (88H, m, SiCH₂CH₂), 0.53 (144H, m, SiCH₂), -0.05 (96H, s, Si(CH₃)₂), -0.09 (36H, s, SiCH₃).

RMN-¹³C{¹H} (CDCl₃): δ 36.4 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂Br), 33.6 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂Br), 22.5 (SiCH₂CH₂), 20.1 (SiCH₂CH₂), 19.0-14.5 (SiCH₂), -3.3 (Si(CH₃)₂), -4.8 (SiCH₃).

RMN-²⁹Si (CDCl₃): δ 2.0 (Si(CH₃)₂), 1.1 (SiCH₃).

Análisis elemental: C₁₉₂H₄₂₈Br₁₆Si₂₉; calculado %: C, 47.74; H, 8.93; encontrado %: C, 48.62; H, 9.00.

G₁[(CH₂)₄N₃]₄ (**5**)

Siguiendo el procedimiento sintético que conduce a **1**, se prepara el dendrímero G₁[(CH₂)₄N₃]₄. En una ampolla de vidrio se disuelven 0.5 g del derivado bromado de partida **2** (0.52 mmol) en DMF (20 ml), a continuación se añaden 0.34 g de azida sódica (5.16 mmol) y una punta de espátula de ioduro sódico. La mezcla se calienta a 90 °C durante 16 horas. Transcurrido el tiempo de reacción, se deja enfriar a temperatura ambiente y la mezcla se concentra a sequedad. Por último, se realiza un proceso de purificación similar al llevado a cabo en el derivado **1**, obteniéndose **5** como un aceite amarillento (0.35 g, 81%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 3.24 (8H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃), 1.60 (8H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃), 1.35 (16H, m, SiCH₂CH₂), 0.52 (24H, m, SiCH₂), -0.06 (24H, s, Si(CH₃)₂).

RMN-¹³C{¹H} (CDCl₃): δ 51.1 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃), 32.6 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃), 21.1 (SiCH₂CH₂), 20.2 (SiCH₂CH₂), 18.6 (SiCH₂), 17.5 (SiCH₂), 15.0 (SiCH₂), -3.3 (Si(CH₃)₂).

RMN-²⁹Si (CDCl₃): δ 1.8 (Si(CH₃)₂).

Análisis elemental: C₃₆H₈₀N₁₂Si₅; calculado %: C, 52.63; H, 9.82; N, 20.46; encontrado %: C, 52.94; H, 9.28; N, 19.88.

G₂[(CH₂)₄N₃]₈ (6)

Para preparar el dendrímero G₂[(CH₂)₄N₃]₈ a partir de G₂-[(CH₂)₄Br]₈ se sigue una metodología sintética análoga a la preparación de **1**. En 30 ml de DMF se suspenden el derivado **3** (1.00 g, 0.44 mmol), la azida sódica (0.43 g, 6.64 mmol) y una punta de espátula de ioduro sódico. Por último, se realiza un proceso de purificación similar al llevado a cabo en el derivado **1**. Una vez purificado se obtiene el producto final **6** como un aceite amarillento (0.67 g, 78%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 3.24 (16H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃), 1.60 (16H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃), 1.29 (40H, m, SiCH₂CH₂), 0.51 (64H, m, SiCH₂), -0.06 (48H, s, Si(CH₃)₂), -0.10 (12H, s, SiCH₃).

RMN-¹³C{¹H} (CDCl₃): δ 51.1 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃), 32.6 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃), 21.2 (SiCH₂CH₂), 20.5 (SiCH₂CH₂), 19.2 (SiCH₂CH₂), 18.8 (SiCH₂), 18.6 (SiCH₂), 18.5 (SiCH₂), 17.7 (SiCH₂), 15.0 (SiCH₂), -3.3 (Si(CH₃)₂), -4.9 (SiCH₃).

RMN-²⁹Si (CDCl₃): δ 1.7 (Si(CH₃)₂), 1.0 (SiCH₃).

Análisis elemental: C₈₈H₁₉₆N₂₄Si₁₃; calculado %: C, 54.04; H, 10.10; N, 17.19; encontrado %: C, 55.35; H, 9.72; N, 16.96.

G₃[(CH₂)₄N₃]₁₆ (7)

Para preparar G₃[(CH₂)₄N₃]₁₆ se sigue el método previamente usado en la síntesis de **1**. Se suspenden el bromoderivado de partida **4** (1.82 g, 0.38 mmol), la azida sódica (0.50 g, 7.70 mmol) y una punta de espátula de ioduro sódico en DMF (30 ml). La mezcla se calienta a 90 °C durante 16 horas. Transcurrido ese tiempo la disolución resultante se deja enfriar a temperatura ambiente. Por último, se realiza un proceso de purificación similar al llevado a cabo en el derivado **1**, obteniéndose el producto final **7** como un aceite amarillento (1.33 g, 82%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 3.24 (32H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃), 1.60 (32H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃), 1.32 (88H, m, SiCH₂CH₂), 0.54 (144H, m, SiCH₂), -0.05 (96H, s, Si(CH₃)₂), -0.09 (36H, s, SiCH₃).

RMN-¹³C{¹H} (CDCl₃): δ 51.1 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃), 32.6 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃), 21.2 (SiCH₂CH₂), 20.0 (SiCH₂CH₂), 19.0-17.5 (SiCH₂) 15.0 (SiCH₂), -3.3 (Si(CH₃)₂), -4.9 (SiCH₃).

RMN-²⁹Si (CDCl₃): δ 1.7 (Si(CH₃)₂), 1.1 (SiCH₃).

Análisis elemental: C₁₉₂H₄₂₈N₄₈Si₂₉; calculado %: C, 54.59; H, 10.21; N, 15.92; encontrado %: C, 56.08; H, 10.14; N, 14.84.

G₀[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂NMe₂] (8)

En un schlenk se disuelven 0.10 g (0.47 mmol) de la azida de partida **1** en 5 ml de THF y se añaden 0.06 ml (0.56 mmol) de N,N-dimetilpropargilamina. A continuación, se añaden dos disoluciones recién preparadas de ascorbato sódico (0.01 g, 0.06 mmol) en 1 ml de agua destilada y de CuSO₄·5H₂O (0.01 g, 0.02 mmol) en 0.5 ml de agua destilada. La mezcla resultante se deja agitar a temperatura ambiente. Transcurridas 4 horas, la reacción se interrumpe añadiendo 0.5 ml de una disolución al 23% de hidróxido amónico y se deja agitar durante 15 minutos. La mezcla se extrae con acetato de etilo (3 x 5 ml), las fases orgánicas se juntan, se lavan con una disolución saturada de cloruro sódico (10 ml) y se secan sobre MgSO₄. A continuación, la suspensión resultante se filtra y el disolvente se elimina a vacío para obtener **8** como un aceite amarillo (0.10 g, 73%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 7.45 (1H, s, NCHCN), 4.33 (2H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3.61 (2H, s, CCH₂N), 2.27 (6H, s, N(CH₃)₂), 1.90 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.29 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 0.88 (9H, t, SiCH₂CH₃), 0.47 (8H, m, SiCH₂CH₃ y SiCH₂).

RMN-¹³C{¹H} (CDCl₃): δ 145.0 (NCHCN), 121.9 (NCHCN), 54.3 (CCH₂N), 49.7 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 45.0 (N(CH₃)₂), 34.0 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 20.7 (SiCH₂CH₂), 10.7 (SiCH₂), 7.2 (SiCH₂CH₃), 3.0 (SiCH₂CH₃).

Análisis Elemental: C₁₅H₃₂N₄Si; calculado %: C, 60.76; H, 10.88; N, 18.99; encontrado %: C, 60.66; H, 11.15; N, 18.50.

G₁[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂NMe₂]₄ (9)

La preparación del dendrímero de 1^a generación G₁[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂NMe₂]₄ se realiza de un modo similar a la síntesis descrita para **8**. En un schlenk se disuelven el derivado azida **5** (0.30 g, 0.37 mmol) y N,N-dimetilpropargilamina (0.17 ml, 1.61 mmol) en 20 ml de THF. A esta mezcla se añaden una disolución recién preparada de ascorbato sódico (0.03 g 0.18 mmol) en 2 ml de agua destilada y otra disolución recién preparada de CuSO₄·5H₂O (0.02 g, 0.07 mmol) en 1 ml de agua destilada y se deja agitar a temperatura ambiente. Transcurridas 15 horas, la reacción se interrumpe añadiendo hidróxido amónico. Por último, se realiza un proceso de purificación similar al llevado a cabo en el derivado **8**, obteniéndose **9** como un aceite amarillo (0.38 g, 91%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 7.41 (4H, s, NCHCN), 4.28 (8H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3.55 (8H, s, CCH₂N), 2.21 (24H, s, N(CH₃)₂), 1.85 (8H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.25 (16H, m, SiCH₂CH₂), 0.49 (24, m, SiCH₂), -0.13 (24H, s, Si(CH₃)₂).

RMN-¹³C{¹H} (CDCl₃): δ 145.0 (NCHCN), 122.0 (NCHCN), 54.4 (CCH₂N), 49.8 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 45.1 (N(CH₃)₂), 33.9 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N) 20.8-14.7 (SiCH₂CH₂ y SiCH₂), -3.5 (Si(CH₃)₂).

RMN-²⁹Si (CDCl₃): δ 1.9 (Si(CH₃)₂).

Análisis elemental: C₅₆H₁₁₆N₁₆Si₅; calculado %: C, 58.28; H, 10.13; N, 19.42; encontrado %: C, 58.07; H, 10.61; N, 18.96.

G₂[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂NMe₂]₈ (10)

Siguiendo la metodología previamente expuesta en la síntesis de **8** se prepara el compuesto G₂[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂NMe₂]₈. En un schlenk se disuelven el derivado azida **6** (0.30 g, 0.15 mmol) y N,N-dimetilpropargilamina (0.14 ml, 1.29 mmol) en 20 ml de THF. A esta mezcla se añaden una disolución recién preparada de ascorbato sódico (0.03 g 0.15 mmol) en 1.5 ml de agua destilada y otra disolución recién preparada de CuSO₄·5H₂O (0.02 g, 0.06 mmol) en 1 ml de agua destilada y se agita a temperatura ambiente. Transcurridas 14 horas, la reacción se interrumpe añadiendo hidróxido amónico. Por último, se realiza un proceso de purificación similar al llevado a cabo en el derivado **8**, obteniéndose **10** como un aceite amarillo (0.35 g, 86%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 7.39 (8H, s, NCHCN), 4.26 (16H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3.52 (16H, s, CCH₂N), 2.19 (48H, s, N(CH₃)₂), 1.83 (16H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.21 (40H, m, SiCH₂CH₂), 0.46 (64H, m, SiCH₂), -0.15 (60, s, Si(CH₃)₂ y SiCH₃).

RMN-¹³C{¹H} (CDCl₃): δ 145.0 (NCHCN), 121.9 (NCHCN), 54.3 (CCH₂N), 49.7 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 45.0 (N(CH₃)₂), 33.8 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N) 20.8-14.7 (SiCH₂CH₂ y SiCH₂), -3.5 (Si(CH₃)₂), -5.2 (SiCH₃).

RMN-²⁹Si (CDCl₃): δ 1.8 (Si(CH₃)₂), 0.9 (SiCH₃).

Análisis elemental: C₁₂₈H₂₆₈N₃₂Si₁₃; calculado %: C, 58.66; H, 10.31; N, 17.10; encontrado %: C, 58.50; H, 10.67; N, 16.32.

G₃[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂NMe₂]₁₆ (11)

La preparación del dendrímero G₃[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂NMe₂]₁₆ se realiza de un modo similar a la síntesis de **8**. En un schlenk se disuelven el derivado azida **7** (0.30 g, 0.07 mmol) y N,N-dimetilpropargilamina (0.13 ml, 1.21 mmol) en 30 ml de THF. A esta mezcla se añaden una disolución recién preparada de ascorbato sódico (0.03 g, 0.14 mmol) en 1.5 ml de agua destilada y otra disolución recién preparada de CuSO₄·5H₂O (0.01 g, 0.06 mmol) en 1 ml de agua destilada y se deja agitar a temperatura ambiente. Transcurridas 15 horas, la reacción se interrumpe añadiendo hidróxido amónico. Por último, se realiza un proceso de purificación similar al llevado a cabo en el derivado **8**, para obtener **11** como un aceite amarillo (0.25 g, 64%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 7.42 (16H, s, NCHCN), 4.27 (32H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3.54 (32H, s, CCH₂N), 2.20 (96H, s, N(CH₃)₂), 1.84 (32H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.22 (88H, m, SiCH₂CH₂), 0.47 (144 H, m, SiCH₂), -0.14 (132H, s, Si(CH₃)₂ y SiCH₃).

RMN-¹³C{¹H} (CDCl₃): δ 144.9 (NCHCN), 122.0 (NCHCN), 54.3 (CH₂N), 49.8 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 45.0 (N(CH₃)₂), 33.9 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 20.8-14.7 (SiCH₂CH₂ y SiCH₂), -3.5 (Si(CH₃)₂), -5.1 (SiCH₃).

RMN-²⁹Si (CDCl₃): δ 1.7 (Si(CH₃)₂), 0.9 (SiCH₃).

Análisis elemental: C₂₇₂H₅₇₂N₆₄Si₂₉; calculado %: C, 54.59; H, 10.21; N, 15.92; encontrado %: C, 56.54; H, 10.41; N, 13.99.

N',N',N''-trimetil-N''-(2-(prop-2-iniloxi)etil)etano-1,2-diamina (12)

A 0.65 g (16.32 mmol) de hidruro sódico al 60% se le añaden 10 ml de hexano, la mezcla se filtra y se le añaden 50 ml de THF al sólido. La suspensión se enfría a -30 °C y se añaden 2.21 ml (13.6 mmol) de 2-[[2(dimetilamino)etil]metilamino]etanol gota a gota. Transcurridas 3 horas se acopla un embudo de adición al schlenk y se transfieren 1.8 ml (16.32 mmol) de bromuro de propargilo al 80% en tolueno, disueltos en 16 ml de THF. A continuación, se añade la disolución lentamente a la suspensión. y se agita durante 16 horas a temperatura ambiente. La reacción se interrumpe añadiendo gota a gota una disolución saturada de cloruro amónico hasta que no se observe desprendimiento de hidrógeno. La mezcla se extrae con acetato de etilo (3 x 50 ml), las fases orgánicas se juntan y se lavan con 100 ml de una disolución saturada de cloruro sódico. La fase orgánica se seca sobre MgSO₄ y se filtra. Por último, se elimina el disolvente a vacío, obteniendo un aceite amarillo oscuro (1.27 g, 51%) que se identifica como **12**.

RMN-¹H (CDCl₃): δ 4.14 (2H, d, CCH₂O), 3.62 (2H, t, NCH₂CH₂O), 2.60 (2H, t, NCH₂CH₂O), 2.51 y 2.40 (5H, m, CH₂CH₂N y CCH), 2.28 (3H, s, NCH₃), 2.22 (6H, s, N(CH₃)₂).

RMN-¹³C{¹H} (CDCl₃): δ 79.6 (CCH), 74.2 (CCH), 67.6 (NCH₂CH₂O), 58.0 (NCCH₂O), 57.2 (NCH₂CH₂O), 56.9 (NCH₂CH₂N), 55.7 (NCH₂CH₂N), 45.7 (N(CH₃)₂), 42.8 (NCH₃).

Análisis elemental: C₁₀H₂₀N₂O; calculado %: C, 65.18; H, 10.94; N, 15.20; encontrado %: C, 64.32; H, 10.56; N, 14.81.

G₀[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂O(CH₂)₂NMe(CH₂)₂NMe₂] (13)

De modo análogo a la preparación de **8** se sintetiza este modelo denominado de generación cero, G₀[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂O(CH₂)₂NMe(CH₂)₂NMe₂]. En un schlenk se disuelven el derivado azida **1** (0.30 g, 1.41 mmol) y N,N,N'-trimetil-N''-(2-(prop-2-iniloxi)etil)etano-1,2-diamina (0.26 g, 1.41 mmol) en 30 ml de THF. A esta mezcla se añaden una disolución recién preparada de ascorbato sódico (0.03 g, 0.17 mmol) en 1.5 ml de agua destilada y otra disolución recién preparada de CuSO₄·5H₂O (0.02 g, 0.07 mmol) en 1 ml de agua destilada y se deja agitar a temperatura ambiente. Transcurridas 16 horas, la reacción se interrumpe añadiendo 2 ml de una disolución al

23% de hidróxido amónico y se deja agitar durante 15 minutos. Por último, se realiza un proceso de purificación similar al llevado a cabo en el derivado **8**, obteniéndose **13** como un aceite amarillo (0.25 g, 64%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 7.50 (1H, s, NCHCN), 4.63 (2H, s, CCH₂O), 4.32 (2H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3.61 (2H, t, OCH₂CH₂N), 2.61 (2H, t, OCH₂CH₂N), 2.50 y 2.37 (4H, m, NCH₂CH₂N), 2.26 (3H, s, NCH₃), 2.21 (6H, s, N(CH₃)₂), 1.90 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.32 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 0.89 (9H, t, SiCH₂CH₃), 0.48 (8H, m, SiCH₂CH₃ y SiCH₂).

RMN-¹³C{¹H} (CDCl₃): δ 144.7 (NCHCN), 122.1 (NCHCN), 68.1 (OCH₂CH₂N), 64.3 (CCH₂O), 56.9 (OCH₂CH₂N), 56.5 (NCH₂CH₂N), 55.0 (NCH₂CH₂N), 49.6 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 45.1 (N(CH₃)₂), 42.7 (NCH₃), 34.0 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 20.7 (SiCH₂CH₂), 10.6 (SiCH₂), 7.2 (SiCH₂CH₃), 3.0 (SiCH₂CH₃).

Análisis elemental: C₂₀H₄₃N₅OSi; calculado %: C, 60.40; H, 10.90; N, 17.61; encontrado %: C, 59.66; H, 10.17; N, 17.44.

G₁[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂O(CH₂)₂NMe (CH₂)₂NMe₂]₄ (14**)**

Siguiendo la metodología previamente expuesta en la síntesis de **13** se prepara el compuesto **14**. En un schlenk se disuelven el derivado azida **5** (0.30 g, 0.36 mmol) y N,N,N'-trimetil-N'-(2-(prop-2-iniloxi)etil)etano-1,2-diamina (0.27 g, 1.46 mmol) en 30 ml de THF. A esta mezcla se añaden una disolución recién preparada de ascorbato sódico (0.04 g, 0.17 mmol) en 1.5 ml de agua destilada y otra disolución recién preparada de CuSO₄·5H₂O (0.02 g, 0.07 mmol) en 1 ml de agua destilada y se deja agitar a temperatura ambiente. Transcurridas 14 horas, la reacción se interrumpe añadiendo 1 ml de una disolución al 23% de hidróxido amónico y se deja agitar durante 15 minutos. Seguidamente, se realiza una extracción con acetato de etilo (3 x 15 ml) y se lleva a cabo una cromatografía de exclusión de tamaños (Bio-Beads S-X1) con tolueno como eluyente para eliminar los restos de amina que pudieran quedar sin reaccionar. A continuación, se concentra a vacío para obtener un aceite amarillo (0.47 g, 91%) que se identifica como **14**.

RMN-¹H (CDCl₃): δ 7.51 (8H, s, NCHCN), 4.63 (8H, s, CCH₂O), 4.31 (8H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3.61 (8H, t, OCH₂CH₂N), 2.61 (8H, t, OCH₂CH₂N), 2.52 y 2.40

(16H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.26 (12H, s, NCH_3), 2.23 (24H, s, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 1.90 (8H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1.28 (16H, m, SiCH_2CH_2), 0.52 (24H, m, SiCH_2), 0.08 (24H, s, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

RMN- $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3): δ 144.9 (NCHCN), 122.2 (NCHCN), 68.3 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 64.4 (CCH_2O), 57.1 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 57.0 y 55.6 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$) 55.6, 49.8 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 45.6 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 42.9 (NCH_3), 33.9 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 20.9-14.8 (SiCH_2 y SiCH_2CH_2), -3.5 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

RMN- ^{29}Si (CDCl_3): δ 2.0 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

Análisis elemental: $\text{C}_{76}\text{H}_{160}\text{N}_{20}\text{O}_4\text{Si}_5$; calculado %: C, 58.56; H, 10.35; N, 17.97; encontrado %: C, 58.07; H, 10.61; N, 16.96.

$\text{G}_2[(\text{CH}_2)_4(\text{C}_2\text{HN}_3)\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{NMe}(\text{CH}_2)_2\text{NMe}_2]_8$ (15)

La preparación de $\text{G}_2[(\text{CH}_2)_4(\text{C}_2\text{HN}_3)\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{NMe}(\text{CH}_2)_2\text{NMe}_2]_8$ se realiza de un modo similar al descrito para el derivado de **14**. En un schlenk se disuelven el derivado azida **6** (0.30 g, 0.15 mmol) y N,N,N'-trimetil-N'-(2-(prop-2-iniloxi)etil)etano-1,2-diamina (0.23 g, 1.22 mmol) en 30 ml de THF. A esta mezcla se añaden una disolución recién preparada de ascorbato sódico (0.03 g, 0.15 mmol) en 1.5 ml de agua destilada y otra disolución recién preparada de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.02 g, 0.06 mmol) en 1 ml de agua destilada y se deja agitar a temperatura ambiente. Transcurridas 14 horas la reacción se interrumpe añadiendo hidróxido amónico. Por último, se realiza un proceso de purificación similar al llevado a cabo en el derivado **14** obteniéndose un aceite amarillo (0.35 g, 86%) que se identifica como **15**.

RMN- ^1H (CDCl_3): δ 7.51 (8H, s, NCHCN), 4.62 (16H, s, CCH_2O), 4.31 (16H, t, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.61 (16H, t, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.61 (16H, t, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.50 y 2.37 (32H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.26 (24H, s, NCH_3), 2.21 (48H, s, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 1.90 (16H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1.28 (40H, m, SiCH_2CH_2), 0.53 (64H, m, SiCH_2), -0.08 (48H, s, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), -0.10 (12H, s, SiCH_3).

RMN- $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3): δ 144.9 (NCHCN), 122.0 (NCHCN), 68.3 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 64.4 (CCH_2O), 57.1 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 57.0 y 56.0 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 49.7 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 45.6 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 42.8 (NCH_3), 33.8 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 20.8-14.7 (SiCH_2 y SiCH_2CH_2), -3.3 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), -5.0 (SiCH_3).

RMN- ^{29}Si (CDCl_3): δ 1.7 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.6 (SiCH_3).

Análisis elemental: C₁₆₈H₃₅₆N₄₀O₈Si₁₃; calculado %: C, 58.83; H, 10.46; N, 16.33; encontrado %: C, 57.61; H, 10.42; N, 15.29.

G₃[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂O(CH₂)₂NMe(CH₂)₂NMe₂]₁₆ (16)

Para la síntesis de **16** se sigue un esquema similar al desarrollado para la preparación **14**. En un schlenk se disuelven el derivado azida **7** (0.20 g, 0.05 mmol) y N,N,N'-trimetil-N'-(2-(prop-2-iniloxi)etil)etano-1,2-diamina (0.14 g, 0.76 mmol) en 30 ml de THF. A esta mezcla se añaden una disolución recién preparada de ascorbato sódico (0.02 g, 0.09 mmol) en 1 ml de agua destilada y otra disolución recién preparada de CuSO₄·5H₂O (0.02 g, 0.09 mmol) en 0.5 ml de agua destilada y se deja agitar a temperatura ambiente. Transcurridas 18 horas, la reacción se interrumpe añadiendo hidróxido amónico. Por último, se realiza un proceso de purificación similar al llevado a cabo en el derivado **14**, obteniéndose un aceite amarillo (0.16 g, 46%) que se identifica como **16**.

RMN-¹H (CDCl₃): δ 7.45 (16H, s, NCHCN), 4.55 (32H, s, CCH₂O), 4.24 (32H, t, CH₂CH₂N), 3.54 (32H, t, OCH₂CH₂N), 2.54 (32H, t, OCH₂CH₂N), 2.50 y 2.37 (64H, m, NCH₂CH₂N), 2.20 (48H, s, NCH₃), 2.15 (96H, s, N(CH₃)₂), 1.82 (32H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.28 (88H, m, SiCH₂CH₂), 0.54 (144H, m, Si CH₂), -0.09 (96H, s, (SiCH₃)₂), -0.11 (36H, s, SiCH₃).

RMN-¹³C{¹H} (CDCl₃): δ 144.9 (NCHCN), 122.0 (NCHCN), 68.3 (OCH₂CH₂N), 64.4 (CCH₂O), 57.1 (OCH₂CH₂N), 57.0 (NCH₂CH₂N), 55.7 (NCH₂CH₂N), 50.0 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 45.7 (N(CH₃)₂), 42.9 (NCH₃), 33.9 (CH₂CH₂N), 20.8-14.7 (SiCH₂ y SiCH₂CH₂), -3.5 (Si(CH₃)₂), -5.1 (SiCH₃).

RMN-²⁹Si (CDCl₃): δ 1.9 (Si(CH₃)₂), 1.0 (SiCH₃).

Análisis elemental: C₁₆₈H₃₅₆N₄₀O₈Si₁₃; calculado %: C, 58.83; H, 10.46; N, 16.33; encontrado %: C, 59.33; H 10.23; N, 15.22.

G₀[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂N⁺Me₃] (17)

A una disolución de 0.10 g (0.34 mmol) de **8** en 5 ml de THF, se añaden 0.03 ml (0.51 mmol) de yoduro de metilo. La mezcla resultante se deja agitar 5 horas a

temperatura ambiente, obteniéndose un sólido blanco en suspensión. A continuación, el disolvente se elimina por filtración y el sólido se seca a vacío aislándose el compuesto **17** (0.15 g, 99%) como un sólido blanco.

RMN-¹H (DMSO-d₆): δ 8.44 (1H, s, NCHCN), 4.68 (2H, s, CCH₂N), 4.43 (2H, t, SiCH₂CHCH₂CH₂N), 3.06 (9H, s, N(CH₃)₃), 1.85 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.22 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 0.85 (9H, t, SiCH₂CH₃), 0.46 (8H, m, SiCH₂CH₃ y SiCH₂).

RMN-¹³C{¹H} (DMSO-d₆): δ 134.7 (NCHCN), 127.3 (NCHCN), 58.4 (CCH₂N), 51.2 (N(CH₃)₂), 48.7 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 32.8 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 19.6 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 9.6 (SiCH₂CH₂), 6.7 (SiCH₂CH₃), 2.2 (SiCH₂CH₃).

Análisis Elemental: C₁₆H₃₅N₄Si; calculado %: C, 43.83; H, 8.05; N, 12.78; encontrado %: C, 43.27; H, 7.11; N, 12.85.

G₁[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂N⁺Me₃]₄ (18**)**

Siguiendo el procedimiento sintético que conduce a **17**, se prepara el derivado G₁[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂N⁺Me₃]₄. A una disolución de 0.38 g (0.33 mmol) del dendrímero **9** en 15 ml de THF, se le añaden 0.13 ml (2.02 mmol) de MeI y se deja agitar 17 horas a temperatura ambiente. Seguidamente el disolvente se elimina por filtración. El sólido obtenido se seca a vacío (0.48 g, 84%) y se identifica como el compuesto **18**.

RMN-¹H (DMSO-d₆): δ 8.42 (4H, s, NCHCN), 4.66 (8H, s, CCH₂N), 4.41 (8H, t, SiCH₂CHCH₂CH₂N), 3.05 (24H, s, N(CH₃)₃), 1.83 (8H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.27 (16H, m, SiCH₂CH₂), 0.51 (24H, m, SiCH₂), -0.10 (24H, s, Si(CH₃)₂).

RMN-¹³C{¹H} (DMSO-d₆): δ 134.7 (NCHCN), 127.3 (NCHCN), 58.5 (CCH₂N), 51.3 (N(CH₃)₂), 48.7 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 32.8 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N) 19.8-13.7 (SiCH₂ y SiCH₂CH₂), -3.9 (Si(CH₃)₂).

RMN-²⁹Si (DMSO-d₆): δ 1.7 (Si(CH₃)₂).

Análisis elemental: C₆₀H₁₂₈I₄N₁₆Si₅; calculado %: C, 41.85; H, 7.49; N, 13.02; encontrado %: C, 42.18; H, 7.35; N, 12.38.

G₂[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂N⁺Me₃]₈ (19)

Siguiendo el procedimiento sintético que conduce a **17**, se prepara el derivado G₂[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂N⁺Me₃]₈. A una disolución de 0.24 g (0.08 mmol) de **10** en 10 ml de THF, se añaden 0.04 ml (0.68 mmol) de MeI y se deja agitar 16 horas a temperatura ambiente, obteniéndose un sólido en suspensión amarillo. El disolvente se elimina por filtración y el sólido se seca a vacío obteniéndose **19** como un sólido amarillo (0.24 g, 81%).

RMN-¹H (DMSO-d₆): δ 8.44 (8H, s, NCHCN), 4.64 (16H, s, CCH₂N), 4.40 (16H, s, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3.05 (72H, s, N(CH₃)₃), 1.81 (16H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.25 (40H, m, SiCH₂CH₂), 0.50 (64H, m, SiCH₂), -0.10 (60H, s, Si(CH₃)₂ y SiCH₃).

RMN-¹³C{¹H} (DMSO-d₆): δ 134.8 (NCHCN), 127.3 (NCHCN), 58.5 (CCH₂N), 48.8 (N(CH₃)₂), 50.5 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 32.8 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N) 19.8-13.8 (SiCH₂CH₂ y SiCH₂), -3.9 (Si(CH₃)₂), (SiCH₃, no se observa) .

RMN-²⁹Si (DMSO-d₆): δ 1.7 (Si(CH₃)₂), (SiCH₃ no se observa).

Análisis elemental: C₁₃₆H₂₉₂I₈N₃₂Si₁₃; calculado %: C, 43.49; H, 7.84; N, 11.93; encontrado %: C, 43.75; H, 7.63; N, 10.93.

G₃[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂N⁺Me₃]₁₆ (20)

De modo análogo a la preparación de **17** se sintetiza el derivado G₃[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂N⁺Me₃]₁₆. A una disolución de 0.05 g (0.01 mmol) de **11** en 10 ml de THF, se añaden 0.06 ml (1.04 mmol) de MeI y se deja agitar 13 horas a temperatura ambiente, obteniéndose un sólido en suspensión amarillo. A continuación, el disolvente se elimina por filtración y el sólido se seca a vacío, obteniéndose **20** como un sólido amarillo (0.05 g, 70%).

RMN-¹H (DMSO-d₆): δ 8.38 (16H, s, NCHCN), 4.62 (32H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 4.39 (32H, s, CCH₂N), 3.04 (144H, s, N(CH₃)₂), 1.83 (32H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.27 (88H, m, SiCH₂CH₂), 0.51 (144H, m, SiCH₂), -0.10 (132H, s, Si(CH₃)₂ y SiCH₃).

RMN-¹³C{¹H} (DMSO-d₆): δ 134.8 (NCHCN), 127.4 (NCHCN), 58.5 (CCH₂N), 48.8 (N(CH₃)₂), 45.0 (CH₂N), 33.0 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 19.9-13.8 (SiCH₂CH₂ y SiCH₂), -3.9 (Si(CH₃)₂), (SiCH₃ no se observa).

RMN-²⁹Si (DMSO-d₆): δ 1.8 (Si(CH₃)₂), (SiCH₃ no se observa).

Análisis elemental: C₂₈₈H₆₂₀I₁₆N₆₄Si₂₉; calculado %: C, 44.20; H, 7.99; N, 11.46; encontrado %: C, 42.66; H, 7.93; N, 10.08.

G₀[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂O(CH₂)₂N⁺Me₂(CH₂)₂N⁺Me₃] (21)

De modo similar a lo expuesto anteriormente para la síntesis de **17** se prepara el derivado G₀[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂O(CH₂)₂N⁺Me₂(CH₂)₂N⁺Me₃]. A una disolución de 0.50 g (1.26 mmol) de **13** en 20 ml de THF, se le añaden 0.20 ml (3.14 mmol) de MeI y se deja agitar 15 horas a temperatura ambiente. A continuación, la suspensión se filtra y el sólido se seca a vacío obteniéndose **21** como un sólido amarillo (0.75 g, 88%).

RMN-¹H (DMSO-d₆): δ 8.17 (1H, s, NCHCN), 4.63 (2H, s, CCH₂O), 4.35 (4H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3.97 (4H, s, NCH₂CH₂N), 3.93 (2H, t, OCH₂CH₂N), 3.67 (2H, t, OCH₂CH₂N), 3.21 (6H, s, N(CH₃)₂), 3.18 (9H, s, N(CH₃)₃), 1.81 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.23 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 0.86 (9H, t, SiCH₂CH₃), 0.48 (8H, m, SiCH₂CH₃ y SiCH₂).

RMN-¹³C{¹H} (DMSO-d₆): δ 142.4 (NCHCN), 123.5 (NCHCN), 62.7 (CCH₂O), 62.6 (OCH₂CH₂N), 62.4 (OCH₂CH₂N) 56.4 y 55.0 (NCH₂CH₂N), 52.5 (N(CH₃)₃), 51.2 (N(CH₃)₂), 48.4 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 33.1 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 19.6 (SiCH₂CH₂), 9.6 (SiCH₂CH₃), 6.8 (SiCH₂), 2.2 (SiCH₂CH₃).

Análisis elemental: C₂₂H₄₉I₂N₅O_{Si}; calculado %: C, 39.77; H, 7.25; N, 10.28; encontrado %: C, 40.60; H, 7.03; N, 10.47.

G₁[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂O(CH₂)₂N⁺Me₂(CH₂)₂N⁺Me₃]₄ (22)

De modo similar a lo expuesto anteriormente para la síntesis de **21** se prepara el compuesto G₁[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂O(CH₂)₂N⁺Me₂(CH₂)₂N⁺Me₃]₄. A una disolución de 0.47 g (0.30 mmol) de **14** en 20 ml de THF, se le añaden 0.16 ml (2.59 mmol) de MeI y se deja agitar 15 horas a temperatura ambiente. Por último, la suspensión se filtra para obtener un sólido amarillo (0.66 g, 83%) que se identifica como **22**.

RMN-¹H (DMSO-d₆): δ 8.18 (4H, s, NCHCN), 4.63 (8H, s, CCH₂O), 4.33 (8H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3.94 (24H, s, NCH₂CH₂N y OCH₂CH₂N), 3.66 (8H, s, OCH₂CH₂N) 3.20 (24H, s, N(CH₃)₂), 3.17 (36H, s, N(CH₃)₃), 1.79 (8H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.24 (16H, m, SiCH₂CH₂), 0.52 (24, m, SiCH₂), -0.10 (24H, s, Si(CH₃)₂).

RMN-¹³C{¹H} (DMSO-d₆): δ 142.4 (NCHCN), 123.4 (NCHCN), 62.8 (CCH₂O), 62.6 (OCH₂CH₂N), 62.4 (OCH₂CH₂N), 56.5 y 55.5 (NCH₂CH₂N), 52.5 (N(CH₃)₃), 51.2 (N(CH₃)₂), 48.5 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 33.0 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 19.8-13.7 (SiCH₂ y SiCH₂CH₂), -3.8 (Si(CH₃)₂).

RMN-²⁹Si (DMSO-d₆): δ 1.8 (Si(CH₃)₂).

Análisis elemental: C₈₄H₁₈₄I₈N₂₀O₄Si₅; calculado %: C, 37.45; H, 6.88; N, 10.40; encontrado %: C, 38.25; H, 7.60; N, 10.79.

G₂[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂O(CH₂)₂N⁺Me₂(CH₂)₂N⁺Me₃]₈ (23)

Para preparar G₂[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂O(CH₂)₂N⁺Me₂(CH₂)₂N⁺Me₃]₈ se sigue el método previamente usado en la síntesis de **17**. A una disolución de 0.47 g (0.30 mmol) de **15** en 20 ml de THF, se le añaden 0.16 ml (2.59 mmol) de MeI y se deja agitar 13 horas a temperatura ambiente. A continuación, la suspensión se filtra y el sólido se seca a vacío obteniéndose un sólido amarillo (0.66 g, 81%) que se identifica como **23**.

RMN-¹H (DMSO-d₆): δ 8.18 (8H, s, NCHCN), 4.62 (16H, s, CCH₂O), 4,33 (16H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3.94 (48H, s, NCH₂CH₂N y OCH₂CH₂N), 3.66 (16H, s, OCH₂CH₂N) 3.20 (120H, s, N(CH₃)₂ y N(CH₃)₃), 1.79 (16H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 0.51 (64H, m, SiCH₂), -0.10 (60H, s, Si(CH₃)₂ y SiCH₃).

RMN-¹³C{¹H} (DMSO-d₆): δ 142.4 (NCHCN), 123.4 (NCHCN), 62.8 (CCH₂O), 62.7 (OCH₂CH₂N), 62.4 (OCH₂CH₂N), 56.4 y 55.6 (NCH₂CH₂N), 52.5 (N(CH₃)₃), 51.2 (N(CH₃)₂), 48.5 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 33.0 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 19.8-13.7 (SiCH₂ y SiCH₂CH₂), -3.9 (Si(CH₃)₂), (SiCH₃ no se observa).

RMN-²⁹Si (DMSO-d₆): δ 1.8 (Si(CH₃)₂), (SiCH₃ no se observa).

Análisis elemental: C₁₆₈H₃₅₆N₄₀O₈Si₁₃; calculado %: C, 58.83; H, 10.46; N, 16.33; encontrado %: C, 59.01; H, 10.08, N, 16.93.

G₃[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂O(CH₂)₂N⁺Me₂(CH₂)₂N⁺Me₃]₁₆ (24)

La preparación de **24** se realiza del mismo modo al descrito para el derivado **21**. A una disolución de 0.16 g (0.02 mmol) de **16** en 5 ml de THF, se le añaden 0.04 ml (0.68 mmol) de MeI y se deja agitar 13 horas a temperatura ambiente. A continuación, la suspensión se filtra y el sólido se seca a vacío obteniéndose un sólido amarillo (0.14 g, 83%) que se identifica como el dendrímero de tercera generación **24**.

RMN-¹H (DMSO-d₆): δ 8.17 (16H, s, NCHCN), 4.62 (32H, s, CCH₂O), 4.33 (32H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3.92 (96H, s, NCH₂CH₂N y OCH₂CH₂N), 3.66 (32H, s, OCH₂CH₂N) 3.20 (240H, s, N(CH₃)₂ y N(CH₃)₃), 1.79 (32H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 0.51 (144H, m, SiCH₂), -0.10 (132H, s, Si(CH₃)₂ y SiCH₃).

RMN-¹³C{¹H} (DMSO-d₆): δ 142.4 (NCHCN), 123.4 (NCHCN), 62.8 (CCH₂O), 62.7 (OCH₂CH₂N), 62.4 (OCH₂CH₂N), 56.4 y 55.6 (NCH₂CH₂N), 52.5 (N(CH₃)₃), 51.2 (N(CH₃)₂), 48.5 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 33.0 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 19.8-13.7 (SiCH₂ y SiCH₂CH₂), -3.9 (Si(CH₃)₂), (SiCH₃ no se observa).

RMN-²⁹Si (DMSO-d₆): δ 1.8 (Si(CH₃)₂), (SiCH₃ no se observa).

Análisis elemental: C₃₈₄H₈₄₄I₃₂N₈₀O₁₆Si₂₉; calculado %: C, 39.37; H, 7.26; N, 9.57; encontrado %: C, 40.44; H, 7.33, N, 9.00.

G₁[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂N((CH₂)₂COOMe)₂]₄ (25)

En un schlenk se disuelven 0.43 g (0.22 mmol) del dendrímero de primera generación terminado en grupos azida **5**, en 60 ml de THF y se añaden 0.40 g (1.76 mmol) de 3,3'-(prop-2-inilazanedil)dipropanoato de dimetilo. A continuación, se añade una disolución recién preparada de 0.04 g (0.21 mmol) de ascorbato sódico en 2 ml de agua destilada y una disolución recién preparada de 0.02 g (0.09 mmol) de CuSO₄·5H₂O en 1 ml de agua destilada. La mezcla resultante se deja agitar a temperatura ambiente. Transcurridas 16 horas la reacción se interrumpe añadiendo 1.5 ml de una disolución al 23% de hidróxido amónico y se deja agitar durante 15 minutos. La mezcla se extrae con acetato de etilo (3 x 40 ml), las fases orgánicas se juntan, se lavan con una disolución saturada de cloruro sódico (60 ml) y se secan sobre MgSO₄. Inmediatamente después se purifica mediante una cromatografía de

exclusión de tamaños (Bio-Beads S-X1) con tolueno como eluyente y a continuación se concentra a vacío para obtener **25** como un aceite amarillo (0.58 g, 70%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 7.42 (4H, s, NCHCN), 4.31 (8H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3.78 (8H, s, CCH₂N), 3.64 (24H, s, CO₂CH₃), 2.78 (16H, t, NCH₂CH₂CO₂CH₃), 2.47 (16H, t, NCH₂CH₂CO₂CH₃), 1.86 (8H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.27 (16H, m, SiCH₂CH₂), 0.52 (24H, m, SiCH₂), -0.08 (24H, s, Si(CH₃)₂).

RMN-¹³C{¹H} (CDCl₃): δ 172.8 (CO₂CH₃), 144.6 (NCHCN), 122.2 (NCHCN), 51.5 (CO₂CH₃), 49.9 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 48.9 (NCH₂CH₂CO₂CH₃), 48.6 (CCH₂N), 34.0 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 32.6 (NCH₂CH₂CO₂CH₃), 21.0-14.9 (SiCH₂CH₂ y SiCH₂), -3.4 (Si(CH₃)₂).

RMN-²⁹Si (CDCl₃): δ 1.7 (Si(CH₃)₂).

Análisis elemental: C₈₀H₁₄₈N₁₆O₁₆Si₅; calculado %: C, 55.52; H, 8.62; N, 12.95; encontrado %: C, 55.24; H, 8.49; N, 12.10.

G₂[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂N((CH₂)₂COOMe)₂]₈ (26**)**

El compuesto G₂[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂N((CH₂)₂COOMe)₂]₈ se sintetiza con condiciones similares al derivado de primera generación **25**. En un schlenk se disuelven el derivado de segunda generación terminado en grupos azida **6** (0.38 g, 0.15 mmol) y la amina 3,3'-(prop-2-ynilazanedil)dipropionato de dimetilo (0.35 g, 1.52 mmol) en 50 ml de THF. A esta mezcla se añaden una disolución recién preparada de ascorbato sódico (0.04 g 0.18 mmol) en 2 ml de agua destilada y otra disolución recién preparada de CuSO₄·5H₂O (0.02 g, 0.08 mmol) en 1 ml de agua destilada y se deja agitar a temperatura ambiente. Transcurridas 15 horas, la reacción se interrumpe añadiendo hidróxido amónico. Por último, se realiza un proceso de purificación similar al llevado a cabo en el derivado **25**, obteniéndose un aceite amarillo (0.59 g, 82%) que se identifica como **26**.

RMN-¹H (CDCl₃): δ 7.41 (8H, s, NCHCN), 4.28 (16H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3.74 (16H, s, CCH₂N), 3.60 (48H, s, CO₂CH₃), 2.74 (32H, t, NCH₂CH₂CO₂CH₃), 2.44 (32H, t, NCH₂CH₂CO₂CH₃), 1.87 (16H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.25 (40H, m, SiCH₂CH₂), 0.50 (64, m, SiCH₂), -0.11 (60H, s, Si(CH₃)₂ y SiCH₃).

RMN-¹³C{¹H} (CDCl₃): δ 172.8 (CO₂CH₃), 144.5 (NCHCN), 122.2 (NCHCN), 51.5 (CO₂CH₃), 49.8 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 48.8 (NCH₂CH₂CO₂CH₃), 48.5 (CCH₂N), 34.0

(SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 32.5 (NCH₂CH₂CO₂CH₃), 20.9-14.8 (SiCH₂CH₂ y SiCH₂), -3.5 (Si(CH₃)₂), -5.1 (SiCH₃).

RMN-²⁹Si (CDCl₃): δ 1.7 (Si(CH₃)₂), 0.9 (SiCH₃).

Análisis elemental: C₁₇₆H₃₃₂N₃₂O₃₂Si₁₃; calculado %: C, 56.01; H, 8.87; N, 11.88; encontrado %: C, 55.65; H, 8.88; N, 10.59.

G₃[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂N((CH₂)₂COOMe)₂]₁₆ (27)

Para la preparación de **27** se siguen las mismas condiciones que para la síntesis del derivado de primera generación **25**. En un schlenk se disuelven el derivado de tercera generación terminado en grupos azida **7** (0.18 g, 0.04 mmol) y 3,3'-(prop-2-inilazanedil)dipropanoato de dimetilo (0.16 g, 0.69 mmol) en 20 ml de THF. A esta mezcla se añaden una disolución recién preparada de ascorbato sódico (0.02 g, 0.08 mmol) en 0.5 ml de agua destilada y otra disolución recién preparada de CuSO₄·5H₂O (0.01 g, 0.03 mmol) en 0.5 ml de agua destilada y se deja agitar a temperatura ambiente. Transcurridas 17 horas, la reacción se interrumpe añadiendo hidróxido amónico. Por último, se realiza un proceso de purificación similar al llevado a cabo en el derivado **25**, obteniéndose un aceite amarillo (0.20 g, 60%) que se identifica como **27**.

RMN-¹H (CDCl₃): δ 7.42 (16H, s, NCHCN), 4.29 (32H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3.76 (32H, s, CCH₂N), 3.61 (96H, s, CO₂CH₃), 2.74 (64H, t, NCH₂CH₂CO₂CH₃), 2.44 (64H, t, NCH₂CH₂CO₂CH₃), 1.87 (32H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.25 (88H, m, SiCH₂CH₂), 0.50 (144H, m, SiCH₂), -0.11 (132H, s, Si(CH₃)₂ y SiCH₃).

RMN-¹³C{¹H} (CDCl₃): δ 172.8 (CO₂CH₃), 144.5 (NCHCN), 122.2 (NCHCN), 51.5 (CO₂CH₃), 49.8 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 48.8 (NCH₂CH₂CO₂CH₃), 48.5 (CCH₂N), 34.0 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 32.5 (NCH₂CH₂CO₂CH₃), 20.9-14.8 (SiCH₂CH₂ y SiCH₂), -3.5 (Si(CH₃)₂), -5.1 (SiCH₃).

RMN-²⁹Si (CDCl₃): δ 1.7 (Si(CH₃)₂), 0.9 (SiCH₃).

Análisis elemental: C₇₆H₁₆₀N₂₀O₄Si₅; calculado %: C, 58.56; H, 10.35; N, 10.97; encontrado %: C, 57.02; H, 9.33; N, 10.16.

G₁[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂N((CH₂)₂COONa)₂]₄ (28)

A una disolución de **25**, 0.18 g (0.14 mmol) en 20 ml de EtOH, se le añaden 0.05 g (1.12 mmol) de NaOH. La mezcla se calienta a 60 °C durante 14 horas, tras lo cual la reacción se filtra a través de celite. A continuación, se realizan lavados con EtOH caliente (3 x 10 ml) y se eliminan los restos de disolvente a vacío. El compuesto **28** se aísla como un sólido blanco (0.21 g, 82%).

RMN-¹H (D₂O): δ 7.78 (4H, s, NCHCN), 4.19 (8H, s, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3.56 (8H, s, CCH₂N), 2.52 (16H, s, NCH₂CH₂CO₂Na), 2.20 (16H, s, NCH₂CH₂CO₂Na), 1.68 (8H, s, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.10 (16H, m, SiCH₂CH₂), 0.31 (24H, s SiCH₂), -0.3 (24H, s, Si(CH₃)₂).

RMN-¹³C{¹H} (D₂O): δ 180.8 (CO₂Na), 142.3 (NCHCN), 124.8 (NCHCN), 49.9 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 49.2 (NCH₂CH₂CO₂Na), 46.9 (CCH₂N), 34.4 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 33.4 (NCH₂CH₂CO₂Na), 20.5-14.2 (SiCH₂CH₂ y SiCH₂), -3.5 (Si(CH₃)₂).

RMN-²⁹Si (D₂O): δ 1.7 (Si(CH₃)₂).

Análisis elemental: C₇₂H₁₂₄N₁₆Na₈O₁₆Si₅; calculado %: C, 48.20; H, 6.97; N, 12.49; encontrado %: C, 48.45; H, 7.39; N, 12.91.

G₂[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂N((CH₂)₂COONa)₂]₈ (29)

De un modo análogo a la preparación de **28**, se sintetiza G₂[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂N((CH₂)₂COONa)₂]₈. Se disuelven 0.12 g (0.03 mmol) de **26** en 6 ml de EtOH y se le añaden 0.02 g (0.51 mmol) de NaOH, seguidamente la mezcla se calienta a 60 °C durante 14 horas. Por último, se realiza un proceso de purificación similar al llevado a cabo en el derivado **28**, obteniéndose un sólido de color blanco (0.10 g, 83%) que se identifica como **29**.

RMN-¹H (D₂O): δ 7.79 (8H, s, NCHCN), 4.19 (16H, s, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3.55 (16H, s, CCH₂N), 2.52 (32H, s, NCH₂CH₂CO₂Na), 2.20 (32H, s, NCH₂CH₂CO₂Na), 1.68 (16H, s, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.14 (40H, m, SiCH₂CH₂), 0.35 (64H, m, SiCH₂), -0.25 (60H, s, Si(CH₃)₂ y SiCH₃).

RMN-¹³C{¹H} (**D₂O**): δ 180.8 (CO₂Na), 142.4 (NCHCN), 124.8 (NCHCN), 49.8 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 49.2 (NCH₂CH₂CO₂Na), 47.0 (CCH₂N), 34.4 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 33.6 (NCH₂CH₂CO₂Na), 20.6-14.4 (SiCH₂CH₂ y SiCH₂), -3.4 (Si(CH₃)₂), -5.1 (SiCH₃).

RMN-²⁹Si (**D₂O**): δ 1.6 (Si(CH₃)₂), 1.4 (SiCH₃).

Análisis elemental: C₁₆₀H₂₈₄N₃₂Na₁₆O₃₂Si₁₃; calculado %: C, 49.26; H, 7.34; N, 11.49; encontrado %: C, 49.16; H, 7.55, N, 11.03.

G₃[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂N((CH₂)₂COONa)₂]₁₆ (30**)**

La preparación del derivado G₃[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂N((CH₂)₂COONa)₂]₁₆ es similar a la del derivado de primera generación **28**. Se disuelven 0.20 g (0.02 mmol) de **27** en 5 ml de EtOH y se le añaden 0.03 g (0.81 mmol) de NaOH. La mezcla se agita a 60 °C 16 horas y se filtra. Por último, se realiza un proceso de purificación similar al llevado a cabo en el derivado **28**, obteniéndose un sólido blanco que se identifica como **30** (0.14 g, 73%).

RMN-¹H (**D₂O**): δ 7.79 (16H, s, NCHCN), 4.19 (32H, s, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3.55 (32H, s, CCH₂N), 2.51 (64H, s, NCH₂CH₂CO₂Na), 2.18 (64H, s, NCH₂CH₂CO₂Na), 1.68 (32H, s, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.13 (88H, m, SiCH₂CH₂), 0.36 (144H, m, SiCH₂), -0.24 (132H, s, Si(CH₃)₂ y SiCH₃).

RMN-¹³C{¹H} (**D₂O**): δ 180.8 (CO₂Na), 142.3 (NCHCN), 124.8 (NCHCN), 49.8 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 49.2 (NCH₂CH₂CO₂Na), 46.9 (CCH₂N), 34.3 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 33.4 (NCH₂CH₂CO₂Na), 20.4-14.2 (SiCH₂CH₂ y SiCH₂), -3.5 (Si(CH₃)₂), -5.1 (SiCH₃).

RMN-²⁹Si (**D₂O**): δ 1.6 (Si(CH₃)₂), 1.4 (SiCH₃).

Análisis elemental: C₃₃₆H₆₀₄N₆₄Na₃₂O₆₄Si₂₉; calculado %: 49.73; H, 7.50; N, 11.05; encontrado %: C, 50.70; H, 7.95; N, 9.96.

G₁[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂N((CH₂)₂N(CH₂P(O)(OMe)₂)₂)]₄ (31**)**

En un schlenk se disuelven 0.35 g (0.42 mmol) del dendrímero **5**, terminado en grupos azida, en 80 ml de THF y se añaden 0.50 g (1.68 mmol) de tetrametil(prop-2-inilazanedil)bis(metilen)difosfonato. A continuación, se le añade una disolución recién

preparada de 0.04 g (0.20 mmol) de ascorbato sódico en 2.0 ml de agua destilada y una disolución recién preparada de 0.02 g (0.08 mmol) de $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 1.2 ml de agua destilada. La mezcla resultante se deja agitar a temperatura ambiente. Transcurridas 15 horas la reacción se interrumpe añadiendo 1ml de hidróxido amónico al 23%. La mezcla se extrae con acetato de etilo (3 x 40 ml), las fases orgánicas se juntan, se lavan con una disolución saturada de cloruro sódico (40 ml) y se secan sobre MgSO_4 . A continuación, se purifica mediante una cromatografía de exclusión de tamaños (Bio-Beads S-X1) con tolueno como eluyente y se concentra a vacío para obtener un aceite incoloro (0.65 g, 76%) identificado como **31**.

RMN- ^1H (CDCl_3): δ 7.58 (4H, s, NCHCN), 4.28 (8H, t, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 4.09 (8H, s, CCH_2N), 3.72 (48H, d, POCH_3), 3.12 (16H, d, NCH_2P), 1.81 (8H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1.22 (16H, m, SiCH_2CH_2), 0.48 (24H, m SiCH_2), -0.12 (24H, s, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

RMN- $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3): δ 143.1 (NCHCN), 123.3 (NCHCN), 52.8 (POCH_3), 51.2 (CCH_2N), 50.0 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 49.0 (NCH_2P), 34.0 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 21.1-14.9 (SiCH_2CH_2 y SiCH_2), -3.5 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

RMN- ^{29}Si (CDCl_3): δ 1.7 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

RMN- ^{31}P (CDCl_3): δ 27.0 ($\text{P}(\text{O})(\text{OCH}_3)_2$).

Análisis elemental: $\text{C}_{72}\text{H}_{156}\text{N}_{16}\text{O}_{24}\text{P}_8\text{Si}_5$; calculado %: C, 42.85; H, 7.79; N, 11.10; encontrado %: C, 42.75; H, 7.64; N, 10.02.

$\text{G}_2[(\text{CH}_2)_4(\text{C}_2\text{HN}_3)\text{CH}_2\text{N}((\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2\text{P}(\text{O})(\text{OMe})_2)_2)]_8$ (32**)**

De un modo análogo a la preparación de **31** se sintetiza **32**. En un schlenk se disuelven el derivado de segunda generación **6** terminado en grupos azida (0.28 g, 0.141 mmol) y 0.16 g de tetrametil (prop-2-inilazanedil)bis(metilen)difosfonato (0.69 mmol) en 25 ml de THF. A esta disolución se añaden una disolución recién preparada de ascorbato sódico (0.03 g, 0.13 mmol) en 2 ml de agua destilada y otra disolución recién preparada de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.01 g, 0.07 mmol) en 1 ml de agua destilada y se deja agitar a temperatura ambiente. Transcurridas 16 horas, la reacción se interrumpe añadiendo hidróxido amónico. Por último, se realiza un proceso de purificación similar al llevado a cabo en el derivado **31**, obteniéndose un aceite transparente (0.47 g, 77%) que se identifica como **32**.

RMN-¹H (CDCl₃): δ 7.57 (8H, s, NCHCN), 4.25 (16H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 4.06 (16H, s, CCH₂N), 3.69 (96H, d, POCH₃), 3.09 (32H, d, NCH₂P) 1.83 (16H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.24 (40H, m, SiCH₂CH₂), 0.46 (64H, m, SiCH₂), -0.14 (60H, s, Si(CH₃)₂ y SiCH₃).

RMN-¹³C{¹H} (CDCl₃): δ 143.0 (NCHCN), 123.2 (NCHCN), 52.7 (POCH₃), 51.1 (CCH₂N), 49.9 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 49.0 (NCH₂P), 34.0 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 20.9-14.9 (SiCH₂CH₂ y SiCH₂), -3.5 (Si(CH₃)₂), -5.0 (SiCH₃).

RMN-²⁹Si (CDCl₃): δ 1.7 (Si(CH₃)₂), (SiCH₃ no se observa).

RMN-³¹P (CDCl₃): δ 27.0 (P(O)(OCH₃)₂).

Análisis elemental: C₁₆₀H₃₄₈N₃₂O₄₈P₁₆Si₁₃; calculado %: C, 44.18; H, 8.06; N, 10.31; encontrado %: C, 44.43; H, 7.90; N, 10.69.

G₃[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂N((CH₂)₂N(CH₂P(O)(OMe)₂)₂)₁₆ (33)

De un modo análogo a la preparación de **31** se sintetiza el derivado G₃[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂N((CH₂)₂N(CH₂P(O)(OMe)₂)₂)₁₆. En un schlenk se disuelven 0.20 g (0.05 mmol) del derivado de tercera generación terminado en grupos azida **7** y 0.22 g de tetrametil(prop-2-inilazanedil)bis(metilen)difosfonato (0.74 mmol) en 13 ml de THF. A esta mezcla se añaden una disolución recién preparada de ascorbato sódico (0.02 g, 0.09 mmol) en 2 ml de agua destilada y otra disolución recién preparada de CuSO₄·5H₂O (0.02 g, 0.06 mmol) en 1 ml de agua destilada y se deja agitar a temperatura ambiente. Transcurridas 14 horas, la reacción se interrumpe añadiendo hidróxido amónico. Por último, se realiza un proceso de purificación similar al llevado a cabo en el derivado **31**, obteniéndose un aceite incoloro (0.47 g, 77%) que se identifica como **33**.

RMN-¹H (CDCl₃): δ 7.61 (16H, s, NCHCN), 4.32 (32H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 4.13 (32H, s, CCH₂N), 3.76 (192H, d, POCH₃), 3.15 (64H, d, NCH₂P), 1.89 (32H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.28 (88H, m, SiCH₂CH₂), 0.51 (144H, m, SiCH₂), -0.08 (132H, s, Si(CH₃)₂ y SiCH₃).

RMN-¹³C{¹H} (CDCl₃): δ 142.8 (NCHCN), 123.1 (NCHCN), 52.6 (POCH₃), 52.0 (CCH₂N), 49.8 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 47.7 (NCH₂P), 33.9 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 20.8-14.7 (SiCH₂CH₂ y SiCH₂), -3.6 (Si(CH₃)₂), -5.2 (SiCH₃).

RMN-²⁹Si (CDCl₃): δ 1.7 (Si(CH₃)₂), (SiCH₃ no se observa).

RMN-³¹P (CDCl₃): δ 27.4 (P(O)(OCH₃)₂).

Análisis elemental: C₃₃₆H₇₃₂N₆₄O₉₆P₃₂Si₂₉; calculado %: C, 44.78; H, 8.19; N, 9.95; encontrado %: C, 45.81; H, 8.69; N, 9.08.

G₁[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂N((CH₂)₂N(CH₂P(O)(ONa)₂)₂)₄ (34)

Para la síntesis del derivado **34** se prepara una disolución de 0.17 g (0.09 mmol) de **31** en 20 ml de THF. La mezcla se pone a 0 °C y se añaden 0.23 ml (1.72 mmol) de bromuro de trimetilsililo. La reacción se agita durante 14 horas, durante las cuales se deja alcanzar la temperatura ambiente. A continuación, se evapora el exceso de bromuro de trimetilsililo y disolvente y se realizan lavados con MeOH (3 x 20 ml). Seguidamente el compuesto se seca a vacío, se redisuelve en agua destilada (10 ml) y se añaden 0.06 g (1.38 mmol) de NaOH. Transcurridas 14 horas se evapora el disolvente, se realizan lavados con EtOH caliente (3 x 20 ml) y se elimina el disolvente a vacío. Se obtiene un sólido blanco que se identifica como **34** (0.11 g, 64%).

RMN-¹H (D₂O): δ 7.95 (4H, s, NCHCN), 4.48 (8H, s, CCH₂N SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 4.21 (8H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3.85 (16H, d, NCH₂P), 1.73 (8H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.17 (16H, m, SiCH₂CH₂), 0.38 (24H, m SiCH₂), -0.27 (24H, s, Si(CH₃)₂).

RMN-¹³C{¹H} (D₂O): δ 142.9 (NCHCN), 125.8 (NCHCN), 54.1 (NCH₂P), 50.1 (CCH₂N), 50.0 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 33.1 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 20.3-14.0 (SiCH₂CH₂ y SiCH₂), -4.0 (Si(CH₃)₂).

RMN-²⁹Si (D₂O): δ 1.3 (Si(CH₃)₂).

RMN-³¹P (CDCl₃): δ 8.5 (P(O)(ONa)₂).

Análisis elemental: C₅₆H₁₀₈N₁₆Na₁₆O₂₄P₈Si₅; calculado %: C, 31.35; H, 5.07; N, 10.44; encontrado %: C, 31.39; H, 5.63; N, 10.18.

G₂[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂N((CH₂)₂N(CH₂P(O)(ONa)₂)₂)₈ (35)

La síntesis de **35** se realiza de un modo similar a la del derivado de primera generación **34**, para ello se prepara una disolución de 0.30 g (0.06 mmol) de **32** en 15 ml de THF y se añaden 0.32 ml (2.4 mmol) de bromuro de trimetilsililo a 0 °C. La reacción se agita durante 16 horas a temperatura ambiente y se elimina el exceso de bromuro de trimetilsililo y disolvente a vacío. Posteriormente, se realizan lavados con

MeOH (3 x 15 ml) y el compuesto se seca a presión reducida, se redisuelve en agua destilada (12 ml) y se añaden 0.08 g (1.92 mmol) de NaOH. Transcurridas 14 horas se evapora el disolvente. Por último, se realiza un proceso de purificación similar al llevado a cabo en el derivado **34**, obteniéndose un sólido blanco que se identifica como **35** (0.19 g, 50%).

RMN-¹H (D₂O): δ 7.96 (8H, s, NCHCN), 4.20 (16H, s, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3.09 (32H, s, NCH₂P) 1.73 (16H, s, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.17 (40H, m, SiCH₂CH₂), 0.39 (64H, m, SiCH₂), -0.26 (60H, s, Si(CH₃)₂ y (SiCH₃)).

RMN-¹³C{¹H} (D₂O): δ 143.0 (NCHCN), 125.2 (NCHCN), 54.2 (NCH₂P), 49.8 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 33.2 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 20.3-14.2 (SiCH₂CH₂ y SiCH₂), -3.6 (Si(CH₃)₂), -5.1 (SiCH₃)

RMN-²⁹Si (D₂O): δ 1.6 (Si(CH₃)₂), (SiCH₃ no se observa).

RMN-³¹P (CDCl₃): δ 8.8 (P(O)(ONa)₂)

Análisis elemental: C₁₂₈H₂₅₂N₃₂Na₃₂O₄₈P₁₆Si₁₃; calculado %: C, 33.39; H, 5.52; N, 9.74; encontrado %: C, 33.61; H, 5.50; N, 9.94.

G₃[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂N((CH₂)₂N(CH₂P(O)(ONa)₂)₂)₁₆ (36**)**

La síntesis de G₃[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂N((CH₂)₂N(CH₂P(O)(ONa)₂)₂)₁₆ se realiza de un modo similar a la del derivado de primera generación **34**, para ello se prepara una disolución de 0.07 g (0.08 mmol) de **33** en 15 ml de THF. La mezcla se pone a 0 °C y se añaden 0.08 ml (0.62 mmol) de bromuro de trimetilsililo. La reacción se agita durante 16 horas, durante las cuales se deja alcanzar la temperatura ambiente. Posteriormente se elimina el exceso de bromuro de trimetilsililo y el disolvente a vacío y se realizan lavados con MeOH (3 x 15 ml). Seguidamente, el compuesto se seca a presión reducida, se redisuelve en agua destilada (10 ml) y se añaden 0.02 g (0.49 mmol) de NaOH. Transcurridas 14 horas se evapora el disolvente. Por último, se realiza un proceso de purificación similar al llevado a cabo en el derivado **34**, obteniéndose un sólido blanco que se identifica como **36** (0.03 g, 39%).

RMN-¹H (D₂O): δ 7.98 (16H, s, NCHCN), 4.21 (32H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3.15 (64H, s, NCH₂P), 1.70 (32H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.17 (88H, m, SiCH₂CH₂), 0.37 (144H, m, SiCH₂), -0.24 (132H, s, Si(CH₃)₂ y (SiCH₃)).

RMN-¹³C{¹H} (D₂O): δ 142.8 (NCHCN), 125.4 (NCHCN), 54.1 (NCH₂P), 49.8 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 33.0 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 20.2-14.0 (SiCH₂CH₂ y SiCH₂), -3.6 (Si(CH₃)₂), -5.2 (SiCH₃).

RMN-²⁹Si (D₂O): δ 1.6 (Si(CH₃)₂), (SiCH₃ no se observa).

RMN-³¹P (CDCl₃): δ 8.9 (P(O)(ONa)₂).

Análisis elemental: C₂₇₂H₅₄₀N₆₄Na₆₄O₉₆P₃₂Si₂₉; calculado %: C, 34.31; H, 5.72; N, 9.42; encontrado %: C, 33.47; H, 5.32; N, 8.46.

4-(prop-2-iniloxi)naftaleno-2,7-disulfonato sódico (37)

La propargilación del naftalensulfonato se realiza poniendo en una ampolla de vidrio una suspensión de 1.0 g (2.87 mmol) de la sal disódica del ácido 1-naftol-3,6-disulfónico y 0.59 g (4.31 mmol) de carbonato potásico en DMF. Sobre esta suspensión se añade 0.31 ml de bromuro de propargilo al 80% en tolueno. La mezcla se calienta a 70 °C durante 2 días, transcurrido este tiempo la mezcla se evapora. El crudo de reacción se cromatografía a través de gel de sílice con una mezcla 1:3 DCM/MeOH. La disolución se evapora, se redisuelve en etanol y se filtra a través de celite para obtener un sólido blanco (0.75 g, 68%) que se identifica con el producto final **37**.

RMN-¹H (DMSO-d₆): δ 8.24 (2H, m, C_{ar}H), 7.93 (1H, s, C_{ar}H), 7.75 (1H, dd, C_{ar}H), 7.28 (1H, s, C_{ar}H) 4.88 (2H, d, CCH₂O), 2.81 (1H, t, CCH).

RMN-¹³C{¹H} (DMSO-d₆): δ 151.7 (C_{ar}H), 145.8 (C_{ar}H), 145.5 (C_{ar}H), 123.9 (C_{ar}H), 123.5 (C_{ar}H), 120.5 (C_{ar}H), 117.2 (C_{ar}H), 78.5 (CCH), 78.2 (CCH).

Análisis elemental: C₁₀H₂₀N₂O; calculado %: C 45.70; H. 5.19; N, 6.66; S, 10.17; encontrado %: C, 46.02; H, 4.94; N, 7.46; S, 11.10.

G₁[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂ONaft(SO₃Na)₂]₄ (38)

En un schlenk se ponen 0.18 g (0.22 mmol) del dendrímero de primera generación **5** disuelto en 40 ml de THF y sobre este se añaden 0.34 g (0.89 mmol) de **37** disueltos en 35 ml de agua destilada. A la mezcla se le añaden 0.02 g (0.01 mmol) de ascorbato sódico disuelto en 2 ml de agua y 0.01 g (0.05 mmol) de CuSO₄·5H₂O disuelto en 1 ml de agua destilada y se calienta a 60 °C. Transcurridos 3 días la

reacción se enfría, se interrumpe añadiendo 2 ml de hidróxido amónico al 23%, se elimina el THF a vacío y se purifica mediante nanofiltración con una membrana de acetato de celulosa (peso molecular nominal límite de 500 g/mol) utilizando H₂O destilada (3 x 40 ml). Una vez que se elimina disolvente a vacío se obtiene un sólido blanco que se identifica con el producto final **38** (0.42 g, 79%).

RMN-¹H (DMSO-d₆): δ 8.32 (4H, s, NCHCN), 8.06 (4H, s, C_{ar}H), 8.01 (4H, s, C_{ar}H), 7.74 (4H, s, C_{ar}H), 7.69 (4H, s, C_{ar}H), 7.32 (4H, s, C_{ar}H), 5.29 (8H, t, CCH₂N), 4.38 (8H, s, SiCH₂CHCH₂CH₂N), 1.86 (8H, m, SiCH₂CHCH₂CH₂N), 1.30 (16H, m, SiCH₂CH₂), 0.54 (24H, m, SiCH₂), -0.07 (24H, s, Si(CH₃)₂).

RMN-¹³C{¹H} (DMSO-d₆): δ 152.7 (C_{ar}H), 146.0 (NCHCN), 145.8 (C_{ar}H), 131.5 (C_{ar}H), 124.0 (NCHCN), 123.4 (C_{ar}H), 120.8 (C_{ar}H), 116.8 (C_{ar}H), 103.5 (C_{ar}H), 61.4 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 33.1 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 20.0-13.8 (SiCH₂CH₂ y SiCH₂), -3.8 (Si(CH₃)₂).

RMN-²⁹Si (DMSO-d₆): δ 1.7 (Si(CH₃)₂).

Análisis elemental: C₈₈H₁₁₂N₁₂Na₈O₂₈S₈Si₅; calculado %: C, 44.66; H, 4.77; N, 7.10; S, 10.84; encontrado %: C, 44.00; H, 3.99; N, 7.49; S, 10.08.

G₂[(CH₂)₄(C₂HN₃)CH₂ONaft(SO₃Na)₂]₈ (39**)**

En un schlenk se ponen 0.14 g (0.07 mmol) del dendrímero de segunda generación **6** disuelto en 30 ml de THF y sobre este se añaden 0.21 g (0.55 mmol) de **37** disueltos en 25 ml de agua destilada. A la mezcla se le añaden 0.01 g (0.01 mmol) de ascorbato sódico disuelto en 1 ml de agua y 0.01 g (0.05 mmol) de CuSO₄·5H₂O disuelto en 0.5 ml de agua destilada y se calienta a 60 °C. Transcurridos 3 días la reacción se enfría, se añade de hidróxido amónico y se elimina el THF a vacío. Por último, el compuesto se purifica mediante nanofiltración con una membrana de acetato de celulosa (peso molecular nominal límite de 1000 g/mol) utilizando H₂O destilada (3 x 40 ml). Una vez que se elimina disolvente a vacío se obtiene un sólido blanco que se identifica con el producto final **39** (0.24 g, 70%).

RMN-¹H (DMSO-d₆): δ 8.37 (8H, s, NCHCN), 8.08 (8H, s, C_{ar}H), 8.01 (8H, s, C_{ar}H), 7.76 (8H, s, C_{ar}H), 7.70 (8H, s, C_{ar}H), 7.33 (8H, s, C_{ar}H), 5.30 (16H, t, CCH₂N), 4.38 (16H, s, SiCH₂CHCH₂CH₂N), 1.83 (16H, m, SiCH₂CHCH₂CH₂N), 1.29 (40H, m, SiCH₂CH₂), 0.53 (64H, m, SiCH₂), -0.08 (60H, s, Si(CH₃)₂ y (SiCH₃)).

RMN-¹³C{¹H} (DMSO-d₆): δ 152.7 (C_{ar}H), 146.0 (NCHCN), 145.8 (C_{ar}H), 131.5 (C_{ar}H), 124.0 (NCHCN), 123.4 (C_{ar}H), 120.8 (C_{ar}H), 116.8 (C_{ar}H), 103.5 (C_{ar}H), 61.4 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 33.1 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 20.0-13.8 (SiCH₂CH₂ y SiCH₂), -3.8 (Si(CH₃)₂ y SiCH₃).

RMN-²⁹Si (DMSO-d₆): δ 1.8 (Si(CH₃)₂), 1.1 (SiCH₃)).

Análisis elemental: C₁₉₂H₂₆₀N₂₄Na₁₆O₅₆S₁₆Si₁₃; calculado %: C, 45.70; H, 5.19; N, 6.66; S, 10.17; encontrado %: C, 44.99; H, 4.87; N, 5.82; S, 9.84.

G₁[(CH₂)₄(C₂HN₃)(CH₂)₂OSO₃Na]₄ (40)

En un schlenk se disuelven 0.24 g (0.29 mmol) del dendrímero de primera generación terminado en azida **5**, en 30 ml de THF y sobre esta disolución se añaden 0.20 g (1.16 mmol) 3-butin-1-sulfato sódico disuelto en 25 ml de agua. Sobre esta mezcla se añaden 0.03 g (0.14 mmol) de ascorbato sódico disuelto en 2 ml de agua destilada y 0.02 g (0.06 mmol) de CuSO₄·5H₂O disuelto en 1 ml de agua destilada. La reacción se agita durante 3 días a 60 °C, tras los cuales la reacción se enfría, se añade 1ml de hidróxido amónico al 23%, se elimina el THF a vacío y se purifica mediante nanofiltración con una membrana de acetato de celulosa (peso molecular nominal límite de 500 g/mol) utilizando H₂O destilada (3 x 40 ml). Se obtiene un sólido de color blanco (0.36 g, 82%) que se identifica con el derivado **40**.

RMN-¹H (DMSO-d₆): δ 7.85 (4H, s, NCHCN), 4.26 (8H, s, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3.91 (8H, s, CCH₂CH₂OSO₃⁻), 2.85 (8H, s, CCH₂CH₂OSO₃⁻), 1.77 (8H, s, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.25 (16H, s, SiCH₂CH₂), 0.50 (24H, s SiCH₂), -0.10 (24H, s, Si(CH₃)₂).

RMN-¹³C{¹H} (DMSO-d₆): δ 143.1 (NCHCN), 121.8 (NCHCN), 64.3 (CCH₂CH₂OSO₃⁻), 48.3 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 33.1 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 25.5 (CCH₂CH₂OSO₃⁻) 19.9-13.8 (SiCH₂CH₂ y SiCH₂), -3.8 (Si(CH₃)₂).

RMN-²⁹Si (DMSO-d₆): δ 1.7 (Si(CH₃)₂).

Análisis elemental: C₅₂H₁₀₁N₁₂Na₄O₁₆S₄Si₅; calculado %: C, 41.33; H, 6.74; N, 11.12; S, 8.49; encontrado %: C, 41.37; H, 6.59; N, 10.91; S, 9.01.

G₂[(CH₂)₄(C₂HN₃)(CH₂)₂OSO₃Na]₈ (41)

En un schlenk se disuelven 0.27 g (0.14 mmol) del dendrímero de segunda generación terminado en azida **6**, en 15 ml de THF y sobre esta disolución se añaden 0.19 g (1.12 mmol) 3-butin-1-sulfato sódico disuelto en 10 ml de agua. Sobre esta mezcla se añaden 0.03 g (0.13 mmol) de ascorbato sódico disuelto en 2 ml de agua destilada y 0.01 g (0.06 mmol) de CuSO₄·5H₂O disuelto en 1 ml de agua destilada. La reacción se agita durante 3 días a 60 °C, tras los cuales la reacción se enfría, se añade hidróxido amónico, se elimina el THF a vacío y se purifica mediante nanofiltración con una membrana de acetato de celulosa (peso molecular nominal límite de 1000 g/mol) utilizando H₂O destilada (3 x 40 ml). Se obtiene un sólido de color blanco (0.31 g, 67%) que se identifica con el producto final **41**.

RMN-¹H (DMSO-d₆): δ 7.86 (8H, s, NCHCN), 4.27 (16H, s, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3.91 (16H, t, CCH₂CH₂OSO₃⁻), 2.85 (16H, t, CCH₂CH₂OSO₃⁻), 1.77 (16H, s, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.26 (40H, s, SiCH₂CH₂), 0.49 (64H, s, SiCH₂), -0.10 (60H, s, Si(CH₃)₂ y Si(CH₃)).

RMN-¹³C{¹H} (DMSO-d₆): δ 142.9 (NCHCN), 121.8 (NCHCN), 64.2 (CCH₂CH₂OSO₃⁻), 48.3 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 33.1 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 25.5 (CCH₂CH₂OSO₃⁻), 19.9-13.8 (SiCH₂CH₂ y SiCH₂), -3.8 (Si(CH₃)₂), -4.2 (SiCH₃).

RMN-²⁹Si (DMSO-d₆): δ 1.8 (Si(CH₃)₂), 1.1 (SiCH₃).

Análisis elemental: C₁₂₀H₂₃₆N₂₄Na₈O₃₂S₈Si₁₃; calculado %: C, 43.24; H, 7.14; N, 10.09; S, 7.70; encontrado %: C, 43.45; H, 7.10; N, 9.00; S, 7.38.

G₃[(CH₂)₄(C₂HN₃)(CH₂)₂OSO₃Na]₁₆ (42)

En un schlenk se disuelven 0.24 g (0.06 mmol) del dendrímero de tercera generación terminado en azida **7**, en 20 ml de THF y sobre esta disolución se añaden 0.16 g (0.91 mmol) 3-butin-1-sulfato sódico disuelto en 10 ml de agua. Sobre esta mezcla se añaden 0.02 g (0.11 mmol) de ascorbato sódico disuelto en 2 ml de agua destilada y 0.01 g (0.05 mmol) de CuSO₄·5H₂O disuelto en 1 ml de agua destilada. La reacción se agita durante 3 días a 60 °C, tras los cuales la reacción se enfría, se añade hidróxido amónico al 23%, se elimina el THF a vacío y se purifica mediante nanofiltración con una membrana de acetato de celulosa (peso molecular nominal límite de 1000 g/mol) utilizando de H₂O destilada (3 x 40 ml). Se obtiene un sólido de

color blanco (0.28 g, 71%) que se identifica con el producto **42**.

RMN-¹H (DMSO-d₆): δ 7.82 (16H, s, NCHCN), 4.23 (32H, s, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3.93 (32H, t, CCH₂CH₂OSO₃⁻), 2.84 (32H, s, t, CCH₂CH₂OSO₃⁻), 1.73 (32H, s, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.22 (88H, s, SiCH₂CH₂), 0.46 (144H, s, SiCH₂), -0.10 (132H, s, Si(CH₃)₂).

RMN-¹³C{¹H} (DMSO-d₆): δ 143.0 (NCHCN), 121.9 (NCHCN), 64.3 (CCH₂CH₂OSO₃⁻), 48.3 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 33.1 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 25.4 (CCH₂CH₂OSO₃⁻), 20.0-13.8 (SiCH₂CH₂ y SiCH₂), -3.9 (Si(CH₃)₂), -4.3 (SiCH₃).

RMN-²⁹Si (DMSO-d₆): δ 1.8 (Si(CH₃)₂), 1.1 (SiCH₃).

Análisis elemental: C₂₅₆H₅₀₈N₄₈Na₁₆O₆₄S₁₆Si₂₉; calculado %: C, 44.06; H, 7.34; N, 9.63; S, 7.35; encontrado %: C, 44.94; H, 7.16; N, 9.12; S, 6.92.

6.5 BIBLIOGRAFIA

- ¹ A. W. Van der Made, P. Van Leeuwen, J. C. de Wilde, R. A. C. Brandes, *Adv. Mater.* **1993**, 5, 466.
- ² I. Cuadrado, M. Morán, J. Losada, C. M. Casado, C. Pascual, B. Alonso, F. Lobete, *Advances in dendritic macromolecules*, Ed. G. R. Newkome, JAI press INC: Greenwich CT, **1996**, 3, pag 151.
- ³ H. Yu, Y. Nie, C. Dohmen, Y. Li and E. Wagner, *Biomacromolecules* **2011**, 12, 2039.
- ⁴ E. Cavero, M. Zablocka, A.-M. Caminade and J. P. Majoral, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 14, 2759.
- ⁵ A. Sousa-Hervés, E. Fernández-Megía and R. Riguera, *Chem. Commun.* **2008**, 27, 3136.

Conclusiones

El trabajo descrito en esta memoria permite establecer las siguientes conclusiones:

1. Se ha sintetizado una familia de dendrímeros carbosilano terminados en átomos de bromo, **2-4**, como precursores de dendrímeros con grupos azida en la periferia, **5-7**. Estos últimos dendrímeros han servido de plataforma sintética para anclar grupos funcionales de naturaleza química muy diversa mediante una cicloadición de Huisgen entre azidas y alquinos catalizada por cobre, que se engloba en la denominada metodología “click chemistry”.

2. La modificación de las estructuras dendríticas con grupos azida terminales para originar sistemas de naturaleza iónica dio lugar a dos tipos de condiciones de reacción en función de la naturaleza del reactivo a incluir:

i) La utilización de moléculas neutras conteniendo un grupo alquino, requiere condiciones de reacción suaves, como paso previo a la consiguiente transformación en la especie iónica.

ii) La utilización de moléculas iónicas conteniendo un grupo alquino da lugar a condiciones más severas, alejándose de las condiciones ideales de la “click chemistry”, pero sin requerir posteriores modificaciones sintéticas.

3. Se ha diseñado un procedimiento sintético para la preparación de dendrímeros carbosilano conteniendo grupos amino terciarios en la periferia mediante una cicloadición de Huisgen entre azidas y alquinos catalizada por cobre. De esta forma, se consiguen preparar dendrímeros de primera a tercera generación conteniendo uno, (**9-11**) o dos (**14-16**) grupos amino por rama dendrítica.

4. La obtención de estructuras catiónicas en la periferia, fue llevada a cabo mediante cuaternización de los derivados precursores amino mediante reacción con MeI, obteniéndose altos rendimientos (dendrímeros **18-20** y **22-24**). La reacción de cuaternización no altera la integridad del anillo triazólico formado mediante “click chemistry”.

5. Se han sintetizado dos familias de dendrímeros catiónicos conteniendo grupos amonio. La primera de ellas posee una sola carga positiva por rama dendrítica (**18-20**) de manera que la solubilidad en agua disminuye al aumentar la generación. En este sentido, la tercera generación solamente se consigue solubilizar añadiendo pequeñas cantidades de DMSO a la disolución acuosa.

La síntesis de la familia de dendrímeros con dos cargas por rama dendrítica (**22-24**) consigue solventar los problemas de solubilidad de los derivados **18-20**. La densidad de carga positiva en esta familia de dendrímeros es capaz de compensar la apolaridad impuesta por el esqueleto carbosilano en las tres generaciones sintetizadas.

6. Los dendrímeros catiónicos **18-20**, **22** y **23** han sido utilizados como vectores no virales en terapia génica en células tumorales. Para este fin, se han usado como agentes transfectantes de ADN plasmídico, pudiéndose concluir que:

- i) Son capaces de formar nanoconjugados estables con el material nucleico mediante interacción electrostática.
- ii) Las cargas positivas son capaces de condensar el ADNp hasta un tamaño inferior al necesario para ser introducidos en el interior celular por endocitosis mediada por receptor.

La capacidad de compactación del material nucleico aumenta al disminuir la generación y para una misma generación al aumentar la relación de cargas dendrímero/ADN.

Además, los dendrímeros **18** y **22** son capaces de compactar más eficazmente el material nucleico que dendrímeros PAMAM comerciales de cuarta generación. Este fenómeno se repite si se comparan los dendrímeros carbosilano descritos en esta memoria con dendrímeros PPI comerciales, siendo los dendrímeros carbosilano **22** y **23** más eficaces en este último ejemplo.

iii) Las medidas de viabilidad celular que se realizaron en las líneas celulares HepG2 y HeLa revelaron un perfil de biocompatibilidad positivo en las proporciones ensayadas, estableciéndose el límite de toxicidad en 20 μ M.

iv) Los dendrímeros **18-20**, **22** y **23** son capaces de transfectar ADNp al interior celular, siendo especialmente destacado el grado de transfección observado para el dendrímero **19** en el caso de la línea celular HepG2. En este caso, el grado de transfección del derivado **19** es sensiblemente superior al mostrado por el PAMAM de cuarta generación.

7. Los dendrímeros catiónicos **18-20**, **22** y **23** han sido usados como vectores no virales en terapia con ácidos nucleicos contra el VIH. Para ello, se han utilizado como agentes transfectantes de ARNpi al citoplasma celular, pudiéndose concluir que:

i) Los dendrímeros de **19** y **23** de segunda generación fueron capaces de formar nanoconjugados con el ARNp en proporción 8:1 a tiempos cortos 3 h, mientras que en tiempos más largos, 24h, el nanocojugado se forma a proporción 4:1.

ii) Las medidas de viabilidad celular se realizaron en las líneas celulares SupT1 y Jurkat y en cultivos primarios CMSP. Los dendrímeros utilizados **18-19**, **22** y **23** son biocompatibles a una concentración 10 μ M o inferior en dichas líneas celulares o cultivos primarios.

iii) Los ensayos de inhibición del VIH utilizando nanoconjugados muestran un grado de inhibición cercano al 90%. Sorprendentemente, los dendrímeros utilizados, **19** y **23**, por sí solos son también capaces de inhibir la replicación del virus, sin la necesidad de un ARNpi, en un porcentaje entre el 70-90%. Este resultado abre una línea de investigación a desarrollar, dado que existen muy pocos casos de sistemas antivirales de naturaleza catiónica.

8. Los dendrímeros catiónicos **18-20** y **23** han sido investigados como agentes antibacterianos.

i) De los ensayos realizados se desprende que presentan una actividad antibacteriana baja frente a bacterias Gram-, siendo dicha actividad moderada en el caso de bacterias Gram+. En estas últimas, la acción bacteriostática y bactericida aumenta al disminuir la generación.

ii) El estudio de vehiculización de la penicilina V con el dendrímero **19** en bacterias Gram- *E. Coli*, han revelado que existe un efecto sinérgico entre ambos aumentando por cuatro la eficacia del antibiótico.

9. Se ha diseñado un procedimiento sintético versátil para la preparación de dendrímeros carbosilano conteniendo grupos aniónicos en la periferia mediante la cicloadición de Huisgen entre azidas y alquinos catalizada por cobre.

i) La síntesis de los derivados carboxilato **28-30** fue llevada a cabo mediante formación de los correspondientes dendrímeros éster neutros (**25-27**), el consiguiente tratamiento con hidróxido de sodio de estas estructuras origina sistemas solubles en agua con excelentes rendimientos.

ii) La preparación de dendrímeros aniónicos basados en fósforo **34-36** fue conducida mediante la preparación de los intermedio fosfonatos neutros **31-33** y el tratamiento posterior con hidróxido de sodio en rendimientos moderados.

iii) La síntesis de dendrímeros basados en azufre se llevó a cabo de forma directa utilizando sistemas propargilo aniónicos utilizando condiciones de reacción más severas como consecuencia del diferente grado de solubilidad mostrado por los reactantes en el medio de reacción.

En el caso de dendrímeros terminados en grupos naftalensulfonato, estas condiciones de reacción más energéticas condujeron a la preparación de dendrímeros de primera y segunda generación **38** y **39**, observándose procesos de descomposición para el caso de tercera generación. Para los dendrímeros sulfato, en las mismas condiciones, sí fue posible la preparación de las tres generaciones **40-42**.

10. Los dendrímeros aniónicos **28-30**, **34-36**, **38-39** y **40-42** se utilizaron como potenciales agentes antivirales en ensayos biomédicos frente al VIH.

i) los ensayos de viabilidad celular en CMSP mostraron que todos los dendrímeros aniónicos no son tóxicos a concentraciones de hasta 20 μM , salvo el derivado carboxilato de segunda generación **29** y los dendrímeros conteniendo azufre **39** y **42** que mostraron una biocompatibilidad ligeramente inferior.

ii) los ensayos de inhibición tanto en pre-tratamiento como en post-tratamiento se llevaron a cabo con los dendrímeros de mayor generación de cada familia **30**, **36**, **39** y **42**.

Para el caso de pre-tratamiento, el dendrímero terminado en grupos carboxilato **30** presenta una actividad antiviral buena y el dendrímero terminado en grupos fosfonato **36** no presenta capacidad antiviral apreciable, mientras que los dendrímeros conteniendo azufre **39** y **42** actúan como potentes agentes antivirales, disminuyendo los niveles de carga virales hasta valores no detectables incluso a la concentración de 1 μM .

En el caso de post-tratamiento el dendrímero **30** presenta una actividad antiviral moderada, mientras que el derivado **36** no posee capacidad antiviral, una vez la célula ya está infectada, mientras que los dendrímeros **39** y **42** son capaces de disminuir el porcentaje de infección del virus hasta niveles no detectables a partir de 10 y 5 μM respectivamente.

iii) A partir de los ensayos de inhibición del virus VIH con las distintas familias de dendrímeros aniónicos utilizadas, el orden de actividad antiviral para dendrímeros de segunda generación en base a la naturaleza de los grupos aniónicos periféricos que contienen, es el siguiente: fosfonato < carboxilato < sulfato \approx naftilsulfonato.

iv) los dendrímeros aniónicos conteniendo grupos naftilsulfonato o sulfato de segunda y tercera generación, respectivamente, se postulan como candidatos idóneos para su uso como agentes microbicidas frente al VIH.

Summary

1. INTRODUCTION

Dendrimers are hyperbranched macromolecules prepared in a step wise synthesis, which lead to well defined and monodisperse structures. The relevance in modern chemistry of these structures is due to the versatility of the synthetic process that permits to obtain dendrimers with very different properties.

This diversity has provoked that dendrimers are currently being used in numerous chemistry fields that includes catalysis, chemical sensing, diagnostic agents, gene and drug delivery, etc.

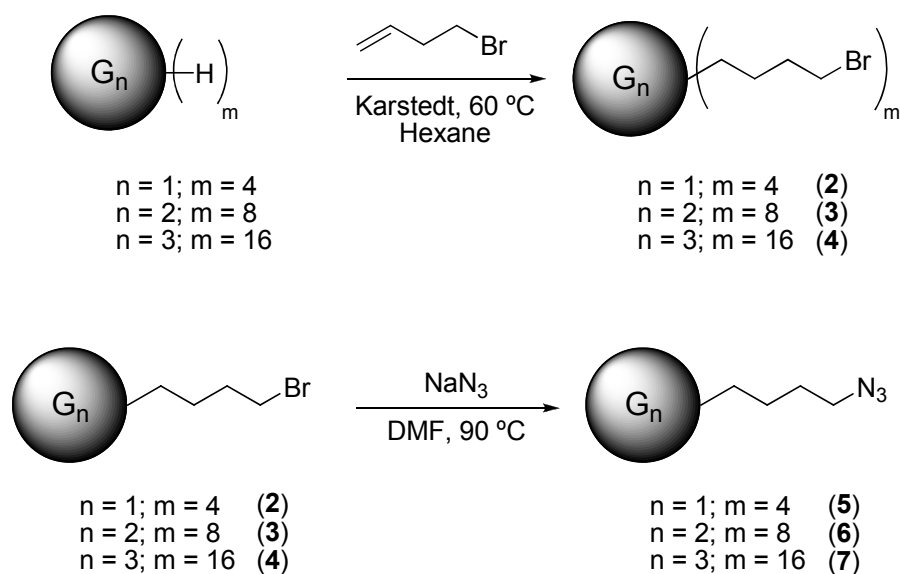
In 2001 Sharpless *et al.* published a new synthetic approach that depends on the use of a group of reactions distinguished by their reliability. The most interesting of these reactions is probably the Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition of alkynes and azides to yield 1,2,3-triazoles catalyzed by Cu(I) species. This reaction distinguishes itself by a high tolerance to reaction conditions and functional groups, high yields, total regioselectivity and no purification steps. These characteristics make this reaction ideal for the building of dendrimers.

The purpose of this work is the synthesis and structural characterization of carbosilane dendrimers that contain cationic or anionic peripheral groups to be evaluated in biomedical applications. Cationic dendrimers will be tested as DNA/RNA carriers in which the mode of action of these compounds is based on electrostatic interaction between dendrimers and nucleic acids. In this way, dendrimers are capable of protecting nucleic acids from nucleases and other hazards inside living organisms.

On the other hand, dendrimers can be used as therapeutic agents *per se*. Cationic dendrimers are often used as antibacterial agents due to the capacity of these structures to displace Ca^{2+} and Mg^{2+} cations, disrupting bacterial membranes. Anionic structures are known to exhibit potent antiviral activity and their mechanism of action is based on the inhibition of the fusion process. The procedure followed by the dendrimer consists on the anchor to a virus region positively charged, named V3 loop, blocking the interaction between HIV virions and membrane receptors. The major advantage of dendrimers over other polyanionic systems is their uniform structure.

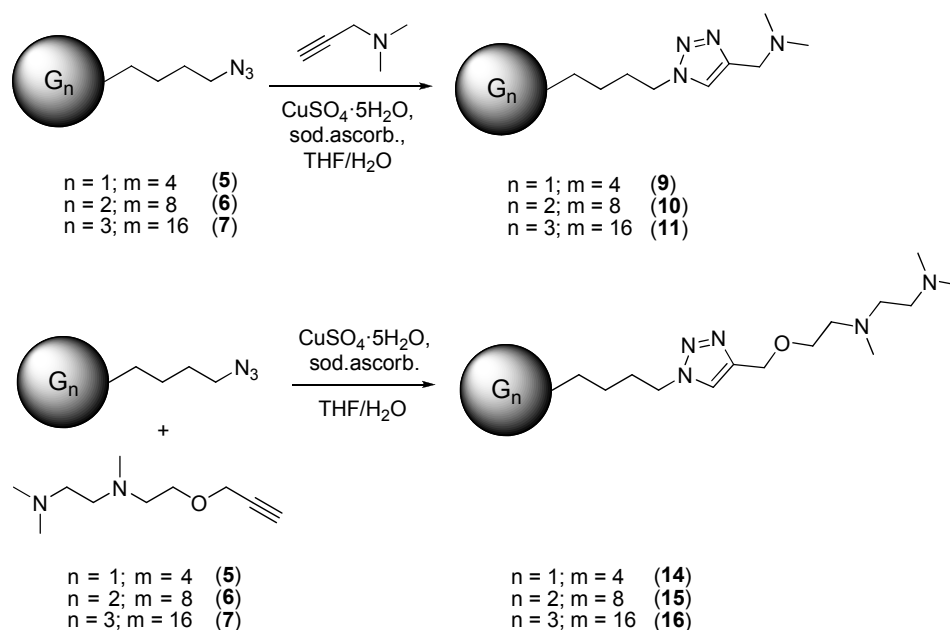
2. RESULTS AND DISCUSSION

The first objective of this work is the preparation of azide terminated dendritic structures, which can easily be transformed in a great variety of terminal groups of different nature. Therefore, the synthesis begins with a hydrosilylation of a dendritic structure with Si-H terminal groups, followed by a SN2 type reaction that substitutes a bromide atom by an azide group.



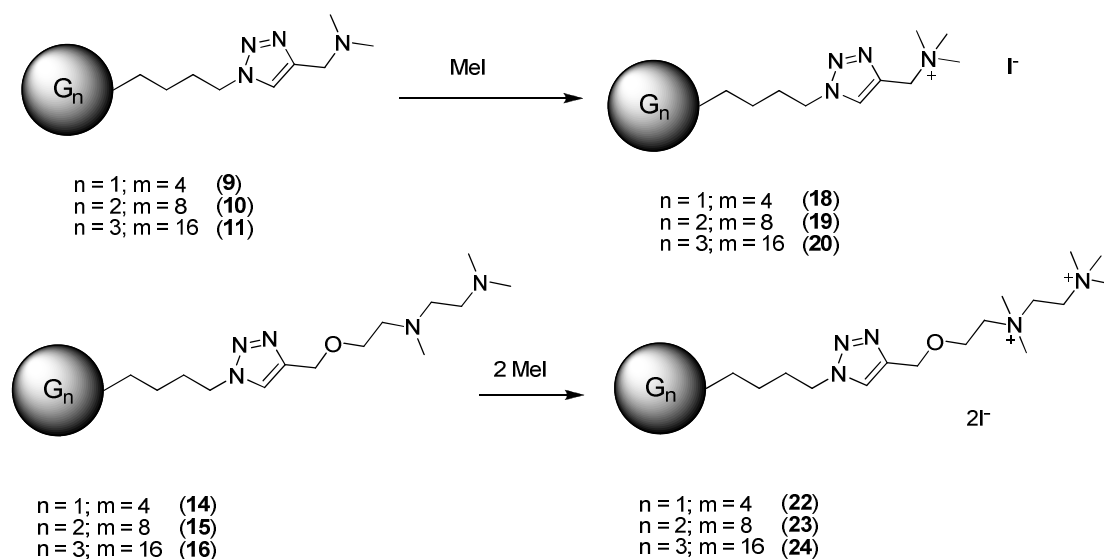
Scheme1. Synthesis of bromide- and azide-terminated dendrimers.

Then, the azide terminated compounds are functionalized with two different amines using the Huisgen cycloaddition catalyzed by Cu(I) species as shown in Scheme 2. The reactions are carried out cleanly in good yields overall, with 5% of $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ and 10% sodium ascorbate per branch, with the amine in the required stoichiometric quantity with respect to the azide capped dendrimers. The only exception was the third generation dendrimer **16**. The latter result is attributed to the ease in which this compound aggregates itself, lowering the general yield of the reaction.



Scheme 2. Synthesis of amine-terminated dendrimers.

The reaction of quaternization of the peripheral groups in the amine-terminated carbosilane dendrimers is carried out with Mel and leads to the formation of water-soluble cationic dendrimers (see Scheme 3). Dendrimer **20** needs the addition of small amounts of DMSO to be solubilized in water.

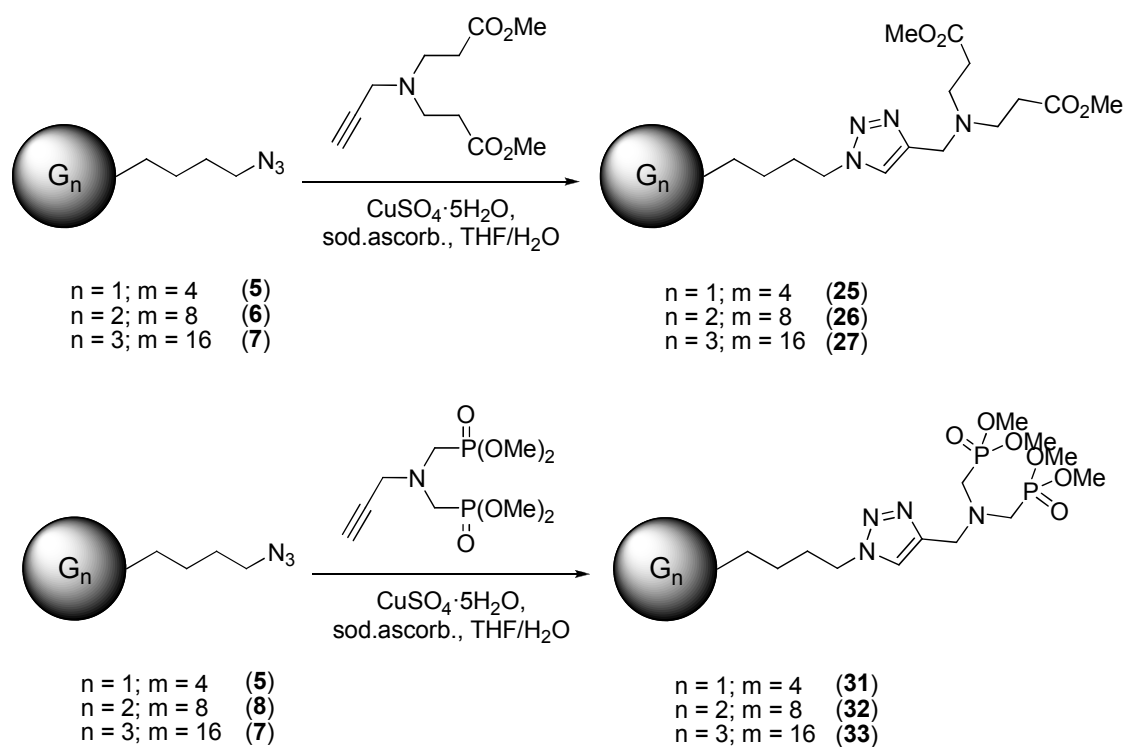


Scheme 3. Synthesis of ammonium-terminated dendrimers.

Following the synthetic procedure developed for the preparation of the cationic dendrimers, phosphonate and carboxylate capped dendrimers can also be synthesized.

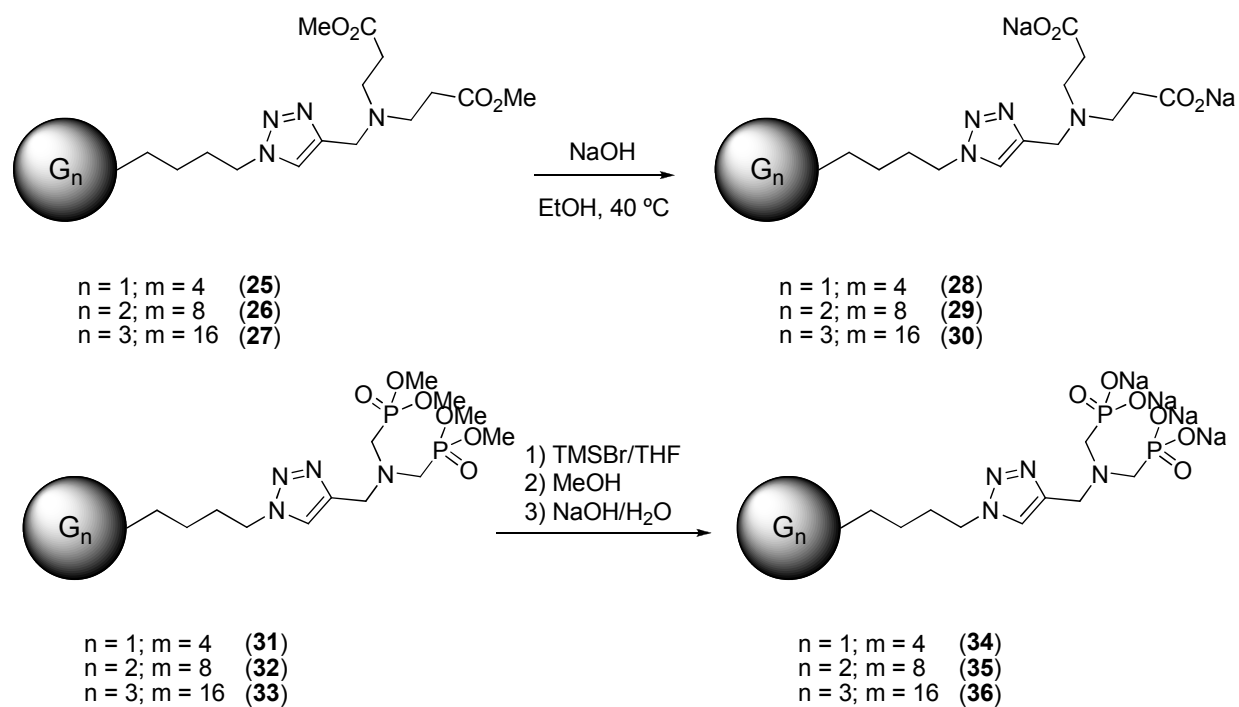
Therefore, the Huisgen cycloaddition is carried out with the azide terminated dendrimers and small organic alkynes.

Ester-terminated dendrimers were prepared as intermediate systems for the synthesis of carboxylate dendrimers, while for anionic phosphonate dendrimers, neutral phosphonates systems were first prepared.



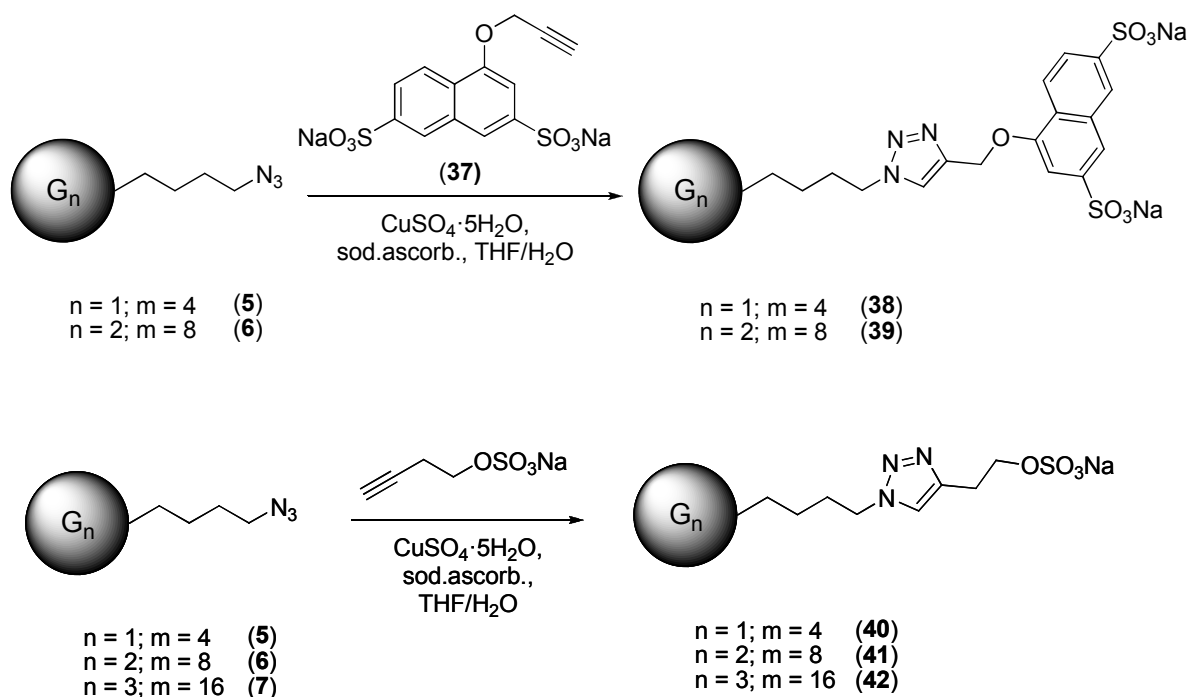
Scheme 4. Synthesis of neutral ester- and phosphonate-terminated dendrimers.

Then, these precursor dendrimers are transformed in their anionic counterparts through the procedure described in Scheme 5:



Scheme 5. Synthesis of anionic carboxylate- and phosphonate-terminated dendrimers.

Regarding to the dendrimers functionalized with sulfate and naphthalenesulfonated, these are prepared in a more direct fashion, carrying the reaction out with anionic alkynes. These synthetic procedures resulted to be more difficult due to the differences of polarity between azide terminated dendrimers and the anionic alkynes. For this reason a more drastic reaction conditions needed to be developed. An increase in the amount of $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ and sodium ascorbate along an excess in the alkyne allows to achieve the desired compounds.



Scheme 5. Synthesis of anionic sulphate- and naphthalenesulfonated-terminated dendrimers.

3.-BIOMEDICAL ASSAYS WITH IONIC CARBOSILANE DENDRIMERS

As already mentioned, cationic dendrimers can be used as carriers for anionic molecules, such as nucleic acids, inside cells. In this way, cationic carbosilane dendrimers can form dendriplexes with nucleic material through electrostatic interaction. Cationic dendrimers prepared in this work are capable of retaining plasmidic DNA (pDNA) in a 5:1 charge proportion shown by electrophoresis in agarose gel. The formation of the dendriplexes has also been studied by ζ potential at different dendrimer/DNA ratios by which the increase of the proportion of dendrimer leads to an increase of ζ potential values, indicating dendriplex formation. Carbosilane dendrimers are able to condense pDNA more efficiently than commercial dendrimers such as PAMAM or PPI. The dendriplex size was also measured by DLS, noticing that radii values are smaller to the DNA alone, suggesting the formation of nanoconjugates between dendrimer and pDNA. It must be also noticed that these size values are inferior to other dendriplexes formed with commercial dendrimers such as PAMAM or PPI, suggesting that these structures are more efficient compacting nucleic material.

The toxicity of the dendriplexes was also determined in HeLa and HepG2 cancerous cell lines establishing that these nanoparticles are non toxic even at ratios as high as 20:1 (dendrimer DNA).

Transfection studies were carried out measuring the expression of luciferase of a pDNA that contained this gen, by fluorescence, also in HeLa and HepG2 cell lines. These assays showed moderate efficiency in pDNA transfection. It must be highlighted that transfection, carried out with dendrimer **19** in HepG2 cell line, was specially high, doubling the expression of the gen transfected with fourth generation PAMAM dendrimer.

These carbosilane cationic dendrimers have also been tested in transfection of small interfering RNA (siRNA) against HIV. In order to know if these compounds are capable of protecting RNA against nucleases and other hazards, electrophoresis in agarose gel assay was carried out again with second generation dendrimers **19** and **23**. At 3 hours dendrimer **19** is capable of forming dendriplexes at 4:1 and 8:1 ratios, however dendrimer **23** is only able of forming a nanoconjugate with the siRNA at 8:1 ratio. At 24 hours the dendriplexes were formed with both dendrimers at 4:1 and 8:1 ratios.

The toxicity of the dendrimers was measured in Jurkat y SupT1 cell lines determining that until 10 μ M mitochondrial activity is situated always above 80%. Biocompatibility was also obtained for peripheral blood monoclonal cells (PBMC) establishing the toxicity also in 10 μ M.

Inhibition studies carried out with **19** and **23** dendrimers showed that these systems can cause an inhibitory effect when they are complexed to siNEF. However surprisingly, dendrimers themselves or complexed to random siRNA sequences are capable of inhibiting HIV formation inside infected PMBC at a similar level that dendrimer/siNEF dendriplexes. The results show that cationic carbosilane dendrimers **19** and **23** can act as therapeutic agents by themselves.

In addition, cationic carbosilane dendrimers **18-20** and **23** were tested as antibacterial agents against *E. coli* and *S. aureus*. It was found that smaller dendrimers

were more efficient stopping the growing of bacteria (IMC) and killing bacteria (BMC). As the dendrimer generation grows the antibacterial effect decreases. Antibacterial properties may increase on increasing the positive charge on dendrimer surface. In this way dendrimer **23** with double of charges per branch than **19** and both with the similar size, resulted to be more active against bacteria. It must be said that all these dendrimers were more effective against Gram+ bacteria *S. aureus* due to its single walled membrane which is more easily disrupted.

Last, synergy experiments with dendrimer **19** and penicillin in Gram- bacteria were carried out. In these assays it was shown that in presence of dendrimer **19**, IMC and BMC of penicillin V are four times lower than penicillin itself, opening the possibility of using dendrimers and antibiotics together as a combined therapy, reducing the possibility of developing resistances to antibiotics in bacteria.

Biomedical assays with anionic dendrimers were also conducted. Cytotoxicity assays were carried out with **28-30**, **34-36**, **38-39** and **40-42** in PBMC. These experiments showed varied results for each dendrimer family. Carboxylate dendrimers **28** and **30** do not exhibit toxicity until 20 μM , while surprisingly second generation dendrimer **29** showed to be toxic from a concentration of 2 μM . Phosphonate capped dendrimers **34-36** do not exhibit toxicity at 20 μM . Naphtalenesulfonate ended dendrimer **38** do not exhibit toxicity at 20 μM , however the increase of functional peripheral groups in **39** reduces the cell viability, placing toxicity near 10 μM . For sulfate dendrimers **40-42**, toxicity also increases with generation, therefore first generation dendrimer is not toxic until 20 μM while toxicity for second and third generation dendrimers, is situated in 10 μM and 2 μM respectively.

Once toxicity levels were known inhibition assays were carried out. The assays consisted in treating PBMC with the dendrimers and then infecting them with HIV (pre-treatment) or infecting the PBMC with HIV and then treating the cells with the dendrimer (post-treatment).

Maximum inhibition in pre-treatment studies for **30** was established at 60% with a concentration of 10 μM , showing that this value also reduces the inhibition degree. On the other hand, it was observed that phosphonate capped dendrimer **36**, is not able

to reduce inhibition below 15% with a concentration of 10 μM in pre-treatment. For post-treatment assays, dendrimers **30** and **36** have not visible effect reducing the viral infection in PBMC.

In view of these results, a HIV inhibition screening using 1-3 generations was carried out in PBL cell line. Carboxylate dendrimers of first and second generation were observed to be more effective reducing infection to 90% at 10 and 20 μM respectively. On the other hand third generation dendrimer was observed to be much less effective reducing the infection to approximately 60% at 20 μM . All phosphonate dendrimers were not able to reduce infection in this cell line in all concentrations tested.

Pre-treatment assays were also performed with dendrimers **39** and **42**. These studies were also carried out in PBMC showing that with these two dendrimers HIV infection cannot be detected even at 1 μM concentration for both systems.

The experiments were repeated in post-treatment conditions showing that increasing the concentration of these dendrimers, the percentage of infection decreased dramatically. For dendrimer **39**, at 1 μM , inhibition is situated at 80%, at 5 μM inhibition is lowered at 90% and at 10 μM virus cannot be detected. Similar results are observed for dendrimer **42**, at 1 μM , inhibition is situated at 60%, although if concentration of the dendrimer is increased to 5 μM , virus was not detected.

In view of these results dose-response graphics were also obtained for naphthalenesulfonate dendrimers **38** and **39** and for sulfate dendrimers **41** and **42**, confirming the strong HIV inhibition effect observed when concentration or dendrimer generation is increased.

As a conclusion, the different anionic character shown by distinct dendrimers seems to be related to their corresponding antiviral activity. Therefore, the following rank of activity can be inferred:

phosphonate < carboxylate < naphthalenesulfonate \approx sulfate